

UFRRJ
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

Tese

**DETERMINAÇÃO DE TANINO CONDENSADO EM
LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS TROPICAIS COMO
INDUTOR DA FERMENTAÇÃO RUMINAL E DE SUA AÇÃO
ANTI-HELMÍNTICA**

Tatiana Pires Pereira

2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**DETERMINAÇÃO DE TANINO CONDENSADO EM LEGUMINOSAS
FORRAGEIRAS TROPICAIS COMO INDUTOR DA FERMENTAÇÃO RUMINAL E
DE SUA AÇÃO ANTI-HELMÍNTICA**

Tatiana Pires Pereira

Sob a Orientação da Professora
Elisa Cristina Modesto

e Co-orientação
Mario Geraldo de Carvalho

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em
Ciências** no Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia, Área de
Concentração em Nutrição e Produção
Animal

Seropédica, RJ
Julho de 2016

583.3

P436d Pereira, Tatiana Pires, 1982-

T Determinação de tanino condensado em leguminosas forrageiras tropicais como indutor da fermentação ruminal e de sua ação anti-helmíntica / Tatiana Pires Pereira - 2016.

92 f.: il.

Orientador: Elisa Cristina Modesto.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Zootecnia.

Bibliografia: f. 61-74.

1. Leguminosa - Teses. 2. Taninos - Teses. 3. Metabólitos - Teses. 4. Metano - Teses. 5. Plantas forrageiras - Teses. I. Modesto, Elisa Cristina, 1973-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

TATIANA PIRES PEREIRA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Nutrição e Produção Animal

TESE APROVADA EM -----/-----/-----

Elisa Cristina Modesto- UFRRJ
(Orientadora)

João Carlos Carvalho de Almeida- UFRRJ

Delci de Deus Nepomuceno- UFRRJ

James Pierre Muir- Texas A&M University

Evandro Maia Ferreira- UEPG

DEDICATÓRIA

Agradeço a Deus por permitir a realização desse sonho;

Dedico este trabalho aos meus pais: Maria Inês da Silva e Sebastião Eustáquio Pires pelo apoio e confiança;

Ao meu marido Thiago que sempre me incentivou e acreditou fielmente na minha capacidade, me encorajando todos os dias para realização de mais uma etapa no decorrer de minha caminhada, por ser meu apoio incondicional, por ter tanta paciência e me esperar (nós dois sabemos o quanto foi difícil à distância), meu eterno agradecimento;

À meus irmãos Lidiana e Lidson e à meu sobrinho Bernardo;

A todos os familiares.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder o dom da vida, saúde e fé nos caminhos pelos quais trilhei e ainda vou trilhar. Por todas as maravilhas que me da na vida e permitir sempre alcançar grandes metas.

À minha família, base para tudo que sou hoje. Sem vocês, nada seria.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e ao programa de pós-graduação em Zootecnia pelas condições de realização do programa de pós-graduação.

À FAPERJ, pela concessão da bolsa de estudo.

À Embrapa Agrobiologia pelas leguminosas cedidas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche, foi um período de extrema riqueza cultura e intelectual para minha formação.

À minha orientadora Elisa Cristina Modesto por me dar a honra de ser sua orientada, pois além de orientadora sempre foi uma grande amiga, por me escutar nos momentos que precisei e nunca mediu esforços para me ajudar. Ensinando-me tanto coisas profissionais como coisas que serviram para minha vida.

Ao Dr. Mário Geraldo pela coorientação e pela oportunidade, ajuda, dedicação e ensinamentos durante e após a execução do experimento.

Ao Professor Roberto Carlos Costa Lelis, ao doutor Michel Cardoso Vieira e ao técnico de laboratório José Carlos pela ajuda na análise de quantificação de tanino no Instituto de Floresta –UFRRJ.

Ao Delci de Deus Nepomuceno por ser além de companheiro do grupo de pesquisa, grande amigo. Muito obrigada pelo incentivo, ensinamentos e pela ajuda durante e após o experimento.

Ao Professor João Carlos de Carvalho Almeida pela ajuda, dedicação e ensinamentos durante meus estudos na UFRRJ.

Ao meu esposo, Thiago, agradeço pelo apoio, companheirismo, e, sobretudo pelo amor incondicional que me reconforta e me dá forças para superar obstáculos.

Ao prof. José Carlos B. Dubeux Jr. por me aceitar de braços abertos em seu grupo de pesquisa na University of Florida, Marianna-EUA, por me proporcionar conquistas, oportunidades, por me deixar mais forte, sábia, e por tê-lo como exemplo de sabedoria, competência e conhecimentos que sempre me transmitiu no decorrer do meu doutorado sanduíche.

Ao Prof. Dr. James (Jim) Pierre Muir, por me aceitar e disponibilizar toda infra-estrutura para realização das análises necessárias da minha pesquisa em seu laboratório no Texas A&M AgriLife Research – Stephenville, além dos grandes ensinamentos adquiridos.

Ao amigo Osniel pela ajuda e disposição e esforços na condução das análises no Texas para que em tão pouco tempo eu conseguisse fazer todos os trabalhos necessários.

À discente do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia Rafaela Scalise Xavier de Freitas pela ajuda durante execução do experimento.

À discente do Programa de Pós-Graduação de Química Débora Ramos pela amizade, direção no laboratório e pela ajuda na execução das análises.

Aos meus queridos amigos do “Dormi” em Marianna-FL, Erick, Hiran, Camila, Joyce, Marina, Ulisses, Gustavo, Rodrigo, Davi, que sempre me ajudaram em tudo que precisei, fomos uma grande família.

Minha amiga Marina que sempre me apoiou nos momentos difíceis. Saiba que ser amigo não é fácil, requer dedicação, carisma, afeto, respeito, enfim... Unidas desde a graduação.

À amiga Kamila Oliveira, pelo companheirismo, apoio, incentivo e amizade de tantos anos.

A meus pais e irmãos que sempre apoiaram e incentivaram meus estudos.

BIOGRAFIA

Tatiana Pires Pereira, nascida em 24 de março de 1982 na cidade de Viçosa – MG. Em 2005, ingressou no ensino superior no curso de zootecnia na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, com conclusão em 2010. Durante a graduação, estagiou no Departamento de Nutrição e Pastagem sob orientação do Professor João Carlos de Carvalho Almeida e foi bolsista de Iniciação Científica do CNPq. No segundo semestre de 2010 ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFRRJ com bolsa da CAPES e desenvolveu pesquisa na área de produção e nutrição de ruminantes. Em agosto de 2012, iniciou o curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFRRJ com bolsa da FAPERJ e durante os meses de junho de 2015 a fevereiro de 2016 foi bolsista do programa de doutorado sanduíche-CAPES onde estagiou na University of Florida – IFAS North Florida Research and Education Center, sob orientação do Professor José Carlos Batista Dubeux Junior. Durante esse período teve a oportunidade de fazer parte de suas análises no laboratório no Texas A&M AgriLife Research – Stephenville sob orientação do Prof. Dr. James (Jim) Pierre Muir.

*“O futuro não é o lugar para onde estamos indo, mas o lugar que estamos criando.
O caminho para ele não é encontrado, mas construído, e o ato de fazê-lo muda tanto a
realidade quanto o destino!”*

(John Shaor)

RESUMO GERAL

PEREIRA, Tatiana Pires. **Determinação de tanino condensado em leguminosas forrageiras tropicais como indutor da fermentação ruminal e de sua ação anti-helmíntica.** 2016. 92p. Tese (Doutorado em Zootecnia). Instituto de Zootecnia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Este trabalho foi dividido em quatro capítulos. O primeiro realizou-se com o objetivo de quantificar o teor de tanino condensado (TC) através da Reação de Stiasny e conhecer as classes de metabólitos secundários presentes pela técnica de prospecção fitoquímica e ressonância magnética nas leguminosas forrageiras tropicais *Cajanus cajan* (guandu-GUA), *Gliricidia sepium* (gliricidia-GLI), *Flemingia macrophylla* (flemingia-FLE), *Cratylia argentea* (cratília-CRA), *Mimosa caesalpiniaefolia* (sabiá) sendo que essa leguminosa tinha a fração casca e folha (SABc e SABf) entre os tratamentos. Os extratos obtidos foram divididos em: extrato total, número de Stiasny (NS), TC e não taninos. A FLE, CRA, GUA, GLI, SABf e SABc apresentaram os valores para o extrato total 13,20; 13,06; 8,28; 14,73; 15,67 e 6,22%, respectivamente. A reatividade pelo NS, na mesma ordem das leguminosas, foi de 11,25; 4,54; 7,37; 6,70; 23,06 e 71,62%, já o TC apresentou os seguintes valores 1,52; 0,59; 0,61; 0,96; 3,6 e 4,43% e o não tanino foi de 11,68; 12,46; 7,67; 13,75; 12,07 e 1,76%, respectivamente. Foram identificadas as seguintes classes de compostos secundários em maiores evidências: os sacarídeos, carboidratos, aminoácidos não protéicos e os glicosídeos cardioativos. Já para o TC, a intensidade foi baixa para grande parte das leguminosas, prevalecendo maior teor para CRA, GUA e SABf. Foi constatado como componente principal nos extratos o metil-inositol (açúcar). O segundo capítulo teve como objetivo avaliar nas leguminosas citadas acima e mais uma espécie, o *Stylosanthes spp* (estilosantes-EST), analisar os constituintes do TC com uso de solvente orgânico, tanino solúvel (TCE), tanino aderido à proteína (TCPB), tanino aderido à fibra (TCFB) e taninos condensados totais (TCT), características estruturais tais como: propelargonidina (PP); prodelfinidina (PD) e procianidina (PC); peso molecular (grau de polimerização–(DP); distância do peso molecular distribuído do polímero (PDI); peso médio da massa molecular (Mw); número médio da massa molecular (Mn); além de determinar a atividade biológica, através da técnica de proteínas precipitáveis por fenóis (PPP). As variáveis TCE, TCPB e TCT apresentadas foram influenciadas pelas diferentes espécies ($P \leq 0,05$). A fração TCFB não foi constatada nas leguminosas. Os pesos moleculares (Mw) foram influenciados pelas diferentes espécies ($P \leq 0,05$), variando de 737 a 1168 Da. As características estruturais (PP, PD, PC e PD:PC) tiveram variação entre as espécies estudadas. Objetivou-se com o terceiro capítulo avaliar a metanogênese (metano total (CH₄.total), incubado (CH₄ inc.) e fermentado (CH₄ ferm.) e os parâmetros de fermentação ruminal (produção de gás total (PGT), pH, amônia (N-NH₃), ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica (DIVMO) frente aos TC presentes nas leguminosas e feno de *Urochloa brizantha* cv. marandu como controle (CTL). Foi testado também o efeito do polietileno glicol (PEG) sobre a fração folha do sabiá, que teve conteúdo de TC de 15,97%. Não foi observada alteração no pH ($P \geq 0,05$) para os tratamentos avaliados. No entanto, foram observadas diminuição da produção total de gás e produção de metano para todos os tratamentos com presença de TC ($P \leq 0,05$). Para o tratamento com PEG houve aumento de 27,01 (8% PEG) e 35,01 (16% PEG) na produção total de gás e 3,59 (8% PEG) e 4,15 (16% PEG) na produção de metano. GUA, FLE, SABc e SABf foram capazes de modificar ($P \leq 0,05$) a concentração de N-NH₃ (mg/dL) juntamente com o CTL, que também apresentou valores inferiores comparado as leguminosas com traços e ausência do TC (ETL, CRA e GLI). Houve diferença ($P \leq 0,05$) para DIVMO

entre as leguminosas e o controle, observou-se menor digestibilidade ($P \leq 0,05$) para FLE, GUA e SABf, em relação ao CTL, não sendo digestível o SABc. A DIVMO foi afetada pela adição de PEG na dieta do SABf. No perfil dos AGCC houve diferença ($P \leq 0,05$) para os tratamentos avaliados, com menor valor para as leguminosas com presença de TC. O quarto capítulo teve como objetivo testar o efeito da técnica de inibição da migração larval (IML) *in vitro* do TC proveniente das leguminosas em estudo (FLE, CRA, GUA, GLI, EST, SABf e SABc) sobre as larvas infectantes L3 do nematóde o *Haemonchus contortus* (HC) comparando com Ivermectina e controle negativo (líquido ruminal e tampão). Entre as leguminosas estudadas o SABf e GUA não diferiram entre si ($P \geq 0,05$), com as maiores porcentagens IML (34,75% e 34,33%). As leguminosas GUA, FLE e SABc não diferiram entre si ($P \geq 0,05$), apresentando moderados valores de IML (30,25%, 30,0% e 29,75%, respectivamente). Entre as leguminosas estudadas a menor porcentagem de IML foi para CRA (18,46%), GLI (23,75%) e controle negativo (líquido de rúmen e tampão) valores próximos do controle positivo com Ivermectina (22,0%).

Palavras-chave: Características estruturais. Metabólito secundário. Metano entérico.

GENERAL ABSTRACT

PEREIRA, Tatiana Pires. **Determination of condensed tannins in tropical forage legumes as an inducer of ruminal fermentation and its anthelmintic action.** 2016. 92p. Thesis (PhD in Animal Science). Instituto de Zootecnia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2016.

This work was divided in four chapters, in which the first was performed with the goal of quantifying the condensed tannin (CT) content by the Stiasny's reaction and to determine the classes of secondary metabolites present by the phytochemical prospection technique and magnetic resonance in the tropical forage legumes *Cajanus cajan* (guandu - GUA), *Gliricidia sepium* (gliricidia - GLI), *Flemingia macrophylla* (flemingia - FLE), *Cratylia argentea* (cratilia - CRA), *Mimosa caesalpiniaeifolia* (sabiá) (this legume divided into bark and leaf fraction – SABc and SABf) among the treatments. The extracts obtained were divided into: total extract, number of Stiasny (NS), CT and non-tannins. The FLE, CRA, GUA, GLI, SABf and SABc had obtained the following values for total extract: 13.20; 13.06; 8.28; 14.73; 15.67 and 6.22%, respectively. The reactivity by NS, in the same order of legumes, was 11.25; 4.54; 7.37; 6.70; 23.06 and 71.62%, whereas the CT presented the following values: 1.52; 0.59; 0.61; 0.96; 3.6 and 4.43%, and non-tannin was 11.68; 12.46; 7.67; 13.75; 12.07 and 1.76%, respectively. The following classes of secondary metabolites were identified with greater evidence: saccharides, carbohydrates, non-protein amino acids and glicosídeos cardioativos. For the CT, the intensity was low for most of the legumes, with greater content in CRA, GUA and SABf. The main compound in the extracts was methyl-inositol (sugar). The second chapter had the objective of assaying in the legumes mentioned above and one more specie, *Stylosanthes spp.* (estilosantes-EST), condensed tannin (CT) constituents, with the use of organic solvents, soluble CT (ECT), CT adhered to protein (PBCT), CT adhered to fiber (FBCT), and total CT (TCT), CT structural pro-pelargonidin (PP); prodelfinidin (PD) and procyanidin (PC), molecular weight (polymerization degree (DP), molecular distance distributed of the polymer (PDI); average weight of molecular mass (Mw), and average number of molecular mass (Mn), and the biological activity through precipitated proteins by phenols (PPP). The variables ECT, PBCT, and TCT presented were influenced by different species ($P \leq 0.05$). The FBCT fraction was not found in the legumes. Molecular weights (DP, PDI, Mw e Mn) were affected by the different species ($P \leq 0.05$), ranging from 737 to 1168 da. The structural characteristics (PP, PD, PC and PD:PC) varied among the species. In the third chapter I evaluated methanogenesis (total methane (CH_4 total)), incubated (CH_4 inc) and fermented (CH_4 ferm) and ruminal fermentation parameters total gas production (PGT), pH, ammonium (N-NH_3), short-chain fatty acids (SCFA) and *in vitro* organic matter disappearance (IVOMD) as they related to CT present in the legumes and *Urochloa brizantha* cv. marandu hay as control (CTL). The effect of polyethylene glycol (PEG) on the leaf fraction of sabiá was tested as well, which had a CT content of 15.97%. No alteration in the pH ($P \geq 0.05$) for the treatments evaluated. However, a decrease of total gas and methane production for all the treatments with presence of CT ($P \leq 0.05$). When PEG was added, there was a 27.01 (8% PEG) and 35.01 (16% PEG) increase in total gas production and 3.59 (8% PEG) and 4.15 (16% PEG) of methane production. GUA, FLE, SABc and SABf were capable of modifying ($P \leq 0.05$) the content of $\text{NH}_3\text{-N}$ (mg/dL), along with the CTL, which also presented lower values compared to legumes with no or only traces of CT (ETL, CRA and GLI). There was significant difference ($P \leq 0.05$) for IVOMD between the legumes and control, it was observed lower disappearance ($P \leq 0.05$) for FLE, GUA and SABf in relation to CTL, while SABc did disappear. The SABf IVOMD was affected by the addition of PEG. There was lower digestibility for FLE, GUA and SABf in relation to the CTL, while the bark

fraction of SAB did not disappear at all. On the SCFA profile, there was difference ($P \leq 0.05$) among the treatments evaluated, with lower values for the legumes with presence of CT. In the fourth chapter I tested the effect of CT from the legumes in study (FLE, CRA, GUA, GLI, EST, SABf and SABc) on larval migration inhibition (LMI) *in vitro*, on the infective larvae L3 of the nematode *Haemonchus contortus* (HC), compared with Ivermectin and a negative control (rumen fluid and buffer). Among the legumes studied, SABf and GUA did not differ ($P \geq 0.05$), with the greater ($P \leq 0.05$) LMI percentage (34.75% and 34.33%) than the other entries. The legumes GUA, FLE and SABc did not differ ($P \geq 0.05$), presenting moderate values of LMI (30.25%, 30.0% and 29.75%, respectively). Among the legumes studied, the lowest LMI percentage was CRA (18.46%), GLI (23.75%) and negative control (rumen fluid and buffer), with values near ($P \geq 0.05$) from to Ivermectin (22.0%).

Key words: Enteric methane. Secondary metabolite. Structural characteristics.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| INTRODUÇÃO GERAL..... | 1 |
| CAPÍTULO I..... | 3 |
| PRODUÇÃO E QUALIFICAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DAS LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS TROPICAIS..... | 3 |
| RESUMO..... | 4 |
| ABSTRACT..... | 5 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 6 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 8 |
| 2.1 Produção e Avaliação do Extrato Aquoso das Leguminosas Forrageiras Tropicais..... | 8 |
| 2.1.1 Origem e colheita das leguminosas..... | 8 |
| 2.1.2 Extração dos taninos..... | 8 |
| 2.1.3 Determinação dos teores de extrativos..... | 8 |
| 2.1.4 Caracterização química dos polifenóis condensados (Taninos)..... | 8 |
| 2.1.5 Determinação dos teores de taninos e não-taninos..... | 9 |
| 2.1.6 Extração da parte aérea das leguminosas forrageiras tropicais em autoclave..... | 9 |
| 2.1.7 Testes de prospecção fitoquímica..... | 10 |
| 2.1.8 Ressonância magnética nuclear de ¹³ C..... | 11 |
| 2.2 Análises Estatísticas..... | 11 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 12 |
| 3.1 Caracterização Química dos Extratos Aquoso das Leguminosas Forrageiras Tropicais..... | 12 |
| 3.2 Prospecção dos Extratos Aquoso das Leguminosas Forrageiras Tropicais..... | 14 |
| 4 CONCLUSÕES..... | 15 |
| CAPÍTULO II..... | 17 |
| PRODUÇÃO E QUALIFICAÇÃO DO EXTRATO COM USO DE SOLVENTE ORGÂNICO EM LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS TROPICAIS..... | 17 |
| RESUMO..... | 18 |
| ABSTRACT..... | 19 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 20 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 22 |
| 2.1 Produção e Avaliação do Extrato Orgânico das Leguminosas Forrageiras Tropicais..... | 22 |
| 2.1.1 Origem e colheita das leguminosas..... | 22 |
| 2.1.2 Purificação do tanino condensado (TC)..... | 22 |
| 2.1.3 Quantificação dos TC pelo método ácido butanol (butanol-HCl)..... | 24 |
| 2.1.4 Precipitação de proteína..... | 24 |
| 2.1.5 Peso molecular dos TC..... | 25 |
| 2.1.6 Caracterização dos TC..... | 25 |
| 2.2 Análises Estatísticas..... | 26 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 27 |
| 3.1 Caracterização dos Taninos Condensados em Leguminosas Forrageiras Tropicais com Uso de Solvente Orgânico..... | 27 |
| 4 CONCLUSÕES..... | 32 |
| CAPÍTULO III..... | 33 |
| EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE TANINO CONDENSADO EM LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS TROPICAIS NA PRODUÇÃO DO METANO RUMINAL IN VITRO..... | 33 |
| RESUMO..... | 34 |
| ABSTRACT..... | 35 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 36 |

| | |
|--|----|
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 37 |
| 2.1 Origem e Colheita das Leguminosas Experimentais | 37 |
| 2.2 Determinação da Composição Química da Forragem | 37 |
| 2.3 Quantificação de Tanino Condensado | 37 |
| 2.4 Peso Molecular do Tanino Condensado | 37 |
| 2.5 Fermentação em Técnica <i>In Vitro</i> | 38 |
| 2.5.1 Substrato | 38 |
| 2.5.2 Inóculo | 38 |
| 2.5.3 Determinação da produção de gás total, metano | 39 |
| 2.5.4 Determinação de pH, nitrogênio amoniacal (N-NH ₃) e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) | 40 |
| 2.6 Análises Estatísticas | 41 |
| 3 RESULTADO E DISCUSSÃO | 42 |
| 4 CONCLUSÕES | 48 |
| CAPÍTULO IV | 49 |
| EFEITO DO TANINO CONDENSADO EM LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS TROPICAIS SOBRE LARVAS DE <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> | 49 |
| RESUMO | 50 |
| ABSTRACT | 51 |
| 1 INTRODUÇÃO | 52 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 53 |
| 2.1 Origem e Colheita das Leguminosas Experimentais | 53 |
| 2.2 Quantificação dos TC pelo Método Ácido Butanol (butanol-HCl) | 53 |
| 2.3 Precipitação de Proteína | 53 |
| 2.3.1 Extrato bruto de planta | 53 |
| 2.3.2 Proteínas precipitadas por fenóis (PPP) | 54 |
| 2.4 Peso Molecular dos TC | 54 |
| 2.5 Inibição da Migração Larval <i>In Vitro</i> | 55 |
| 2.5.1 Forragem | 55 |
| 2.5.2 Larvas | 55 |
| 2.5.3 Fermentação e extração TC | 55 |
| 2.6 Inibição da Migração Larval (IML) | 55 |
| 2.7 Análises Estatísticas | 56 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 57 |
| 4 CONCLUSÕES | 60 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 61 |
| ANEXO A | 75 |

INTRODUÇÃO GERAL

A pecuária tem passado por um processo contínuo de transformação, sobretudo nos países em desenvolvimento como o Brasil, impulsionada pela grande demanda de carne e leite e ao constante crescimento populacional. Com isto surge o crescente desafio de aumentar a produtividade sem, contudo prejudicar o ambiente.

Questões sobre a emissão de “gases do efeito estufa” têm sido constantemente discutidas e investigadas no âmbito científico. Ademais, existe um consenso internacional da influência humana sobre o aquecimento global e da urgente necessidade da redução destes gases na atmosfera, sobretudo quanto às emissões no Brasil (CERRI et al., 2010).

Embora o dióxido de carbono receba mais atenção como gás responsável pelo aquecimento global, existem outros gases a serem considerados, dentre eles o metano (MOSS et al., 2000). O metano é o mais importante gás dentro do grupo dos “gases do efeito estufa” e aproximadamente 70% da emissão de metano está relacionada à atividade humana (MAKKAR e VERCOE, 2007).

Os ruminantes domésticos são responsáveis por 21 a 25% do total das emissões de metano na escala global, oriundos da fermentação entérica e também das operações agropecuárias (LASCANO e CÁRDENAS, 2010). No entanto, a emissão advinda do trato gastrointestinal dos ruminantes é aproximadamente 10 vezes maior que a emissão oriunda do manejo (MAKKAR e VERCOE, 2007).

Um mecanismo encontrado, até o momento para indução do padrão fermentativo no rúmen é através do emprego de aditivos, que possuem características medicamentosas, selecionando microrganismos e dificultando o crescimento ou eliminando algumas espécies. Em função disto, algumas linhas de pesquisa sugerem que o emprego de tais aditivos podem ser prejudiciais para a saúde humana, pois deixariam resíduos na carne e leite além de promover à resistência de microrganismos patogênicos a saúde (GRAMINHA et al., 2007).

Os compostos secundários de plantas constituem-se aditivos naturais e não medicamentosos, que em função da dose utilizada, podem promover desde o aumento de proteína metabolizável da dieta até o controle de alguns microrganismos patogênicos do trato intestinal (RAMÍREZ-RESTREPO e BARRY, 2005; PORDOMINGO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008).

Os Taninos Condensados (TC) são polímeros de flavonóides encontrados em muitas espécies de plantas consumidas por ruminantes (MUIR, 2011). Tais polímeros são resultados dos mecanismos desenvolvidos ao longo da escala do processo evolutivo das plantas, como forma de defesa contra herbivoria (MUIR, 2011). Estes compostos tem apresentado capazes de exercer atividades antimicrobiana, antioxidante e anti-helmíntica em ruminantes, afetando positivamente o bem-estar animal e a qualidade dos produtos oriundos por este (LUCIANO et al., 2011).

Os efeitos dos TC sobre o processo de digestão ruminal resultam, principalmente, do seu conteúdo e estrutura na forragem inserida pelo ruminante. Conteúdos em torno de 3 a 4% da matéria seca, segundo Barry e McNabb (1999), ao avaliarem leguminosas, podem aumentar a absorção intestinal de aminoácidos, enquanto o fornecimento de doses acima (6 a 12% na MS) pode causar depressão do consumo e redução na eficiência do processo digestivo (FRUTOS et al., 2002). Segundo Mbugua et al. (2005), a produção de proteína microbiana *in vitro*, aumentou quando o TC estava presente em pequena concentração, quando comparada aos tratamentos com ausência ou alta concentração de taninos.

A presença de teores moderados de TC no rúmen está relacionada à proteção da proteína da dieta contra a degradação pelos microrganismos ruminais, dificultando a adesão pelos microrganismos na parede celular (GUIMARÃES-BEELEN et al., 2006) reduzindo a população de bactérias celulolíticas e contribuindo para a redução da metanogênese

(LASCANO e CÁRDENAS, 2010), aumentando assim, o fluxo de proteína para absorção no intestino (MIN et al., 2003; MUETZEL e BECKER, 2006).

O TC pode atuar como uma alternativa de manejo de controle de endoparasitos gastrintestinais de ruminantes. Estudos *in vivo* de avaliação de atividade anti-helmíntica, os extratos de plantas contendo TC promoveram diminuição do número de ovos por grama de fezes (OPG), que geralmente está associada com redução, uma vez que não ocorre absorção deste composto no trato gastrintestinal dos pequenos ruminantes, ocorrendo sua eliminação nas fezes e assim atuando também na descontaminação do pasto (MUPEYO et al., 2011).

Devido ao exposto, objetivou-se neste trabalho quantificar e qualificar a presença de TC em extrato aquoso e extraídos com diferentes solventes orgânicos nas leguminosas forrageiras tropicais *Cajanus cajan* (guandu), *Gliricidia sepium* (gliricídia), *Stylosanthes spp* (estilosantes), *Flemingia macrophylla* (flemingia), *Cratylia argentea* (cratilia), *Mimosa caesalpiniaefolia* (sabiá), e, avaliar o efeito da atividade biológica dos TC encontrados sobre a fermentação ruminal *in vitro* como estratégia nutricional visando à redução da produção de metano entérico e de sua ação anti-helmíntica em ruminantes.

CAPÍTULO I

PRODUÇÃO E QUALIFICAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS TROPICAIS

RESUMO

Alguns metabólitos secundários presentes em várias plantas têm propriedades bioativas com potencial para ser utilizado como aditivos naturais na alimentação de ruminantes de forma a melhorar o aproveitamento da dieta mantendo os padrões de qualidade e sustentabilidade na nutrição animal. Assim, objetivou-se neste trabalho utilizar a técnica de extração com água como solvente e quantificar pela técnica da reação de Stiasny o teor de tanino condensado totais (TCT) além de identificar pela técnica de prospecção fitoquímica e ressonância magnética nuclear de carbono 13 nas leguminosas forrageiras tropicais *Cajanus cajan* (guandu), *Gliricidia sepium* (gliricídia), *Flemingia macrophylla* (flemingia), *Cratylia argentea* (cratilia), *Mimosa caesalpineafolia* (sabiá) extraídas juntamente com o tanino Condensado (TC) e que agregam as impurezas do extrato. O material foi colhido área experimental “Terraço”, pertencente a Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ e seco em galpão a temperatura ambiente (± 25 °C). Após secagem o material foi moído em moinho de martelo em partículas de 2 mm e encaminhada ao Laboratório de Tecnologia da Madeira, do Departamento de Produtos Florestais do Instituto de Florestas da UFRRJ, para extração de taninos. Os extratos de cada espécie forrageira foram submetidos a um delineamento inteiramente casualizados com quatro repetições cada. Os extratos obtidos foram divididos em: extrato total, número de Stiasny (NS), TC e não taninos, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P= 0,05$). Na prospecção fitoquímica foi observado às seguintes classes de metabolitos: aminoácidos não protéicos, alcalóides, carboidratos, catequinas, flavonóides, glicosídeo cardioativo, naftoquinas, sacarídeos, saponina e TC, utilizando aproximadamente 1 mg da amostra de acordo com a reação. Os espectros de RMN ^{13}C (Ressonância magnética nuclear de ^{13}C) foram obtidos através da dissolução de 100 mg da amostra em dimetilsulfóxido-deuterado (DMSO- d_6) filtrado e colocado em um tubo de vidro especial de 5 mm. Os espectros foram obtidos em um espectrômetro da Bruker a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C da Central Analítica do Departamento de Química, do Instituto de Ciências Exatas da UFRRJ (ICE-UFRRJ). A flemingia e cratilia obtiveram valores próximo para extrato total (13,20% vs 13,06%), já a reatividade diante do formaldeído (Número de Stiasny-NS) variou (11,25% vs 4,54%), já o TC (1,52% vs 0,59%) e não tanino (11,68% vs 12,46%). O guandu e gliricídia extrato total (8,28%vs 14,73), NS foram próximos (7,37%vs 6,70%), tanino (0,61%vs 0,96%) e não tanino (7,67% vs 13,75%). O sabiá fração folha e fração casca apresentaram extrato total (15,67% vs 6,22%), NS (23,06% vs 71,62%), TC (3,6% vs 4,43%) e não tanino (12,07% vs 1,76%). Foram identificadas as seguintes classes de compostos secundários em maiores evidências os sacarídeos, carboidratos e aminoácidos não protéicos e os glicosídeos cardioativos. Já para o TC a intensidade foi baixa para grande parte das leguminosas, prevalecendo maior teor para cratilia, guandu e fração folha do sabiá. Foi constatado ausência de flavonóides, catequinas, alcalóides e naftoquinas para as leguminosas estudadas. O extrato aquoso nomeado como “Extrato tânico” é uma mistura de substâncias, tendo como principal componente o metil-inositol. Este fato implica em resultados contraditórios ao esperado quando se utiliza extrato de plantas contendo TC. O que sugere a adoção de novos métodos para extração, visando o aumento do conteúdo de TC para promoção dos efeitos desejados.

Palavras-chave: Aditivos fitogênicos. Extrato aquoso. Metabólitos secundários.

ABSTRACT

Secondary metabolites present in several plants have bioactive properties with potential to be used as natural additives in ruminant feeding in order to improve the use of diet, keeping the standard of quality and sustainability in animal nutrition. Thus, it was aimed in this work use the extraction technique, with water as solvent, to quantify by the technique of Stiasny's reaction the content of total condensed tannin (TCT), beyond to identify by the phytochemical prospection technique and magnetic resonance on the tropical legume forages *Cajanus cajan* (guandu), *Gliricidia sepium* (gliricidia), *Flemingia macrophylla* (flemingia), *Cratylia argentea* (cratilia), *Mimosa caesalpiniaefolia* (sabiá), and leaf fraction with the TCT extraction, that aggregates the dross of the extract. The material was picked at the experimental area "Terraço", belonged to Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ, and dried in a hangar at room temperature (± 25 °C). After drying, the material was ground in hammer mill at 2 mm particles and forwarded to the Wood Technology Laboratory, at the Forest Products Department, from Forests Institute of UFRRJ, for extraction of tannins. The extracts from each forage specie were submitted to a completely randomized design with four repetitions each. The extracts obtained were split in: total extract, number of Stiasny (NS), tannins and non-tannins, being the means compared by Tukey test ($P=0.05$). The phytochemical prospection was performed for observation of non-protein amino acids, alkaloids, carbohydrates, catechins, flavonoids, glicosídeo cardioativo, naphthoquinones, saccharides, saponnins and tannins, using about 1 mg of sample according to the reaction. The RMN ^{13}C spectrums (nuclear magnetic resonance of ^{13}C) were obtained through dissolution of 100 mg of sample in filtered dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d6), and placed in a special glass tube of 5 mm. The spectrums were obtained in a Bruker spectrophotometer at 500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C in the Analytical Center of the Chemistry Department, belonged to the Institute of Exact Sciences UFRRJ (ICE-UFRRJ). *Flemingia* sp. and *Cratylia* sp. have obtained values near to the total extract (13.20% vs 13.06%). Reactivity to Stiasny (NS) reaction already varied (11.25% vs 4.54%) while the tannin (1.52% vs 0.59%) and non-tannin (11.68% vs 12.46%). The guandu and gliricidia total extract (8.28% vs 14.73), NS were next (7.37% vs 6.70%), tannin (0.61% vs 0.96%) and non-tannin (7.67% vs 13.75%). The sabiá fraction leaf and bark fraction showed total extract (15.67% vs 6.22%), NS (23.06% vs 71.62%), CT (3.6% vs 4.43%) and non tannin (12.07% vs 1.76%). The following classes were identified with greater evidence: saccharides, carbohydrates, non-protein amino acids and cardiac glycosides. For the tannin, the intensity was low for the biggest part of legumes, prevailing greater content for cratilia, guandu and leaf fraction from sabiá. It was found no presence of flavonoids, catechins, alkaloids and naphthoquinones for the legumes studied. The aqueous extract named as "tannic extract" is a mixture of substances, the main component methyl-inositol. This fact implies contradictory results than expected when using plant extract containing CT. What it suggests the adoption of new methods for extraction, in order to increase the CT content to promote the desired effects.

Key words: Phytogetic additives. Secondary metabolites. Watery extract.

1 INTRODUÇÃO

Extratos fenólicos, tais como taninos, têm sido amplamente estudados em vários setores da agroindústria, tais como indústria do couro, setor moveleiro, alimentício como antioxidantes naturais, uso na medicina humana (antitumorais, anticarcinogênicos e antiinflamatórios). Na pecuária seu maior enfoque atualmente tem sido como aditivo promissor no que concerne à redução das emissões de gases produzidos durante o processo digestivo de animais ruminantes, com consequente aumento do desempenho dos mesmos (HIXSON et al., 2015).

Os efeitos dos compostos orgânicos das plantas são normalmente atribuídos aos metabólitos secundários: alcalóides, terpenos ou polifenóis, tais como proantocianidinas, também conhecidos como taninos condensados (TC). Taninos são os compostos polifenólicos mais encontrados nas plantas, apresentando diversos pesos moleculares e complexidade variável (SINGH et al., 2003). A quantidade sintetizada pode variar de acordo com a planta, temperatura, luminosidade, efeito hídrico e tipo de solo (OTERO & HIDALGO, 2004) e afetar assim suas propriedades. Estão divididos em dois grupos: taninos condensados e hidrolisáveis, sendo diferenciados por sua estrutura química e na capacidade da mesma ser ou não hidrolisada.

Eles são encontrados em material vegetal de clima subtropical e temperado estando envolvidos na adequação da planta ao seu meio, para defesa contra herbivoria e outras defesas inter-espécies, mas entre leguminosas forrageiras apenas algumas espécies acumulam taninos a níveis significativos (WOLFE et al., 2008). O TC infere adstringência no animal, logo reduz o consumo de forragem, mas, em baixas concentrações, pode aumentar a fração não degradável da proteína no rúmen (PDR) (WOODWARD et al., 2001, MAKKAR, 2003 e MORAIS et al., 2006), influenciando na diminuição da produção de metano em ruminantes.

Embora os TC sejam muitas vezes considerados “fatores antinutricionais e antiqualitativos”, alguns estudos têm mostrado que este composto em algumas leguminosas forrageiras, tais como *Lotus corniculatus* em concentrações moderadas (3-4% em base da MS) têm efeitos benéficos sobre os ruminantes (BARRY & McNABB 1999). Isto ocorre devido ao aumento da capacidade de tanino para ligar proteína através de ligações de hidrogênio, formando um complexo tanino-proteína que é estável no rúmen (pH 5,0 a 7,0) e resistente à degradação microbiana (MIN et al., 2003). Consequentemente, o complexo tanino-proteína atinge o abomaso, onde é dissociado por diferenças no pH (NOZELLA, 2001). Entretanto, estes efeitos dependem da concentração, estrutura química e outros fatores como diferentes espécies de ruminantes, estado fisiológico do animal e a composição da dieta (MAKKAR, 2003).

Para aumentar o desempenho em ruminantes e reduzir a poluição ambiental é importante conhecer os principais compostos destas leguminosas forrageiras com suas devidas concentrações. Devido aos benefícios e limitações dos TC na alimentação animal, os esforços dos pesquisadores da área de nutrição animal estão em estudar a caracterização, a concentração e a oferta de plantas forrageiras a animais sem promover efeitos adversos. Neste contexto, o conhecimento mais aprofundado das características apresentadas por estes compostos presentes nessas forragens, bem como a avaliação de sua influência sobre a microbiota ruminal, poderão auxiliar no desenvolvimento de estratégias de alimentação que utilizem leguminosas forrageiras tropicais, ou emprego de seus extratos processados, visto que, estas leguminosas já fazem parte da dieta desses animais.

O extrato tânico de *Acácia mearnsii* está disponível no mercado brasileiro para uso na alimentação animal com o propósito de induzir a fermentação ruminal de forma a melhorar o aproveitamento da dieta, no entanto, as informações disponíveis nas embalagens dos produtos quanto à quantificação de TC presente no extrato não são suficiente para determinar

proporções ideais na alimentação, logo as informações quanto suas características estruturais e teor de pureza são fundamentais para podermos qualificar tal produto ofertado aos animais.

Devido o exposto objetivou-se neste estudo avaliar através da técnica de extração com o solvente água e quantificação pela técnica da reação de Stiasny o teor de TC totais além de identificar outros metabólitos secundários pela técnica de prospecção fitoquímica e ressonância magnética da parte aérea das leguminosas forrageiras tropicais *Cajanus cajan* (guandu), *Gliricidia sepium* (gliricídia), *Flemingia macrophylla* (flemingia), *Cratylia argentea* (cratilia), *Mimosa caesalpineafolia* (sabiá), além da fração casca do sabiá.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Produção e Avaliação do Extrato Aquoso das Leguminosas Forrageiras Tropicais

2.1.1 Origem e colheita das leguminosas

As leguminosas *Cajanus cajan* (Guandu), *Gliricidia sepium* (Gliricídia), *Flemingia macrophylla* (Flemingia), *Cratylia argentea* (Cratilia), *Mimosa caesalpineafolia* (Sabiá) foram colheitadas da área experimental “Terraço”, pertencente a Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ, situada na latitude 22 a 45’S, longitude 43 a 41’W Grw. e altitude de 33 metros. As partes aéreas das leguminosas forrageiras foram colhidas entre outubro e novembro de 2013, sendo secas em galpão ventilado com temperatura média de 28 °C, no período de uma semana. Após secagem o material foi encaminhado ao Laboratório de Tecnologia da Madeira, do Departamento de Produtos Florestais, do Instituto de Florestas da UFRRJ, sendo fragmentado em moinho de martelo e armazenado em sacos identificados de acordo com cada espécie trabalhada. Esse material foi utilizado nas extrações para obtenção dos taninos.

2.1.2 Extração dos taninos

O tanino das leguminosas forrageiras cratilia, guandu, gliricídia, flemingia e sabiá foram extraídos em meio aquoso. O material foi extraído em balão de fundo chato sob refluxo por 2 horas utilizando-se uma relação licor/folha e/ou casca igual a 15:1 (1 kg de amostra para 15 litros de água destilada). Após a extração, o material foi filtrado a vácuo utilizando-se cadinho de vidro sinterizado. O filtrado foi separado para posterior análise. Para cada leguminosa (tratamento) foram realizadas quatro repetições.

2.1.3 Determinação dos teores de extrativos

Após cada extração/leguminosa, foi separada uma alíquota de 20 mL para determinação da massa de extrativos totais. Esta foi colocada em uma placa de petri, previamente tarada, e posto para secagem em estufa a $103^{\circ} \pm 2$ °C, até peso constante. Da diferença entre a massa da placa de petri antes e depois da secagem em estufa, obteve-se a quantidade de extrativos (g) em 20 mL de solução e considerando-se a quantidade de partículas, na base seca, e o volume inicial empregados na extração, calculou-se o teor de extrativos em percentagem.

2.1.4 Caracterização química dos polifenóis condensados (taninos)

O cálculo do teor de polifenóis condensados foi realizado pelo método do número de Stiasny (NS) que baseou-se na metodologia de WISSING (1955) e LELIS (1995). Após cada extração/leguminosa, foi separada uma alíquota de 50 ml que foi colocada em um balão de 500 mL. À alíquota foram adicionados 5 mL de ácido clorídrico e 10 mL de formaldeído à 37%. Este material foi então colocado para ferver em refluxo por 30 minutos, sendo em seguida filtrado e lavado com água destilada quente em cadinho filtrante de peso previamente conhecido. O resíduo (tanino) foi colocado em estufa a $103 \pm 3^{\circ}\text{C}$ até obtenção de peso

constante. O percentual de tanino condensado contido nos extratos (Número de Stiasny - NS) foi determinado pela razão entre a massa de tanino e a massa dos extrativos totais extrapolada para 50 mL e o resultado convertido em porcentagem, segundo a Equação 1:

Equação 1

$$NS = \frac{\text{Massa de tanino}}{\text{Massa de extrativos totais}} \times 100$$

Em que:

NS = Número de Stiasny (%).

2.1.5 Determinação dos teores de taninos e não-taninos

Para a obtenção do percentual de tanino nas leguminosas estudadas multiplicou-se o número de Stiasny pelo teor de extrativos totais determinado e converteu-se o resultado em porcentagem (**Equação 2**). A diferença entre teor de extrativo e tanino forneceu a porcentagem de não-taninos (**Equação 3**).

Equação 2

$$\% \text{ Tanino} = \frac{NS \times \text{Ext.}}{100}$$

Em que:

Tanino = Tanino no extrato (%); NS = Número de Stiasny (%); Ext. = Extrativos totais (%);

Equação 3

$$\% \text{NT} = \% \text{Ext.} - \% \text{Tan.}$$

Em que:

% NT = Não-taninos (%); Ext. = Extrativos totais (%); Tan = Teor de taninos (%).

2.1.6 Extração dos taninos condensados (TC) da parte aérea das leguminosas forrageiras tropicais em autoclave

A parte aérea das leguminosas individualmente foi extraída em autoclave, com capacidade volumétrica de 15 litros e tampa dotada de manômetro e termômetro, no Laboratório de Tecnologia da Madeira (DPF/IF/UFRRJ), por um período de 2 horas, numa relação licor: folha igual a 15:1, sendo empregada na extração água. Após cada extração, o material foi filtrado em cadinho de vidro sinterizado, colocado em bandejas de vidro e posto em estufa a $103^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 8 horas, para uma secagem prévia do extrato. Posteriormente, o

material foi levado para estufa a 60°C até secagem completa, quando então o material foi moído obtendo-se o extrato na forma de pó (**Figura 1**).



Figura 1. A- Material sendo filtrado em cadinho de vidro sinterizado após passagem pelo autoclave. B- Material em bandejas de vidro e levado a estufa 103° ± 2°C por 8 horas, para uma secagem prévia do extrato. C- Após secagem o tanino é raspado e triturado em pó. Fonte: Arquivo Pessoal

2.1.7 Testes de prospecção fitoquímica

Os extratos das leguminosas obtidos em meio aquoso foram submetidos à prospecção fitoquímica nas dependências dos Laboratórios de Química de Produtos Naturais da UFRRJ, visando à identificação das classes de metabólicos secundários presentes, de acordo com as metodologias citadas por Matos (1988). O método físico de análise orgânica, Ressonância Magnética nuclear de ^{13}C foi utilizado para auxiliar nas conclusões observadas nos testes realizados nos tubos de ensaio (reações químicas) (**Figura 2**).

Os resultados foram qualificados por sistemas de cruzes onde: (+++) = presença grande, (++) = presença notável, (+) = presença leve, (-) = ausência ou resultado inconclusivo

para cada classe de metabólito secundário, avaliada. A interpretação da coloração e/ou precipitado foi realizada por dois avaliadores.

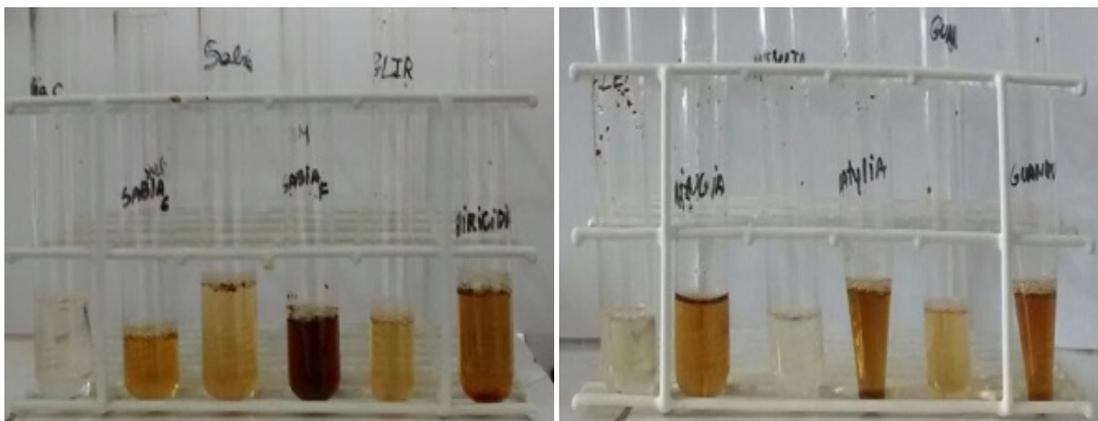


Figura 2. Teste fitoquímico por coloração para análise do metabólito secundário tanino nos extratos aquosos das leguminosas forrageiras cratyliã, flemingia, glirícidia, guandu, sabiá folha e sabiá casca juntamente com o controle. Fonte: Arquivo Pessoal

2.1.8 Ressonância magnética nuclear de ^{13}C

A análise de Ressonância Magnética de Carbono 13 (RMN ^{13}C) foi realizada utilizando cerca de 10 mg das amostras de extratos das leguminosas estudadas dissolvidos em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6) filtrado e colocado em um tubo de vidro especial (15 x 5 mm) e inserido na probe do equipamento para registro dos espectros. O espectros foram obtidos em um espectrômetro da Bruker para 125 MHz para ^{13}C da central analítica do Departamento de Química, ICE-UFRRJ. O espectro foi plotado com escala em ppm (σ) tendo o tetrametilsilano como referência interna.

2.2 Análises Estatísticas

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis tratamentos e quatro repetições. Os resultados dos percentuais de extrativos totais, número de Stiasny, taninos e não taninos foram submetidos à análise de variância onde as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) através do programa estatístico (RStudio).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização Química dos Extratos Aquosos das Leguminosas Forrageiras Tropicais

Tabela 1. Teores de extrativos (%) e teores de (%) polifenóis (NS) oriundos da extração aquosa das leguminosas forrageiras cratilia, flemingia, gliricídia, guandu, sabiá folha e sabiá casca.

| Leguminosas | Variáveis | |
|---------------|---------------------|--------------------|
| | (%) Extrativos | (%) NS |
| Cratilia | 13,06 ^b | 4,54 ^d |
| Flemingia | 13,20 ^b | 11,51 ^c |
| Gliricídia | 14,73 ^{ab} | 6,70 ^{cd} |
| Guandu | 8,28 ^c | 7,37 ^{cd} |
| Sabiá (folha) | 15,67 ^a | 23,06 ^b |
| Sabiá (casca) | 6,22 ^c | 71,62 ^a |
| CV(%) | 6,47 | 11,65 |

Letras iguais, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey em base da matéria seca (MS).

Através da metodologia de extração proposta por WISSING (1955) e LELIS (1995), foi possível determinar a quantidade de extrativos e o Número de Stiasny (NS) de cada leguminosa (Tabela 1). Visando à produção de extratos de plantas para emprego na alimentação animal, uma das características primordiais é o rendimento de extrativos, pois este direciona a planta que pode ser utilizada de forma mais efetiva. As leguminosas estudadas apresentaram diferentes teores de extrativos. O sabiá fração folha e a gliricídia apresentaram maiores teores de extrativos ($P \leq 0,05$), entretanto o teor apresentado pela gliricídia, não diferiu dos obtidos da cratilia e da flemingia ($P \geq 0,05$).

Carneiro et al. (2009) observaram teor de extrativo de 23,26 % para a espécie de Angico vermelho (*Anadenanthera peregrina*), extraídas utilizando a mesma metodologia, sendo este valor superior as espécies analisadas neste estudo. Segundo Gonçalves et al. (2003), a quantidade e qualidade do extrativo depende da temperatura de extração, em temperatura muito alta provoca uma decomposição dos polifenóis e uma temperatura baixa propicia uma queda no rendimento de extrativos. Assim, estes autores, relatam que para aumentar o rendimento em baixas temperaturas o uso de alguns produtos químicos (bisulfito e sulfito) auxiliam a extração de polifenóis de difícil dissolução, além de clarear o extrato e impedir a oxidação durante a extração, assim, a reação para taninos condensados com íons sulfito aumentam o rendimento, entretanto, pode ocasionar alteração do peso molecular (HOONG et al., 2009). Neste caso, contradiz o objetivo do presente trabalho, pela busca de um aditivo natural, fazendo escolha por apenas uso de água como solvente extrator, o que diminuiria também os custos na produção do extrato.

O Número ou Índice de Stiasny juntamente com o teor de extrativos relaciona se diretamente com o teor de taninos. Sendo maior o Número de Stiasny, maior é a quantidade de taninos condensados reativos nos extratos, pois de acordo com Ferreira (2004) o Número de Stiasny (NS) representa a reatividade dos polifenóis (taninos condensados) existentes no extrato frente ao formaldeído em meio ácido (Reação de Stiasny). Desta forma, os extratos da

casca e folha do sabiá foram os que apresentaram os taninos mais reativos frente ao formaldeído.

O resultado obtido nas diferentes leguminosas teve diferença significativa ($P \leq 0,05$), entretanto foram baixos quando comparado ao da literatura (VIEIRA et al., 2014). O NS da fração casca do sabiá foi superior aos citados na literatura, entretanto em alguns trabalhos foram adicionados sais para melhorar a extração do tanino. Vieira et al. (2014), trabalharam com extração aquosa de taninos de casca de pinus e citam teores de (61,6%), e aumento deste teor quando utilizado sulfito e bisulfito, respectivamente.

Tabela 2. Porcentagem de tanino e não tanino oriundo da extração aquosa das leguminosas forrageiras cratylia, flemingia, gliricídia, guandu, sabiá folha e sabiá casca.

| Leguminosas | Variáveis | |
|---------------|-------------------|--------------------|
| | (%) Tanino | (%) não Tanino |
| Cratylia | 0,59 ^e | 12,46 ^a |
| Flemingia | 1,52 ^c | 11,68 ^a |
| Gliricídia | 0,96 ^d | 13,75 ^a |
| Guandu | 0,61 ^e | 7,67 ^b |
| Sabiá (folha) | 3,60 ^b | 12,07 ^a |
| Sabiá (casca) | 4,43 ^a | 1,76 ^c |
| CV(%) | 3,34 | 7,61 |

Letras iguais, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey em base da matéria seca (MS).

Na Tabela 2, estão representados os teores de tanino (%) e não taninos (%) das leguminosas forrageiras extraídos utilizando água quente. A leguminosa que apresentou o maior teor de taninos foi o sabiá ($P \leq 0,05$), tanto na fração casca quanto na fração folha, sendo que a fração casca apresentou maior teor que a fração folha ($P \leq 0,05$), e o menor teor foi obtido pela cratylia.

O TC possui característica de ligar-se a proteínas e outras macromoléculas reduzindo sua disponibilidade para o metabolismo animal, logo fornece ao animal efeito positivo ou negativo, dependendo do conteúdo na qual o TC se apresenta na planta e sua estrutura (OLIVEIRA e BERCHIELLI, 2007). Tendo como efeito positivo melhor aproveitamento da fração protéica da dieta e aumento na eficiência de síntese microbiana no rúmen, indicando, de forma consistente, redução da metanogênese ruminal, já em altas concentrações pode reduzir a digestão ruminal e ocasionar danos à saúde animal.

Apesar da influência dos taninos sobre o valor nutritivo das forrageiras tropicais, há poucos estudos que avaliam a concentração e reatividade dos taninos, principalmente nos extratos aquoso disponíveis no mercado brasileiro que vem sendo utilizado na alimentação de ruminantes, onde informações não são relatadas ao consumidor. O uso destes extratos foi previamente avaliados em ensaios de digestibilidade (GRAINGER et al., 2009) com resultados divergentes não deixando claro os impactos deste extrato sobre a fermentação entérica em ruminantes. Grande parte destes extratos contém outros tipos de metabólitos secundários e de altas concentrações de impurezas que não é informado nos rótulos dos produtos, sendo que uma simples análise de tanino não explica tais informações, o que pode criar dúvidas se tais efeitos benéficos ou deletérios estão relacionados ao tanino ou outras substâncias solúveis em água como açúcares, aminoácidos, pectinas, glicosídeos, saponinas, alcalóides dentre outros. Segundo Yunes et al. (2001), esta atuação de forma diferente pode estar relacionada aos diferentes grupos químicos dos compostos encontrados nos vegetais, o

que confere efeitos sinérgicos ou antagônicos, ainda pela diferenças na composição química e concentração de cada componente, proporcionando ações diversificadas em todo o ambiente ou organismo.

Houve diferença dos teores de não tanino entre as leguminosas estudadas ($P \leq 0,05$). A cratilia, flemingia, gliricídia e sabiá (fração folha) apresentaram maiores teores de não tanino não diferindo entre si ($P \geq 0,05$). A fração casca do sabiá seguido pela leguminosa guandu apresentou os menores teores de não tanino. O teor de não tanino do guandu diferiu do sabiá casca ($P \leq 0,05$), sendo intermediário seu resultado comparado às demais leguminosas que apresentaram valores superiores.

Os compostos não tânicos representam as impurezas do extrato, (substâncias solúveis extraídas com água) que corresponde à fração de açúcares e outros extrativos não fenólicos presentes nos extratos das leguminosas. Deste modo, a extração com água possibilitou a maior solubilização dos extratos exceto para fração casca do sabiá, não favorecendo um aumento dos componentes polifenólicos, devido à solubilização de componentes não tânicos tornando alto o teor de impurezas no extrato aquoso.

3.2 Prospecção dos Extratos Aquosos das Leguminosas Forrageiras Tropicais

A prospecção fitoquímica foi empregada com intuito de detectar outras classes de metabólitos secundários diferentes de taninos na amostra, que por ventura possam influenciar na qualidade do extrato. Conforme apresentado na Tabela 3, os extratos aquosos das leguminosas analisadas mostraram uma baixa predominância dos derivados fenólicos.

Tabela 3. Resultado dos ensaios qualitativos da prospecção fitoquímica dos extratos aquoso das leguminosas forrageiras tropicais: cratilia, flemingia, gliricídia, guandu, sabiá folha e sabiá casca.

| Metabólitos secundários | Leguminosas | | | | | |
|-------------------------|-------------|-----------|------------|--------|-------------|-------------|
| | Cratilia | Flemingia | Gliricídia | Guandu | Sabiá Folha | Sabiá Casca |
| Saponina | + | + | +++ | +++ | +++ | + |
| Tanino | ++ | + | - | ++ | ++ | - |
| Flavonóides | - | - | - | - | - | - |
| Sacarídeos | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Catequina | - | - | - | - | - | - |
| Aminoácido não protéico | +++ | ++ | +++ | ++ | +++ | +++ |
| Glicosídeo Cardioativo | + | + | ++ | ++ | +++ | +++ |
| Alcalóide | - | - | - | - | - | - |
| Carboidratos | ++ | ++ | + | ++ | + | +++ |
| Naftoquinas | - | - | - | - | - | - |

Respectivamente (+++) presença grande, (++) presença notável, (+) presença leve e (-) ausência ou resultado inconclusivo para a classe de substância estudada.

As intensidades das reações para saponinas, sacarídeos, carboidratos e aminoácidos não protéicos evidenciam a presença de elevados teores nas espécies analisadas. A intensidade de TC foi baixa para grande parte das leguminosas, prevalecendo maior teor para cratilia, guandu e fração folha do sabiá. Não foi confirmado a presença de tanino para gliricídia e a fração casca do sabiá. Foi constatado ausência de flavonóides, catequinas, alcalóides e naftoquinas para as leguminosas. Santos et al. (2006), além de estudos fitoquímicos por

espectrometria de massa e espectroscopia de ressonância magnética nuclear, revelaram que as catequinas são um componente importante na classe dos taninos condensados.

A análise fitoquímica preliminar indica o grupo de metabólitos secundários relevantes na mesma, entretanto caso o interesse esteja restrito a uma classe específica de constituintes ou alguma substância responsável pela atividade biológica, a investigação deve ser direcionada para o isolamento e a elucidação estrutural da mesma (FALKENBERG et al., 2004). A concentração de princípios ativos na planta depende naturalmente da interface química entre plantas e o ambiente, logo sua síntese é frequentemente afetada pelas condições ambientais, como, por exemplo, idade da planta, temperatura, disponibilidade hídrica, intensidade de luz, fatores mecânicos, poluentes, etc. (BRAZ-FILHO, 2010).

As análises dos espectros permitiu identificar sinais intensos de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados compatíveis com carboidratos e um grupo metoxila além de sinais na região de hidrogênio em sistemas aromáticos em baixa intensidade. A análise dos espectros de RMN ^{13}C (Experimento conhecido como Distorção por transferência de polarização incluindo a detecção de núcleos quaternários (DEPTQ), que permite distinguir os carbonos, metínicos (CH) e metílicos (CH_3) em uma fase enquanto os sinais dos carbonos metilênicos (CH_2) e quaternários (C) aparecem em fase oposta) permitiu identificar, de acordo com os valores dos deslocamentos químicos e multiplicidade, a presença do metil-inositol, um carboidrato cíclico, em grande quantidade, sendo o componente majoritário nos extratos aquoso de todas leguminosas analisadas. Os espectros dos extratos de acácia, sabiá folha, gliricídia e cratília apresentaram sinais em menor intensidade de hidrogênios e carbonos de sistemas aromáticos (podendo ser dos taninos). As análises dos espectros de RMN ^{13}C obtidos com os solventes utilizados (água ou dimetilsulfóxido-deuterados) permitem propor a presença de sacarose, outros carboidratos e outros compostos não identificados além do componente majoritário. A análise com acetona- d_6 + D_2O poderá, talvez, revelar a presença dos taninos, mas em pequena quantidade.

4 CONCLUSÕES

A metodologia de extração aquosa nomeado como extrato tânico é uma mistura de substâncias, tendo como principal componente o metil-inositol (açúcar). Este fato implica em resultados contraditórios ao esperado quando se utiliza extrato de plantas contendo tanino condensado (TC) na dieta dos animais. O que sugere a adoção de novos métodos para extração, visando o aumento do conteúdo de TC para promoção dos efeitos desejados.

CAPÍTULO II

PRODUÇÃO E QUALIFICAÇÃO DO EXTRATO COM USO DE SOLVENTE ORGÂNICO EM LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS TROPICAIS

RESUMO

Alguns compostos secundários tais como tanino restringe o potencial forrageiro de algumas leguminosas, pois em altas concentrações podem trazer toxidez e/ou reduzir o valor nutritivo destas forrageiras. No entanto, alguns destes metabólitos em baixas concentrações podem ser benéficos aos animais, aumentando a eficiência no aproveitamento da proteína da dieta, controle de parasitas gastrointestinal, redução da amônia ruminal e metano. Objetivou-se neste trabalho avaliar os taninos condensados (TC) purificados do *Cajanus cajan* (guandu), *Gliricidia sepium* (gliricídia), *Stylosanthes spp* (estilosantes), *Flemingia macrophylla* (flemingia), *Cratylia argentea* (cratilia), *Mimosa caesalpineafolia* (sabiá) sendo este último utilizado a fração folha e a fração casca. Para isto foi determinado as seguintes variáveis com uso de solventes orgânicos: frações do tanino condensado (TC solúvel (TCE), TC aderido à proteína (TCPB), TC aderido à fibra (TCFB) e TC totais (TCT)), características estruturais (propelargonidina (PP); prodelfinidina (PD) e procianidina (PC)), peso molecular (grau de polimerização (GP); distância do peso molecular distribuído do polímero (PDI); peso médio da massa molecular (Mw) e número médio da massa molecular (Mn)), além de determinar a atividade biológica, através da técnica de proteínas precipitáveis por fenóis (PPP). As análises químicas foram realizadas no laboratório do centro de pesquisa Texas A&M AgriLife Research at Stephenville, Texas, EUA. As variáveis TCE, TCPB e TCT apresentadas foram influenciadas pelas diferentes espécies ($P \leq 0,05$). A cratilia não apresentou TCE, apresentando somente traços do TC ligado à PB (0,09%). A fração TCE variou do menor teor para cratilia e 7,97% para a fração folha do sabiá. O TCPB variou de 0,09% para cratilia e 5,26% para a flemingia. A fração TCFB não foi constatada nas leguminosas. Os pesos moleculares (DP, PDI, Mw e Mn) foram influenciadas pelas diferentes espécies ($P \leq 0,05$). O Mw variou de 737 a 1168 Da, já o Mn variou de 271 a 436 Da. O estilosantes foi a leguminosa que apresentou maior Mw (1168 Da), e a fração folha da leguminosa sabiá apresentou um Mw (917 Da) considerado moderado, comparado a uma concentração de baixo TC. A gliricídia, guandu e fração casca do sabiá apresentaram uma relação PD:PC de aproximadamente 40:60, já a flemingia e a fração folha do sabiá tem uma maior relação próximo de 60:40 (PD:PC). O estilosantes e cratilia apresentaram o monômero PP. O estilosantes teve alto valor para PC e baixa para PD e PP, já a cratilia apresentou quase 50% do valor para PP. As leguminosas variaram as concentrações de tanino condensado assim como uma diversidade na suas estruturas químicas o que pode levar a ter múltiplas atividades biológicas ao animal.

Palavra-chave: Metano. Precipitação de proteínas. Tanino condensado.

ABSTRACT

The presence of secondary compounds such as tannins restricts the forage potential of some legumes, because when in high concentrations may bring toxicity and/or reduce their nutritive value. However, some of those metabolites may be beneficial to animals in low concentrations, enhancing the efficiency on the use of protein from the diet, control of gastrointestinal parasites, reduction of ruminal ammonium and methane. Due to the exposed, it was aimed on this work evaluate the purified condensate tannins (CT) from six forage legumes, which were: *Cajanus cajan* (guandu), *Gliricidia sepium* (gliricidia), *Stylosanthes spp* (estilosantes), *Flemingia macrophylla* (flemingia), *Cratylia argentea* (cratilia), *Mimosa caesalpineafolia* (sabiá), being used the bark and leaf fraction for the last specie. For that, it was determined the following variables with using organic solvents: condensate tannins fractions (soluble tannin (ECT), tannin adhered to protein (PBCT), tannin adhered to fiber (FBCT), and total condensate tannins (TCT), structural characteristics (propelargonidina (PP); prodelfinidina (PD) e procianidina (PC), molecular weight (polymerization degree (DP), molecular distance distributed of the polymer (PDI); average weight of molecular mass (Mw), and average number of molecular mass (Mn), besides determining the biological activity through the technique precipitated proteins by phenols (PPP). The chemical analysis were performed in the laboratory of the research center Texas A&M AgriLife in Stephenville, Texas, EUA. The variables ECT, PBCT, and TCT presented were influenced by different species ($P \leq 0.05$). Cratilia did not present ECT, showing only traces of TC linked to PB (0.09%). The ECT fraction varied at 0.0% for cratilia and 7.97% for the leaf fraction of Sabia. The PBCT varied at 0.09% for cratilia and 5.26% for flemingia. The FBCT fraction was not found in the legumes. The molecular weights (DP, PDI, Mw e Mn) were affected by the different species ($P \leq 0.05$). The Mw ranged from 737 to 1168 Da, whereas the Mn ranged from 271 to 436 Da. Estilosantes was the legume that showed greater Mw (1168 Da), and the leaf fraction from the Sabiá legume presented a Mw considered moderate (917 Da), compared to a concentration of low TC. The gliricidia, the pigeonpea, and peel fraction of Sabia exhibited ratio PD to PC ratio about 40:60, whereas the flemingia and the leaf fraction of Sabiá has a greater ratio, near to 60:40 (PD:PC). Estilosantes and cratilia have presented the monomer PP. Estilosantes had a high value for PC and low for PD and PP, and cratilia exhibited almost 50% of the value for PP. The legumes have changed the concentrations of condensate tannins as well as diversity on their chemical structures, what may lead to multiple biologic activities on the animal.

Key words: Condensate tannins. Methane. Proteins precipitation.

1 INTRODUÇÃO

A escassez de forragens e de recursos alimentares de boa qualidade é apontada como um dos maiores problemas na pecuária, principalmente nos países em desenvolvimento. Com a introdução de leguminosas (de porte herbáceo e arbustivo) em consórcio com gramíneas ou como banco de proteína, condiz interessantes fontes de alimentos do ponto de vista: nutricional, pois possuem alto teor de proteína e digestibilidade; sendo estratégico, pelo fato destas servirem como reserva de alimento para a época da seca, além do aporte de nitrogênio ao sistema de pastagens diminuindo gasto com adubação nitrogenada comparado ao monocultivo de gramíneas (NEPOMUCENO et al., 2013).

A maioria das leguminosas tropicais apresenta baixa aceitabilidade pelos animais na estação chuvosa. Assim, o efeito mais marcante da leguminosa de baixa palatabilidade na dieta animal ocorre a partir do período de transição das águas para a seca, quando as condições ambientais para crescimento e a qualidade da gramínea são bastante críticas, limitando o consumo. A aceitabilidade das leguminosas está relacionada diretamente com a presença de compostos metabólicos secundários tais como: taninos, saponinas, terpenos e lignina, sendo estes compostos designados de “fator antinutricional” termo usado para descrever compostos ou classes de compostos presentes numa extensa variedade de alimentos de origem vegetal, que quando consumidos, reduzem o valor nutritivo dos alimentos (NEPOMUCENO et al., 2013). Eles interferem na digestibilidade, absorção ou utilização de nutrientes e, se ingeridos em altas concentrações, podem acarretar efeitos danosos à saúde (GRIFFITHS et al., 1998).

Taninos condensados (TC) são compostos fenólicos classificados como polímeros de flavan-3-ol com diferentes pesos moleculares (MUELLER-HARVEY, 2006), amplamente presentes em plantas, especialmente leguminosas, tendo evoluído como mecanismo de defesa química contra microrganismos patogênicos, insetos e outros herbívoros (FORKNER et al., 2004). Por apresentar capacidade de ligar a proteínas e outras macromoléculas, de forma reversível de acordo com o pH (McALLISTER et al., 2005). Esta capacidade lhes permitem desempenhar papéis importantes no metabolismo e nutrição animal com o aumento na absorção de aminoácidos no intestino delgado (bypass), com consequente redução da população de parasitas no intestino (MIN et al., 2003; WAGHORN et al., 2003; HECKENDORN et al., 2007), aumento na síntese de proteína microbiana (MAKKAR, 2003) e redução na produção de metano no rúmen (SCALBERT, 1991; WOODWARD et al., 2001). Os TC também alteram a rota de eliminação do nitrogênio da urina para as fezes, proporcionando menor efeito negativo para o ambiente (OLIVEIRA e BERCHIELLI, 2007).

Por causa da estrutura química muito heterogênea destes compostos fenólicos (McSWEENEY et al., 2001; MUELLER-HARVEY, 2006), os taninos de uma mesma espécie vegetal podem ter repostas diferentes na disponibilidade e utilização de nutrientes, mesmo quando consumido na mesma concentração (SCHOFIELD et al., 2001).

O TC tem efeito adstringente (PORTER e WOODRUFFE, 1984), afetando o consumo de forragem pelos ruminantes, porém a variação do efeito depende do grau de polimerização das proantocianidinas e peso molecular do tanino (PORTER & WOODRUFFE, 1984), tamanho, estrutura das proteínas que se ligam (HAGERMAN & BUTLER, 1978) e concentração de prodelfinidina e procianidinas (GUIMARÃES-BEELLEN et al., 2006).

Existem diferentes metodologias para análise química e de reatividade de TC. No entanto, a maioria dos métodos colorimétricos que são rápidos fornece pouca informação sobre esta questão (MUELLER-HARVEY, 2006). Gea et al. (2011), propuseram combinar a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para obter informações em termos de grau de polimerização, procianidina/prodelpinidina e peso molecular. Estes procedimentos são trabalhosos e dispendiosos o que dificulta tais análises, entretanto são métodos mais

confiáveis que demonstram realmente a reatividade do TC e valor nutritivo de leguminosas forrageiras na alimentação de ruminantes, já que temos uma variação de efeitos em diferentes plantas que sugerem existir diferenças quantitativas bem como qualitativas (NAUMANN et al., 2014).

Devido o exposto objetivou-se neste estudo obter taninos condensados purificados com uso de extração com solventes orgânicos caracterizá-los através da determinação do peso molecular (DP=grau de polimerização; PDI=distância do peso molecular distribuído do polímero; Mw=peso médio da massa molecular e Mn=número médio da massa molecular), das frações (tanino solúvel, tanino aderido à proteína e taninos condensados totais), estruturais (PP= propelargonidina; PD= prodelfinidina e PC= procianidina) e além de determinar sua atividade biológica através da técnica de proteínas precipitáveis por fenóis (PPP) da parte aérea das leguminosas forrageiras tropicais *Cajanus cajan* (guandu), *Gliricidia sepium* (gliricídia), *Stylosanthes spp* (estilosantes), *Flemingia macrophylla* (flemingia), *Cratylia argentea* (cratília), *Mimosa caesalpineafolia* (sabiá) e a fração casca do sabiá.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Produção e Avaliação do Extrato Orgânico de Leguminosas Forrageiras Tropicais

2.1.1 Origem e colheita das leguminosas

As leguminosas forrageiras *Cajanus cajan* (guandu), *Gliricidia sepium* (gliricídia), *Stylosanthes spp* (estilosantes), *Flemingia macrophylla* (flemingia), *Cratylia argentea* (cratilia), *Mimosa caesalpineafolia* Benth. (sabiá) foram colheitadas da área experimental “Terraço”, pertencente a Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ.

Desta forma, as partes aéreas das leguminosas foram colheitadas entre outubro e novembro de 2013, sendo posta para secar em galpão ventilado com temperatura média de 28°C, no período de uma semana. As leguminosas foram secas em estufa ventiladas a 55°C por mais 48 horas. Após secagem o material foi moído em moinho tipo Willey utilizando peneiras de 1 mm de crivos, sendo em seguida encaminhado para as análises químicas no laboratório do centro de pesquisa Texas A&M AgriLife Research em Stephenville, Texas, EUA.

2.1.2 Purificação do tanino condensado (TC)

A purificação do tanino condensado das leguminosas estudadas foi realizada de acordo com metodologia proposta por Wolfe et al. (2008), a partir de tecidos de plantas (25 g) com cerca de 300 mL de acetona:água (70:30) e agitados durante 30 minutos. Usou-se um auto-padro de cada espécie derivado de TC purificado dessa espécie. Após este período foi realizada uma filtração para eliminação das partículas e a parte filtrada foi colocada em um funil de decantação, no qual foi adicionado 300 mL de éter etílico e agitado manualmente por 30 segundos até a separação por densidade dos líquidos e afinidade das substâncias. Em seguida a fase inferior, contendo os fenóis, foi recolhida e a fase superior descartada (**Figura 1-A**). Devido nesta fase ficarem retidos compostos como clorofila e óleos, se repetiu o procedimento com a parte recuperada por três vezes, até que na fase inferior permanecesse apenas os fenóis, água, traços de éter e acetona. A parte inferior foi então encaminhada à evaporação em sob pressão reduzida para remoção dos traços de acetona e éter da amostra.

Seguiu-se o processo de purificação de taninos condensados (TC) a partir de cada espécie de planta, sendo utilizado o Sephadex LH-20 hidratado com metanol:água (50:50) sobre o fundo do funil, com adição da solução de TC, seguida de um repouso de 5 minutos (tempo que permite o TC de se ligar ao Sephadex LH-20) (**Figura 1-B**). A mistura foi lavada com metanol:água (50:50) repetidamente até que o filtrado ficasse incolor.



Figura 1. A- Material com diferença de densidade, sendo coletada parte inferior (com presença de tanino). B- Sephadex LH-20 hidratado com taninos aderidos- coloração bege. Fonte: Arquivo Pessoal

Os TC foram liberados do Sephadex LH-20 por lavagem com acetona:água (70:30) e em seguida foi realizada a remoção dos vestígios de acetona com bomba à vácuo. Após esta etapa, as amostras foram preparadas e colocadas em refrigeração a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e após essa etapa levados para o liofilizador por 72 horas (**Figura 2**).



Figura 2. Aparelho liofilizador com as amostras de tanino condensado purificado das leguminosas forrageiras tropicais. Fonte: Arquivo Pessoal

Os TC purificados de cada espécie foram usados para desenvolver padrões específicos das espécies para as análises de ácido butanol, cloreto férrico segundo Wolfe et al. (2008), determinação do peso molecular e caracterização dos TC.

2.1.3 Quantificação dos taninos condensados (TC) pelo método ácido butanol (butanol-HCl)

A concentração total de TC foi determinada em duas amostras de cada espécie de planta, como descrito por Terrill et al. (1992). A extração do TC solúvel (TCE) foi a partir de 250 mg de tecido de plantas com 10 ml de acetona:água (70:30) seguido de 10 ml de éter etílico. O TC ligado à proteína bruta (TCPB) foi extraído a partir do resíduo da extração do ETC com 10 ml de dodecil sulfato de sódio/mercaptoetanol contendo 0,01 M de tris-HCl. O TC ligado à fibra bruta (TCFB) foi determinado usando-se os resíduos após a extração do TCE e do TCPB. As frações dos TC (tanino solúvel, tanino aderido à proteína, tanino aderido à fibra e taninos condensados totais) foram determinadas com base na absorbância a 550 nm na sequência reação com o HCl-butanol (5% v/v HCl).

2.1.4 Precipitação de proteína

O método em escala reduzida descrito por Hagerman e Butler (1978) foi utilizado para determinar a precipitação de proteínas por fenóis, correlacionado aos TC, em extratos brutos de plantas realizados em amostras duplicadas. A precipitação da proteína foi determinada utilizando o extrato bruto devido às limitações na quantidade de TC purificado.

2.1.4.1 Extrato bruto de planta

Os extratos brutos das plantas foram preparados a partir da amostra de cada espécie de leguminosas através da extração de 50 mg de tecido de planta com 1 mL de metanol: água (50:50), vortex para homogeneização, agitador rotativo durante 15 min seguido por centrifugação a 16000 x g durante 5 minutos em 4 °C.

2.1.4.2 Proteínas precipitadas por fenóis (PPP)

Para determinar as proteína precipitadas por fenóis (PPP) ou PB, utilizou-se 50 µl de sobrenadante a partir do extrato bruto de cada espécie estudada, aos quais foram adicionados 250 µl de solução tampão A (0,20 M ácido acético, 0,17M NaCl, pH 4,9), 50 µl de albumina de soro bovino (5 mg/ml em tampão A) e 50 µl de metanol:água (50:50). Após repouso de 30 minutos em temperatura ambiente o material foi centrifugado 16.000 x g durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi aspirado e descartado e o sedimento (pellet) de fenólico - proteína foi lavado com 100 µl de tampão A antes de voltar a centrifugação e aspiração.

Para determinar o PPP, os pellets foram dissolvidos em 800 µL de Dodecil sulfato de sódio (1% w/v) -*trietanolamina* (5% v/v) antes da adição de 200 µl de FeCl₃ (0,01 M FeCl₃ em 0,01 M HCl). A absorbância de 510 nm foi lida após 15 min.

A curva padrão para PPP foi preparada em solução com TC purificado (1 mg/mL) em água deionizada. Os níveis de 100-700 µL de solução de TC foram combinadas com 250 µl da solução tampão A (ácido acético 0,20 M, NaCl 0,17 M, pH 4,9) com 50 µL de BSA (5

mg/mL em tampão A) onde foi convertido para um volume final de 1 mL com água deionizada. Logo foi incubado à temperatura ambiente durante 30 min antes da centrifugação a 16000 x g durante 5 minutos a 4°C.

Para determinar PB, a reação de precipitação foi realizado exatamente como descrito acima, entretanto o pellet do BSA TC - proteína foi analisado por N para determinar proteína precipitada. O pellet foi submetido a um vórtice mais 500 µl de solução tampão A, a solução foi transferida para um copo da folha pré-pesado e deixou-se secar. O resíduo seco de fenólico-proteína foi analisado para N através de um Elementar Vario Macro C:N (Elementar Americas, Inc., Mt. Laurel, NJ, EUA). A Porcentagem de N foi convertida em proteína pela multiplicação por 6,25.

2.1.5 Peso molecular dos taninos condensados (TC)

Para proceder as determinações das massas moleculares, utilizou-se o GPC (Cromatografia de permeação em gel -Gel PermeationChromatography) em sistema modular HPLC, como descrito por Huang et al. (2010). Primeiramente, amostras de extratos de TC purificados foram dissolvidos em 1 mL de tetrahidrofurano até uma concentração final de 0,5 mg/ml e 50 µL foram injetados em uma coluna de permeação em gel PL gel 3 mm Mixed-E (Agilent, Santa Clara, EUA), como fase estacionária, para as separações cromatográficas. Tetrahidrofurano foi utilizado como a fase móvel, com taxa de fluxo de 1,0 mL/min a 25 °C. Os pesos moleculares (Mw) foram calculados com base na curva de calibração estabelecida com padrões da PolystyreneLowEasiVials de 4 ml (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), com massas moleculares variando de 162 a 38.640 Dalton (Da). O peso médio relativo da massa molecular (Mw) e número médio da massa molecular (Mn) foram integrados e quantificados pelo Breeze Software (Waters Corporation, Milford, MA). Grau de polimerização (GP) é o número estimado de monômeros que compõem o polímero do TC purificada sendo calculado de acordo com Williams et al. (1983) no qual uma unidade simples de proantocianidina tem aproximadamente 500 Da de Mw, já o PDI (Mw/Mn) representa a distância do peso molecular distribuído do polímero.

2.1.6 Caracterização dos taninos condensados (TC)

Para determinar a relação PC:PD dos TC das plantas, monômeros de antocianidinas foram utilizados como descrito por Naumann et al. (2015). Uma solução de TC purificados adicionado ao ácido butanol (0,5 mg/mL) foi reagida em banho maria a 95°C por 45 min para dissociação em antocianidinas. Para detecção e integração com tempos de retenção e espectro dos padrões comerciais cianidina, delphinidina e pelargonidina (Sigma-AldrichCo., St. Louis, MO) foi utilizado o HPLC, controlado por Breeze Software (Waters Corporation, Milford, MA). A coluna C18 (5µm, fase reversa, 4,6 x 150 mm) foi utilizada como fase estacionária. A injeção da solução na coluna foi de 50µl, a qual foi separada utilizando 0,13% de ácido trifluoroacético em água (fase móvel A) e 0,1% de ácido trifluoroacético em acetonitrila (fase móvel B) em 0,5 mL/min durante 45 min: 0 a 10 min, 5% de B; 10 a 15 min, 10% de B; 15 a 25 min, 20% de B; 25 a 40 min, 55% de B; 40 a 45 min, retorna para 5% de B. O eluído foi detectado na absorbância de 550 nm.

2.2 Análises Estatísticas

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com sete tratamentos (6 espécies mais a fração casca da *Mimosa caesalpineafolia*) e quatro repetições. Os resultados dos percentuais de frações do tanino condensado (tanino solúvel (TCE), tanino aderido à proteína (TCPB), tanino aderido à fibra (TCFB) e taninos condensados totais (TCT)), características estruturais (propelargonidina (PP); prodelfinidina (PD) e procianidina (PC)), peso molecular (grau de polimerização (DP); distância do peso molecular distribuído do polímero (PDI); peso médio da massa molecular (Mw) e número médio da massa molecular (Mn)) e as proteínas precipitáveis por fenóis (PPP) foram submetidos à análise de variância onde as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) através do programa estatístico (RStudio).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização dos Taninos Condensados de Leguminosas Forrageiras Tropicais com Uso de Solvente Orgânico

As variáveis TCE, TCPB e TCT apresentadas foram influenciadas pelas diferentes espécies ($P \leq 0,05$). A cratilia foi à leguminosa livre de presença de TC pela técnica de extração empregada, apresentando somente traços do TC ligado a PB (0,09%). A fração TCE considera-se o maior componente do TCT, e variou de 0,0% para cratilia e 7,97% para a fração folha do sabiá. O TCPB variou de 0,09% para cratilia e 5,26% para a flemingia. A fração TCFB que representa a menor porcentagem do TCT não foi constatada nas leguminosas estudadas.

Sturm et al. (2007) avaliando duas das mesmas espécies de leguminosas cratilia e flemingia observaram valores próximo dos relatados neste trabalho. Estes mesmos autores relataram valores similares para cratilia em relação ao TC aderido a FB e a PB (0,0%), TCE (0,0%) e TCT (0,0%), para leguminosa flemingia os resultados foram próximos para ECT (4,8%), entretanto, o TC total foi inferior (4,8%) e não foi encontrado TC aderido às frações fibra e proteína. Fagundes (2012) estudando a flemingia encontrou teores de TCT (10,4%), TCE (4,8%), TCPB (4,4%) valores bem próximo dos observados neste estudo, variando somente o TCFB (1,3%) que não foi observado no presente trabalho. Vale ressaltar que os TC são compostos secundários que sofrem interferência de fatores edafoclimáticos, bem como níveis de herbivoria (MONTEIRO et al, 2005).

A gliricídia foi uma das leguminosas que também não apresentou TCE. No trabalho de Balogun et al. (1998) foi encontrado somente traços da fração TCE (< 1%) e os maiores valores na fração de TCPB (2,41%) e TCT (3,64%), valores similares ao encontrado no presente trabalho. Nozella (2001) avaliou a concentração de tanino em plantas com potencial forrageiro para ruminantes e observou que a gliricídia apresenta baixos teores de fenóis (13,72 g/kg MS), taninos (6,86 g/kg MS) e taninos condensados (0,30 g/kg MS). O maior desempenho animal é observado quando as dietas contendo níveis moderados de 20 a 50 g/kg MS de TC (MUIR, 2011), tendo um efeito benéfico da proteção da proteína (efeito by-pass) e diminuindo a degradação no rúmen, levando a um aumento da absorção dos aminoácidos essenciais em nível de intestino, não comprometendo a ingestão e levando ao aumento do peso dos animais (PATRA e SAXENA, 2011). Além disto, a rota do nitrogênio pode ser alterada da urina para as fezes, reduzindo efeito negativo no ambiente (OLIVEIRA e BERCHIELLI, 2007).

Costa et al. (2009) avaliaram o fornecimento de folhas de gliricídia como fonte exclusiva de alimento para ovinos da raça Santa Inês, contudo, os maiores consumos de MS foram registrados quando a folha de gliricídia foi oferecida associada ao capim elefante. Além disso, estes autores relataram que inclusão da gliricídia como suplemento em dietas de capim-elefante elevou o ganho de peso dos animais e melhorou a conversão alimentar. Hess et al. (2003) avaliaram em seus estudos a inclusão de cratilia e calliandra em uma dieta com gramínea com baixo teor de proteína indicando grande potencial como suplemento para ruminantes alimentados.

Tabela 1. Concentração de taninos condensados (TCE = taninos condensados extraíveis; TCPB = tanino condensado aderido à proteína; TCFB = tanino condensado aderido à fibra e TCT = total de tanino condensado; PPP= proteínas precipitáveis por fenóis) nas leguminosas tropicais cratilia, estilosantes, flemingia, gliricídia, guandu, sabiá folha e sabiá casca.

| Leguminosas | (%)TCE | (%)TCPB | (%)TCFB | (%)TCT | (%)PPP |
|--------------------|-------------------|-------------------|----------------|--------------------|--------------------|
| Cratilia | ND | 0,09 ^e | ND | ND | ND |
| Estilosantes | 0,90 ^e | 1,43 ^d | ND | 2,33 ^e | 0,32 ^d |
| Flemingia | 4,06 ^b | 5,26 ^a | ND | 9,33 ^b | 4,22 ^b |
| Gliricídia | ND | 3,55 ^c | ND | 3,57 ^d | ND |
| Guandu | 2,46 ^c | 0,83 ^d | ND | 3,29 ^d | 3,75 ^b |
| Sabiá (folha) | 7,95 ^a | 4,42 ^b | ND | 12,38 ^a | 15,97 ^a |
| Sabiá (casca) | 1,48 ^d | 3,52 ^c | ND | 5,02 ^c | 1,08 ^c |
| CV | 5,67 | 7,61 | - | 8,10 | 6,54 |

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$) pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados são apresentados com base na % MS dos TC purificados numa curva de calibração para cada espécie utilizando.

ND= não detectado

Sendo assim, as leguminosas que não apresentam tanino em sua composição oferecem uma boa fonte de proteína, por servir de aporte de N para ruminantes, representando uma alternativa possível para a substituição dos insumos mais caros das dietas, principalmente no período de escassez de forragens de boa qualidade. O consumo de até 0,5 a 2,0% de TC evita o timpanismo e não interferem na digestibilidade em ruminantes (BARRY e MCNABB, 1999; PONCET e RÉMOND, 2002), assim o estilosantes, guandu, gliricídia e fração casca do sabiá que continha entre 2,33 a 5,02 % de TCT, são fontes de TC benéficos para dieta animal. Segundo Gonçalves et al. (2010) a madeira do sabiá apresenta potencial para ser utilizada como fonte de TC. Tem sido recomendado que concentrações superiores de TC a 50 g /kg em cima da MS das dietas podem afetar negativamente o consumo de ração, e menores concentração de taninos não têm influência sobre a ingestão pelos ruminantes, assim, a dieta e sua interação com os taninos pode influenciar o consumo voluntário (AERTS et al., 1999; BARRY & MCNABB, 1999; FRUTOS et al., 2002; PELLIKAN et al., 2010; LITTLEFIELD et al., 2011). Em estudo com cordeiros alimentados com taninos de quebracho (89,3 g/kg de MS) reduziu a ingestão de MS com forragem fresca de ervilhaca (*Vicia sativa*) do que os cordeiros alimentados com a mesma forragem sem taninos (768 vs. 956 g dia) (PATRA e SAXENA, 2011).

A leguminosa sabiá fração folha apresentou altos teores de TC (12,3%), o que já era esperado, segundo relatado por Guimarães-Beelen et al. (2006), o sabiá possui alto conteúdo em TC. Nozella (2006) avaliando o valor nutritivo de leguminosas arbóreas-arbustiva na Caatinga encontrou valor similar para TCT (12,1%), segundo o autor essa quantidade de tanino pode ser um risco para saúde animal, quando fornecido como única fonte de alimento. Porém, vale ressaltar que certos herbívoros podem produzir e regular mais prolina e outras proteínas salivares como meio de inativação dos TC (MOLE et al., 1990).

Segundo Wolfe et al. (2008), os níveis de TC nas leguminosas com baixo teor de TC indicam potencial nutricional, já as com alta concentração de TC o uso deve ser medicinal, entretanto as análises *in vitro* seguido por *in vivo* devem ser realizadas para tais afirmações.

A concentração de TC em cada fração é dependente de vários fatores, como espécie, maturidade fisiológica do tecido, tipo de tecido vegetal, os procedimentos de preparação de amostras, incluindo aquecimento/secagem, condições ambientais e os níveis de nutrientes induzida ao estresse (MANSFIELD et al., 1999; VETELI et al., 2007), idade, origem

anatômica do tecido da planta, e varia tanto entre e dentro das espécies de plantas. A abundância relativa destas três frações pode afetar a atividade biológica do TC (NAUMANN et al., 2013).

Palmer et al. (2000) e Terrill et al. (1994) mostraram que a temperatura de secagem diminui o tanino condensado extraível de *Calliandra calothyrsus* e as folhas da *Lespedeza cuneata* aumentaram a fração de taninos condensados ligados a proteína e fibra. Segundo Muetzel e Becker (2006), a secagem em estufa não afetou negativamente a extração e atividade biológica do tanino, porém diminuiu a solubilidade da parede celular e proteína da planta reduzindo a sua degradabilidade no rúmen. Lin et al. (2007), trabalharam com diferentes frações da planta e com estádios fenológicos e constatou variação na concentração do TCE, TCPB, TCFB, TCT e PPP, onde teve menores valores com maturidade das plantas.

As leguminosas estudadas apresentaram diferentes teores (%) de PPP (Tabela 2). Sendo que a fração folha do sabiá apresentou maior teor de PPP ($P \leq 0,05$), entretanto o teor apresentado pelo guandu e flemingia não diferiram entre si ($P \geq 0,05$), diferindo dos menores teores encontrados pelo estilosantes e fração casca do sabiá ($P \leq 0,05$). As leguminosas cratilia e gliricídia não apresentaram teor de PPP e foram as que apresentaram o menor peso molecular (Mw).

Segundo Lin et al. (2007), alterações na composição química dos TC diminui a capacidade de ligação das proteínas. Com o baixo PPP no estágio fenológico com a maturidade e senescência da planta e com o aumento do grau de polimerização, os sítios ativos do TC para a interação com as proteínas estavam menores tornando as moléculas mais complexas na interação com as proteínas. Esse fator pode ser um dos fatores ocorridos nas espécies estudadas, visto que não foi avaliada a idade das mesmas no presente trabalho. Segundo Guimarães-Beelen et al. (2006), variações de TC podem ocorrer entre diferentes fases de crescimento da planta.

Todas as variáveis apresentadas foram influenciadas pelas diferentes espécies ($P \leq 0,05$). O Mw das leguminosas estudadas variou de 737 a 1168 Da, já o Mn é duas vezes menos o Mw, variando de 271 a 436 Da. O estilosantes apesar de possuir baixo TCT (2,33%) e PPP (0,32%) foi a leguminosa que apresentou maior Mw (1168 Da), e a leguminosa sabiá fração folha com maior TCT (12,38%) e PPP (15,97%) apresentou um moderado Mw (917 Da) comparado a uma concentração de baixo TC. Naumann et al. (2013) afirmam que altos teores de TC poderão não ter elevada Mw (Tabela 2).

Em geral, a massa molecular de polifenóis nas plantas varia entre 100 a 10.000 Da (YANAGIDA et al., 2002), enquanto que para taninos se tem uma variação de 500 a 20.000 Da (MANÉ et al., 2007). A influência do peso molecular do TC tem sido explorado para os fatores que contribuem para atividade biológica do TC que não são conhecidos. Segundo Bate-Smith (1973), a capacidade do TC para se ligar e precipitar as proteínas aumenta à medida que aumenta GP e Mw. Huang et al. (2010), trabalhando com híbridos da leguminosa leucena encontrou valores em torno de 2737 a 2871 Da, entretanto o autor não atribuiu a afinidade de ligação das proteínas devido ao tamanho molecular (Mw), segundo o autor a estrutura química também pode desempenhar um papel vital na mesma. O que pode confirmar com o estilosantes, onde apresentou baixo PPP (0,32%) e um alto Mw (1168).

Tabela 2. Valores dos pesos moleculares das leguminosas forrageiras tropicais (DP=grau de polimerização; PDI=distância do peso molecular distribuído do polímero; Mw=peso médio da massa molecular e Mn=número médio da massa molecular) cratilia, estilosantes, flemingia, gliricídia, guandu, sabiá folha e sabiá casca.

| Leguminosas | DP | PDI | Mw | Mn |
|--------------------|------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| Cratilia | 1,6 ^b | 2,88 ^c | 791 ^d | 274 ^d |
| Estilosantes | 2,3 ^a | 2,83 ^c | 1168 ^a | 436 ^a |
| Flemingia | 2,0 ^a | 2,89 ^c | 999 ^b | 351 ^b |
| Gliricídia | 1,5 ^b | 2,84 ^c | 737 ^e | 260 ^e |
| Guandu | 1,7 ^b | 3,09 ^b | 838 ^c | 271 ^d |
| Sabiá (folha) | 1,8 ^b | 3,25 ^a | 917 ^c | 284 ^c |
| Sabiá (casca) | 2,0 ^a | 3,49 ^a | 993 ^b | 284 ^c |
| CV | 2,1 | 16,06 | 2,14 | 18,9 |

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$) pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados são apresentados com base na % MS dos TC purificados numa curva de calibração para cada espécie utilizando TC purificada a partir de cada espécie.

Já Naumann et al. (2013), avaliaram diferentes leguminosas perenes de clima quente na região sul dos EUA encontrou valores de 552 a 1483 Da, valores mais próximo dos encontrados neste estudo, no entanto para os autores o Mw avaliado no TCE não explica a atividade biológica na produção de CH₄ *in vitro*, sugerindo pesquisas mais detalhadas no refinamento da metodologia para análises do Mw nas frações de TCPB e TCFB. Talvez, outros fatores, incluindo a estrutura química pode desempenhar um papel vital na mesma.

Tabela 3. Características estruturais (PP= propelargonidina; PD= prodelfinidina e PC= procianidina) do tanino condensado em leguminosas forrageiras tropicais cratilia, estilosantes, flemingia, gliricídia, guandu, sabiá folha e sabiá casca.

| Leguminosas | %PP | %PD | %PC | PD:PC |
|--------------------|------------|------------|------------|--------------|
| Cratilia | 44,55 | 30,75 | 24,70 | 30:25 |
| Estilosantes | 10,72 | 7,14 | 82,14 | 10:80 |
| Flemingia | ND | 64,10 | 35,33 | 65:35 |
| Gliricídia | ND | 39,82 | 60,18 | 40:60 |
| Guandu | ND | 40,28 | 59,72 | 40:60 |
| Sabiá (folha) | ND | 52,78 | 47,22 | 52:48 |
| Sabiá (casca) | ND | 40,00 | 60,00 | 40:60 |

ND= nada detectado

A porcentagem de propelargonidina (PP), prodelfinidina (PD) e procianidina (PC) e relação de PD e PC de taninos condensados (TC) purificados em leguminosas tropicais se encontram na Tabela 3.

A composição monomérica de taninos purificados (relação PD:PC) variou consideravelmente entre espécie. A gliricídia, guandu e fração casca do sabiá apresentaram uma relação PD:PC de aproximadamente 40:60, já a flemingia e a fração folha do sabiá tem uma maior relação próximo de 60:40 (PD:PC). O estilosantes e cratilia foram às únicas leguminosas que apresentaram o monômero PP. Neste trabalho o estilosantes teve alto valor para PC e baixa para PD e PP, já a cratilia apresentou quase 50% do valor para PP.

Segundo Jones et al. (1976) o teor de prodelphinidina (PD) está relacionado a uma maior adstringência dos taninos. Ayres et al. (1997) associaram a maior porcentagem de prodelphinidina para uma ação de defesa anti-herbívoros. Guimarães-Beelen et al. (2006) observaram que *Mimosa tenuiflora* (jurema) teve maior TC (310 g kg⁻¹) e maior PC:PD (97:3), diferente da *Bauhinia cheilantha* (pata de vaca) que apresentou menor TC (104 g kg⁻¹) e menor PC:PD (40:50).

Conhecer a proporção relativa dos diferentes polímeros e oligômeros das proantocianidinas pode ajudar a prever sua eficácia global como componentes funcionais, visto que suas atividades biológicas podem trazer efeitos benéficos ou maléficos na nutrição de ruminantes. Além disso, atividades biológicas, como supressão de metano e inibição larval, devem ser estudadas como benefícios adicionais ao ambiente.

4 CONCLUSÕES

As leguminosas estudadas variaram as concentrações de tanino condensado assim como uma diversidade na suas estruturas químicas o que pode levar a ter múltiplas atividades biológicas ao animal dependendo da concentração fornecida aos animais.

CAPÍTULO III

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE TANINO CONDENSADO EM LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS TROPICAIS NA PRODUÇÃO DO METANO RUMINAL *IN VITRO*

RESUMO

O uso de metabólitos secundários de plantas como aditivos naturais à indução da fermentação ruminal apresenta-se uma alternativa para aumentar a eficiência produtiva e redução de gases do efeito estufa produzido no trato gastrointestinal destes animais. Devido o exposto objetivou- neste estudo avaliar a metanogênese e os parâmetros de fermentação ruminal frente à inclusão taninos condensados presentes nas leguminosas *Cajanus cajan* (guandu-GUA), *Gliricidia sepium* (gliricídia-GLI), *Stylosanthes spp* (estilosantes-EST), *Flemingia macrophylla* (flemingia-FLE), *Cratylia argentea* (cratilia-CRA), *Mimosa caesalpineafolia* (sabiá) fração folha (SABf) e a fração casca do sabiá (SABc) sobre forma de 2 experimentos. O primeiro experimento foi realizado para avaliar as seis espécies de leguminosas forrageiras tropicais, e o feno *Urochloa brizantha* cv. Marandu como controle (CTL). O segundo experimento foi realizado com a fração folha do sabiá, por apresentar alta concentração de tanino condensado (15,97%), frente as demais leguminosas e seu efeito com adição do polietilenoglicol (PEG) em dois níveis (8% e 16% PEG), para elucidar a atividade biológica do tanino condensado sobre a fermentação ruminal *in vitro*. As análises biológicas foram realizadas no Laboratório do centro de pesquisa - North Florida Research & Education Center, University of Florida, Marianna- Flórida, EUA. A produção cumulativa de gás (PGT/ mL/g MS), produção total de metano/grama de matéria seca (CH₄ total/mL/g MS), produção de metano de acordo com a MS incubada (CH₄ inc./mmol/g MS incubada); produção de metano de acordo com MS fermentada (CH₄ ferm /mM/g MS fermentada), pH, N-NH₃, digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica (DIVMO) e a concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) foram avaliadas após 48 horas de incubação. Não foi observado alteração no pH ($P \geq 0,05$) para os tratamentos avaliados. No entanto, foram observadas diminuição da produção total de gás e produção de metano para todos os tratamentos com presença de tanino condensado ($P \leq 0,05$). Para o tratamento com PEG houve aumento nas variáveis produção total de gás e produção de metano. GUA, FLE, SABc e SABf foram capazes de modificar ($P \leq 0,05$) a concentração de N-NH₃ (mg/dL) juntamente com o CTL que também apresentou valores inferiores comparado as leguminosas com traços e ausência do TC (ETL, CRA e GLI). Houve diferença ($P \leq 0,05$) para DIVMO entre as leguminosas e o controle, observou-se menor digestibilidade ($P \leq 0,05$) para FLE, GUA e SABf, em relação ao CTL, não sendo digestível o SABc. A DIVMO foi afetada pela adição de PEG na dieta do SABf. Observou-se menor digestibilidade ($P \leq 0,05$) para FLE, GUA e SABf, em relação ao CTL, não sendo digestível a fração casca do SAB. No perfil dos AGCC houve diferença ($P \leq 0,05$) para os tratamento avaliados, com menor valor para as leguminosas com presença de TC. As leguminosas com presença de tanino apresentaram potencial uso como redutor de metano, no entanto, os efeitos ainda apresentam variadas respostas com relação à forrageira e os níveis a serem utilizados.

Palavras-Chave: Fermentação ruminal. Metanogênese. Taninos.

ABSTRACT

The use of secondary metabolites from plants as natural additives to induction of ruminal fermentation has been studied as a way to increase the productive efficiency of those animals and to reduce of gases of greenhouse effect produced in the gastrointestinal tract of the animals. Due to the exposed, it was aimed in this study evaluate the methanogenesis and the parameters of ruminal fermentation address the condensate tannins present in the legumes *Cajanus cajan* (guandu-GUA), *Gliricidia sepium* (gliricidia-GLI), *Stylosanthes* spp (estilosantes-EST), *Flemingia macrophylla* (flemingia-FLE), *Cratylia argentea* (cratilia-CRA), *Mimosa caesalpiniaefolia* (sabiá) leaf fraction(SABf) and bark fraction from sabiá (SABc) in a arrangement of 2 experiments. For that, two experiments were conducted. The first trial was performed to evaluate six species of tropical legume forages, and *Urochloa brizantha* cv. Marandu hay as control (CTL). The second Trial was performed with the leaf fraction of sabiá, for it presenting high concentration of condensate tannins (15.97%), compared to the other legumes, and its effect with addiction of polyethylene glycol (PEG) in two levels (8% and 16% PEG) to elucidate the biological activity of condensate tannin on ruminal fermentation *in vitro*. The biological analyses were carried out in the laboratory at the research center North Florida Research & Education Center, University of Florida, Marianna-Flórida, EUA. The cumulative gas production (PGT mL/g DM), total methane production/gram of dry matter (CH₄ total/mL/g DM), methane production according the incubated dry matter (CH₄ inc./mmol/g DM incubated), methane production according the dry matter fermented (CH₄ ferm /mM/g DM fermented), pH, N-NH₃, *in vitro* organic matter digestibility (IVOMD) and the concentration of short-chain fatty acids (SCFA) were evaluated after 48 hours of incubation. It was not observed pH alteration ($P \geq 0.05$) for the treatments evaluated. However, it was observed a decrease of total gas production, and methane production for all the treatments with presence of condensate tannin ($P \leq 0.05$). For the treatment with PEG, there was an increase of the variables total gas production and methane production. GUA, FLE, SABc e SABf were capable of modifying ($P \leq 0.05$) the concentration of NH₃-N (mg/dL), along with the CTL, which also presents lower values compared to legumes with traces and absence of TC (ETL, CRA e GLI). There was significant difference ($P \leq 0.05$) for IVOMD between the legumes and control, it was observed lower digestibility ($P \leq 0.05$) for FLE, GUA e SABf in relation to CTL, not being digestible the SABc. The IVOMD was significantly affected by the addiction of PEG in the SABf diet. It was found lower digestibility for FLE, GUA e SABf in relation to the CTL, not being digestible the peel fraction of SAB. On the SCFA profile, there was significant difference ($P \leq 0.05$) for the treatments evaluated, with lower value for the legumes with presence of CT. The legumes with presence of tannin have exhibited potential use as methane reducer. Nevertheless, the effects present varied responses in relation to the forage and the levels to be used.

Key words: Methanogenesis. Ruminal fermentation. Tannins.

1 INTRODUÇÃO

A fermentação de alimentos no rúmen é realizada por uma população densa e diversa de microrganismos anaeróbios, incluindo bactérias, fungos e protozoários. O ajuste desse ecossistema microbiano para reduzir as emissões de metano e excreção do nitrogênio tem reflexo direto sobre a eficiência energética e desempenho animal, visto que até 12% da energia bruta dietética pode ser perdida na forma do CH₄.

Os metabólitos secundários das plantas como os taninos, são particularmente atraentes como indutores ruminais, principalmente por serem produtos naturais, que muitas das vezes já estão contidos na própria alimentação dos ruminantes como as leguminosas forrageiras que apresentam os chamados “fatores antinutricionais”, devido o potencial negativo sobre o consumo de ração e utilização dos nutrientes. No entanto, quando administrados em baixas concentrações, alguns compostos como o tanino podem ser favoráveis a melhoria do padrão de fermentação ruminal (BHATTA et al., 2002).

Leguminosas forrageiras possuem quantidades e diversidades de princípios ativos com efeito sobre a microbiota ruminal. Estudos com estas plantas estão sendo relacionados, principalmente aos efeitos benéficos do tanino condensado sobre a mitigação de metano ruminal (POSSENT et al., 2008), ação anti-helmínticos (CENCI et al., 2007; MINHO et al., 2010), melhorando a síntese de proteína microbiana (BHATTA et al., 2001).

Um dos métodos usados para avaliar a atividade do tanino é o uso do polietilenoglicol (PEG) sobre a planta, sendo um artifício usado para entender melhor como eles afetam a digestão e o aproveitamento da forragem pelos ruminantes. O PEG se liga aos taninos com maior afinidade que as proteínas e com isso irá substituí-las nos complexos tanino-proteína, inclusive os pré-formados, sem ser degradado ou absorvido pelos animais (BEN SALEM et al., 1999).

Dessa maneira, diversos trabalhos têm demonstrado que o PEG é um dos reagentes mais utilizados para neutralizar esses compostos secundários, sendo o uso diário de PEG capaz de aumentar a ingestão e eficiência de utilização da forragem, ingerindo plantas com altas concentrações de taninos (BEN SALEM et al., 2000; DECANDIA et al., 2000; BHATTA, 2004).

A pesquisa destas plantas é um passo importante para a descoberta de novos compostos e seu desenvolvimento para suas múltiplas atividades biológicas, incluindo ligação às proteínas (JONES & MANGAN, 1977), ação anti-helmíntica (ATHANASIADOU et al., 2001), e a redução na emissão de CH₄ entérico (GRAINGER et al., 2009). Porém estes estudos são relatados com um pequeno número de espécies de plantas. Com a riqueza do reino vegetal, muitas plantas não foram investigadas para tais fins. Além disto, as plantas testadas para essas funções biológicas podem ser limitadas em relação a sua distribuição geográfica, concentrações dos metabólitos secundários e tipos existente que eles contêm podem variar regionalmente.

Devido ao exposto, objetivou-se neste estudo a partir de 2 experimentos avaliar a metanogênese e os parâmetros de fermentação ruminal frente os constituintes dos taninos condensados presentes nas leguminosas estudadas. O primeiro experimento foi à avaliação da parte aérea de seis leguminosas forrageiras tropicais: *Cajanus cajan* (guandu), *Gliricidia sepium* (gliricidia), *Stylosanthes spp* (estilosantes), *Flemingia macrophylla* (flemingia), *Cratylia argentea* (cratilia), *Mimosa caesalpineafolia* (sabiá), mais a fração casca do sabiá e o feno *Urochloa brizantha* cv. Marandu como controle. O segundo experimento foi avaliado a fração folha do sabiá, por apresentar alta concentração de tanino condensado (15,97%) e seu efeito com adição do PEG (polietilenoglicol) em dois níveis (8% e 16% PEG), com o intuito de comprovar atividade biológica do tanino condensado sobre a produção de metano ruminal *in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Origem e Colheita das Leguminosas

As leguminosas forrageiras *Cajanus cajan* (guandu), *Gliricidia sepium* (gliricidia), *Stylosanthes spp* (estilosantes), *Flemingia macrophylla* (flemingia), *Cratylia argentea* (cratilia), *Mimosa caesalpineafolia* (sabiá) foram obtidas da área experimental “Terraço”, pertencente a Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ, situada na latitude 22^a 45’S, longitude 43 a 41’ W Grw. e altitude de 33 metros. As partes aéreas das leguminosas forrageiras foram colhidas entre outubro e novembro de 2013 sendo postas para secar em galpão ventilado com temperatura média de 28°C, no período de uma semana. As leguminosas que apresentavam um pouco mais de umidade foram colocadas em estufa a 55 °C por mais 48 horas. Após secagem esse material foi moído em 1 mm e armazenado para futuras análises biológicas no Laboratório do centro de pesquisa - North Florida Research & Education Center, University of Florida, Marianna- Flórida, EUA .

2.2 Determinação da Composição Química da Forragem

As análises químico-bromatológicas foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Foram analisados os teores de proteína bruta, segundo o método Kjeldhal, usando o fator 6,25 para conversão de nitrogênio em proteína bruta (AOAC, 1990) e os componentes da parede celular (fibras insolúveis em detergente neutro e ácido) segundo Van Soest et al. (1991).

2.3 Quantificação de Tanino Condensado

A fração do TC e conteúdos foram determinadas para cada espécie de planta em estudo, como descrito por Terril et al. (1992). O TC Extraível (TCE) foi extraído a partir de 250 mg de tecido de plantas com 10 ml de uma solução a base de acetona:água (70:30) adicionado em 10 mL de éter etílico. O TC aderido a PB (TCPB) foi extraído a partir do resíduo do TCE com 10 mL de dodecil sulfato de sódio-mercaptoetanol. O TC aderido á fibra bruta foi determinado usando o resíduo das extrações do TCE e TCPB. As concentrações de TC em cada fração foram determinadas com base em absorvância de 550 nm (Thermo Fisher Scientific, Hudson, NH) seguindo a reação com HCL-butanol. Foram criadas curvas específicas para cada espécie de plantas analisadas (WOLFE et al., 2008) utilizando os extratos purificados de TC por Sephadex LH-20 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ) que teve sua recuperação por liofilização.

2.4 Peso Molecular do Tanino Condensado

As massas moleculares do TC de cada espécie foram determinadas utilizando (Cromatografia de permeação em gel - Gel Permeation Chromatography (GPC) em sistema modular de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), como descrito por Huang et al. (2010). As separações cromatográficas foram realizadas utilizando coluna de permeação em gel PLgel 3 mm Mixed-E coluna (Agilent, Santa Clara, EUA) e tetrahidrofurano como a fase móvel. Dissolveu o TCE purificado em tetrahidrofurato a uma concentração final de 0,5 mg/ml e 50 ml foi injetado a uma taxa de fluxo de 1,0 ml/min a 25 °C. Os pesos moleculares

relativos foram calculados com base na curva de calibração estabelecida com Polystyrene Low EasiVials (4 ml) como padrão (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), com massas moleculares variando de 162 a 38.640 Dalton (Da). O relativo peso médio da massa molecular (Mw) e número médio da massa molecular (Mn) foram integrados e quantificados. O grau de polimerização (DP) aproximado foi calculado de acordo com Williams et al. (1983) no qual uma unidade simples de proantocianidina tem aproximadamente 500 Da de Mw.

2.5 Fermentação em Técnica *In Vitro*

O presente estudo foi dividido em 2 experimentos, onde foi avaliada produção de gás total (PGT), metano total (CH₄ total), metano com base na matéria seca incubada (CH₄-inc), metano com base na matéria seca fermentada (CH₄-ferm), concentração de amônia (N-NH₃), ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), pH e digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica (DIVMO). No primeiro experimento avaliou-se as seguintes leguminosas forrageiras tropicais: cratília, estilosantes, flemingia, gliricídia, guandu e sabiá, mais a fração casca do sabiá e feno de *Urochloa brizantha* cv. Marandu como controle. No segundo experimento foi avaliada a fração folha da leguminosa sabiá e seu efeito com adição do PEG (polietilenoglicol) em dois níveis (8% e 16% PEG), totalizando com o tratamento controle (sem adição de leguminosa) 10 tratamentos.

2.5.1 Substrato

Uma amostra de 0,7 gramas de cada espécie forrageira foi pesado e transferido para um frasco (125 mL). Uma dieta de feno de *Urochloa brizantha* cv. Marandu foi utilizado como controle.

As incubações *in vitro* foram realizadas em três dias separados e em duplicata de forma que ao final do mesmo foram obtidas 6 repetições de cada tratamento (replica 1; 20 de janeiro de 2016, replica 2; 27 de janeiro de 2016 e replica 3; 04 de fevereiro de 2016). Foram incluídos 22 frascos de fermentação por período (10 tipos de substrato x 2 frascos por tratamento + 2 frascos sem substrato (branco) em que apenas o inóculo foi adicionado).

2.5.2 Inóculo

O líquido ruminal, utilizado na incubação *in vitro*, foi coletado de dois novilhos (peso médio 291± 22,6 kg) fistulados no rúmen. Os novilhos foram alimentados com uma dieta composta por 52,2% de concentrado, 13,45% de feno de alfafa e 34,55% de silagem de milho, durante pelo menos 14 dias antes da primeira coleta de líquido ruminal para executar as incubações *in vitro*. A coleta do líquido foi realizada via fistula em várias partes do rúmen de forma a obter uma mistura homogênea e com maior representatividade do ambiente ruminal. O líquido ruminal foi filtrado em membrana dupla de gaze e o mesmo foi transportado ao laboratório em garrafas térmicas pré-aquecidas (39°C).

Cada frasco de 125 mL continha 0,7g de substrato-base (aproximadamente 0,67g de MS) e 50 ml da mistura anaeróbica (Tampão de McDougall: líquido ruminal na proporção de 3:1). Após a adição do inóculo aos frascos, estes foram tampados com rolha de borracha, selados e colocados em uma câmara de fermentação durante 48 horas a 39 °C em agitação constante de 60 rotações por minuto (rpm).

O desaparecimento *in vitro* da matéria orgânica (DIVMO) foi realizada por incubação em um conjunto separado de tubos de polipropileno de 100 mL em duplicata durante 24 h a

39 ° C em cada um dos dias replicados. Foi adicionado 0,7 g de substrato e 50 mL de uma mistura 3:1 de tampão de McDougall: fluido ruminal. Após uma incubação de 24 h com fluido ruminal, foi adicionada uma solução de pepsina/HCl e os tubos foram incubados durante mais 24 h antes de se filtrar e incineração, para determinar a matéria orgânica não digerida.

2.5.3 Determinação da produção de gás total e metano

Após 48 horas de incubação os frascos de fermentação foram submersos em banho de gelo por 15 minutos para interromper o processo de fermentação e após este período permaneceram por mais 15 minutos em temperatura ambiente (**Figura 1**).

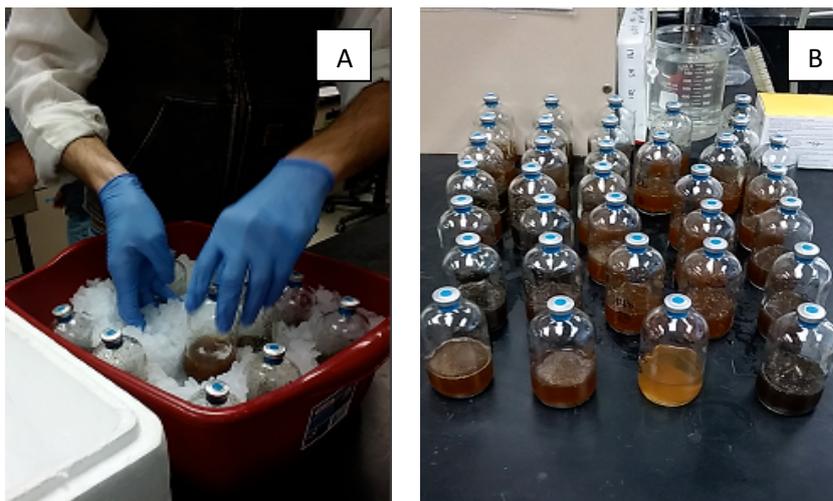


Figura 1. A- Após as 48 h de incubação colocou o material sobre o gelo com intuito de parar a fermentação. B- Após os 15 minutos sobre o gelo retirou os frasco e colocou em temperatura ambiente por igual período. Fonte: Arquivo Pessoal

A aferição da produção de gás e metano foi determinada pelo método de deslocamento de água em uma bureta invertida, conforme descrito por Kung et al. (2000). Uma agulha de calibre 14 ligada a bureta invertida de 250 mL foi utilizada para perfurar a rolha de borracha de cada frasco de 125 mL (**Figura 2**).

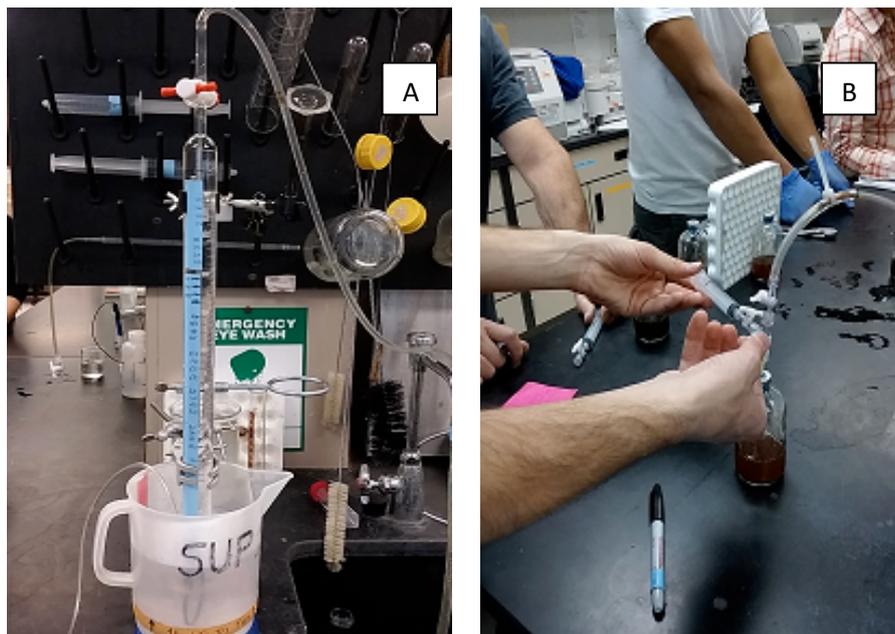


Figura 1. A- Coleta da produção total de gás após as 48h pelo o método da bureta invertida. B- Coleta do gás metano. Fonte: Arquivo Pessoal

A produção de gás foi calculada medindo os mililitros de água deslocada. Depois a pressão foi liberada e coletou-se a amostra de gás (10 mL) a partir do espaço superior do frasco utilizando uma agulha de calibre 14 ligada a uma válvula de 2 vias conectada a uma seringa. Uma vez que a amostra de gás foi coletada a válvula foi fechada e a agulha foi removida do frasco. A amostra de gás (10 mL) foi utilizada para medir a concentração de CH₄ por cromatografia em fase gasosa. Após a coleta da produção total de gás e CH₄ os frascos foram abertos e o pH imediatamente medido utilizando (Orion Thermo 710 metros pH, Beverly, MA).

2.5.4 Determinação de pH, nitrogênio amoniacal (N-NH₃) e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

Para a determinação dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e nitrogênio amoniacal (N-NH₃) foram retiradas alíquotas ao final da medição do pH e imediatamente colocadas no freezer a - 20°C para futuras análises .

As concentrações de N-NH₃ da amostra do fluido incubado foram medidas após a centrifugação a 10000 x g (força g) durante 15 min a 4°C (Avanti JE, Beckman Coulter, Inc., Palo Alto, CA) seguindo a técnica de fenol-hipoclorito descrito por Broderick e Kang (1980) com a seguinte modificação: a absorvância foi lida a 620 nm, em placas de 96 poços de fundo plano, utilizando um leitor de placas (DU-500, Beckman Coulter, Inc.).

A análise de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) das amostras foi determinada numa solução à base de água utilizando a acetato de etila. As amostras foram centrifugadas durante 10 min a 10.000 x g. Cinco mililitros do sobrenadante do líquido ruminal foram misturados com um mL da solução de ácido metafosfórico: ácido crotônico (padrão interno) e as amostras foram congeladas durante uma noite, descongeladas e centrifugadas durante 10 min a 10.000 x g. O sobrenadante foi transferido para tubos de ensaio e misturado com acetato de etila numa proporção de 2:1 de acetato de etila para sobrenadante. Após agitação dos frascos vigorosamente, a fração de acetato de etila subiu para o topo e uma sub-amostra

foi transferida para um frasco. As amostras foram analisadas por cromatografia em fase gasosa (GC Agilent 7820A, Agilent Technologies, Palo Alto, CA) utilizando-se um detector de ionização de chama e uma coluna capilar (CP-Wax 58 FFAP 25 m 0,53 milímetros, Varian CP7767).

2.6 Análises Estatísticas

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com sete tratamentos e quatro repetições. Os resultados dos percentuais de frações do tanino condensado (tanino solúvel (TCE), tanino aderido à proteína (TCPB), tanino aderido à fibra (TCFB) e taninos condensados totais (TCT)), peso da massa molecular (Mw) e as proteínas precipitáveis por fenóis (PPP) foram submetidos à análise de variância onde as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) através do programa estatístico (RStudio).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com dez tratamentos e seis repetições. Os dados para as variáveis dependentes produção de gás total (PGT), metano total (CH_4 total), metano em cima da matéria seca incubada (CH_4 -inc), metano em cima da matéria seca fermentada (CH_4 -ferm), concentração de amônia (N- NH_3), ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), pH e digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica (DIVMO) foram submetidos à análise de variância onde as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) através do programa estatístico (RStudio).

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

Os resultados da análise química e quantificação dos constituintes de TC são apresentados na Tabela 1, nota-se grande variação entre as espécies. A gramínea usada como controle apresentou baixa PB e o maior valor de FDN ($P \leq 0,05$) e valor intermediário no teor de FDA, já os constituintes de TC não foram avaliados. A cratilia e gliricídia não apresentaram TC aderido à fração solúvel (TCE) e fibra (TCFB), somente traços aderido a PB, em relação à precipitação de proteínas (PPP) não foi detectado, entretanto, mostrou características nutricionais favoráveis, como maiores teores de PB ($P \leq 0,05$), sendo ótimas como fonte de nutrientes, caracterizando-as como uma opção econômica de alimento para produção animal.

O estilosantes, guandu e fração casca do sabiá apresentaram níveis moderados para as frações do TC com variação ($P \leq 0,05$) entre elas. Já a flemingia e fração folha do sabiá, ao contrário, apresentaram os mais elevados valores de TC, entretanto, mostrou algumas características nutricionais favoráveis, como valores intermediários de PB.

Tabela 1. Constituintes de taninos condensados (TCE = taninos condensados extraíveis; TCPB = tanino condensado aderido à proteína; TCFB = tanino condensado aderido à fibra e TCT = total de tanino condensado; PPP= proteínas precipitáveis por fenóis e Mw= peso médio da massa molecular) e Teores médios de proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) das leguminosas e gramínea (*Urochloa brizantha* cv. Marandu).

| Plantas | TCE | TCPB | TCFB | TCT | PPP | Mw | PB | FDN | FDA |
|--------------|-------------------|-------------------|------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Controle | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 12,5 ^c | 68,0 ^a | 39,8 ^c |
| Cratilia | ND | 0,09 ^e | ND | ND | ND | 791 ^e | 22,0 ^a | 62,0 ^b | 28,0 ^e |
| Estilosantes | 0,90 ^e | 1,43 ^d | ND | 2,33 ^e | 0,32 ^d | 1168 ^a | 21,2 ^a | 53,0 ^c | 29,5 ^e |
| Flemingia | 4,06 ^b | 5,26 ^a | ND | 9,33 ^b | 4,22 ^b | 999 ^b | 17,6 ^b | 50,7 ^d | 38,7 ^c |
| Gliricídia | ND | 3,55 ^c | ND | 3,57 ^d | ND | 737 ^e | 21,8 ^a | 52,1 ^d | 32,7 ^d |
| Guandu | 2,46 ^c | 0,83 ^d | ND | 3,29 ^d | 3,75 ^b | 838 ^d | 20,8 ^a | 54,7 ^c | 42,3 ^b |
| Sabiá Folha | 7,95 ^a | 4,42 ^b | ND | 12,38 ^a | 15,97 ^a | 917 ^c | 18,2 ^b | 42,8 ^e | 48,3 ^b |
| Sabiá Casca | 1,48 ^d | 3,52 ^c | ND | 5,02 ^c | 1,08 ^c | 993 ^c | 8,4 ^d | 33,1 ^f | 58,1 ^a |

Letras iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey. ND= não detectado

De acordo com Waghom et al. (1990), o nível de tanino não deve ultrapassar 4% da matéria seca na dieta para ruminantes, sendo que valores maiores que o citado comprometerão o consumo da forragem, ocasionando problemas com a digestão de proteínas. Apesar de algumas leguminosas terem níveis de taninos aceitáveis em uma dieta para ruminantes é importante esclarecer que somente a utilização dela não é aconselhável, pois pode levar o animal a ter problemas, como o timpanismo espumoso (DALTO et al., 2009). É relatado que o consumo de plantas com níveis de 3-4% da MS de TC por ruminantes pode estar relacionado a efeitos positivos, com 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: redução do consumo e da digestibilidade, inibição de enzimas digestíveis e perdas de proteínas endógenas (GETACGEW et al., 2000).

A produção total de gás (PGT), metano total (CH₄-total), metano com base na matéria seca incubada (CH₄ inc), metano com base na matéria seca fermentada (CH₄ ferm), pH, amônia (N-NH₃) e digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica (DIVMO) são apresentados na

Tabela 2. As leguminosas forrageiras adicionadas à dieta e a inclusão do polietilenoglicol (PEG) nos níveis de 8 e 16% da matéria seca (MS) para leguminosa sabiá na fração folha (SABf- que teve o maior teor de TC, aproximadamente 16 % na base da MS) tiveram diferenças para as variáveis analisadas ($P \leq 0,05$).

Tabela 2. Efeito das diferentes leguminosas tropicais controle= *Urochloa brizantha* cv. Marandu (CTL), cratília (CRA), estilosantes (ETL), flemingia (FLE), gliricídia (GLI), guandu (GUA), sabiá fração casca (SABc), sabiá fração folha (SABf) mais o efeito da inclusão de 8 e 16 % de polietilenoglicol (PEG) na leguminosa sabiá fração folha (SAB-8PEG e SAB16-PEG) sobre os parâmetros de fermentação *in vitro*.

| Variáveis | Tratamentos | | | | | | | | %CV | P |
|------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------|------|
| | CTL | CRA | ETL | FLE | GLI | GUA | SABc | SABf | | |
| PGT | 70,33 ^a | 40,80 ^b | 75,85 ^a | 28,00 ^c | 71,17 ^a | 27,82 ^c | 20,25 ^c | 20,99 ^c | 11,05 | **** |
| CH ₄ -Total | 4,95 ^{ab} | 5,83 ^a | 6,11 ^a | 2,61 ^b | 5,70 ^a | 2,19 ^b | 3,56 ^{ab} | 1,93 ^b | 26,0 | *** |
| CH ₄ inc. | 0,79 ^a | 0,81 ^a | 1,21 ^a | 0,02 ^b | 1,05 ^a | 0,18 ^b | 0,23 ^b | 0,05 ^b | 31,3 | **** |
| CH ₄ ferm. | 1,53 ^{ab} | 1,96 ^{ab} | 2,08 ^a | 0,05 ^c | 1,79 ^{ab} | 0,82 ^c | 0 ^d | 0,44 ^c | 49,76 | *** |
| pH | 6,42 | 6,62 | 6,40 | 6,58 | 6,53 | 6,63 | 6,72 | 6,70 | 3,42 | Ns |
| N-NH ₃ | 0,48 ^c | 15,25 ^b | 12,20 ^b | 2,43 ^c | 21,40 ^a | 4,0 ^c | 3,06 ^c | 0,55 ^c | 25,47 | **** |
| DIVMO | 52,68 ^a | 42,04 ^b | 59,17 ^a | 25,5 ^c | 59,26 ^a | 26,60 ^c | 0 ^e | 12,18 ^d | 8,71 | **** |

| Variáveis | Tratamento com PEG (%) | | | | %CV | P |
|------------------------|------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------|------|
| | CTL | SABf | SAB-8 | SABf- 16 | | |
| PGT | 70,33 ^a | 20,99 ^c | 48,00 ^b | 56,00 ^b | 13,59 | **** |
| CH ₄ -Total | 4,95 ^{ab} | 1,93 ^b | 5,52 ^a | 6,08 ^a | 28,85 | *** |
| CH ₄ inc. | 0,79 ^a | 0,05 ^b | 0,72 ^a | 0,85 ^a | 32,03 | *** |
| CH ₄ ferm. | 1,53 ^b | 0,44 ^c | 2,40 ^a | 2,23 ^{ab} | 45,82 | *** |
| pH | 6,42 | 6,70 | 6,51 | 6,50 | 3,33 | ns |
| N-NH ₃ | 0,48 ^c | 0,55 ^c | 8,23 ^b | 14,28 ^a | 33,56 | **** |
| DIVMO | 52,68 ^a | 12,18 ^c | 30,33 ^b | 34,99 ^b | 6,81 | **** |

PGT= produção de gás total- 48 horas (mL/g MS); CH₄-Total= produção total de metano (mL/g MS); CH₄ inc.= produção de metano de acordo com a MS incubada (mmol/g MS incubada); CH₄ ferm.= produção de metano de acordo com MS fermentada (mM/g MS fermentada); N-NH₃= amônia (mg/dL); DIVMO= digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica. %CV= coeficiente de variação; médias na mesma linha com letras diferentes diferem estatisticamente ($P \leq 0,05$); P= significância do modelo sendo *** $\leq 0,05$ **** $\leq 0,001$; ns= não significativo

Houve diferença ($P \leq 0,001$) quanto à PGT entre as plantas testadas, que variou de 70,33 a 20,25 mL/mg MS na seguinte ordem decrescente: ECT > GLI > CTL > CRA > FLE > GUA > SABf > SABc. Para o tratamento com PEG não teve diferença significativa ($P \geq 0,05$) quanto ao nível (8 e 16% PEG), tendo a seguinte ordem decrescente: CTL > SABf 16 > SABf 8 > SABf. A fermentação foi influenciada pela presença de TC nas leguminosas assim como a qualidade nutritiva das mesmas. O SABf apresentou os maiores teores de TC juntamente com

alta porcentagem de FDA. Estes dados corroboram com os encontrados por Longo et al. (2012), segundo os autores essa baixa PGT deve se ao reflexo da ação conjunta da quantidade de fibra pouco digestível (FDA) e alta quantidade de TC presente na espécie. No presente ensaio, observou-se que as leguminosas com presença satisfatória de TC (SABf, FLE, GUA, e a fração do SABc) não tiveram valores altos para PGT como pelas leguminosas que apresentaram traços ou inexistência do TC. Segundo Getachew et al. (2005), a fração lentamente digestível na alimentação está associada com maior produção de metano. Conforme mencionado por Meale et al. (2012), o aumento da produção total de gás, tende a promover o aumento da produção de metano por g de matéria seca ingerida. Em geral, dietas que proporcionam alta taxa de digestão reduzem a emissão de CH₄, já que o alimento não permanece por tempo prolongado no rúmen. A quantidade de forragem na dieta, o método de preservação, o estágio de crescimento da planta forrageira, o tamanho de partícula e o grau de moagem, a quantidade de grãos na dieta e a adição de lipídeos e aditivos como os modificadores da fermentação como tanino, são importantes componentes que afetam a produção de metano no rúmen (JOHNSON e JOHNSON, 1995; STRADIOTTI JÚNIOR et al., 2004).

Os resultados demonstraram que houve uma correlação negativa entre esses parâmetros para a leguminosa com alto teor de TC, pois o PEG agiu sobre esse efeito aumentando os valores para bem próximo do CTL. O polietilenoglicol apresenta moléculas de oxigênio suficiente para formar fortes ligações com os grupos fenólicos e hidroxilas dos taninos, sendo assim, estas moléculas se ligam aos taninos impedindo que estes se liguem as proteínas disponibilizando maior quantidade de substrato, o que é relatado pela maior produção de gases.

A inibição da produção CH₄-total em relação ao controle ($P \leq 0,05$) diferiu entre as plantas, tendo mesma tendência para a PGT, variando de 6,11 a 1,93 mL/g de gás. As leguminosas que diferiram do controle foram FLE, GUA e SABf. Essa variação ocorreu principalmente para as leguminosas com presença moderada a alta de TC. Dietas com plantas contendo tanino podem diminuir a degradação protéica ruminal, diminuir as excreções de nitrogênio e, conseqüentemente, aumentar a retenção de nitrogênio no rúmen. O tanino condensado da espécie *Lotus corniculatus* aumentaram a produção de leite das vacas, e a lã de ovelhas cresceram mais finas (MCNABB et al., 1993; BARRY e MCNABB, 1999; MIN et al., 2003). No entanto, em doses elevadas, eles também influenciam negativamente a degradação da parede celular da planta em ruminantes (SILANIKOVE et al., 2001) e o consumo voluntário (ZIMMER e CORDESSE, 1996; MCNABB et al., 1996).

Tiemann et al. (2008), avaliando dietas ricas em tanino observaram menor degradabilidade da MS e menor produção de gás, mas não alterou a concentração de metano. Esta redução pode ser, em parte, devido à interferência de taninos na degradabilidade da parede celular através da inibição das enzimas microbianas e a adesão de populações fibrolíticas, reduzindo assim a concentração na produção de gás do rúmen. Os resultados deste estudo corroboram com o de Bhatta et al. (2013) e Anantasook et al. (2014) que relataram que a concentração de CH₄ no rúmen foi reduzida quando houve presença de tanino na dieta. Varias são as tentativas para estudar o real efeito da atividade biológica dos taninos sobre os ruminantes, entretanto, são vários os fatores que podem afetar tais funções como a estrutura do tanino, como também a natureza dessas proteínas (SCHOFIELD et al., 2001; REED, 1995). A grande variação dentro dos grupos de plantas oferece a oportunidade de selecionar espécies e até mesmo diferentes acessos da mesma espécie para baixo potencial metanogênico, quando consumido por ruminantes.

As leguminosas e os níveis de PEG no SABf não foram capazes de modificar ($P \geq 0,05$) o pH em relação ao tratamento controle. A manutenção do pH ruminal em condições normais, entre 6,0 e 7,0, deve-se a produção de ácidos graxos voláteis que, associada ao processo de

ruminação promove o aumento do fluxo de saliva (alto poder tamponante), o qual é capaz de neutralizar a acidez no rúmen (MOREIRA et al., 2009). O pH do meio é peça fundamental no sistema de regulação das vias metabólicas do organismo. A produção de hidrogênio ocorre no processo de acidificação do processo metabólico. O pH do sistema também influencia o substrato a ser metabolizado, a síntese microbiana, síntese de material de reserva e a liberação do subproduto do metabolismo. Na maior parte dos estudos, butirato e acetato são os dois principais produtos, enquanto baixos pH parecem favorecer a produção de butirato. A produção de propionato aumentou substancialmente em pH acima de 7,0. Estudos investigando o perfil dos produtos de fermentação mostraram que butirato foi o produto predominante (até 45,6%) em pH igual ou menor que 6,0, enquanto acetato se tornou predominante (até 34,1%) em pH maior ou igual a 6,5 (KOTHARI et al., 2012).

Estudos mostram correlação entre a redução de pH e o aumento da produção de metano (MCGEOUGH et al., 2010). Segundo Pereira et al. (2011), o pH ótimo para crescimento das metanogênicas está na faixa de 6,0 a 7,5, e o limite mais baixo entre 5,5 e 6,5. Neste experimento os valores de pH obtidos possivelmente não afetaram a atividade das metanogênicas em nenhum dos tratamentos avaliados.

Uma vez que os taninos são reconhecidos como ligantes da proteína, as leguminosas GUA, FLE, SABc e SABf foram capazes de modificar ($P \leq 0,05$) a concentração de N-NH₃ (mg/dL) juntamente com o CTL que também apresentou valores inferiores comparado as leguminosas com traços e ausência do TC, são esses: ETL, CRA e GLI. As proteínas e o tanino hidrolisado (TH), geralmente, formam complexos em um intervalo de pH ótimo de 3-4, mas estes complexos também pode ocorrer a um pH de 6-7 (LEINMULLER e MENKE, 1990). Algumas bactérias ruminais podem dissociar o complexo TH-proteína. No entanto, a dissociação do complexo TC-proteína não é fácil (MCSWEENEY et al., 2001). Segundo Russel et al. (1992), quanto maior a degradabilidade da proteína, maior será a produção de amônia e, possivelmente, maiores serão as perdas de nitrogênio protéico através da excreção de compostos nitrogenados na forma de ureia pela urina do animal. As plantas com ausência de TC teve a degradabilidade da proteína maior, resultando em maior concentração de N-NH₃, possivelmente houve uma inibição de deaminase microbiana pelos taninos (LEINMULLER e MENKE, 1990).

Descobertas semelhantes foram também observados por Min et al. (2003), que verificaram que as populações das bactérias celulolíticas *Butyrivibrio fibrisolvens* foram menores quando as ovelhas receberam uma dieta de feno do trevo-branco (*Trifolium repens*) com ausência de TC a uma dieta de *Lotus corniculatus* contendo TC (32 g TC kg⁻¹MS). Com isto houve um aumento da concentração de aminoácidos essenciais e perda de amônia pelo rúmen, o que demonstrou ser um efeito do TC na desaceleração das taxas de degradação microbiana no rúmen da proteína das forragens.

Puchala et al. (2005) relataram que as concentrações de amônia foram menores em cabras alimentadas em pastagens de *Sericea lespedeza* contendo altos teores de TC, em relação a gramínea. Williams et al. (2011), em experimentação *in vitro*, reportaram menores valores de amônia para a dieta contendo o maior valor de TC. Entretanto, em ensaio com ovelhas, Toral et al. (2011) não encontraram efeito da adição de extratos comerciais de TC sobre a concentração de amônia.

Os aditivos químicos como Ionóforo e os naturais compostos secundários como o TC podem minimizar a concentração de amônia ruminal, por meio da inibição das bactérias proteolíticas (YANG e RUSSEL, 1993) e, no caso dos taninos, também ocorre a redução da desaminação ruminal seja por sua complexação com as enzimas (BAE et al., 1993) ou mesmo com a proteína da dieta, indisponibilizando o substrato para os microrganismos (McSWEENEY et al., 2001; MEZZOMO et al., 2011). Assim o consumo de forragens com presença de tanino pode ser de interesse no desenvolvimento de novos aditivos na

alimentação de ruminantes, tendo necessidade de saber o nível ótimo para se obter supressão máxima de metano sem qualquer efeito adverso sobre a redução da digestibilidade e produção animal.

Houve diferença ($P \leq 0,05$), para digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica (DIVMO) entre as leguminosas e o controle. Observou-se menor digestibilidade ($P \leq 0,05$) para FLE, GUA e SABf, em relação ao CTL, não sendo digestível o SABc. A população microbiana é afetada em altas concentrações de TC, havendo diminuição devida inibição da atividade enzimática a partir da formação de complexos tanino-enzima, logo acarreta a queda da digestibilidade da MS (GUIMARÃES-BEELLEN et al., 2006). CHIQUETTE et al. (1988) sugeriram que as bactérias aderentes penetram melhor nos tecidos contendo baixos teores de taninos.

A redução da degradação da matéria seca pode estar também relacionada a alguns componentes inerentes à própria planta, como o grau de lignificação e proteção da cutícula que formam uma barreira à adesão e a degradação pelas bactérias do rúmen (MCALLISTER et al., 1994). Devido à presença de metabólitos secundários com ação antimicrobiana no nestas leguminosas (acima aproximadamente de 4% da MS) a degradação da matéria seca da pode ter sido diminuída. Barry et al. (1986), descreveram que concentrações de 30-40g kg⁻¹MS, de taninos condensados na espécie de *Lotus*, promoveu proteção da proteína dietética da excessiva degradação ruminal, sem afetar o consumo de forragem ou digestão da fibra.

Segundo Van Soest (1994) os taninos e outros polifenóis protegem a celulose e a proteína da degradação ruminal. A condensação dos ácidos fenólicos (taninos) leva a formação de lignina, sendo seus principais precursores (BRITO et al., 2003). Estes promovem a redução da digestibilidade da celulose, por limitar a ação da celulase sobre a celulose, porque os feixes de celulose se apresentam dispersos em uma matriz de hemicelulose e lignina (BRITO et al., 2003).

As concentrações da razão A:P, AGCCt, ACE, PRO, BUT, ISOBUT, ISOVAL, VAL e CAP, foram alteradas ($P \leq 0,05$) pelas diferentes leguminosas avaliadas (Tabela 3). Para o tratamento com PEG não teve diferença significativa ($P \geq 0,05$) para as concentrações da razão A:P, ACE, PRO, BUT.

A razão A:P foi maior em SABf ($P \leq 0,05$), seguindo a seguinte ordem decrescente: SABf > ETL > CRA > GLI > CTL > FLE > GUA > SABc. A GLI apresentou maior concentração de AGCCt (mmol/l) não diferindo do ETL ($P \geq 0,05$). A CRA, FLE e GUA tiveram valores abaixo do CTL e superiores ao SABc e SABf ($P \leq 0,05$). A menor concentração de ACE foi para leguminosa GUA e que não diferiu das outras leguminosas estudadas ($P \geq 0,05$). A concentração de PRO não diferiu entre as leguminosas e o CTL ($P \geq 0,05$). O BUT foi menor para o GUA ($P \leq 0,05$) não diferindo as demais leguminosas do controle ($P \geq 0,05$). Entre as leguminosas e o controle, os ácidos graxos ISOBUT, ISOVAL e o VAL tiveram a mesma sequência decrescente: CRA > GLI > ETL > SABc > CTL > FLE > GUA > SABf. Para o tratamento com PEG a inclusão não teve diferença na sequência decrescente para estas porções do AGCC: SABf 16 > SABf 8 > CTL > SABf.

Tabela 3. Efeito das diferentes leguminosas tropicais: cratília (CRA), estilósantes (ETL), flemingia (FLE), gliricídia (GLI), guandu (GUA), sabiá fração casca (SABc), sabiá fração folha (SABf) em relação ao controle= *Urochloa brizantha* cv. Marandu (CTL) mais o efeito da inclusão de 8 e 16 % de polietilenoglicol (PEG) na leguminosa sabiá fração folha (SAB-8PEG e SAB16-PEG) sobre a razão de acetato: propionato, a concentração total de AGCC (mM) e proporções de AGCC (mmol / 100 mol) *in vitro*.

| Variáveis | Tratamentos | | | | | | | | %CV | P |
|-----------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|-------|------|
| | CTL | CRA | ETL | FLE | GLI | GUA | SABc | SABf | | |
| Razão A:P | 1,25 ^{abc} | 1,38 ^{abc} | 1,49 ^{ab} | 1,07 ^{bc} | 1,33 ^{abc} | 0,97 ^c | 1,05 ^{bc} | 1,66 ^a | 13,8 | *** |
| AGCCt | 97,86 ^b | 83,90 ^c | 104,84 ^{ab} | 76,22 ^{cd} | 109,55 ^a | 72,54 ^d | 60,82 ^e | 53,27 ^e | 3,69 | **** |
| ACE | 48,27 ^{ab} | 49,7 ^{ab} | 52,86 ^{ab} | 46,0 ^{ab} | 50,46 ^{ab} | 45,34 ^b | 46,36 ^{ab} | 55,41 ^a | 6,58 | *** |
| PRO | 39,75 | 37,29 | 36,30 | 45,17 | 38,70 | 47,49 | 41,63 | 35,11 | 11,27 | *** |
| BUT | 9,98 ^a | 9,44 ^{ab} | 7,68 ^{ab} | 6,24 ^{ab} | 7,32 ^{ab} | 5,72 ^b | 9,34 ^{ab} | 8,17 ^{ab} | 17,26 | *** |
| ISOBUT | 0,38 ^d | 0,74 ^a | 0,62 ^b | 0,29 ^e | 0,71 ^{ab} | 0,21 ^e | 0,50 ^c | 0,20 ^e | 7,13 | **** |
| ISOVAL | 0,54 ^c | 1,22 ^a | 1,10 ^a | 0,35 ^d | 1,17 ^a | 0,20 ^d | 0,70 ^b | 0,27 ^d | 8,25 | **** |
| VAL | 1,03 ^c | 1,59 ^a | 1,46 ^{ab} | 1,15 ^b | 1,52 ^a | 1,01 ^c | 1,33 ^{ab} | 0,82 ^d | 8,89 | **** |
| CAP | 0,04 ^{ab} | 0 ^b | 0,01 ^{ab} | 0 ^b | 0,09 ^a | 0 ^b | 0 ^b | 0 ^b | 117,0 | *** |

| Variáveis | Tratamento com PEG (%) | | | | %CV | P |
|-----------|------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------|------|
| | CTL | SABf | SAB-8 | SABf- 16 | | |
| Razão A:P | 1,25 | 1,66 | 1,55 | 1,50 | 15,26 | ns |
| AGCCt | 97,86 ^a | 53,27 ^d | 82,14 ^c | 90,88 ^b | 3,21 | **** |
| ACE | 48,27 | 55,41 | 52,76 | 51,44 | 5,36 | ns |
| PRO | 39,75 | 35,11 | 35,81 | 35,90 | 10,04 | ns |
| BUT | 9,98 | 8,17 | 8,00 | 8,77 | 11,97 | ns |
| ISOBUT | 0,38 ^c | 0,20 ^d | 0,57 ^b | 0,69 ^a | 6,54 | **** |
| ISOVAL | 0,54 ^c | 0,27 ^d | 0,98 ^b | 1,19 ^a | 4,81 | **** |
| VAL | 1,03 ^c | 0,82 ^d | 1,83 ^b | 1,98 ^a | 3,71 | **** |
| CAP | 0,04 | 0 | 0,01 | 0 | 113,5 | ns |

A:P= razão acetato: propionato; AGCCt= concentração total de ácidos graxos de cadeia curta; ACE= acetato; PRO= propionato; BUT= butirato; ISOBUT= isobutirato; ISOVAL= isovalérico; VAL= valérico; CAP= caprótico. %CV= coeficiente de variação; médias na mesma linha com letras diferentes diferem estatisticamente ($P \leq 0,05$); P= significância do modelo sendo *** $\leq 0,05$ **** $\leq 0,001$; ns= não significativo

Para entender as variações nas produções de CH₄ é importante o conhecimento do total e perfil dos AGCC (ARCHIMÈDE et al., 2011), já que existe uma forte correlação negativa entre a proporção de propionato nos AGCC produzidos e a quantidade de CH₄ formado (RUSSEL, 1998). Contudo, as variações observadas na produção do propionato entre as diferentes leguminosas do presente trabalho, ocasionou forte alterações na diminuição da produção de CH₄ para a FLE, GUA e SABf estas que apresentaram os maior teores de TC. A produção de AGCC esta relacionada com o crescimento microbiano, assim como os gases eliminados pelos microorganismos no processo de obtenção de ATP para seu crescimento, logo quanto maior a quantidade de ATP, maior a massa microbiana e menor a relação de AGCC e/ou gás por unidade de matéria orgânica digerida. Estes resultados corroboram com Makkar et al. (1995) que concluiu que a inclusão de uma dieta com presenças de compostos secundários com o tanino e/ou saponina os nutrientes degradados são preferencialmente direcionados para a síntese microbiana apesar dessas plantas diminuïrem a produção de AGCC e degradação da celulose.

4 CONCLUSÕES

As leguminosas estilosantes, flemingia, guandu, sabiá que tem presença de tanino, apresentaram potencial uso como mitigador de metano, no entanto, os efeitos ainda oferecem variadas respostas com relação à forrageira e os níveis a serem utilizados. Desta forma, mais estudos devem ser realizados, já que vários fatores relacionados não somente com o conteúdo de TC influenciam, mais também a estrutura, peso molecular, estado fisiológico da planta, como também as condições climáticas a qual estas plantas estão condicionadas.

As leguminosas cratilia e gliricídia que não apresentam tanino são uma opção para ser utilizada como banco de proteína em períodos de escassez de forragem, já que para fim como aditivo sua atividade biológica em nível de rúmen seria baixa.

CAPÍTULO IV

EFEITO DO TANINO CONDENSADO EM LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS TROPICAIS SOBRE LARVAS DE *HAEMONCHUS CONTORTUS*

RESUMO

Os parasitas gastrintestinais constituem um dos principais fatores limitantes na produção de pequenos ruminantes, principalmente pela ocorrência da resistência aos anti-helmínticos sintéticos, o que faz aumentar perdas dentro da criação. Portanto, o uso de plantas bioativas no controle de helmintos em todo mundo tem se mostrado promissor. Este trabalho teve como objetivo através da técnica de inibição da migração larval (IML) *in vitro* determinar se os constituintes do tanino condensado (TC) das leguminosas forrageiras tropicais *Cajanus cajan* (guandu-GUA), *Gliricidia sepium* (gliricídia-GLI), *Stylosanthes spp* (estilosantes-EST), *Flemingia macrophylla* (flemingia-FLE), *Cratylia argentea* (cratilia-CRA), *Mimosa caesalpineafolia* (sabiá) sendo que esta leguminosa apresenta a fração casca e folha (SABc e SABf) e o controle positivo com o uso de Ivermectina tem ação anti-helmíntica sobre as larvas infectante L3 de *Haemonchus contortus* (HC). Entre as leguminosas estudadas a fração folha do sabiá e guandu não diferiram entre si ($P \geq 0,05$), com as maiores porcentagens IML (34,75% e 34,33%). As leguminosas GUA, FLE e SABc não diferiram entre si ($P \geq 0,05$), apresentando moderados valores de IML (30,25%, 30,0% e 29,75%, respectivamente). Entre as leguminosas estudadas a menor porcentagem de IML foi para CRA (18,46%), GLI (23,75%) e controle negativo (liquido de rúmen e tampão) valores próximos do controle positivo com Ivermectina (22,0%). O fato de algumas espécies testadas não terem apresentado efeito relevante, pode estar relacionado ao conteúdo de 25% de leguminosas na dieta, desta forma, a concentração pode ter sido baixa, considerando que as plantas foram utilizadas como produtos fitoterápicos.

Palavras chave: Controle Parasitário. Helmintos. Ruminantes.

ABSTRACT

Gastrointestinal parasites are one of the main limiting factors in small ruminant production, especially due to the occurrence of resistance of synthetic anthelmintics, what makes increase the losses inside of the herd. Therefore, the use of bioactive plants for the control of helminths all over the world has shown itself promising. This work aimed, by the “larval migration inhibition” technique (LMI) *in vitro*, determine if the constituents of condensate tannins (CT) from the tropical forage legumes: *Cajanus cajan* (guandu-GUA), *Gliricidia sepium* (gliricidia-GLI), *Stylosanthes spp* (estilosantes-EST) *Flemingia macrophylla* (flemingia-FLE), *Cratylia argentea* (cratilia-CRA), *Mimosa caesalpineafolia* (sabiá) (this legume with peel and leaf fraction – SABc and SABf) and the positive control with the use of Ivermectin have anthelmintic action on infective larvae L3 of *Haemonchus contortus* (HC). Among the legumes studied, the leaf fraction of SABf and GUA has not shown difference ($P \geq 0.05$), with the greater LMI percentage (34.75% and 34.33%). The legumes GUA, FLE and SABc did not differ, presenting moderate values of LMI (30.25%, 30.0% and 29.75%, respectively). Among the legumes studied, the lowest LMI percentage was CRA (18.46%), GLI (23.75%) and negative control (rumen fluid and buffer), near values from the positive control with Ivermectin (22.0%). The fact of some tested species have not presented relevant effect may be related to the concentration of 25% of legumes in the diet, and so the concentration may have been low, considering that the plants were used as phytotherapeutic products.

Key words: Helminths. Parasite control. Ruminant.

1 INTRODUÇÃO

A complexidade do controle das infecções por nematóides no trato gastrointestinal (NGI) são um dos indicativos de ameaça na viabilidade econômica da produção de ruminantes, logo afeta o bem estar e saúde de bovinos, ovinos e caprinos, trazendo doenças como anemia, anorexia, que acabam por diminuir a digestão e absorção de nutrientes, ocorrendo perdas produtivas nas criações (HOLMES, 1987; SYKES, 1994; HOSTE, 2001).

O controle dos parasitas em ruminantes baseia-se principalmente da utilização de anti-helmínticos sintéticos em combinação com o manejo das pastagens, entretanto o surgimento e a propagação da resistência anti-helmíntica entre as principais espécies de nematóides (*Haemonchus contortus*) tornou um dos principais desafios enfrentados nos programas de controle em todo o mundo (PRICHARD, 1994; VAN WYK et al., 2002). Além destes produtos serem de alto custo o que causa sua disponibilidade limitada para alguns agricultores em países em desenvolvimento (HAMMOND et al., 1997).

Dentre as alternativas que estão sendo pesquisadas para o controle do parasitismo gastrintestinal, destaca-se o uso de plantas bioativas, necessitando, entretanto, para seu emprego que suas eficácias sejam cientificamente comprovadas (VIEIRA, 2003). Os metabólitos secundários como os taninos, são amplamente encontrados nos vegetais e seus efeitos sobre a resiliência do hospedeiro e o parasitismo têm sido de muito interesse para os pesquisadores da área de saúde e nutrição animal, merecendo destaque, uma vez que poderão contribuir para a redução do uso de substâncias sintéticas e prolongar a vida útil dos medicamentos disponíveis (VIEIRA, 2008)

A atuação dos TC contra a população de nematódeos gastrintestinais pode ser na forma direta, com a capacidade que os taninos têm de agir no parasito formando complexo com membrana protéica do parasita (ADEMOLÁ et al., 2010; ALONSO-DIAZ et al., 2011), afetando severamente os processos biológicos dos nematódeos (HOSTE et al., 2006) e/ou indiretamente seu efeito na nutrição, havendo melhor aproveitamento da proteína da dieta pelo hospedeiro e conseqüentemente, ocorrendo uma melhor resposta imunológica deste aos parasitos (BUTTER et al., 2000; STRAIN; STEAR, 2001).

Entretanto, o exato mecanismo de ação é incerto e pode diferir dependendo do parasito e estágio de desenvolvimento da planta (MIN, 2003). Segundo Hoste et al. (2006) taninos podem afetar os processos biológicos dos nematódeos dependendo de onde e como os taninos se ligam com várias estruturas dos nematódeos tais como a bainha, cutícula, sistema digestivo ou reprodutivo. A diferença de susceptibilidade de larvas de *H. contortus* frente aos diferentes monômeros de taninos condensados pode estar relacionada à espécie de parasito e a composição da bainha e cutícula dos nematódeos (BRUNET; HOSTE, 2006).

Devido ao exposto, objetivou neste estudo através da técnica de inibição da migração larval (IML) *in vitro* determinar se os constituintes do tanino condensado (TC) da parte aérea das leguminosas forrageiras tropicais: *Cajanus cajan* (guandu-GUA), *Gliricidia sepium* (gliricídia-GLI), *Stylosanthes spp* (estilosantes-EST) *Flemingia macrophylla* (flemingia-FLE), *Cratylia argentea* (cratilia-CRA), *Mimosa caesalpineafolia* (sabiá) mais a fração casca do sabiá (SABf e SABc) sobre as larvas infectantes L3 do nematóde o *Haemonchus contortus* (HC) comparando com Ivermectina (controle positivo).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Origem e Colheita das Leguminosas

As leguminosas forrageiras *Cajanus cajan* (guandu), *Gliricidia sepium* (gliricídia), *Stylosanthes spp* (estilosantes), *Flemingia macrophylla* (flemingia), *Cratylia argentea* (cratília), *Mimosa caesalpineafolia* (sabiá) foram obtidas da área experimental “Terraço”, pertencente a Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ, situada na latitude 22^a 45’S, longitude 43 a 41’ W Grw. e altitude de 33 metros. As partes aéreas das leguminosas forrageiras foram colhidas entre outubro e novembro de 2013 sendo posta para secar em galpão ventilado com temperatura média de 28°C, no período de uma semana. As leguminosas que apresentaram maior teor de umidade foram colocadas em estufa a 55 °C por mais 48 horas. Após secagem o material foi moído em moinho tipo Willey utilizando peneiras de 1 mm de crivos, sendo em seguida encaminhado para as análises químicas no laboratório do centro de pesquisa Texas A&M AgriLife Research em Stephenville, Texas, EUA.

2.2 Quantificação dos Taninos Condensados (TC) pelo Método Ácido Butanol (butanol-HCl)

A concentração total de TC foi determinada em duas amostras de cada espécie de planta, como descrito por Terrill et al. (1992). A extração do TC extraível (TCE) foi a partir de 250 mg de tecido de plantas com 10 mL de acetona:água (70:30) seguido de 10 mL de éter etílico. O TC ligado à proteína bruta (TCPB) foi extraído a partir do resíduo da extração do TCE com 10 ml de dodecil sulfato de sódio/mercaptoetanol contendo 0,01 M de tris-HCL. O TC ligado à fibra bruta (TCFB) foi determinado usando-se os resíduos após a extração do TCE e do TCPB. As frações dos TC (tanino solúvel, tanino aderido à proteína, tanino aderido à fibra e taninos condensados totais) foram determinadas com base na absorvância a 550 nm na sequência reação com o HCL-butanol (5% v/v HCL).

2.3 Precipitação de Proteína

Para determinar a precipitação de proteínas por fenóis foi utilizado o método em escala reduzida descrito por Hagerman e Butler (1978), correlacionado aos TC, em extratos brutos de plantas realizados em amostras duplicadas. A precipitação da proteína foi determinada utilizando o extrato bruto devido às limitações na quantidade de TC purificado.

2.3.1 Extrato bruto de planta

Os extratos brutos das plantas foram preparados para cada espécie através da extração de 50 mg de tecido de planta com 1 mL de metanol: água (50:50), vortex para homogeneização, agitador rotativo durante 15 min seguido por centrifugação a 16000 x g durante 5 minutos em 4 °C.

2.3.2 Proteínas precipitadas por fenóis (PPP)

Para determinar as proteínas precipitadas por fenóis (PPP) ou PB, utilizou-se 50 µl de sobrenadante a partir do extrato bruto de cada espécie estudada, aos quais foram adicionado 250 µl de solução tampão A (0,20 M ácido acético, 0,17M NaCl, pH 4,9), 50 µl de albumina de soro bovino (5 mg/ml em tampão A) e 50 µl de metanol:água (50:50). Após repouso de 30 minutos em temperatura ambiente o material foi centrifugado 16.000 x g durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi aspirado e descartado e o sedimento (pellet) de fenólico - proteína foi lavado com 100 µl de tampão A antes de voltar a centrifugação e aspiração.

Para determinar o PPP, os pellets foram dissolvidos em 800 µL de Dodecil sulfato de sódio (1% w/v) -*trietanolamina* (5% v/v) antes da adição de 200 µl de FeCl₃ (0,01 M FeCl₃ em 0,01 M HCl). A absorbância de 510 nm foi lida após 15 min.

A curva padrão para PPP foi preparada em solução com TC purificado (1 mg ml) em água deionizada. Os níveis de 100-700 µL de solução de TC foram combinadas com 250 µl da solução tampão A (ácido acético 0,20 M, NaCl 0,17 M, pH 4,9) com 50 µL de BSA (5 mg/mL em tampão A) onde foi convertido para um volume final de 1 mL com água deionizada. Logo foi incubado à temperatura ambiente durante 30 min antes da centrifugação a 16000 x g durante 5 minutos a 4°C.

Para determinar PB, a reação de precipitação foi realizado exatamente como descrito acima, entretanto o pellet do BSA TC - proteína foi analisado por N para determinar proteína precipitada. O pellet foi submetido a um vórtice mais 500 µl de solução tampão A, a solução foi transferida para um copo da folha pré-pesado e deixou-se secar. O resíduo seco de fenólico-proteína foi analisado para N através de um Elementar Vario Macro C:N (Elementar Americas, Inc., Mt. Laurel, NJ, EUA). A Porcentagem de N foi convertida em proteína pela multiplicação por 6,25.

2.4 Peso Molecular dos Taninos Condensados (TC)

Para proceder as determinações das massas moleculares, utilizou-se o GPC (Cromatografia de permeação em gel -Gel PermeationChromatography) em sistema modular HPLC, como descrito por Huang et al. (2010). Primeiramente, amostras de extratos de TC purificados foram dissolvidos em 1 ml de tetrahidrofurano até uma concentração final de 0,5 mg/ml e 50 µL foram injetados em uma coluna de permeação em gel PLgel 3 mm Mixed-E (Agilent, Santa Clara, EUA), como fase estacionária, para as separações cromatográficas. Tetrahidrofurano foi utilizado como a fase móvel, com taxa de fluxo de 1,0 ml/min a 25 °C. Os pesos moleculares (Mw) foram calculados com base na curva de calibração estabelecida com padrões da PolystyreneLowEasiVials de 4 ml (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), com massas moleculares variando de 162 a 38.640 Dalton (Da). O relativo peso médio da massa molecular (Mw) e número médio da massa molecular (Mn) foram integrados e quantificados pelo Breeze Software (Waters Corporation, Milford, MA). Grau de polimerização (DP) é o número estimado de monômeros que compõem o polímero do TC purificada sendo calculado de acordo com Williams et al. (1983) no qual uma unidade simples de proantocianidina tem aproximadamente 500 Da de Mw, já o PDI (Mw/Mn) representa a distância do peso molecular distribuído do polímero.

2.5 Inibição da Migração Larval *In Vitro* (IML)

A atividade anti-helmíntica do TC das leguminosas foi determinada utilizando uma versão em escala reduzida de inibição *in vitro* da migração larval (IML) conforme descrito por Armstrong et al. (2013).

2.5.1 Forragem

A quantidade de forragem suposta usada para a bioatividade *in vitro* dos extratos das plantas que incluíram as seguintes proporções: um caprino de 55 kg deverá consumir 3% do seu peso do corporal tendo um consumo total de 1360 g. Dos 1360 g consumidos, estima-se que 25% da dieta foram compostas de uma leguminosa forrageira contendo TC. Um fator de conversão de 0.005625 foi aplicada para converter uma média considerada de 8 litros da capacidade do rúmen de um caprino para um sistema de 45 mL *in vitro* (WHITNEY et al., 2011) para um sistema de 45 mL *in vitro*. A quantidade de forragem utilizada em cada replicação foi determinada com base matéria seca (MS) usando a seguinte fórmula:

$$\text{Forragem} = \frac{\text{pesocabra} \times \% \text{ forragemdieta} \times \text{fatorconversão}}{\text{MSforragem}}$$

2.5.2 Larvas

As cepas das larvas L3 de *Haemoncus contortus* (HL) resistentes a Ivermectina foram selecionadas para garantir pelo menos 90% de motilidade antes da utilização.

2.5.3 Fermentação e extração dos taninos condensados (TC)

O líquido ruminal foi coletado de caprinos mestiços Boer-Espanhol canulados no rúmen consumindo feno de Bermuda grass e amendoim forrageiro que foi colocado num recipiente isolado pré-aquecido a 39 °C. O líquido ruminal foi filtrado através de seis camadas de gaze. O tampão de McDougall (McDOUGALL, 1947) e o líquido ruminal foram misturados numa proporção de 1:4 para um volume líquido total de 45 mL. Cada uma das forragens secas (tratamentos) foi adicionada a sua fermentação individual em um erlenmeyer contendo o líquido ruminal filtrado e a solução tampão. Os frascos foram purgados com CO₂ e tampados com uma tampa de borracha de tamanho 6 (Midwest Brewing Supply Company, Minneapolis, MN, EUA) e um bloqueio de ar de 3 peças (Midwest Brewing Supply Company, Minneapolis, MN, EUA) e incubou-se a 39°C em agitador de 45 RPM durante 18 h para extrair TC. Os frascos foram removidos da incubadora e o pH final foi registado. Um total de 25 mL de cada solução foi removido individualmente e centrifugada a 1912 × g durante 15 min. Os sobrenadantes contendo o TC extraído foram usados para encher os poços da placa.

2.6 Inibição da Migração Larval (IML)

Foram realizados dois ensaios separados para IML. O líquido ruminal recém coletado foi utilizado para preparar extratos de plantas, como descrito acima, para cada ensaio. Placas Millipore de 96 poços equipada com um crivo de malha de 20 µm; (Billerica, MA, EUA)

foram utilizados para mensurar a IML de HC para cada tratamento. Cada tratamento foi designado para seis poços na sua própria linha individual da placa de 96 poços. Controles e tratamentos foram executados no mesmo prato. As porções de fundo de cada poço foram cheias com 125 µL de sobrenadante por tratamento.

A tela de 20 µm foi colocada na placa de 96 poços contendo o sobrenadante de cada tratamento e suavemente colocada para remover o ar. Com telas no lugar, 10µL de larvas foram transferidos para cada cavidade. Um adicional de 125µL de sobrenadante de tratamento foi dispensado dentro da cavidade para encher o poço. As placas foram bem seladas e colocadas num recipiente hermético purgado com CO₂ durante 30 segundos e colocado num incubador agitador a 39 °C durante 18 h. A tela sob a placa de poço foi removida após a incubação. O restante do líquido no fundo da placa removido por completo utilizando uma micropipeta e colocada numa lâmina.

As larvas foram contadas microscopicamente sob 100 vezes e registrada como larvas migrantes. Os poços foram lavados com 100 µL de água para garantir que todas as larvas que migraram para a parte inferior da cavidade da placa foram recolhidas e contabilizadas. O controle negativo sem forragem (líquido ruminal e tampão) foi avaliada juntamente com tratamentos de forragem para cada replicação. A porcentagem IML foi calculada utilizando a seguinte fórmula: A porcentagem de IML = $(A - B / A) \times 100$, onde A é igual ao número médio de larvas que migraram através de poços de controle negativo (Sem forragem (líquido ruminal e tampão)) para validar que as larvas utilizadas não foram resistentes) e B é igual ao número médio de larvas que migraram através dos poços para cada tratamento. Foi incluído um tratamento com Ivermectina (40 µg/mL) para validação que foram utilizadas larvas com resistência a Ivermectina.

2.7 Análises Estatísticas

Os resultados dos percentuais de frações do tanino condensado (tanino solúvel (ECT), tanino aderido à proteína (PBCT), tanino aderido à fibra (FBCT) e taninos condensados totais (TCT)), características estruturais (propelargonidina (PP); prodelfinidina (PD) e procianidina (PC)), peso médio da massa molecular (Mw) e as proteínas precipitáveis por fenóis (PPP) foram submetidos à análise de variância onde as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) através do programa estatístico (RStudio).

O resultado do teste *in vitro* para inibição da migração larval para as diferentes leguminosas forrageiras estudadas foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as medias comparadas pelo teste de Tukey (5%), através do programa estatístico (R Studio).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As frações dos constituintes do tanino condensado das leguminosas forrageiras tropicais encontram-se na Tabela 1. As variáveis TCE, TCPB e TCT apresentadas foram influenciadas pelas diferentes espécies ($P \leq 0,05$). A cratilia não apresentou TC livre somente traços do TC ligado a PB (0,09%). A fração TCE considera-se a maior concentração de TCT, variando a partir de 0,0% para cratilia e 7,97% para a fração folha do sabiá. O TCPB variou de 0,09% para cratilia e 5,26% para a flemingia. A fração TCFB que representa a menor porcentagem do TCT não foi constatada nas leguminosas estudadas.

As leguminosas estudadas apresentaram diferentes teores (%) de PPP. Sendo que a fração folha do sabiá apresentou maior teor de PPP ($P \leq 0,05$), entretanto o teor apresentado pelo guandu e flemingia não diferiram entre si ($P \geq 0,05$), diferindo dos menores teores encontrados pelo estilosantes e fração casca do sabiá ($P \leq 0,05$). As leguminosas cratilia e gliricídia não apresentaram teor de PPP, e como pode ser visto foram as que apresentaram TC com o menor peso molecular (Mw). O Mw das leguminosas estudadas variou de 737 a 1168 Da, já o estilosantes apesar de possuir baixo TCT (2,33%) e PPP (0,32%) foi a leguminosa que apresentou TC com maior Mw (1168 Da), e a leguminosa sabiá fração folha com maior TCT (12,38%) e PPP (15,97%) apresentou um moderado Mw (917Da) comparado a uma concentração de baixo TC.

Naumann et al. (2013) afirmaram que altos teores de TC não representam necessariamente elevado Mw (Tabela 1).

Tabela 1. Constituintes de taninos condensados (TCE = taninos condensados extraíveis; TCPB = tanino condensado aderido à proteína; TCFB = tanino condensado aderido à fibra e TCT = total de tanino condensado; PPP = proteínas precipitáveis por fenóis e Mw = peso médio da massa molecular do TC).

| Leguminosas | TCE | TCPB | TCFB | TCT | PPP | Mw | PD:PC |
|---------------|-------------------|-------------------|------|--------------------|--------------------|-------------------|-------|
| Cratilia | ND | 0,09 ^e | ND | ND | ND | 791 ^d | 55:45 |
| Estilosantes | 0,90 ^c | 1,43 ^d | ND | 2,33 ^e | 0,32 ^d | 1168 ^a | 10:90 |
| Flemingia | 4,06 ^b | 5,26 ^a | ND | 9,33 ^b | 4,22 ^b | 999 ^b | 65:35 |
| Gliricídia | ND | 3,55 ^c | ND | 3,57 ^d | ND | 737 ^c | 40:60 |
| Guandu | 2,46 ^c | 0,83 ^d | ND | 3,29 ^d | 3,75 ^b | 838 ^c | 40:60 |
| Sabiá (folha) | 7,95 ^a | 4,42 ^b | ND | 12,38 ^a | 15,97 ^a | 917 ^c | 52:48 |
| Sabiá (casca) | 1,48 ^d | 3,52 ^c | ND | 5,02 ^c | 1,08 ^c | 993 ^b | 40:60 |

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$) pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. ND= não detectado

A composição monomérica de taninos purificados (relação PD:PC) variou consideravelmente entre espécie. A gliricídia, guandu e fração casca do sabiá apresentaram uma relação PD:PC de aproximadamente 40:60, já a flemingia e a fração folha do sabiá tem uma maior relação próximo de 60:40 (PD:PC). O estilosantes e cratilia foram às únicas leguminosas que apresentaram o monômero PP. O estilosantes teve alto valor para PC e baixa para PD e PP, já a cratilia apresentou quase 50% do valor para PP.

A porcentagem de inibição da migração larval (IML%) *in vitro* verificada nas leguminosas forrageiras tropicais está representada na Figura 1.

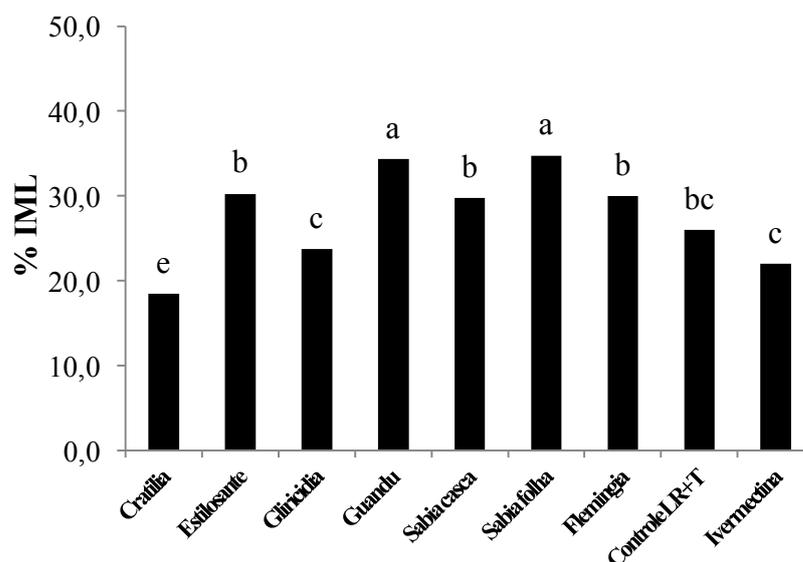


Figura 1. Percentagem de inibição da migração larval do estágio L3 de *Haemonchus contortus* (HL) por taninos condensados presentes nas leguminosas forrageiras tropicais. Letras diferentes acima das barras significam que houve diferença na porcentagem de IML para os tratamentos avaliados ($P \leq 0,05$).

Entre as leguminosas estudadas a fração folha do sabiá e guandu não diferiram entre si ($P \geq 0,05$), com as maiores porcentagens IML (34,75% e 34,33%). As leguminosas estilosantes, flemingia e fração casca do sabiá não diferiram entre si, apresentando moderados valores de IML (30,25%, 30,0% e 29,75%, respectivamente). Entre as leguminosas estudadas a menor porcentagem de IML foi para cratília (18,46%), glicíδια (23,75%) e controle negativo (líquido de rúmen e tampão) valores próximos do controle positivo com Ivermectina (22,0%). A metodologia avaliação da IML utilizada neste trabalho apresenta alto coeficiente de variação (CV) por várias razões: fluido ruminal, pH, bactérias do rúmen, a própria contagem das larvas, o que demonstra um efeito baixo para o tratamento controle com apenas o fluido ruminal e solução tampão.

A fitoterapia para saúde animal representa uma alternativa para muitos produtores, principalmente pelo baixo custo comparado ao uso dos produtos sintéticos que prolongam a vida útil dos produtos anti-helmínticos (AH) disponíveis no mercado, pois diminuem a pressão de seleção sobre os isolados de nematódeos (VIEIRA et al., 1999), bem como a preocupação com resíduos decorrentes do uso profilático de drogas sintéticas na produção dos alimentos. Com a grande biodiversidade de plantas tropicais, somente nos últimos 15 anos estudos vêm sendo realizados para rastrear a atividade anti-helmíntica (ALONSO-DIAZ et al., 2010). Entretanto, os primeiros estudos *in vitro* para a bioatividade deu-se com extratos de sementes de *Mangifera indica* (COSTA et al., 2002) e leucena (ADEMOLÁ et al., 2005, 2006). Com a busca por produtos nutracêuticos começaram os estudos com uso de extratos de leguminosas ricas em taninos nas regiões tropicais, dentre elas: *Acacia pennatula*, *Acacia gaumerii*, *Brosimum alicastrum*, *Havardia albicans*, *Leucaena leucocephala*, *Lysiloma latisiliquum* e *Piscidia piscipula* (ALONSO-DÍAZ et al., 2008a,b; HERNANDEZ-ORDUNO et al., 2008; CALDERON-QUINTAL et al., 2010). Após vários estudos *in vitro* foi observado que a maioria dessas plantas apresentaram algum efeito AH, sendo promissor para o *Haemochus contortus* (HC) como dentre outros parasitas.

Von-Son-de-Fernex et al. (2012) trabalharam com extratos de leguminosas forrageiras tropicais, incluindo *Arachis pintoi*, diferentes cultivares da *Cratília argentea* e *Glicíδια*

sepium e observaram atividade biológica anti-helmíntica nas diferentes fases de desenvolvimento do HC, confirmando a bioatividade dos taninos o que foi comprovado quando adicionou o polietilenoglicol (PEG). A leguminosa cratília no presente estudo apresentou efeito contrário ao encontrado pelos autores acima, com menor IML, esse efeito pode ter ocorrido pela menor concentração de TC. Já as leguminosas com presença moderada de TC obtiveram respostas satisfatórias para IML. Tais discrepâncias, observadas entre os diferentes estudos, são atribuídas à grande variabilidade nas estruturas químicas, nas concentrações de taninos, época de coleta das plantas e proteínas presentes nas leguminosas forrageiras (PATRA & SAXENA, 2011), bem como, a grande biodiversidade de espécies e fatores ambientais existente nos países tropicais que ainda necessitam ser mais exploradas. Outras pesquisas testaram folhas de *Manihot esculenta* e *Musa paradisiaca* que também mostraram uma boa atividade anti-helmíntica contra HC (MARIE-MAGDELEINE et al., 2010, 2014).

Várias plantas já foram reveladas com potencial anti-helmíntico (HOSTE et al., 2006; MINHO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2011). Entretanto, definições mais detalhadas como a parte da planta, idade, estado fisiológico, aspectos relacionados à purificação dos extratos devem ser considerados para uso no controle parasitário. Segundo Hoste et al. (2006), as características estruturais, concentração e peso molecular definiram melhor a bioatividade do TC.

Para Naumann et al. (2013), avaliaram a correlação do peso molecular do TC em relação a IML observou baixa correlação, pois a medida que aumentou o Mw diminuiu a IML. Os autores observaram que o tanino extraído da *Lespedeza cuneata* teve maior Mw das espécies estudadas, no entanto a porcentagem de IML não diferiu do controle. Já o TC das leguminosas *Lespedeza stuevei* e *Leucaena retusa* tinham um Mw de 552 e 950, respectivamente, valores estes menores do que a de *Lespedeza cuneata* (1483). No entanto, a porcentagem de IML para *Lespedeza stuevei* e *Lespedeza retusa* foram maiores do que para *Lespedeza cuneata*, assim a atividade biológica do TC podem estar relacionadas não apenas com o peso molecular, mas com aspectos estruturais do tanino. No trabalho realizado por Molan et al. (2003b) com as espécies *Lespedeza sericea* e *Lespedeza pedunculatus* encontraram maior relação de prodelfinidina/procianidina (PD:PC) o que levou as melhores resposta anti-helmíntica do que a espécie *Lespedeza corniculatus* que tem uma menor relação PD:PC. A maior proporção de prodelpinidina/ procianidina e maior Mw têm sido associados a melhor bioatividade antiparasitária (NOVOBILSKÝ et al., 2013; QUIJADA et al., 2015).

As leguminosas tropicais apesar de grande potencial no controle de helmintos gastrintestinais devem levar em conta alguns fatores como os constituintes presentes nesse tanino, espécies, a quantidade ofertada aos animais, indicando ser um amplo campo de pesquisa de fitoterápicos com ação anti-helmíntica, visto que essas plantas já fazem parte da alimentação destes animais.

4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no teste *in vitro* permitem deduzir que as leguminosas guandu, sabiá, flemingia e estilosantes tem elevado efeito anti-helmíntico. O fato de algumas espécies testadas não terem apresentado efeito relevante pode estar relacionado à concentração do TC presente nas mesmas, devido ao fato que somente 25 % de leguminosa foi incluída na dieta utilizada. Considerando que as plantas utilizadas podem ser produtos fitoterápicos a concentração pode ter sido baixa e por isso futuros estudos podem considerar concentrações superiores para verificar um possível efeito anti-helmíntico das demais plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AERTS, R.J.; BARRY, T.N., MCNABB, W.C. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.75, p. 1-2, 1999.

ADEMOLA, I.O.; ELOFF, J.N. *In vitro* anthelmintic activity of *Combretum molle* (R. Br. ex G. Don) (Cunbretaceae) against *Haemonchus contortus* ova and larvae. **Veterinary Parasitology**, v. 169, p. 198-203, 2010.

ADEMOLA, I.O.; IDOWU, S.O. Anthelmintic activity of *Leucaena leucocephala* seed extract on *Haemonchus contortus* infective larvae. **Veterinary Record**. v.158, p.485-486, 2006.

ADEMOLA, I.O.; FAGBEMI, B.O.; IDOWU, S.O. Anthelmintic activity of extracts of *Spondias mombin* against gastrointestinal nematodes of sheep: studies in vitro and in vivo. **Tropical Animal Health and Production**, v.37, p.223-235, 2005.

ALONSO-DÍAZ, M.A.; TORRES-ACOSTA, J.F.J.; SANDOVALCASTRO, C.A.; HOSTE, H. Comparing the sensitivity of two *in vitro* assays to evaluate the anthelmintic activity of tropical tannin rich plant extracts against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v.181, p. 360-364, 2011.

ALONSO-DÍAZ, M.A.; TORRES-ACOSTA, J.F.J.; SANDOVAL-CASTRO, C.A.; AGUILAR CABALLERO, A.J.; HOSTE, H. *In vitro* larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* exposed to four tropical tanniferous plant extracts. **Veterinary Parasitology**, v.153, p.313-319, 2008a.

ALONSO-DÍAZ, M.A.; TORRES-ACOSTA, J.F.J.; SANDOVAL-CASTRO, C.A.; CAPETILLO-LEAL, C.M.; BRUNET, S.; HOSTE, H. Effects of four tropical tanniferous plant extracts on the inhibition of larval migration and the exsheathment process of *Trichostrongylus colubri-formis* infective stage. **Veterinary Parasitology**, v.153, p.187-192, 2008b.

ÁLVAREZ DEL PINO, M.C.; HERVÁS, G.; MANTECÓN, A.R.; GIRÁLDEZ F.J.; FRUTOS, P. Comparison of biological and chemical methods, and internal and external standards, for assaying tannins in shrub species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.85, p.583-590, 2005.

ANANTASOOK, N.; WANAPAT, M.; CHERDTHONG, A.; GUNUN, P. Effect of tannins and saponins in *Samaneasaman* on rumen environment, milk yield and milk composition in lactating dairy cows. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v.99, p.335-344, 2014.

AOAC. 1990. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. Washington, Association of Official Analytical Chemists, 15th ed., p.369-406.

ARCHIMÈDE, H.; EUGÈNE, M.; MARIE MAGDELEINE, C.; BOVAL, M.; MARTIN, C.; MORGAVI, D.P.; LECOMTE, P.; DOREAU, M. Comparison of methane production

between C3 and C4 grasses and legumes. **Animal Feed Science and Technology**, v.166, p.59-64, 2011.

ARMSTRONG, S.A.; KLEIN, D.R.; WHITNEY, T.R.; SCOTT, C.B.; MUIR, J.P.; LAMBERT, B.D.; CRAIG, T.M. Effect of using redberry juniper (*Juniperus pinchotii*) to reduce *Haemonchus contortus* in vitro motility and increase ivermectin efficacy. **Veterinary Parasitology**, v.197, p. 271-276, 2013.

ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JACKSON, F.; COOP, R.L. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: in vitro and *in vivo* studies. **Veterinary Parasitology**, v.99, p. 205-219, 2001.

BAE, H.D.; McALLISTER, T.A.; YANKE, J. Effects of condensed tannins on endoglucanase activity and filter paper digestion by *Fibrobacter succinogenes* S85. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p. 2132-2138, 1993.

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

BARRAU, E.; FABRE, N.; FOURASTE, I.; HOSTE, H. Effect of bioactive compounds from Sainfoin (*Onobrychis viciifolia Scop.*) on the in vitro larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. **Parasitology**, v. 13, p. 531-538, 2005.

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

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

BATE-SMITH, E.C. Hemanalysis of tannin-Concept of relative astringency. **Phytochemistry**, v.12, p.907-912, 1973.

BEN SALEM, H.A.; NEFZAOU, L.; BEN SALEM, A.; TISSER, J.L. Deactivation of condensed tannins in *Acacia cyanophylla* Lindl. Foliage by polyethylene glycol in feed blocks effect on feed intake, diet digestibility, nitrogen balance, microbial synthesis and growth by sheep. **Livestock Production Science**, v.64, p.51-60, 2000.

BEN-SALEM, H.; NEFZAOU, A.; BEN-SALEM, L.; TISSERAND, J.L. Different means of administering polyethylene glycol to sheep: effect on the nutritive value of *Acacia cyanophylla* Lindl. **Foliage Animal Science**, v.68, p.809-818, 1999.

BHATTA, R.; SARAVANAN, M.; BARUAH, L.; SAMPATH, K.T.; PRASAD, C.S. Effect of plant secondary compounds on *in vitro* methane, ammonia production and ruminal protozoa population. **Journal of Applied Microbiology**, v.115, p.455-465, 2013.

BHATTA, R.; SHINDE, A.K.; VERMA, D.L.; SANKHYAN, S.K.; VAITHIYANATHAN, S. Effect of supplementation containing polyethylene glycol (peg)-6000 on intake, rumen fermentation pattern and growth in kids fed foliage of *Prosopis cineraria*. **Small Ruminant Research**, v. 52, p. 45-52, 2004.

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**, v.101, p.45-54, 2002.

BHATTA, R.; KRISHNAMOORTHY, U.; MOHAMMED, F. Effect of tamarind (*Tamarindus indica*) seed husk tannins on *in vitro* rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, v.90, p.143-152, 2001.

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v.33, p. 229-239, 2010.

BRITO, C. J. F. A.; RODELLA, R. A.; DESCHAMPS, F.C. Perfil químico da parede celular e suas implicações na digestibilidade de *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria humidicola*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, p.1835-1844, 2003.

BRODERICK, G.A.; KANG, J.H. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media. **Journal of Dairy Science**, v.63, p.64-75, 1980.

BRUNET, S.; HOSTE, H. Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 7481-7487, 2006.

BUTTER, N. L.; DAWSON, J. M.; WAKELIN, D.; BUTTERY, P.J. Effect of dietary tannin and protein concentration on nematode infection (*Trichostrongylus colubriformis*) in lambs. **Journal of Agricultural Science**, v. 134, p. 89-99, 2000.

CALDERON-QUINTAL, J.A.; TORRES-ACOSTA, J.F.J.; SANDOVAL-CASTRO, C.A.; ALONSO- DÍAZ, M.A.; HOSTE, H.; AGUILAR-CABALLERO, A. Adaptation of *Haemonchus contortus* to condensed tannins: can it be possible. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.42, p.165-171, 2010.

CARNEIRO A.; BENEDITO B.; FREDERICO P.G.; CARVALHO A.M.; VIDAURRE G. Propriedades de chapas de aglomerado fabricadas com adesivo tânico de angico-vermelho (*Anadenanthera peregrina*) e ureia-formado. **Revista Árvore**, v. 33, p.521-531, 2009.

CENCI, F.B.; LOUVANDINI, H.; McMANUS, C.M.; DELL'PORTO, A.; COSTA, D.M.; ARAÚJO, S.C.; MINHO, A.P.; ABDALLA, A.L. Effects of condensed tannin from *Acacia mearnsii* on sheep infected naturally gastrointestinal helminthes. **Veterinary Parasitology**, v.144, p.132-137, 2007.

CERRI, C. C.; BERNOUX, M.; MAIA, S.M.F. Greenhouse gas mitigations in Brazil for land-use change, livestock and agriculture. **Scientia Agricola**, v. 67, p.102-116, 2010.

CHIQUETTE, J.; CHENG, K.J.; COSTERTON, J.W.; MILLIGAN, L.P. Effect of tannins on the digestibility of two isosynthetic strains of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) using in vitro and in sacco techniques. **Canadian Journal of Animal Science**, v.68, p.751-760, 1988.

COSTA, B.M. DA, SANTOS, I.C.V., OLIVEIRA, G.J.C., PEREIRA, I.G. Avaliação de folhas de *Gliricidia sepium* (Jacq.) Walp por ovinos. **Archivos de Zootecnia**, v.58, p. 33-41, 2009.

DALTO, A.G.C.; BANDARRA, P.M.; PEDROSO, P.M.O.; GUAGNINI, F.S.; LEAL, J.S.; RAYMUNDO, D.L.; DRIEMEIER, D. Timpanismo espumoso em bovinos leiteiros em pastagens de *Trifolium spp.* (Leg. Caesalpinioideae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, p.401-403, 2009.

DECANDIA, M.; SITZIA, M.; CABIDDU, A.; KABABYA, D.; MOLLE, G. The use of polyethylene glycol to reduce the anti-nutritional effects of tannins in goats fed woody species. **Small Ruminant Research**, v.38, p.157-164, 2000.

FAGUNDES, G. M. **Desempenho produtivo e composição do leite de cabras alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de *Flemingia macrophylla* (willd.) Merrill com e sem polietilenoglicol.** 2012. 103f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C.M.O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Editora UFRGS, Porto Alegre, Editora UFSC, Florianópolis, 2004.

FERREIRA, E. S. **Utilização dos polifenóis da casca de pinus para produção de adesivos para compensados.** 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais) – Área de Concentração em Tecnologia e Utilização de Produtos Florestais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2004.

FORKNER, R.E.; MARQUIS, R.; TILL, J.L. Condensed tannins as anti- herbivore defenses in leaf-chewing herbivore communities of *Quercus*. **Ecological Entomology**, v.29, p.174-187, 2004.

FRUTOS, P.; HERVÁS, G.; RAMOS, G.; GIRÁLDEZ, F. J.; MANTECÓN, A.R. Condensed tannin content of several shrub species from a mountain area in northern Spain, and its relationship to various indicators of nutritive value. **Animal Feed Science and Technology**, v. 95, p. 215-226, 2002.

GEA, A.; STRINGANO, E.; BROWN, R.H.; MUELLER-HARVEY, I. *In situ* analysis and structural elucidation of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) tannins for high throughput germplasm screening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p.495–503, 2011.

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**, v.84, p.73-83, 2000.

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

GONÇALVES, C. A.; LELIS, R. C. C.; BRITO, E. O.; NASCIMENTO, A.M. Produção de chapas de madeira aglomerada com adesivo uréia-formaldeído modificado com tanino de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth (sabiá), **Floresta e Ambiente**, v. 10, p.18-26, 2003.

GRAMINHA, C.V.; MARTINS, A.L.M.; FAIÃO, C.A. Viabilidade de alguns aditivos utilizados no confinamento no Brasil. In: CONFINAMENTO: GESTÃO TÉCNICA E ECONÔMICA, I, 2007, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal, 2007, v.1, p.103-132.

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

GRIFFITHS, D.W.; BIRCH, A.N.E.; HILLMAN, J.R. Antinutritional compounds in the *Brassicaceae*: analysis, biosynthesis, chemistry and dietary effects. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 73, p. 1-18, 1998.

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

HAGERMAN, A.E.; BUTLER, L.G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, p.809-812, 1978.

HAMMOND, J.A.; FIELDING, D.; BISHOP, S.C. Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. **Veterinary Research Communications**, v.21, p.213-228, 1997.

HECKENDORN, F.; HÄRING, D.A.; MAURER, V.; SENN, M.; HERTZBERG, H. Individual administration of three tanniferous forage plants to lambs artificially infected with *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei*. **Veterinary Parasitology**, v.146, p.123-34, 2007.

HERN-ANDEZ-ORDUNO, G.; TORRES-ACOSTA, J.F.J.; SANDOVAL-CASTRO, C.; AGUILAR-CABALLERO, A.J.; REYES-RAMÍREZ, R.R.; HOSTE, H.; CALDERON-QUINTAL, J.A. *In vitro* anthelmintic effect of *Acacia gaumeri*, *Havardia albicans* and Quebracho tannin extracts on a Mexican strain of *Haemonchus contortus* L3 larvae. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v.8, p.191-197, 2008.

HESS, H.D.; MONSALVE, L.M.; LASCANO, C.E.; CARULLA, J.E.; DIAZ, T.E.; KREUZER, M. Supplementation of a tropical grass diet with forage legumes and *Sapindus saponaria* fruits: effects on *in vitro* ruminal nitrogen turnover and methanogenesis. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.54, p.703-713, 2003.

HIXSON, J.L.; BINDON, K.A.; SMITH, P.A. Evaluation of Direct Phloroglucinolysis and Colorimetric Depolymerization Assays and Their Applicability for Determining Condensed Tannins in Grape Marc. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.63, p. 9954–9962, 2015.

HOONG, Y.B.; PARIDAH, M.T.; LUQMANB, C.A.; KOHC, M.P.; LOH, Y.F. Fortification of sulfited tannin from the bark of *Acacia mangium* with phenol–formaldehyde for use as plywood adhesive. **Industrial Crops and Products**. v.30, p.416-421, 2009.

HOSTE, H. Adaptive physiological processes in the host during gastrointestinal parasitism. **Int. Journal of Parasitology**. v.31, p.231-244, 2001.

HOSTE, H.; JACKSON, F.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S.M.; HOSKIN, S. O. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 6, p. 253- 261, 2006.

HOLMES, P.H. **Pathophysiology of nematode infections**. University of Glasgow Veterinary School, Bearsden Road, Glasgow, G61 (Scotland) U.K. p.443-451, 1987.

HUANG, X.D.; LIANG, J.B.; TAN, H.Y.; YAHYA, R.; KHAMSEKHIEW, B.; HO, Y.W. Molecular weight and protein binding affinity of *Leucaena* condensed tannins and their effects on in vitro fermentation parameters. **Animal Feed Science and Technology**, v.159, p.81-87, 2010.

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

JONES, W.T.; BROADHURST, R.B.; LYTTLETON, J.W. The condensed tannins of pasture legume species. **Phytochemistry**, v.15, p.1407-1409, 1976.

JONES, W.T.; MANGAN, J. L. Complexes of the condensed tannins of sainfoin (*Onobrychis viciaefolia* Scop) with fraction 1 leaf protein and with submaxillary mucoprotein and their reversal by PEG and pH. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.28, p.126-136, 1977.

KOTHARI, R.; SINGH, D.P.; TYAGI, V.V.; TYAGI, S.K. Fermentative hydrogen production – An alternative clean energy source. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.16, p. 2337– 2346, 2012.

KUNG, L.; BRACHT, J. P.; TAVARES J.Y. Effects of various compounds on in vitro ruminal fermentation and production of sulfide. **Animal Feed Science and Technology**, v.84, p.69–81. 2000.

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

LELIS, R. C. C. **Zur Bedeutung der Kerninhaltsstoffe obligatorisch verkernter Nadelbaumarten bei der Herstellung von feuchtebeständigen und biologisch resistenten Holzspanplatten, am Beispiel der Douglasie (*Pseudotsuga menziesii* Mirb. Franco)**. 175f.

Tese (Doutorado em Ciências Florestais). Forstliche Fakultät, Universität Göttingen, Göttingen, Alemanha, 1995.

LEINMULLER, E.; MENKE, K.H. Tannine in Futtermitteln für Wiederkäuer. 1. Chemische Eigenschaften und Reaktionen mit Makromolekülen. Übers **Tierernähr**, v.18, p.91–114, 1990.

LIN, Y. M.; LIU, J. W.; XIANG, P.; LIN, P.; DING, Z. H.; STERNBERG, L.S. L. Tannins and nitrogen dynamics in mangrove leaves at different age and decay stages (Jiulong River Estuary, China). **Hydrobiologia**, v.583, p.285-295, 2007.

LITTLEFIELD, K. A.; MUELLER, J. P.; MUIR J. P.; LAMBERT B. D. Correlation of Plant Condensed Tannin and Nitrogen Concentrations to White-Tailed Deer Browse Preferences in the Cross Timbers. **Texas Journal of Agriculture and Natural Resources**, v.24, p.1-7, 2011.

LONGO, C.; HUMMEL, J.; LIEBICH, J.; BUENO, I.C.S. ; BURAUUEL, P.; AMBROSANO, E.J.; BDALLA, A.L.; ANELE, U.Y. ; SÜDEKUM, K.H. Chemical characterization and *in vitro* biological activity of four tropical legumes, *Stylobium aterrimum* L., *Stylobium deeringianum*, *Leucaena leucocephala* and *Mimosa caesalpiniae folia*, as compared to a tropical grass, *Cynodon spp* for the use in ruminant diets. **Czech Journal of Animal Science**, v.57, p.255-264, 2012.

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

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

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

MAKKAR, H.P.S.; VERCOE, P.E. **Measuring Methane Production from Ruminants**. p.138, 2007.

MANE, C.; SOMMERER, N.; YALCIN, T.; CHEYNIER, V.; COLE, R.B.; FULCRAND, H. Assessment of the molecular weight distribution of tannin fractions through MALDI-TOF MS analysis of protein-tannin complexes. **Analytical Chemistry**, v.79, p.2239-2248, 2007.

MANSFIELD, J.L.; CURTIS, P.S.; ZAK, D.R.; PREGITZER, K.S. Genotypic variation for condensed tannin production in trembling aspen (*Populus tremuloides*, Salicaceae) under elevated CO₂ and in high and low fertility soil. **American Journal of Botany**, v.86, p.1154-1159, 1999.

MARIE-MAGDELEINE, C.; MAHIEU, M.; PHILIBERT, L.; DESPOIS, P.; ARCHIMEDE, H. Effect of cassava (*Manihot esculenta*) foliage on nutrition, parasite infection and growth of lambs. **Small Ruminant Research**, v.93, p.10-18, 2010.

MARIE-MAGDELEINE, C.; UDINO, L.; PHILIBERT, L.; BOCAGE, B.; ARCHIMEDE, H. *In vitro* effects of Musa x paradisiaca extracts on four developmental stages of *Haemonchus contortus*. **Research in Veterinary Science**, v.96, p.127-132, 2014.

MATOS, F.J.A. **Introdução a fitoquímica experimental**. Edições UFC, Fortaleza. 126p. 1988.

MBUGUA, D.M.; PELL, A.N.; FOX, D.G.; SCHOFIELD, P. The effects of proanthocyanidins from Calliandra calothyrsus and the alkaloid sparteine on *in vitro* fiber digestion. **Animal Feed Science and Technology**, v. 121, p. 89-107, 2005.

McALLISTER, T.A.; BAE, H.D.; JONES, G.A.; CHENG, K.J. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. **Journal Animal Science**, v.72, p.3004–3018, 1994.

McALLISTER T.A.; MARTINEZ T.; BAE H.D.; MUIR A.D.; YANKEL.J.; JONES G.A. Characterization of condensed tannins purified from legume forages: chromophore production, protein precipitation, and inhibitory effects on cellulose digestion. **Journal of Chemical Ecology**, v.31, p.2049-2063, 2005.

McDOUGALL, E.I. The composition and output of a sheep's saliva. **Biochemical Journal**, v.43, p.99–109, 1947.

McGEOUGH, E.J.; O'KIELY, P.; HART, K.J.; MOLONEY, A.P.; BOLAND, T.M; KENNY, D.A. 'Methane emissions, feed intake, performance, digestibility, and rumen fermentation of finishing beef cattle offered whole-crop wheat silages differing in grain content. **Journal of Animal Science**, v. 88, p. 2703-2716, 2010.

McNABB, W.C.; WAGHORN, G.C.; BARRY, T.N.; SHELTON, I.D. The effect of condensed tannins in Lotus pedunculatus on the digestion and metabolism of methionine, cysteine and inorganic sulfur in sheep. **British Journal of Nutrition**. v. 70, p.647-661,1993.

McSWEENEY, C. S.; PALMER, B.; BUNCH, R. Effect of the tropical forage calliandra on microbial protein synthesis and ecology in the rumen. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p.78-88, 2001.

MEALE, S. J.; McALLISTER, T.A.; BEAUCHEMIN, K.A.; HARSTAD, O.M.; CHAVES, A.V. Strategies to reduce greenhouse gases from ruminant livestock. **Acta Agricultura e Scandinavica**, v. 62, p.199-211, 2012.

MEZZOMO, R.; PAULINO, P.V.R.; DETMANN, E. Influence of condensed tannin on intake, digestibility and efficiency of protein utilization in beef steers fed high concentrate diet. **Livestock Science**, v. 141, p.1-11, 2011.

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

MINHO, A.P.; BUENO, I. C. S.; GENNARI, S. M.; JACKSON, F.; ABDALLA, A. L. Effect of *Acacia molissima* tannin extract on the control of gastrointestinal parasites in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v.147, p.172-181, 2008.

MINHO, A.P.; FILIPPSSEN, L.F.; AMARANTE, A.F.T.; ABDALLA, A.L. Efficacy of condensed tannin present in acacia extract on the control of *Trichostongylus colubriformis* in sheep. **Ciência Rural**, v. 40, p. 1360-1365, 2010.

MOLE, S.; BUTLER, L.G.; IASON, G. Defense against tannin in herbivores: a survey for proline rich salivary proteins in mammals. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.18, p.287-293, 1990.

MOLAN, A.L.; DUNCAN, A.J.; BARRY, T.N.; MCNABB, W.C. Effect of condensed tannins and crude sesquiterpene lactones extracted from chicory on the motility of larvae of deer lungworms and gastrointestinal nematodes. **Parasitology International**, v.52, p.209-218, 2003.

MONTEIRO, J.E.B.A.; SENTELHAS, P.C.; CHIAVEGATO, E.J.; GUISELINI, C.; SANTIAGO, A.V.; PRELA, A. Estimulação da área foliar do algodoeiro por meio de dimensões e massa das folhas. **Bragantia**, v.64, p. 15-24, 2005.

MORAIS, J.A.S.; BERCHIELLI, T.T.; REIS, R.A. Aditivos. In: Berchielli, T.T.; Pires, A.V.; Oliveira, S.G. (Eds.), **Nutrição de Ruminantes**. Funep, Jaboticabal, p. 583. 2006.

MOREIRA, P.C.; MENDONÇA, A.C.; MARTINS, A.P.; WASCHECK, R.C.; SOUZA, P.R.; DUTRA, A.R.; GRANDSIRE, C.; REZENDE, P.L.P.; CARDOSO, J.R.; BENETTI, E.J.; SILVA, M.S.B. Avaliação do pH do fluido ruminal de vacas leiteiras. **Estudos, Goiânia**, v. 36, p. 1201-1218, 2009.

MOSS, A.R.; JOUANY, J.P.; NEWBOLD, J. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. **Annales de Zootechnie**, v. 49, p. 231-253, 2000.

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

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. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 125, p. 139-149, 2006.

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

MUPEYO, B.; BARRY, T.N.; POMROY, W.E.; RAMÍREZ-RESTREPO, C.A.; LÓPEZ-VILLALOBOS, N.; PERNTHANER, A. Effects of feeding willow (*Salix* spp.) upon death of established parasites and parasite fecundity. **Animal Feed Science and Technology**, v.164, p.8-20, 2011.

NAUMANN, H. D.; TEDESCHI, L. O.; MUIR, J. P.; LAMBERT, B. D.; KOTHMANN, M. M. Effect of molecular weight of condensed tannins from warm-season perennial legumes on

ruminal methane production *in vitro*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.50, p.154-162, 2013.

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

NAUMANN, H.D.; HAGERMAN, A.E.; LAMBERT, B.D.; MUIR, J.P.; TEDESCHI, L.O.; KOTHMANN, M.M. Molecular weight and protein-precipitating ability of condensed tannins from warm-season perennial legumes. **Journal of Plant Interactions**, v.9, p.212-219, 2014.

NAUMANN, H.D.; LAMBERT, B.D.; ARMSTRONG, S.A.; FONSECA, M.A.; TEDESCHI, L.O.; MUIR, J. P.; ELLERSIECK, M.R. Effect of replacing alfalfa with paniced-tick clover or sericea lespedeza in corn-alfalfa-based substrates on *in vitro* ruminal methane production. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p.3980-3987, 2015.

NEPOMUCENO, D.D.; ALMEIDA, J.C.C.; CARVALHO, M.G.; FERNANDES, R.D.; JUNIOR, F.E.A.C. Classes of secondary metabolites identified in three legume species. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.42, p.700-705, 2013.

NOVOBILSKÝ, A.; STRINGANO, E.; HAYOT CARBONERO, C.; SMITH, L.M.J.; ENEMARK, H.L.; MUEL-LER-HARVEY, I.; THAMSBORG, S.M. *In vitro* effects of extracts and purified tannins of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) against cattle nematodes. **Veterinary Parasitology**, v.196, p.532-537, 2013.

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

NOZELLA, E.F., 2001. **Determinação de taninos em plantas com potencial forrageiro para ruminantes**. Centro de energia Nuclear na Agricultura. ESALQ, Piracicaba, p. 58.

OLIVEIRA, S.G.; BERCHIELLI, T.T. Potencialidades da utilização de taninos na conservação de forragens e nutrição de ruminantes-revisão, **Archives of Veterinary Science**, v.12, p.1-9, 2007.

OLIVEIRA, S. G.; BERCHIELLI, T.T.; NATARELLI, B.; MALHEIROS, E.B. Valor alimentício e aspectos econômicos de dietas com variação no teor de tanino e nível protéico em bovinos de corte. **Revista Ceres**, v. 55, p. 467-475, 2008.

OLIVEIRA, M. V.; MOURA, M. S.; BARBOSA, F. C. Avaliação comparativa do método Famacha, volume globular e OPG em ovinos. **PUBVET**, v. 5, n. 7, Ed. 154, Art. 1039, 2011.

OTERO, M.J.; HIDALGO, L.G. Taninos condensados en especies forrajeras de clima templado: efectos sobre productividad de rumiantes afectados por parasitosis gastrointestinales. **Livestock Research for Rural Development**, v.16, p.1-9, 2004.

PALMER, B.; MCSWEENEY, C.S. **Tannins in Calliandra calothyrsus: effect of polyethylene glycol (PEG) and an evaluation of 19 accessions.** In: Brooker, J.D. (Ed.), *Tannins in livestock and Human Nutrition. Proceedings of the International Workshop, Adelaide, Australia, May 31–June 2, 1999.* ACIAR Proceedings, n. 92, p. 36–39, .2000.

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

PELLIKAAN, W.H.; HENDRIKS, G.; UWIMANA, L.J.G.M.; BONGERS, P.M.; BECKER, J.W. CONE. **A novel method to determine methane production simultaneously during *in vitro* gas production measurements.** Proc. 4th Greenhouse Gases Anim. Agric. p. 228, 2010.

PEREIRA, L.G.R.; MACHADO, F.S.; CAMPOS, M.M. Avanço conceitual em diagnóstico e estratégias de mitigação de metano entérico em bovinos de leite no Brasil. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BOVINOCULTURA LEITEIRA, 3., Viçosa, MG. **Anais...Viçosa**, 2011. p. 75-122.

PONCET, C.; RÉMOND, D. Rumen digestion and intestinal nutrient flows in shepp consuming pea seeds: the effect of extrusion or chestnut tannin addition. **Animal Research**, v.51, p.201-216, 2002.

PORDOMINGO, A. J.; VOLPI LAGRECA, G.; STEFANAZZI, I. N.; PORDOMINGO, A. B. Efecto de lainclusión de taninos versus monensina y de soja cruda en dietas basadas en grano entero, sin fibra larga en engorde de vaquillonas a corral. **Boletín de Divulgación Técnica**, EEA Anguil, n. 90, 2006.

PORTER, L.J.; WOODRUFFE, J. Haemanalysis: The relative astringency of proanthocyanidin polymers. **Phytochemistry**, v.23, p.1255-1256, 1984.

POSSENTI, R.A.; FRANZOLIN, R.; SCHAMMAS, E. A. Efeitos de dietas contendo *Leucaena leucocephala* e *Saccharomyces cerevisiae* sobre a fermentação ruminal e a emissão de gás metano em bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.1509-1516, 2008.

PRICHARD, R.K. Anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v.54, p.259-268, 1994.

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

QUIJADA, J.; FRYGANAS, C.; ROPIAK, H.M.; RAMSAY, A.; MUELLER-HARVEY, I.; HOSTE, H. Anthelmintic activities against *Haemonchus contortus* or *Trichostrongylus colubriformis* from small ruminants are influenced by structural features of condensed tannins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.63, p.6346-6354, 2015.

RAMÍREZ-RESTREPO, C. A.; BARRY, T.N. Alternative temperate 71 forages containing secondary compounds for improving sustainable productivity in grazing ruminants. **Animal Feed Science & Technology**, v. 120, p.179-201, 2005.

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

RUSSELL, J.B.; O'CONNOR, J.D.; FOX, D.G. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminant fermentation. **Journal Animal Science**, v.70, p.3551-3561, 1992.

SANTOS, S.C.; COSTA, W.F.; BATISTA, F.; SANTOS, L.R.; FERRI, P.H.; FERREIRA, H.D. Seasonal variation in the content of tannins in barks of barbatimão species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.552-556, 2006.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry** v.30, p.3875-3883, 1991.

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

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

SINGH, B.; BHAT, T.K.; SINGH, B. Potential therapeutic applications of some antinutritional plant secondary metabolites. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.5579-5597, 2003.

STRAIN, S.A.J.; STEAR, M.J. The influence of protein supplementation on the immune response to *Haemonchus contortus*. **Parasite Immunology**, v. 23, p. 527-531, 2001.

STRADIOTTI JUNIOR, D.; QUEIROZ, A.C.; LANA, R.P. Ação do extrato de própolis sobre a fermentação *in vitro* de diferentes alimentos pela técnica de produção de gases. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, p. 1093-1099, 2004.

STÜRM, C.D.; TIEMANN, T.T.; LASCANO, C.E.; KREUZER, M.; HESS, H.D. Nutrient composition and *in vitro* ruminal fermentation of tropical legume mixtures with contrasting tannin contents. **Animal Feed Science and Technology**, v.138, p.29-46, 2007.

SYKES, A.R. Parasitism and production in farm animals. **Animal Production**, v.59, p.155-72, 1994.

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

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

TIEMANN, T.T.; LASCANO, C. E.; WETTSTEIN, H.R.; MAYER, A. C.; KREUZER, M.; HESS, H.D. Effect of the tropical tannin-rich shrub legumes *Calliandra calothyrsus* and *Flemingia macrophylla* on methane emission and nitrogen and energy balance in growing lambs. **Animal**, v.2, p.790-799, 2008.

TORAL, P. G.; HERVÁS, G.; BICHI, E.; BELENGUER, Á., FRUTOS, P. Tannins as feed additives to modulate ruminal biohydrogenation: effects on animal performance, milk fatty acid composition and ruminal fermentation in dairy ewes fed a diet containing sunflower oil. **Animal Feed Science and Technology**, v.164, p.199–206, 2011.

VAN SOEST, P.J. **Nutricional ecology of the ruminant**. 2ed. Ithaca: Cornell Press/Constock Publish. p.476, 1994.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre and non-starch carbohydrate in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3583-3597, 2001.

VAN WYK, J.A.; BATH, G.F. The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. **Veterinary Research**, v. 33, p.509-529, 2002.

VIEIRA, L.S.; CAVALCANTE, A.C.R.; PEREIRA, M.F.; DANTAS, L.B.; XIMENES, L.J.F. Evaluation of anthelmintic efficacy of plants available in Ceará State, Northeast Brazil, for the control of goat gastrointestinal nematodes. **Revue Medicin Veterinaire**, v.150, p.447-52, 1999.

VIEIRA, L. S. **Alternativas de controle da verminose gastrintestinal dos pequenos ruminantes**. Circular Técnica, n. 29, p. 1-10, EMBRAPA-CNPC, Sobral, CE, 2003.

VIEIRA, L.S. Métodos alternativos de controle de nematóides gastrintestinais em caprinos e ovinos. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v.2, p.49-56, 2008.

VIEIRA, M.C.; LELIS, R.C.C.; RODRIGUES, N.D.R. Propriedades químicas de extratos tânicos da casca de pinus oocarpa e avaliação de seu emprego como adesivo. **Cerne**, v. 20, p. 47-54, 2014.

VETELI, T. O.; MATTSON, W. J.; NIEMELÄ, P.; JULKUNEN-TIITTO, R.; KELLOMÄKI, S.; KUOKKANEN, K.; LAVOLA, A. Do elevated temperature and CO₂ generally have counteracting effects on phenolic phytochemistry of boreal trees. **Journal of Chemical Ecology**, v.33, p.287–296, 2007.

VON SON-DE FERNEX, E.; ALONSO-DIAZ, M. A.; VALLES-DE La MORA, B.; CAPETILLO-LEAL, C. M. In vitro anthelmintic activity of five tropical legumes on the exsheathment and motility of *Haemonchus contortus* infective larvae. **Experimental Parasitology**, v. 131, p. 413-418, 2012.

WAGHORN, G.C.; JONES, W.T.; SHELTON, I.D.; MCNABB, W.C. Condensed tannins and the nutritive value of herbage. **Proceedings of the New Zealand Grassland Association**, v.51, p.171-176, 1990.

WAGHORN, G.C.; MCNABB, W.C. Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.62, p.383-392. 2003.

WHITNEY, A.E.; LEE, D.R.; KLEIN, C.B.; SCOTT. A modified in vitro larvae migration inhibition assay using rumen fluid to evaluate *Haemonchus contortus* viability. **Veterinary Parasitology**, v.176, p. 217–225, 2011.

WILLIAMS, V.M.; PORTER, L.J.; HEMINGWAY, R.W. Molecular weight profiles of proanthocyanin polymers. **Phytochemistry**, v.22, p.569-572,1983.

WILLIAMS, C. M.; EUN, J. S.; MACADAM, J.W.; YOUNG, A.J.; FELLNER, V.; MIN, B. R. Effects of forage legumes containing condensed tannins on methane and ammonia production in continuous cultures of mixed ruminal microorganisms. **Animal Feed Science and Technology**, v.166-167, p.364-372, 2011.

WISSING, A. The utilization of bark II: Investigation of the Stiasny-reaction for the precipitation of polyphenols in Pine bark extractives. **Svensk Papperstidning**. v.58, p. 745-750, 1955.

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

WOODWARD, S.L., WAGHORN, G.C., ULYATT, M.J., LASSEY, K.R., Early indications that feeding Lotus will reduce methane emission from ruminants. **The New Zealand Society of Animal Production**, v, 61, p. 23–26. 2001.

YANAGIDA, A.; SHOJI, T.; KANDA, T. Characterization of polymerized polyphenols by size-exclusion HPLC. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.66, p.1972-1975, 2002.

YANG, C.M.J.; RUSSELL, J.B. The effect of monensin supplementation on ruminal ammonia accumulation in vivo and the numbers of amino acid-fermenting bacteria. **Journal of Animal Science**, v.71, p.3470-3476, 1993.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL-FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v.24, p.147-52, 2001.

ZIMMER, N.; CORDESSE, R. Influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. **INRA Productions Animales**, v.9, p.167-179, 1996.

ANEXO A

Prospecção fitoquímica

Triagem Fitoquímica ou Screening Fitoquímico é considerada mais precisamente a parte preliminar de um trabalho químico sobre uma planta. Sem chegar a detalhes, a triagem procura sistematizar, ou melhor, rastrear os principais grupos de constituintes químicos que compõem um extrato vegetal.

1 Alcalóides (WALL et al., 1954).

Redissolver alguns miligramas do resíduo em 4ml de ácido clorídrico a 1%. Filtrar se necessário. Separar duas porções de 2ml para tubos de ensaio diferentes e adicionar 5 gotas dos reagentes abaixo. A ocorrência de precipitado indica reação positiva.

- Reação de Dragendorff

| Soluções | Reagente | Quantidade |
|-----------|-----------------------|------------|
| Solução A | Subnitrato de bismuto | 0,17 g |
| | Ácido acético glacial | 2 ml |
| | Água destilada | 8 mL |
| Solução B | Iodeto de potássio | 1,6 g |
| | Água destilada | 4 ml |

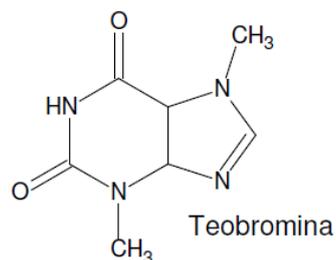
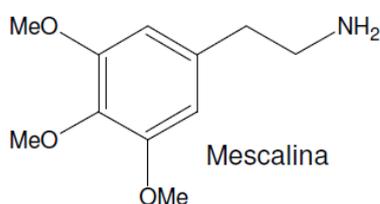
* Mistura solução A com solução B. O precipitado tem vermelho tijolo.

- Reação de Mayer

| Reagente | Quantidade |
|---------------------|------------|
| Cloreto de mercúrio | 280 mg |
| Iodeto de potássio | 1 g |
| Água destilada | 20 ml |

* O precipitado tem coloração esbranquiçada

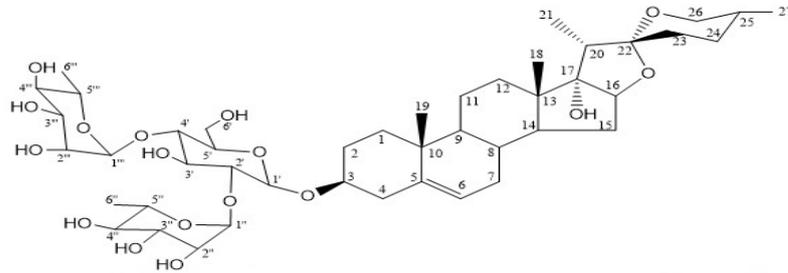
Ex.:



2 Saponinas (BARBOSA, 2001)

Redissolver alguns miligramas do resíduo em 3ml de água destilada. Agitar vigorosamente em tubo de ensaio por 5 segundos. Deverá formar espuma que permanecerá persistente pelo menos durante 20 minutos, indicando a presença de saponina.

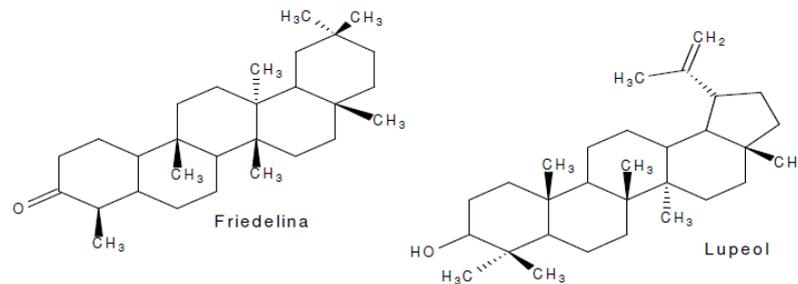
Ex.



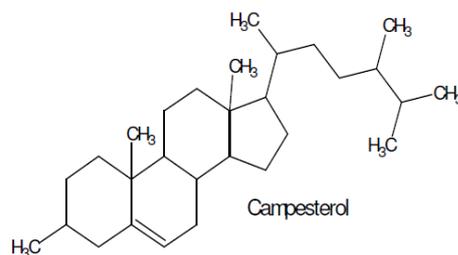
3 Esteróides e triterpenóides (WALL et al., 1954).

Redissolver alguns miligramas do resíduo em 3ml de clorofórmio. Filtrar se necessário. Juntar 2ml de anidrido acético ao extrato. Agitar suavemente. Pelas paredes do tubo adicionar 1ml de ácido sulfúrico concentrado. No caso de reação positiva, observar-se-á uma sucessão de cores, róseo ao azul e verde.

Ex: triterpenóides



Ex. Esteróides



4 Flavanóides (WALL et al., 1954).

Redissolver alguns miligramas do resíduo em 3ml de metanol. Filtrar se necessário. Adicionar 1ml de ácido clorídrico concentrado. Deixar esta solução reagir com uma fita de magnésio. O surgimento de uma coloração rósea na solução indica reação positiva.

5 Catequinas (COSTA, 1972)

Redissolver alguns miligramas do resíduo em 3ml de metanol. Filtrar se necessário. Juntar 1ml de solução de vanilina a 1% e 1ml de ácido clorídrico concentrado. Deixar esta solução reagir com uma fita de magnésio. O surgimento de uma coloração vermelha intensa indica reação positiva.

6 Glicosídeos cardíacos (DOMINGUEZ, 1973).

Redissolver alguns miligramas do resíduo em 4ml de metanol. Filtrar se necessário. Separar em 2 porções de 2ml cada e adicionar gotas aos reagentes a seguir:

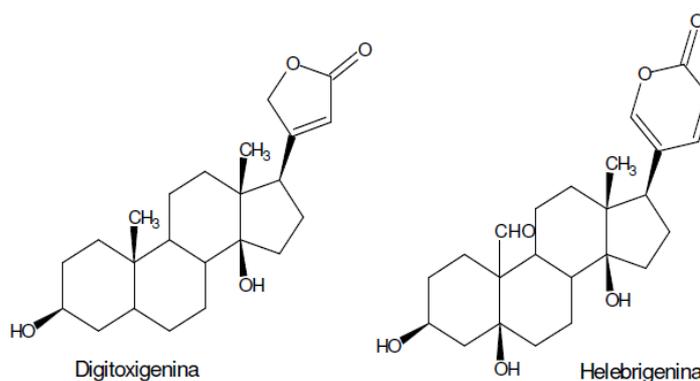
- Reativo de Kedde

| Soluções | Reagente | Quantidade |
|------------|---------------------------|------------|
| | Acido 3,5-dinitrobenzóico | 2 g |
| Solução I | metanol | 100 g |
| Solução II | Hidróxido de potássio | 0,71 g |
| | Água destilada | 18,8 ml |

No momento da reação juntar partes iguais de I e II. A coloração azul ou violeta indica reação positiva.

Adicionar 3 gotas de solução recente a 5% de nitroprussionato de sódio em água e 3 gotas de hidróxido de sódio 2N. A coloração roxa intensa indica reação positiva.

Ex.:



7 Sacarídeos (BARBOSA, 2001).

Num tubo de ensaio, adicionar duas gotas de solução de bórax 1% e duas gotas de solução de fenolftaleína. Produz-se uma coloração rosa. A adição de alguns miligramas do material em estudo sobre esta solução deve ocasionar o desaparecimento da coloração rosa, que reaparece, ao se aquecer, e some novamente ao esfriar.

8 Purinas (COSTA, 1972).

Numa cápsula de porcelana, juntar alguns miligramas do resíduo, 3 gotas de ácido clorídrico 6N e duas gotas de peróxido de hidrogênio concentrado. Evaporar em banho-maria. Deve-se formar um resíduo vermelho. Juntar 3 gotas de hidróxido de amônia 6N. A coloração violeta indica reação positiva.

9 Taninos

Redissolver alguns miligramas do resíduo em 5ml de água destilada. Filtrar se necessário. Adicionar 4gotas de solução de cloreto férrico a 1%. Aparecimento de uma coloração verde ou azul indica reação positiva.

Ex.:

