

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO**

**EXTRATO TANÍFERO DE *ACACIA MEARNSII* COMO
ADITIVO NA NUTRIÇÃO DE RUMINANTES**

Simone da Silva Ribeiro

CAMPO GRANDE, MS
2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO**

**EXTRATO TANÍFERO DE *ACACIA MEARNSII* COMO
ADITIVO NA NUTRIÇÃO DE RUMINANTES**

Acacia mearnsii tannin extract as an additive in ruminant nutrition

Simone da Silva Ribeiro

Orientador: Prof. Dr. Gumercindo Loriano Franco

Tese apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Área de concentração: Produção Animal.

CAMPO GRANDE, MS, 2014

Certificado de aprovação

SIMONE DA SILVA RIBEIRO

Extrato tanífero de *Acacia Mearnsii* como aditivo na nutrição de ruminantes.

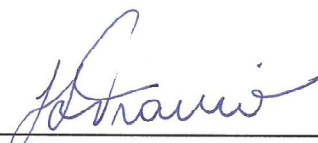
***Acacia mearnsii* tannin extract as an additive in ruminant nutrition.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de doutora em Ciência Animal.

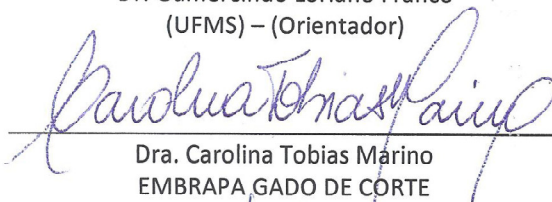
Área de concentração: Produção Animal.

Aprovado(a) em: 21/08/2014

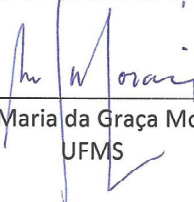
BANCA EXAMINADORA:



Dr. Gumercindo Lorian Franco
(UFMS) – (Orientador)



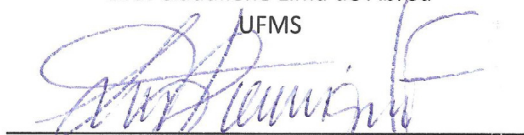
Dra. Carolina Tobias Marino
EMBRAPA GADO DE CORTE



Dra. Maria da Graça Moraes
UFMS



Dra. Claudilene Lima de Abreu
UFMS



Dr. Luís Henrique Fernandes
UFMS

*À minha família, em especial ao meu
marido Rodrigo e ao nosso filho Davi,
que por diversos momentos careceram
de minha presença, mas entenderam a
falta de tempo para convivência,
amparando-me em situações de
apreensão e também à minha pequena
Sofia que, embora ainda não tenha
nascido, já compartilha intensamente as
lutas diárias para eu conseguir concluir
satisfatoriamente esta etapa e a tempo,
dedico.*

AGRADECIMENTOS

A Deus Pai, pela oportunidade de aproveitar integralmente o livre arbítrio por Ele concedido;

A Jesus Cristo, que veio para que tenhamos vida em abundância (João 10:10);

À Nossa Senhora de Fátima, minha mãe do céu, a quem recorro nos momentos de incertezas e angústias, proporcionando acontecimentos muito além da Ciência e do entendimento humano e à Nossa Senhora da Pena, protetora das Artes, Ciências e Letras;

Aos meus pais, Jorge e Nilza, pelo amor incondicional, pelos ensinamentos diários e insistentes que construíram meu caráter, pelo oferecimento das melhores oportunidades possíveis para obtenção do conhecimento e por toda ajuda que sempre oferecem;

Aos meus sogros, Orocídio e Maria Helena, exemplos de esforço e dedicação ao trabalho, pelo apoio durante todo tempo que precisei contar com eles;

Às minhas irmãs Adriane e Aline, pela ajuda oferecida, leitura e traduções que me auxiliaram durante todo o processo e pelo companheirismo, mesmo a distância;

Ao meu marido Rodrigo pelo incentivo em ingressar no curso de doutorado, por sua amizade e companhia na alegria e na tristeza, doando-se integralmente pela sana criação do nosso Davi, meu pequeno incentivador;

Ao Professor Dr. Gumercindo Lorian Franco pela amizade e pela orientação prestada, minha profunda gratidão, pois mesmo quando lhe faltou tempo nos dias de serviço, contribuiu para o desenvolvimento do trabalho valendo-se de suas madrugadas e finais de semana;

À professora Dra. Maria da Graça Morais, que representa a dedicação à arte de educar, pela prontidão em construir o conhecimento e pelo auxílio direto que sempre pude contar durante todos estes (doze) anos como sua aluna;

Aos demais membros da banca de defesa, os professores Dr. Luís Henrique Fernandes, Dra. Camila Celeste Brandão Ferreira Ítavo, Dr. Alexandre Menezes Dias e às Pesquisadoras Doutoradas Carolina Tobias Marino e Claudilene Lima de Abreu, que prontamente aceitaram meu pedido de participar e ajudar nas correções e melhorias do meu trabalho;

À Professora Alda Izabel de Souza e a toda sua simpática equipe do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da FAMEZ, pelos ensinamentos durante as análises e pelas considerações a respeito dos resultados obtidos;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, na figura de seu atual representante o Prof. Dr. Charles Kiefer e aos demais docentes deste curso, pelas oportunidades oferecidas e aprendizagem conseguida;

A todos servidores da FAMEZ, em especial ao Sr. Antônio Straviz e à Me. Adriana, técnicos do Laboratório de Nutrição Animal, pela amizade e prontidão em contribuir;

Aos colegas de pós-graduação, Marcella D'Oliveira, Ibrahim Cortada Neto, João Artêmio, Marcelo Vedovato, Gabriella Dalla Martha, Cláudia Muniz, Gleice Ayardes, Letícia Rezende, Natália Heimbach, Jonilson Silva, Caroline Ribeiro e professora Maria de Fátima Gomes, pela amizade e convívio, pelas agradáveis trocas de experiências e pela ajuda na condução e nas discussões das etapas da pesquisa;

Aos bolsistas de iniciação científica André Nascimento e Camila Pereira que me ajudaram do início ao fim, com muita proatividade, além dos demais estagiários da Zootecnia, Anderson Bento, Raizza Tulux, Alberto Gaspar, Guilherme Kinjo, Símillia Horing, Franciele Barbosa, Jéssika Santos, Isabela Bartz, Alan Tavares, Bruno Rodrigues, Ana Carla Ribeiro, André Gaban e Aldo Felipe, pela amizade, pela ajuda prestada, pela oportunidade de ensinar e aprender todos os dias do experimento e nas nossas reuniões;

À TANAC, empresa que forneceu o produto que foi o objeto deste estudo, representada pelo Sr. Carlos Wolf (Gerente do setor P&D) que disponibilizou rapidamente informações acerca do produto sempre que solicitadas;

Ao CNPq/Capes pela concessão da bolsa, auxílio financeiro que permitiu a dedicação exclusiva ao curso durante sua vigência, contribuindo ainda para as despesas eventuais do experimento e laboratório;

À gerente de pesquisa do Ceper/Agraer, Me. Ana Karla Moulard de Mello, exemplo de amor pelo que faz, por ser solidária à minha necessidade de conclusão do curso de doutorado, apoiando-me nesta etapa final, e a todos os demais colegas de trabalho pelo convívio prazeroso e pela ajuda prestada, tornando este meu recente emprego a cada dia mais motivador, possibilitando-me aprimorar e dar continuidade no que aprendi a fazer durante os vários anos de mestrado e doutorado em Ciência Animal: ser pesquisadora ...

Enfim, a todos que, embora possam não estar diretamente mencionados nesta seção, têm conhecimento de que fizeram parte desta etapa, auxiliando-me a completar esta longa caminhada.

*“Leva na brincadeira
Não me leve a mal
Nem tudo é de primeira
Nem tudo é banal*

*Uma vida só é perfeita
Quando chega no final
Não segue uma receita
É uma história sem moral*

*Você leva a vida inteira
E a vida é curta e coisa e tal
Se você não aproveita a vida passa
E tchau*

*Leva a vida mais simples
Que a morte é sempre ingrata
Se acabar ficando quites
É a vida que te mata”*

O que se leva da vida, Túlio Dek.

RESUMO

RIBEIRO, S.S. Extrato tanífero de *Acacia mearnsii* como aditivo na nutrição de ruminantes. 2014. 81f. Tese. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2014.

Entre os benefícios do uso de ionóforos nas rações de ruminantes, destacam-se aqueles relacionados às melhorias no metabolismo energético e nitrogenado no rúmen, por favorecerem a fermentação bacteriana desejável e, conseqüentemente, o animal hospedeiro. Entretanto, em 2006 a União Europeia proibiu o uso de ionóforos na alimentação animal, estimulando assim pesquisas com aditivos naturais, considerados mais seguros. Os taninos condensados são compostos secundários extraídos das plantas que podem modular a fermentação ruminal, sendo que *in vitro* mostraram efeito antimicrobiano significativo, atuando analogamente aos ionóforos. Todavia, o efeito dos taninos sobre a resposta animal, *in vivo*, ainda não foi totalmente elucidado. Portanto, foi realizado um estudo com objetivo de avaliar o efeito do fornecimento de três quantidades de extrato tanífero, em comparação com um aditivo ionóforo, sobre a digestibilidade *in vivo* e a degradabilidade *in situ* da dieta oferecida aos ovinos. Em gaiolas individuais cinco borregos canulados no rúmen foram organizados em um delineamento quadrado latino 5 x 5, com períodos de 21 dias cada, divididos em dez dias de adaptação e 11 de coletas. Os tratamentos foram Controle: placebo; Tan 1: 0,60 g.kg⁻¹ de peso corporal (PC), Tan 2: 1,20 g.kg⁻¹PC, Tan 3: 1,80 g.kg⁻¹PC de extrato tanífero e Ionóforo: monensina a 0,75 mg.kg⁻¹PC (controle positivo). A dieta base foi o feno de alfafa (*Medicago sativa*) restrito a 3,0% do peso corporal, suplemento mineral e água *ad libitum*. Utilizou-se como fonte de taninos condensados (TC) um extrato comercial de acácia-negra (TC a 725 g.kg⁻¹ em base de matéria seca, MS). Quanto às digestibilidades dos nutrientes analisados, houve diferença significativa (P<0,05), sendo o Tan 3 (1,80 g.kg⁻¹PC) levou aos menores valores de MS, proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) digestíveis, reduzindo cerca de 15% ± 2% o aproveitamento destes nutrientes da dieta pelos animais. Em relação às degradabilidades *in situ*, os grupos Controle, Ionóforo e Tan 1, não diferiram entre si e apresentaram os maiores valores observados após 3, 8, 16, 24, 48, 72 e 96 horas de incubação do material no rúmen (P<0,05). Os valores pH (entre 6,27 e 7,12) situaram-se dentro da faixa normal no líquido ruminal. Os maiores valores de nitrogênio (N) amoniacal foram observados logo após os dois horários de fornecimento do volumoso e, no tempo de 10 horas o Tan 3 foi inferior (12,17 mg.dL⁻¹), em cerca de 11% (P<0,05), em relação ao Controle (13,65 mg.dL⁻¹). O balanço de N teve efeito significativo (P<0,05), sendo que o Tan 2 e Tan 3 levaram às menores quantidades de N absorvido em relação ao N ingerido. O N excretado via urina foi maior para o Ionóforo (0,46 g.kg⁻¹PC) e os menores para o Tan 2 e Tan 3 (ambos 0,35 g.kg⁻¹PC), alterando-se a via de eliminação de N pela adição dos taninos. Dos dez analitos sanguíneos avaliados, somente a alanina aminotransferase (ALT) foi modificada em função do tratamento aplicado (P<0,05), com os maiores valores para os tratamentos com extrato tanífero, mantendo-se, porém, dentro do intervalo de referência da espécie. A inclusão de 0,60 g.kg⁻¹PC de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* não intervém na digestibilidade dos nutrientes nem as degradações ruminais da matéria seca e da fibra do feno de alfafa. As maiores quantidades de extrato tanífero (1,20 e 1,80 g.kg⁻¹PC) aumentam a proporção do N ingerido perdido nas fezes ao passo que reduzem o volume urinário e o N perdido na urina. Os ovinos não sofrem efeitos de intoxicação por taninos de acácia-negra até a quantidade de 1,80 g.kg⁻¹PC.

Palavras-chave: Acácia-negra. Bioprodutos. Monensina. Ovinos. Polifenóis. Tanino.

ABSTRACT

RIBEIRO, S.S. *Acacia mearnsii* tannin extract as an additive in ruminant nutrition. 2014. 81p. Thesis. College of Veterinary Medicine and Animal Science, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2014.

Among the benefits of ionophores use in ruminant rations, those related to improvements in energy and nitrogen in the rumen metabolism are noticeable, favoring the desirable bacterial fermentation desirable and, therefore, the host animal. However, they were prohibited by the European Union since 2006, which stimulated researches about natural additives, considered safer than ionophores. Condensed tannins are secondary compounds extracted from plants that can modulate ruminal fermentation, and they showed significant antimicrobial effect *in vitro*, acting analogously to ionophores. Nonetheless, the effect of tannins on animal response has not been fully elucidated. Therefore, a study was conducted to evaluate the effect of the supply of three doses of tannin extract, which was compared to an ionophore additive on digestibility and *in situ* degradability in sheep. In individual cages, five rumen cannulated wethers were arranged in a latin square design 5 x 5. Each period lasted for 21 days, ten days of adaptation and 11 days of collections. Treatments were: placebo (Control); Tan 1: 0.60 g.kg⁻¹ of body weight (BW), Tan 2: 1.20 g.kg⁻¹BW, Tan 3: 1.80 g.kg⁻¹BW tannin extract and Ionophore: monensin 0.75 mg.kg⁻¹BW (positive control). The basal diet was alfalfa hay (*Medicago sativa*) restricted to 3.0 % of BW, mineral supplement and water *ad libitum*. It was used as source of condensed tannin (CT) a commercial extract of black wattle (CT at 725 g.kg⁻¹ in dry matter basis, DM). There was a significant difference in nutrients digestibilities, (P<0.05), and Tan 3 (1.80 g.kg⁻¹BW) had the lowest values of DM, crude protein (CP) and neutral detergent fiber (NDF) digestible, reducing about 15% ± 2% the use of these nutrients in the animals' diet. About the *in situ* degradability, the Control, Ionophore and Tan 1 treatments did not differ from each other and showed the highest values observed after 3, 8, 16, 24, 48, 72 and 96 hours of incubation in the rumen (P< 0.05). The pH values (between 6.27 and 7.12) stayed in a normal range for ruminal fluid. The highest values of nitrogen (N) ammonia were after the two roughage providing and, in time of 10 hours, the Tan 3 was lower (12.17 mg.dL⁻¹), at about 11% (P<0.05), than to the trial Control (13.65 mg.dL⁻¹). The N balance had a significant effect (P<0.05), and the Tan 2 and the Tan 3 resulted on the smallest amounts of absorbed N to N intake ratios. The nitrogen excreted in urine was greater for ionophore (0.46 g.kg⁻¹BW) and lower for Tan 2 and Tan 3 (both 0.35 g.kg⁻¹BW), thus it was noted a changing the N elimination route by the addition of tannins. Only alanine aminotransferase (ALT) was modified as a function of the applied treatment (P<0.05), with the highest values for treatments with tannin extract, remaining, however, within the range reference for this specie. The inclusion of 0.60 g.kg⁻¹BW tannin extract of *Acacia mearnsii* does not affect the nutrients digestibility nor rumen degradability of dry matter and alfalfa hay fiber. The greater amounts of tannin extract (1.20 and 1.80 g.kg⁻¹BW) increase the N fecal losses while urinary volume and N lost in the urine were reduced. Until 1.80 g.kg⁻¹BW of black wattle tannin extract not affect the sheep in relation of poisoning effects.

Keywords: Bioproducts. Black wattle. Monensin. Polyphenols. Sheep. Tannin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema do efeito hipotético da monensina (M) no fluxo de íons na bactéria Gram positiva	16
Figura 2 - Taninos hidrolisáveis oriundos de ácido gálico ou elágico G = unidade monomérica	23
Figura 3 – Modelo de estrutura de um tanino condensado	24
Figura 4 - Vias da biossíntese das proantocianidinas (PAC) e antocianinas (AC) e sua relação com a biossíntese de lignina (LIG). A formação intracelular dos intermediários da biossíntese de LIG, AC e PAC ocorrem por meio das enzimas: Calcona sintase (CHS), calcona isomerase (CHI), flavonona-3'-hidroxilase (F3'H), flavonona-3-hidroxilase (F3H), dihidroflavonol redutase (DFR), leucoantocianidina redutase (LAR), enzima de condensação da PAC (?), antocianidina sintase (ANS), flavonol-UDP-glicosil-transferase (FGT), glutationa-S-transferase (GST)	25
Figura 5 – Acácia-negra: planta inteira, folhas e tronco	31
Figura 6 – Extrato tanífero de acácia-negra.....	32
Figura 7 – Curva de desaparecimento da matéria seca (MS) do feno de alfafa em função do tempo de incubação <i>in situ</i> no rúmen dos ovinos. Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey (P<0,05 e CV=4,34%).....	55
Figura 8 – Curva de desaparecimento da fibra em detergente neutro (FDN) do feno de alfafa em função do tempo de incubação <i>in situ</i> no rúmen dos ovinos. Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey (P<0,05 e CV=7,43%)	56

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

Tabela 1 - Composição do feno de alfafa (<i>Medicago sativa</i>) e do extrato tanífero (<i>Acacia mearnsii</i> de Wild.) utilizados no experimento.....	44
Tabela 2 - Ingestão (I) média diária do feno de alfafa e quantidades infundidas de extrato tanífero (MS tan) em ovinos submetidos aos diferentes tratamentos	48
Tabela 3 - Coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca (MS) e conteúdos digestíveis dos componentes nutricionais da dieta oferecida aos ovinos	50
Tabela 4 – Excreções fecais diárias dos nutrientes nos tratamentos experimentais contendo extrato tanífero ou ionóforo fornecido a ovinos	53
Tabela 5 - Estimativas das variáveis de degradação ruminal da MS e da FDN do feno de alfafa em função dos tratamentos	54

ARTIGO II

Tabela 1 - Composição do feno de alfafa (<i>Medicago sativa</i>) e do extrato tanífero (<i>Acacia mearnsii</i> de Wild.) utilizados no experimento.....	63
Tabela 2 - Médias de pH em diferentes momentos de coleta de amostra de líquido ruminal dos ovinos, a partir do tempo zero (imediatamente antes) até 12 horas após o fornecimento dos tratamentos.....	67
Tabela 3 - Médias de N-amoniaco (mg.dL^{-1}) em diferentes momentos de coleta de amostra de líquido ruminal dos ovinos, a partir do tempo zero (imediatamente antes) até 12 horas após o fornecimento dos tratamentos.....	68
Tabela 4 - Consumo, excreção e balanço de nitrogênio (N) em ovinos recebendo diferentes quantidades de extrato tanífero e monensina como aditivos	70
Tabela 5 - Variáveis metabólicas sanguíneas de ovinos submetidos aos tratamentos contendo taninos ou aditivo monensina e valores referência utilizados para a espécie.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius	L	Litro
$\mu\text{g.mL}^{-1}$	Micrograma por mililitro	LIG	Lignin
μm	Micrometro	<i>ln</i>	Logaritmo neperiano
A	Acetato	mg	Miligrama
<i>a</i>	Fração solúvel	mg.cm^{-2}	Miligrama por centímetro quadrado
A:G	Relação albumina:globulina	mg.kg^{-1}	Miligrama por quilograma
A:P	Relação acetato: propionato	mL	Mililitro
AGV	Ácido graxo volátil	MM	Matéria mineral
AHC	Ácido hidrolisado de caseína	mm	Milimetro
ALT	Alanina aminotransferase	MO	Matéria orgânica
AST	Aspartato aminotransferase	MS	Matéria seca
ATP	Adenosina trifosfato	N	Nitrogênio
<i>b</i>	Fração insolúvel potencialmente degradável	NDT	Nutrientes digestíveis totais
<i>c</i>	Taxa de degradação	N-NH ₃	Nitrogênio amoniacal
CA	Conversão alimentar	OE	Óleos essenciais
CIDN	Cinza insolúvel em detergente neutro	OPG	Ovos por grama de fezes
CNF	Carboidratos não fibrosos	PAC	Proantocianidina
CV	Coefficiente de variação	PB	Proteína bruta
DE	Degradabilidade efetiva	PC	Peso corporal
DFDN	Degradabilidade da fibra em detergente neutro	PEG	Polietilenoglicol
DL 50	Dose letal media	pH	Potencial hidrogeniônico
DMS	Degradabilidade da matéria seca	PIDN	Proteína insolúvel em detergente neutro
EE	Extrato etéreo	Proc GLM	Procedimento <i>General Linear Models</i>
FDN	Fibra em detergente neutro	Qsp	Quantidade suficiente para
FDNcp	FDN corrigida para cinzas e proteína bruta	SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
g	Gramas	Tan 1	Extrato tanífero a 0,60 $\text{g.kg}^{-1}\text{PC}$
G	Globulinas	Tan 2	Extrato tanífero a 1,20 $\text{g.kg}^{-1}\text{PC}$
g.kg^{-1}	Gramas por quilograma	Tan 3	Extrato tanífero a 1,80 $\text{g.kg}^{-1}\text{PC}$
g.m^{-2}	Gramas por metro quadrado	TC	Taninos condensados
GGT	Gama glutamiltransferase	TH	Taninos hidrolisáveis
H ⁺	Hidrogênio iônico	TNT	Tecido não tecido
H ₂	Hidrogênio molecular	U	Ureia
HCl 0,005N	Ácido clorídrico a 0,005 Normal	U.LL ⁻¹	Unidades internacionais por litro
<i>k</i>	Taxa de passagem de sólidos		
Kg	Quilograma		
KOH 2N	Hidróxido de potássio a 2 Normal		

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Aditivos moduladores da fermentação ruminal	15
1.2 Uso de bioprodutos como aditivos na nutrição animal	19
1.2.1 Óleos essenciais	20
1.2.2 Saponinas	21
1.2.3 Taninos: caracterização e composição	22
1.3 Aplicações dos taninos	26
1.3.1 Taninos na nutrição animal	27
1.3.1.1 Taninos na nutrição de ruminantes	28
1.4 Caracterização do extrato tanífero de acácia-negra	31
REFERÊNCIAS	34
ARTIGO I - EXTRATO TANÍFERO DE ACÁCIA-NEGRA COMO ADITIVO ALTERNATIVO AO IONÓFORO PARA OVINOS: DIGESTIBILIDADE E DEGRADABILIDADE DO FENO DE ALFAFA	41
RESUMO	41
ABSTRACT	41
INTRODUÇÃO	42
MATERIAIS E MÉTODOS	43
RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
CONCLUSÃO	57
COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA	57
REFERÊNCIAS	57
ARTIGO II - ADITIVO TANÍFERO OU IONÓFORO NO APROVEITAMENTO DA FRAÇÃO NITROGENADA DA DIETA FORNECIDA A OVINOS.....	60
RESUMO	60
ABSTRACT	60
INTRODUÇÃO	61
MATERIAIS E MÉTODOS	62
RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
CONCLUSÃO	77
COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA	77
REFERÊNCIAS	77
CONSIDERAÇÕES FINAIS	80

1 INTRODUÇÃO

Anteriormente a maioria dos sistemas de produção animal fundamentava-se na extração máxima dos recursos naturais, que constituíam o principal insumo que fomentava a cadeia produtiva de carne e leite no país. Mais recentemente, esta visão extrativista dos recursos tem se transformado, não por estes deixarem de ser utilizados, mas a forma como são empregados nestes sistemas tem se tornado mais racionalizada e eficiente.

Na nutrição de ruminantes este fato pode ser atribuído ao maior acesso e interesse na incorporação de novas tecnologias, tal como o uso de suplementos estratégicos contendo aditivos capazes de melhorar o desempenho animal por meio de alterações positivas na microflora e ambiente do rúmen, modulando-o.

Com o advento das tecnologias na agropecuária, a pressão para adotá-las tem sido forte, pois mesmo sendo possível continuar com a produção menos intensiva e menos eficiente, a cada dia os recursos, como área útil de pastagens, estão sendo reduzidos. Somando-se a isto são apresentadas outras atividades com maior rentabilidade e mais capitalizadas, concorrentes das áreas ocupadas pela pecuária, como a produção de cereais. Para tal, o aumento dessas áreas de exploração agrícola advém, em maior escala, do desmatamento, prática que tem se tornado inviável.

Assim sendo, a utilização de técnicas que viabilizem o aumento da eficiência produtiva tendo como princípio a manutenção ou melhoria dos índices zootécnicos faz-se imprescindível no cenário contemporâneo, em que sistemas de produção de baixo impacto ambiental são almejados tanto pelo mercado interno como, principalmente, pelo externo.

Nos animais ruminantes os alimentos ingeridos são inicialmente fermentados em pré-estômagos (rúmen, retículo e omaso) e somente depois passam pela digestão enzimática que ocorre no abomaso (estômago “verdadeiro”) e no intestino delgado. No rúmen ocorre uma relação simbiótica entre o animal (hospedeiro), que contribui com o ambiente ruminal e com o suprimento dos substratos provenientes do alimento, e os microrganismos presentes que, por meio de processos fermentativos, suprem o animal com os ácidos graxos voláteis (energia) e com a proteína microbiana.

Dependendo da população de bactérias existentes e da proporção entre estas, podem ocorrer perdas energéticas substanciais (produção de metano) e perdas de nutrientes (proteólise) a partir do metabolismo microbiano ruminal, gerando excessos de gases (metano) e nitrogênio amoniacal (VAN NEVEL & DEMEYER, 1988).

Na redução de tais perdas, alguns aditivos como os ionóforos há muito vêm sendo incluídos nas rações dos animais, com o respaldo científico de que estes interferem no transporte de hidrogênio associado a metais alcalinos (maior afinidade pelo sódio, no caso da monensina ou pelo potássio, no caso da lasalocida) dificultando a reciclagem de cofatores enzimáticos necessários para a continuidade do metabolismo celular. Estes aditivos também intervêm no transporte e absorção de substratos pela célula, ocorrendo maior gasto de energia (na forma de ATP) para a manutenção do balanço osmótico, assim o crescimento microbiano é dificultado devido à exaustão energética (NICODEMO, 2002).

A monensina e a lasalocida têm sido amplamente utilizadas no Brasil como promotores de crescimento em animais confinados. Estes aditivos favorecem o crescimento das bactérias Gram negativas produtoras de propionato e succinato, inibindo as Gram positivas, que têm como principal produto final o acetato e, conseqüentemente, o metano. Porém, as bactérias Gram positivas podem desenvolver resistência após certo período de exposição e pelo uso repetido dos ionóforos, seja por uma mutação na camada externa de peptidoglicano ou por algum aumento adaptativo na atividade da bomba iônica (NEWBOLD et al., 1993; MORAIS et al., 2006).

Além deste inconveniente, a União Europeia desde 2006 proibiu o uso de aditivos ionóforos (antimicrobianos) nas rações de animais de produção, adotando o princípio da precaução na tentativa de minimizar a seleção de bactérias resistentes que poderiam comprometer a biossegurança dos produtos de origem animal para o ser humano (OJEU, 2003). Apesar de não existirem ainda trabalhos científicos que comprovem que os resíduos destes antibióticos encontrados na carne e no leite possam acumular-se no organismo humano.

Os aditivos tradicionais, como os ionóforos, há muito são empregados na nutrição animal, mas novas estratégias para este cenário mais recente demandam pesquisas atualizadas as alternativas de aditivos, para idealizar protocolos com substâncias naturais que possam substituir as tradicionalmente utilizadas, com intuito de tornar o produto final mais seguro para o consumidor, este mais informado e, portanto, mais exigente atualmente.

Tendo em vista as atuais conjunturas algumas substâncias têm sido estudadas para manipular a fermentação ruminal de forma a melhorar o aproveitamento da dieta e, conseqüentemente, a eficiência produtiva, são elas: ácidos orgânicos, ácidos graxos, leveduras, própolis, além dos extratos naturais de plantas representados pelas saponinas, taninos e óleos essenciais (MORAIS et al., 2006).

Neste contexto, objetivou-se avaliar o extrato tanífero de *Acacia mearnsii* De Wild como aditivo na dieta de ovinos alimentados com feno de alfafa.

1.1 Aditivos moduladores da fermentação ruminal

A nutrição de ruminantes é norteada pela tentativa de melhorar ou modular positivamente a eficiência de fermentação ruminal. Em termos gerais, consiste em aumentar a produção de ácido propiônico e diminuir algumas perdas, tais como as decorrentes da formação em excesso de gás metano, da ação das bactérias proteolíticas com desaminação em excesso no rúmen das proteínas de alto valor nutritivo que poderiam ser absorvidas no intestino delgado. Esta modulação visa melhorar a produtividade dos animais e ainda pode contribuir na redução da incidência de algumas doenças, como é o caso da acidose e do timpanismo.

Os antibióticos promotores de crescimento têm sido muito utilizados nos sistemas de produção animal dos Estados Unidos e em muitos outros países desde os anos 70 (BARTON, 2000; McGUFFEY et al., 2001).

Os ionóforos são antibióticos promotores de crescimento que podem reduzir ou inibir seletivamente os microrganismos do rúmen. Eles são substâncias produzidas por bactérias *Streptomyces* e, antes da década de 70 eram utilizados como antiparasitários na avicultura (coccidiostáticos), passando a serem aproveitados na dieta de ruminantes como aditivos moduladores da fermentação ruminal (NICODEMO, 2002).

No Brasil, os ionóforos mais empregados na nutrição de ruminantes são: monensina sódica, lasalocida e a salinomicina. Além destas, outros antibióticos não ionóforos como a bacitracina de zinco, a colistina, flavomicina e a virginiamicina são permitidos como aditivos melhoradores de desempenho (MAPA, 2014).

Vários trabalhos têm demonstrado que o principal mecanismo de ação dos ionóforos para melhorar a eficiência alimentar nos ruminantes está relacionado às mudanças na população microbiana do rúmen, selecionando as bactérias Gram negativas, produtoras de ácido propiônico e inibindo as Gram positivas, maiores produtoras de ácidos acético, butírico e láctico, além do H₂ e metano (McCAUGHEY et al., 1997).

Assim, atuam na redução do crescimento da população de bactérias Gram positivas que não possuem envelope extracelular (segunda membrana) que poderia dificultar a ação do ionóforo na membrana plasmática, como ocorre nas Gram negativas presentes no rúmen (RUSSEL, 1997).

Conforme Kozloski (2009), o processo de inibição dos ionóforos às bactérias Gram positivas baseia-se nas trocas iônicas entre os meios intra e extracelular destes microrganismos. A monensina, ionóforo comumente usado nos sistemas de produção de

ruminantes, é uma molécula altamente lipofílica e acopla-se à membrana celular destas bactérias interferindo em sua permeabilidade, de forma a permitirem a passagem de sódio e outros prótons para o interior celular, dissipando o gradiente eletroquímico da membrana, que culmina na redução da entrada de substratos fermentáveis e do metabolismo celular. Neste processo ocorre uma redução da concentração de íons potássio, redução do potencial hidrogeniônico (pH) pela entrada de H^+ e aumento de íons sódio no meio intracelular (Figura 1).

Desta forma inicia-se um transporte celular ativo na bactéria Gram positiva, que visa reduzir a quantidade intracelular de íons de hidrogênio, ação que demanda energia (bomba próton ATPase), reduzindo a capacidade de síntese destas bactérias e, por consequência da eficiência na continuidade da bomba iônica, culminando no aumento da pressão osmótica (acúmulo de sódio no interior) e, rompimento celular pela entrada de água do meio extracelular (MORAIS et al., 2006).

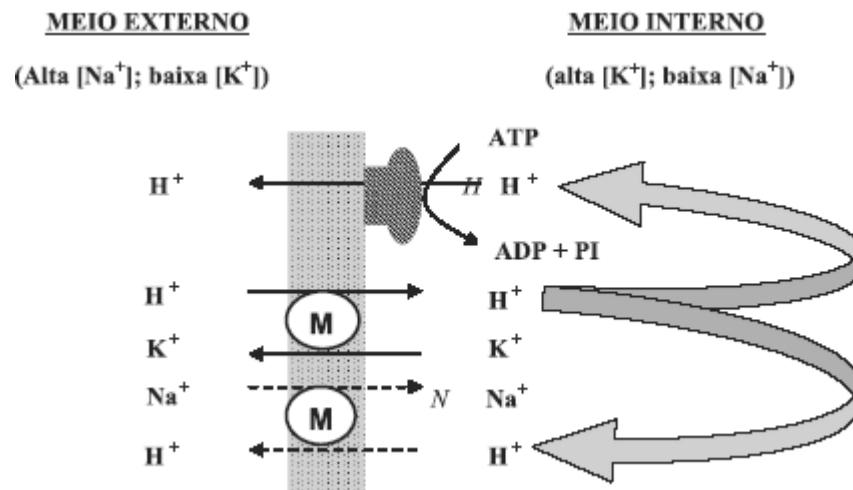


Figura 1 – Esquema do efeito hipotético da monensina (M) no fluxo de íons na bactéria Gram positiva (Adaptado de RUSSEL & STROBEL, 1989).

Um dos benefícios diretos da redução das bactérias Gram positivas é a redução dos seus produtos finais no meio ruminal, tais como os ácidos acético e butírico, e os gases metano e carbônico, que são energeticamente menos eficientes. Portanto, ocorre diminuição na relação acetato:propionato (A:P), cuja magnitude é dependente da dieta (KOZLOSKI, 2009).

Quando o sistema de produção é baseado no consumo de forragem, normalmente a relação A:P é mais elevada do que aquela com dietas ricas em carboidratos não fibrosos, como o amido, e esta relação pode reduzir de 4:1 para 2,5:1, por meio do uso dos ionóforos

(RUSSEL, 1998). Esta diminuição é benéfica, pois o propionato é importante para a nutrição do animal hospedeiro, já que é um precursor da gliconeogênese em ruminantes.

Com a redução proporcional na população de bactérias Gram positivas, conseqüentemente, a produção de metano cai em 30% menor, em decorrência da redução das bactérias celulolíticas que liberam excesso de hidrogênio durante a fermentação, que é substrato para as bactérias metanogênicas (SCHELLING, 1984).

O metano é um gás que, além de outros sistemas anaeróbios, pode ser produzido no rúmen durante o processo de fermentação dos carboidratos. No ambiente ruminal, primeiramente, o H_2 é formado durante a fermentação anaeróbia das hexoses, sendo que este pode ser utilizado na produção de ácidos graxos voláteis (AGV). Dentre os três principais AGV do rúmen, acético, butírico e propiônico, somente para a produção deste último é que ocorre remoção de hidrogênio do meio, assim, o excesso deste equivalente redutor (H_2), devido à formação dos demais AGV, precisa ser eliminado principalmente pela formação de metano (MORAIS et al., 2006).

A produção de metano pelos bovinos e outros ruminantes do ponto de vista nutricional e ambiental é indesejável porque diminui a energia metabolizável que poderia ser absorvida e utilizada pelo animal e ainda agrava o efeito estufa (FRANCO & RIBEIRO, 2007).

Nos sistemas de produção de ruminantes, a produção de metano pode assumir grandes proporções sendo uma das mais importantes perdas de eficiência (MOSS et al., 2000), pois, dependendo da dieta e manejo destes animais, este gás oriundo da fermentação ruminal pode representar uma perda de 2 a 15% da energia bruta ingerida (HOLTER & YOUNG, 1992).

Estima-se que no mundo, as fermentações entéricas dos rebanhos produzam de 160 a 200 milhões de toneladas de metano por ano. O total de metano emitido pela pecuária (fermentação ruminal e dejetos) chega a corresponder cerca de 40% de todo metano emitido pelas fontes antrópicas (STEINFELD et al., 2006). Como o metano contribui com aproximadamente 15% do aquecimento global, logo a produção de ruminantes poderia agravar em 6% o efeito estufa.

Outro efeito positivo do ionóforo é sobre a população de bactérias proteolíticas, a qual também é reduzida por meio de sua adição na dieta, ocorrendo menor degradação da proteína dietética em amônia (YANG & RUSSEL, 1993) o que possibilita um maior fluxo de aminoácidos e proteína do rúmen para o intestino delgado para serem aproveitados pelo metabolismo animal.

Isto é importante, pois a eficiência de utilização dos compostos nitrogenados é muito baixa, uma vez que apenas 20 a 30% do nitrogênio consumido por bovinos leiteiros, por

exemplo, encontra-se na proteína do leite e carne, sendo o restante excretado pelas vias fecal e urinária (OENEMA et al., 2001).

Deste modo, o nitrogênio excretado pode assumir uma grande proporção, e este, em excesso, contamina o solo e a atmosfera. Por isso, os aditivos dietéticos podem atuar positivamente, já que a taxa de degradação ruminal da proteína que leva à formação de amônia no rúmen é diminuída. Além disso, a eficiência de sincronia entre o uso deste nitrogênio liberado e da fonte de carboidrato para a síntese microbiana pode ser melhorada por meio de sua utilização e, assim, contribuem para aumentar a eficiência de conversão do nitrogênio da dieta em proteína do leite e músculos (REIS et al., 2006).

Então, levando-se em conta os pontos discutidos sobre os mecanismos de atuação dos ionóforos, esta melhoria no desempenho animal deve-se à maior eficiência do metabolismo energético e proteico no rúmen. Sabe-se que o ionóforo pode melhorar a densidade energética da dieta em 3 a 4% (MORAIS et al., 2006). Além disso, este aditivo adicionado às dietas contribui também na diminuição da acidose láctica e timpanismo, desordens que ocorrem devido à fermentação anormal no rúmen, comuns em sistemas de produção baseados em dietas com alta proporção de grãos.

Com bovinos recebendo dietas mais concentradas em confinamento, Goodrich et al. (1984) produziram uma revisão cujo conteúdo foi uma metanálise envolvendo dados de 11.274 bovinos em 228 experimentos que testaram os efeitos da monensina sobre o desempenho desses animais. Em geral, estes autores verificaram que, para cada 100 kg de ganho de peso, os bovinos que receberam monensina como aditivo dietético demandaram 7,5 kg menos alimento comparado ao Controle. No trabalho supracitado, a dose de monensina aplicada nos tratamentos foi ao redor de $0,68 \pm 0,16 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ PC}$, considerando-se a média entre os pesos inicial e final dos animais nos diferentes ensaios.

Entretanto, com animais a pasto, os benefícios do uso de ionóforos ainda não foram bem elucidados, com muitas informações controversas tanto na literatura mais antiga como na atual.

Em trabalhos conduzidos por Bagley et al. (1988) e Rode et al. (1994) não houve efeito significativo sobre o desempenho de novilhas recebendo salinomicina ou lasalocida sódica, respectivamente. Mais recentemente, Beltrame (2013) incluiu doses diárias de virginiamicina, salinomicina ou lasalocida ($0,75 \text{ mg.kg}^{-1}$ de peso corporal, PC) em suplemento mineral ofertado a animais em pasto de boa qualidade e não verificou aumento no ganho de peso de bovinos.

Por outro lado, resultados positivos a pasto foram obtidos por Valdes et al. (1988) que encontraram superioridade de 87 g de ganho de peso diário de novilhos recebendo 0,41 mg.kg⁻¹ PC ao dia de lasalocida e por McLennan et al. (2012), os quais verificaram que a monensina (0,52 mg.kg⁻¹PC) promoveu um incremento no ganho de peso na ordem de 110 g ao dia, quando compararam dois suplementos contendo ou não este ionóforo, fornecido a bovinos recebendo feno de baixa qualidade.

Resumindo 136 comparações entre animais alimentados a base de forragem, recebendo ou não antibióticos promotores de crescimento, Bretschneider et al. (2008) encontraram um efeito quadrático ($P=0,01$) sobre a conversão alimentar (CA) conforme a dosagem do ionóforo utilizado, em que aumentou o ganho de peso sem afetar o consumo de matéria seca, sendo que o nível ótimo de CA ocorreu em doses ao redor de 0,80 mg.kg⁻¹PC.

O efeito dos ionóforos depende da composição do alimento, e esta de fatores como a espécie e estágio fisiológico da planta, a qual afeta diretamente a concentração e tipo de cátions presentes, como sódio e potássio, que irão compor o meio extracelular, ou seja, o ambiente ruminal (RUSSEL & STROBEL, 1989). Deste modo os diferentes resultados observados na eficiência dos ionóforos nos sistemas de produção podem estar diretamente relacionados à qualidade diversa da dieta oferecida aos animais.

As melhorias no desempenho de bovinos poderiam estar relacionadas a alterações na utilização da energia da forragem que é consequência das mudanças na relação A:P pelo aumento do propionato devido à ação do ionóforo sobre as bactérias Gram positivas (KOSLOSKI, 2009).

1.2 Uso de bioprodutos como aditivos na nutrição animal

Apesar dos efeitos benéficos dos aditivos químicos como promotores de crescimento para animais ruminantes, alguns fatores devem ser levados em consideração. O primeiro deles é que as bactérias Gram positivas podem desenvolver resistência após certo período de exposição e pelo uso repetido dos ionóforos, seja por uma mutação na camada externa de peptidoglicano ou por algum aumento adaptativo na atividade da bomba iônica (NEWBOLD et al., 1993; MORAIS et al., 2006).

Além disso, os ionóforos em altas dosagens podem levar a riscos de intoxicação, devendo-se minimizar estes riscos por meio de cuidadosas formulações das dietas, adequação e adaptação da dose fornecida à espécie e à categoria animal do sistema de produção.

A dose letal média (DL50) para a monensina está entre 21,9 a 35,8 mg.kg⁻¹ PC, já para a lasalocida em bovinos é de aproximadamente 50 mg.kg⁻¹ PC (GALITZER et al., 1986).

Existem ainda outras preocupações relacionadas ao uso dos antibióticos ionóforos na produção animal, pois se cogita a hipótese de algum efeito cumulativo nos produtos finais destinados ao consumo humano e, com isso, decorre o receio de se promover a resistência por parte dos microrganismos patogênicos, temendo-se uma ameaça à saúde do consumidor final (CALSAMIGLIA et al., 2007).

De acordo com Reis et al. (2006), não existem trabalhos na literatura que comprovem esta hipótese de resistência das bactérias ao uso de ionóforos, apesar disso, na Europa, predomina o princípio da precaução e, portanto, houve a proibição, pelo Regulamento 1831/2003 (OJEU, 2003), do uso de antibióticos na alimentação animal e, ainda, a comercialização de produtos de origem animal cujos sistemas de produção utilizaram os ionóforos como insumo.

Assim, as pesquisas atuais buscam alternativas ao uso de aditivos antibióticos na produção animal por meio de produtos naturais aos quais já foi creditado algum efeito antimicrobiano e que poderiam atuar como moduladores da fermentação ruminal, incrementando a eficiência produtiva.

Neste contexto, algumas substâncias oriundas dos vegetais, tais como óleos essenciais, saponinas e taninos que são compostos secundários bioativos com atividade antimicrobiana que, quando são extraídos das plantas e concentrados na forma de extratos, podem ser explorados na nutrição de ruminantes, inibindo alguns grupos de microrganismos ruminais, por exemplo na formação do metano (BENCHAAR et al., 2007).

Esses compostos são metabólicos secundários das plantas e não participam dos processos bioquímicos primários delas, ou seja, do crescimento vegetal em si, sendo capazes de promover a proteção e integridade da planta contra patógenos e outros invasores atuando como uma barreira química protetora do seu sistema de defesa (BEART et al., 1985; WINA et al., 2005).

1.2.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais (OE) são compostos que incluem misturas de alguns grupos químicos (com diversos componentes ativos): terpenóides (monoterpenóides e sesquiterpenóides) e fenilpropanóides, que possuem em sua estrutura hidrocarbonetos cíclicos e são sintetizados a partir de diferentes precursores do metabolismo primário por meio de vias metabólicas distintas (CALSAMIGLIA et al., 2007).

Tais substâncias têm sido descritas na literatura tanto por sua função antimicrobiana como fungicida, sendo um dos possíveis mecanismos de ação devido à natureza hidrofóbica e sua afinidade por lipídeos, os quais podem se acumular, interagir e desestabilizar a membrana celular com conseqüente perda dos constituintes intracelulares citoplasmáticos (BURT, 2004).

Quanto aos resultados obtidos para os óleos essenciais na manipulação ruminal, houve uma redução significativa ($P < 0,05$) na taxa de produção de amônia a partir de aminoácidos livres provenientes de um hidrolisado de caseína ácido (AHC) quando este foi incubado *in vitro* com o líquido ruminal de vacas recebendo dietas a base de silagem e suplementadas com 1 g.dia^{-1} com uma mistura comercial contendo OE (BEO; Crina® ruminants; Akzo Surface Chemistry Ltda., Herfordshire, UK). A taxa de desaminação foi reduzida em 9% quando comparado ao controle, porém esta redução não diferiu do tratamento que continha o ionóforo monensina (McINTOSH et al., 2003).

Uma redução de 24% na desaminação de aminoácidos também provenientes de AHC foi observada por Newbold et al. (2004) quando o incubaram por 24 horas em líquido ruminal de ovelhas recebendo 100 mg.dia^{-1} de OE.

Alterações desejáveis nas concentrações molares dos ácidos graxos voláteis também têm sido demonstradas em estudos *in vitro*, Busquet et al. (2005) mostraram que ao se incubar em cultura contínua o óleo de alho ($31,2 \text{ mg.L}^{-1}$ e 312 mg.L^{-1} , ambos os tratamentos com 0,7% de alicina), o cinamaldeído ($31,2 \text{ mg.L}^{-1}$ e 312 mg.L^{-1}), a monensina ($1,25 \text{ mg.L}^{-1}$ e $12,5 \text{ mg.L}^{-1}$, controle positivo), além do controle negativo (sem aditivo), somente a monensina na maior dosagem promoveu as mudanças esperadas nos padrões fermentativos da microbiota do rúmen e assim como nas duas doses de cinamaldeído houve redução da proporção de acetato.

Quanto ao óleo de alho, somente na maior dosagem ocorreu aumento na proporção de propionato e redução no acetato quando comparado ao controle negativo.

1.2.2 Saponinas

As saponinas são glicosídeos de elevado peso molecular em que os açúcares (glicosídeos) interagem com moléculas não glicosídicas (agliconas) hidrofóbicas (sapogeninas) que na natureza podem ser classificados em triterpenóide ou esteroidal e estão presentes principalmente em plantas de *Yucca schidigera* (México), *Quillaja saponaria* (Chile), entre outras (MORAIS et al., 2006).

Essas substâncias possuem propriedades detergentes e emulsificantes, que podem ser a causa de morte dos protozoários ruminais quando administradas para bovinos (MAKKAR et al., 1998).

Sabe-se que os protozoários são utilizadores de nitrogênio provenientes da lise bacteriana por eles promovida, assim, ocorre um aumento da amônia ruminal, diminuindo o fluxo de nitrogênio microbiano para o duodeno. Portanto, a redução destes microrganismos por meio das saponinas pode levar a uma redução na amônia ruminal, melhorando o uso do nitrogênio dietético (MORAIS et al., 2006).

Além desses fatores, alguns estudos observaram efeito positivo da adição das saponinas sobre as emissões de metano pelos ruminantes em torno de 15 a 20% (WANG et al., 1998; HESS et al., 2003).

Outro efeito da adição das saponinas é a mudança no perfil de ácidos graxos voláteis e o incremento na produção de propionato (HESS et al., 2003; AGARWAL et al., 2006; HOLTSHAUSEN et al., 2009). Em contrapartida, outros trabalhos não encontraram este efeito (PEN et al., 2007; GOEL et al., 2008).

Apesar da utilização do extrato de yucca, ou das saponinas dela derivada, também já terem apresentado resultados positivos no desempenho de bovinos de corte (DEVANT et al., 2007) e na manipulação ruminal abordada acima, ainda ocorrem muitas divergências na literatura quanto à sua eficácia.

Este fato pode ser atribuído, pelo menos em parte, à atividade antiprotozoária das saponinas que pode ser transitória, sendo que Cheeke (2000) afirmou que a ação destes compostos depende que as cadeias núcleo e laterais de sua estrutura estejam presentes e intactas, mas no ambiente ruminal elas podem sofrer muita ação hidrolítica pelas bactérias ruminais que removem o carboidrato de suas cadeias laterais, desativando-as.

1.2.3 Taninos: caracterização e composição

Os taninos, assim como os demais bioprodutos citados nos tópicos anteriores, são metabólitos secundários produzidos pelas plantas como um mecanismo de defesa a agentes agressivos, como a herbivoria (consumo dos vegetais pelos herbívoros) ou o ataque de fungos, bactérias e insetos (BEART et al., 1985).

Segundo Silva (1999), eles podem ser encontrados em várias espécies vegetais, sendo que no Brasil destacam-se algumas plantas taniníferas: *Acacia mearnsii* De Wild. (acácia-negra ou mimosa), *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão), *Anadenanthera molleoides*

(angico), *Schinopsis lorentzii* (quebracho), *Mimosa hostilis* (jurema preta), *Lithrala molleoides* (aroeira), *Dimorphandra mollis Benth* (barbatimão de folha miúda), *Psidium guayava Raddi* (goiabeira), *Hymenaea stilbocarpa* (jatobá da mata); *Byrsonima verbascifolia Rich* (Murici), dentre outras, podendo estar presentes na casca, folhas e frutos.

Dentre estas, as principais espécies utilizadas para extração em escala industrial dos taninos são a acácia-negra e o quebracho, cujo tanino está presente, em maior escala, nas cascas dos caules. Além destas árvores, os taninos ocorrem em folhas e caules de um grande número de plantas forrageiras (AERTS et al., 1999).

Os compostos polifenólicos são as principais substâncias ativas dos taninos, os quais podem ser classificados em hidrolisáveis (poliésteres de ácido gálico e açúcares, Figura 2) e condensados (polímeros de flavonoides, Figura 3), dependendo do arranjo estrutural da molécula e da reatividade desta (VAN SOEST, 1994).

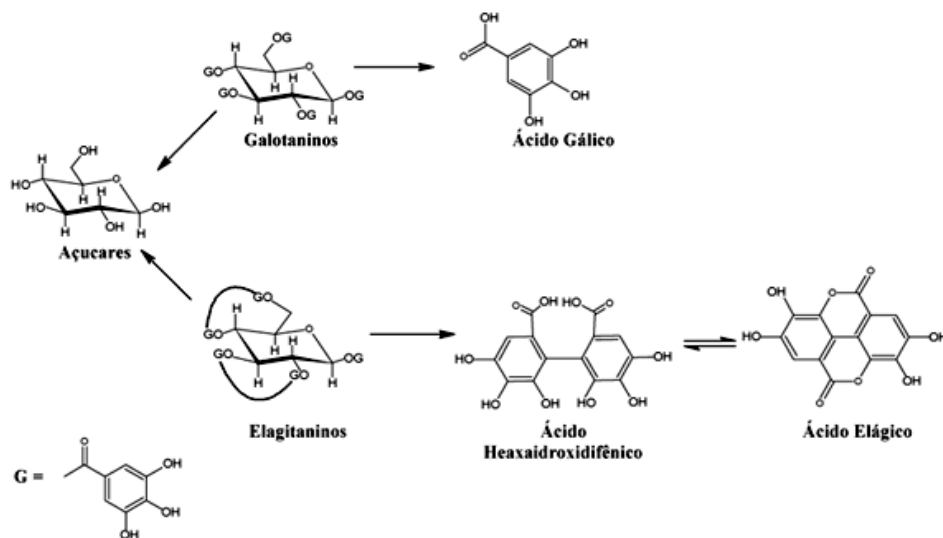


Figura 2- Taninos hidrolisáveis oriundos de ácido gálico ou elágico, G = unidade monomérica. Fonte: QUEIROZ et al. (2002).

Os taninos hidrolisáveis (TH) possuem uma estrutura poliéster que se quebra com facilidade. Tanto os galotaninos como os elagitaninos apresentam como núcleo a glicose, sendo a diferença apenas que os últimos são formados por um grupo a mais (ácido gálico).

Conforme explicam Makkar et al. (1995), apenas os TH podem ser metabolizados pelo rúmen, enquanto os taninos condensados (TC) passam pelo trato gastrointestinal com poucas modificações.

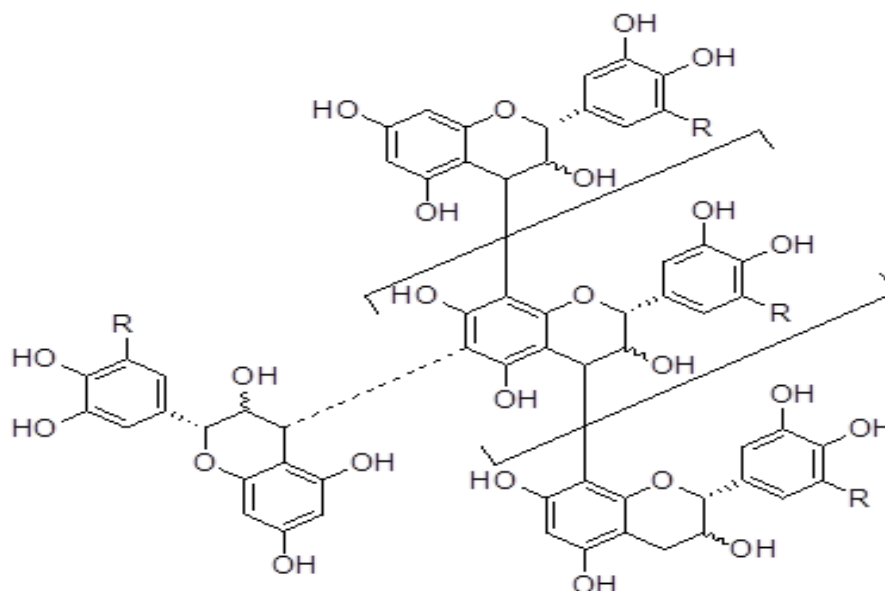


Figura 3 - Modelo de estrutura de um tanino condensado. Fonte: CARNEIRO et al. (2009).

Os TC possuem ligações carbono-carbono mais dificilmente rompidas e sua clivagem hidrolítica produz antocianidinas, e por isso, eles podem ser denominados proantocianidinas (PAC) ou ainda de poliflavonóides, sendo que variações no comprimento da cadeia dos TC levam às diferentes reatividades e atividades biológicas encontradas nas plantas (NORTON, 1999).

Estes compostos podem ser encontrados em várias espécies de dicotiledôneas, ocorrendo mais frequentemente nas leguminosas forrageiras do que nas gramíneas (JANSMAN, 1993 *apud* WAGHORN, 2008).

De acordo com Monteiro et al. (2005), apresentam ainda elevada solubilidade em água e peso molecular compreendido entre 500 e 3000 Dalton, possuindo a habilidade de formar complexos insolúveis em água com proteínas, gelatinas e alcaloides. Assim, podem ocorrer tanto na forma livre (solúvel) como combinados com alguma proteína ou carboidrato da parede celular e somente na forma solúvel ocorre seu efeito de reduzir a digestibilidade *in vitro* da proteína e da fibra em detergente neutro (RITTNER & REED, 1992).

Quando a célula vegetal encontra-se viva, as moléculas dos TH e dos TC, encontram-se isoladas no interior dos vacúolos (Figura 4) e, somente quando ocorre alguma injúria ou

morte celular por ruptura ou mastigação que estas moléculas são liberadas ao citoplasma (MIN et al., 2003).

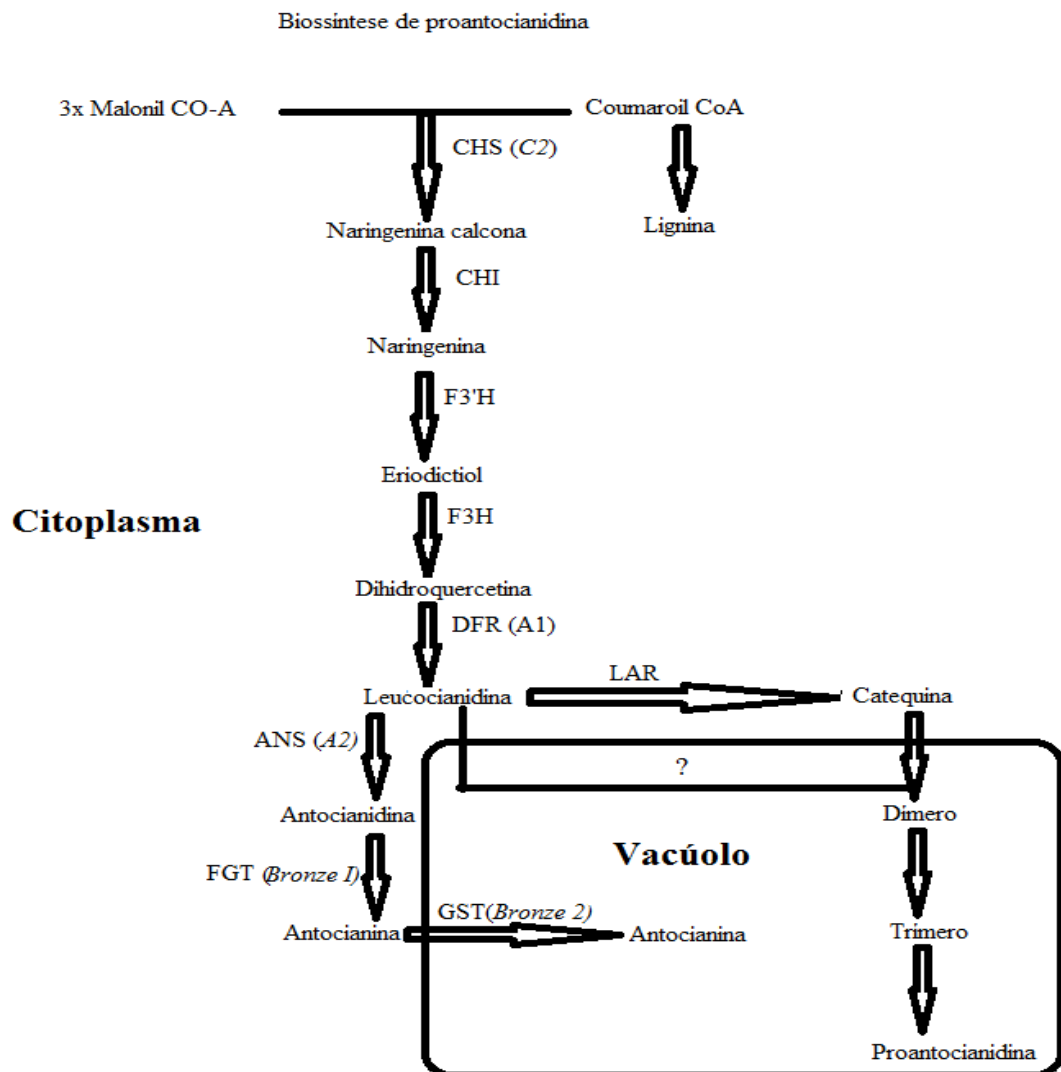


Figura 4 - Vias da biossíntese das proantocianidinas (PAC) e antocianinas (AC) e sua relação com a biossíntese de lignina (LIG). A formação intracelular dos intermediários da biossíntese de LIG, AC e PAC ocorrem por meio das enzimas: Calcona sintase (CHS), calcona isomerase (CHI), flavonona-3'-hidroxilase (F3'H), flavonona-3-hidroxilase (F3H), dihidroflavonol redutase (DFR), leucoantocianidina redutase (LAR), enzima de condensação da PA (?), antocianidina sintase (ANS), flavonol-UDP-glicosil-transferase (FGT), glutationa-S-transferase (GST). Fonte: Adaptado de AERTS et al. (1999).

Devido à alta quantidade de grupos fenólico-hidroxil, sob determinadas condições de pH do meio, os TC podem complexar proteínas, e atuar de maneira benéfica ou adversa no

organismo, sendo este fator determinado por sua concentração na substância ou vegetal utilizado, pela dose administrada, pela espécie e estado fisiológico do animal, além da composição da dieta. Na nutrição de ruminantes o efeito mais conhecido dos taninos é o de formar complexos com as proteínas, diminuindo sua degradação ruminal (MAKKAR, 2003).

Um mol de taninos pode complexar 12 mols de proteínas e esta ligação pode ocorrer por meio de ligações de hidrogênio entre os grupos fenólicos dos taninos e alguns sítios das proteínas, conferindo certa estabilidade aos complexos formados. Os compostos fenólicos, em geral, são encontrados como ésteres ou de heterosídeos apresentando solubilidade em água e solventes orgânicos polares (MONTEIRO et al., 2005).

As interações entre os TC e as proteínas ocorrem mais frequentemente por meio de ligações de hidrogênio, enquanto interações iônicas e covalentes são menos comuns. O grupo fenol dos taninos é doador de hidrogênio formando ligações com o grupo carboxílico (-COOH) da proteína (CANNAS, 1999).

As proteínas que apresentam uma estrutura mais aberta e aquelas abundantes na quantidade de aminoácido prolina possuem um coeficiente de complexação maior, enquanto as glicoproteínas, proteínas globulares e aquelas de baixo peso molecular têm baixa afinidade com os taninos (AUSTIN et al. 1989 *apud* BROOKER, 1999).

1.3 Aplicações dos taninos

Os taninos possuem um sabor adstringente que se deve à precipitação de glicoproteínas salivares levando à redução do poder lubrificante, sendo fundamentais para a formação das características organolépticas de alguns produtos como, por exemplo, o sabor e aparência do vinho tinto em seu processo de envelhecimento, e ainda, naturalmente, são constituintes de chás e alguns sucos de frutas, além de outras bebidas (SINGLETON, 1992).

Existem diversas aplicações para os taninos extraídos das plantas, principalmente pelo seu poder de coagular as proteínas, complexando-as. No processo de curtimento o tanino oriundo dos vegetais pode ser considerado como um método “limpo”, pois substitui o uso do mineral cromo, tóxico e cumulativo no ambiente, na transformação da pele em couro. Entretanto, com o aumento do uso de materiais sintéticos na fabricação de solas, o curtimento vegetal de couro para este fim diminuiu significativamente (PACHECO, 2005).

Os TC também podem ser utilizados no tratamento de efluentes, como agentes floculantes em estações de tratamento da água. Eles proporcionam uma grande aplicação industrial, pois podem ser matéria-prima na produção de resinas para a fabricação de aglomerados de madeira, borrachas, entre outros materiais construtivos, podendo substituir os

adesivos oriundos do petróleo. Os taninos também são úteis no processo de fabricação da cerveja, em que sua adição melhora a estabilidade do produto de origem vegetal, suscetível a alterações, sendo o objetivo precipitar as proteínas presentes e depois retirá-las da mistura, por meio de sedimentação ou centrifugação e filtração (BATTESTIN et al., 2004).

Além destas aplicações, na nutrição animal os taninos podem ter importantes efeitos, podendo ser considerado um fator antinutricional, em especial para monogástricos e se fornecidos em altas quantidades, tóxico para ruminantes. Segundo Oliveira & Berchielli (2007), em determinadas condições, podem promover melhorias ao sistema produtivo quando utilizado racionalmente como aditivo nas dietas de ruminantes.

1.3.1 Taninos na nutrição animal

Nas regiões tropicais, devido à sazonalidade de produção das forragens, base alimentar dos ruminantes, a proteína é o nutriente de maior limitação. A inclusão de aditivos que possam melhorar a eficiência de utilização da proteína para os ruminantes pode ser uma estratégia interessante em qualquer época do ano, ainda mais tendo em vista o elevado custo em adicionar este nutriente nos sistemas de produção, seja por meio de concentrados proteicos ou leguminosas, estas últimas conservadas ou utilizadas como bancos de proteína.

As principais vantagens dos taninos nas dietas são a proteção da proteína alimentar da degradação ruminal, o aumento da resistência e resiliência parasitária e a prevenção do timpanismo (GETACHEW et al., 2000).

Para monogástricos, o fator antinutricional dos taninos é mais importante do que em ruminantes, e, de acordo com Makkar (2003), quando em altas dosagens, o efeito tóxico pode ser prejudicial até mesmo aos ruminantes, pois ocorre demasiada absorção dos produtos da degradação dos taninos hidrolisáveis pela corrente sanguínea e transporte para o fígado, sobrecarregando-o. Com isso, o aumento da concentração dos fenóis no sangue acaba sendo maior do que a capacidade de detoxificação hepática, podendo levar a necroses no fígado e rins, com quadro de fotossensibilização até a morte do animal.

Já a degradação dos TC parece ser menos provável, pois ainda não foi observada em condições anaeróbicas em pH próximo ao ruminal, sendo que as ligações são mais difíceis de serem clivadas e podem não ocorrer (MAKKAR et al., 1995; McSWEENEY et al., 2001).

Não ocorre absorção de TC a partir do trato digestivo para a corrente sanguínea, assim, em condições normais, é provável que os TC não prejudiquem órgãos vitais como fígado, baço e rins (TERRILL et al., 1994).

1.3.1.1 Taninos na nutrição de ruminantes

Os taninos na nutrição animal sempre foram vistos apenas como um fator antinutricional e, de fato, para alguns animais seus efeitos adversos superam os benéficos, sendo tóxicos para monogástricos, mas também potencialmente para ruminantes, dependendo da dose administrada. Atualmente, as pesquisas têm mostrado que os taninos podem beneficiar os ruminantes aumentando a absorção intestinal de aminoácidos provenientes da dieta (*by pass*), além de outros benefícios como o efeito anti-helmíntico (MIN et al., 2003).

Embora os taninos possam causar toxidez em animais ruminantes (McSWEENEY et al., 2001), eles não são tão sensíveis aos compostos polifenólicos como os monogástricos e essa diferença é atribuída à ação dos microrganismos ruminais.

Em geral, o efeito dos TC é dependente da dose, com concentrações entre 20 a 45 g.kg⁻¹ de matéria seca (MS) da dieta podendo produzir efeitos benéficos, enquanto valores superiores a 55 g.kg⁻¹MS seriam responsáveis por prejuízos ao metabolismo animal (MIN et al., 2003). Em concordância Aerts et al. (1999) afirmaram que, se ingerido em alta quantidade, ou seja, acima de 60 g.kg⁻¹ MS da dieta, os TC podem ocasionar efeito depressivo sobre o consumo voluntário e redução na eficiência do processo digestivo e na produtividade de ruminantes, primeiramente devido à sua adstringência e ainda pela elevada de complexação do substrato disponível para fermentação.

A possibilidade de aumento no desempenho ocorre quando baixas concentrações de TC são utilizadas na nutrição de ruminantes e o efeito se faz via proteção da proteína alimentar, diminuindo sua degradação ruminal ou proteólise (MIN et al., 2003), e pela maior eficiência de síntese microbiana (GETACHEW et al., 2000), proporcionando, em conjunto, um maior fluxo de aminoácidos para o intestino delgado.

O modo de ação antimicrobiano dos taninos se deve, principalmente, ao potencial dos compostos polifenólicos reagirem e ligarem-se à membrana celular bacteriana e com as enzimas extracelulares secretadas (capacidade complexante). Estas interações inibem o transporte dos nutrientes pela parede celular, retardando o crescimento microbiano (McSWEENEY et al., 2001). De acordo com pesquisas relatadas por estes autores, as bactérias *Fibrobacter succinogenes* e algumas envolvidas com atividade proteolítica (*Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminobacter amylophilus* e *Streptococcus bovis*) foram inibidas na presença de taninos.

A capacidade complexante dos taninos com as proteínas é pH dependente, sendo maximizada em meios cujo pH está próximo ao ponto isoelétrico da proteína a ser ligada. Em

geral, é favorável em pH 3,5 a 7,0 e em caso de pH superior a 8,0, o complexo é desfeito, assim como em pH 1,0 a 3,0, em que cerca de 90% da proteína está na forma livre. Deste modo, a formação do complexo é favorecida no rúmen (pH em torno de 6,5), sendo o complexo dissociado no abomaso (pH cerca de 2,0-3,0) de forma a possibilitar a digestão proteico enzimática no intestino delgado (LEINMÜLLER et al., 1991).

Em experimento avaliando a possibilidade de uso na manipulação ruminal do tanino de quebracho oferecido diariamente a dezesseis ovelhas Merino, divididas em quatro grupos sendo, o Controle; Q1=0,5; Q2= 1,5; Q3= 3,0 g.kg⁻¹ PC do extrato deste vegetal, com 76% de TC, Hervás et al. (2003) concluíram que o efeito na atividade ruminal foi dependente da dose de tanino e do substrato incubado no desaparecimento *in vitro* da alfafa, palha de cevada e *Erica arborea* (nomes comuns queiroga, torga ou betouro), e o tratamento com menor nível (Q1) não ocasionou efeitos adversos na fermentação enquanto o maior nível (Q3) foi tóxico para as ovelhas.

Visando comparar a produtividade de ovelhas paridas de cordeiros gemelares em relação ao efeito de taninos condensados (grupo TC ativo) de *Lotus corniculatus* (contendo 44,5 g.kg⁻¹ de TC) com a mesma dieta, mas com adição do polietilenoglicol (PEG), um inibidor de atividade do tanino (grupo TC inativo), Wang et al. (1996) concluíram que do meio até o final da lactação (6-11 semanas) as ovelhas do grupo TC-ativo produziram mais leite (21%) e secretaram mais proteína (14%) e lactose no leite (12%) do que o grupo TC-inativo, enquanto a amônia ruminal foi menor para o tratamento com TC-ativo. Neste mesmo experimento, o ganho de peso, o crescimento da lã, ácidos graxos voláteis totais e proporções molares do ácido acético e propiônico não diferiram entre os grupos.

Entretanto, Cieslak et al. (2012), não observaram efeito sobre a produção e componentes do leite de vacas em lactação em relação à dieta controle, utilizando taninos de *Vaccinium vitis-idaea* (VVI) - nomes comuns arando vermelho ou amora alpina - como aditivo para vacas em lactação com cerca de 600 kg de PC, na dosagem de 2,0 g.kg⁻¹ MS da dieta em termos de taninos presentes na planta adicionada na dieta total a base de volumoso e concentrado (60:40).

Outra variável estudada pelos autores supracitados foi o conteúdo de ácidos graxos voláteis (AGV) do líquido ruminal, em que mesmo com baixa quantidade de taninos na dieta destes animais, obteve-se um perfil em que o propionato foi aumentado em 13,2%, reduzindo-se a relação acetato:propionato comparado ao controle experimental, sem o aditivo tanífero. Isto é desejável do ponto de vista da manipulação ruminal e dos benefícios ao meio ambiente, tendo em vista que o propionato é o ácido graxo volátil precursor da glicose e ainda, uma de

suas vias biossintéticas, desfavorece a formação de equivalentes redutores no rúmen, minimizando-se a produção de metano.

Sobre a ingestão de matéria seca (IMS), Krueger et al. (2010) utilizaram extrato tanífero de mimosa na quantidade de $0,54 \text{ g.kg}^{-1} \text{ PC}$ ($10,4 \text{ g de TC.kg}^{-1} \text{MS}$ da dieta) para novilhos em terminação (444 kg de PC) e não encontraram efeito sobre esta variável nem mesmo sobre o ganho de peso vivo dos animais confinados. Estes dados contrariaram Mueller-Harvey (2006) cujo pressuposto é de que os taninos utilizados diariamente como aditivos normalmente reduzem o consumo de MS em decorrência da adstringência que reduz a aceitabilidade dos animais.

Contudo, pode ser que nos estudos acima as quantidades de taninos adicionadas foram relativamente baixas para reproduzir este efeito do tanino como aditivo em reduzir a IMS ao se comparar com os pressupostos citados na literatura que em torno de $20 \text{ a } 45 \text{ g.kg}^{-1} \text{ de TC}$ na MS da dieta (MIN et al., 2003; VITTI et al., 2005).

Além do fator produtivo, tem-se ainda a questão ambiental, tendo em vista que os taninos têm potencial de reduzir a produção de metano, tanto pelo efeito direto, por meio da inibição das bactérias metanogênicas, como pelo indireto devido à diminuição da produção de agentes redutores no rúmen pela diminuição da fermentação (WOODWARD et al., 2001; TAVENDALE et al., 2005).

Carulla et al. (2005) observaram redução na emissão de metano (cerca de 13%) quando utilizaram $41 \text{ g.kg}^{-1} \text{MS}$ da dieta na forma de extrato tanífero oriundo da casca de *Acacia mearnsii* De Wild oferecida para ovinos. Resultados positivos neste quesito também foram obtidos por Cieslak et al. (2012) que obtiveram uma redução da produção de metano ($P=0,006$) e na concentração de amônia ($P<0,001$) em bovinos, em cerca de 8 e 46%, respectivamente.

Outro efeito ambiental positivo é a possível diminuição do nitrogênio excretado na urina, devido ao aumento no aproveitamento deste nutriente no organismo animal recebendo tanino adicionado na dieta. Mashudi et al. (1997) constataram que a concentração ruminal de amônia e a concentração de ureia plasmática de borregos foram reduzidas ($P<0,05$) com a administração de TC a $4,1 \text{ g.kg}^{-1} \text{MS}$ do pasto ingerido, oriundos do extrato de mimosa contendo $507 \text{ g.kg}^{-1} \text{ de TC}$, ou seja, com fornecimento de $7,0 \text{ g.dia}^{-1}$ do extrato bruto para os ovinos. No mesmo trabalho, o uso de TC da mesma planta a $3,6 \text{ g.kg}^{-1} \text{MS}$ do pasto (ou seja, 100 g.dia^{-1} do extrato bruto) também reduziu a concentração de ureia plasmática de vacas em lactação.

Em suma, os taninos apresentam efeitos positivos e negativos sobre o valor nutricional das dietas fornecidas, sendo que os fatores que influenciam estes efeitos são o nível de proteína bruta na dieta e sua degradabilidade, a energia disponível para a síntese de proteína microbiana e a concentração/dose destes aditivos.

1.4 Caracterização do extrato tanífero de acácia-negra

A *Acácia mearnsii* De Wild. é uma espécie leguminosa arbustiva (Figura 5) originária da Austrália, de múltiplos propósitos, tais como recuperação dos solos degradados, fixação de nitrogênio, produção de tanino e de energia na forma de carvão, dentre outros (GRIGOLETTI et al., 2003). É uma das espécies vegetais mais utilizadas como fontes de taninos para fins industriais, juntamente com o quebracho (*Schinopsis spp.*).



Figura 5- Acácia-negra: planta inteira, folhas e tronco. Fonte: Adaptado de UFSM (2011).

No Brasil vem sendo plantada principalmente com a finalidade de produção de energia e produção de taninos para curtimento do couro ou como agente flocculante no tratamento de águas e efluentes. Destaca-se a abundância desta espécie vegetal cuja área plantada no país estava em torno de 200 mil hectares (HIGA & RESENDE, 1994), principalmente na região Sul do país, sendo que, conforme Simon (1999), o programa anual de plantio no estado do Rio Grande do Sul tem oscilado entre 15 e 20 mil hectares.

O extrato natural tanífero (Figura 6) é obtido a partir da casca da acácia-negra, por meio da extração com água quente, evaporação a vácuo e subsequente secagem por pulverização, tendo como características a alta solubilidade em água, estado sólido pó de cor marrom, sabor adstringente, contendo no mínimo 75% de polifenóis totais, com conteúdo de TC descrito como 72,5% no extrato bruto obtido (Tanfood, Tanac S.A., Montenegro, RS, Brasil).



Figura 6 - Extrato tanífero de acácia-negra. Fonte: FIB (2011).

Estudando o efeito da substituição de azevém por duas leguminosas na alimentação de ovinos recebendo ou não extrato de tanino nas dietas (extrato tanífero a $41\text{g.kg}^{-1}\text{MS}$ da dieta que correspondeu a $1,40\text{g.kg}^{-1}\text{PC}$, ou ainda $25,20\text{g}$ de $\text{TC.kg}^{-1}\text{MS}$ da dieta) em um fatorial 3×2 (tipos de forragens \times presença ou não do tanino como suplemento), Carulla et al. (2005) verificaram que a suplementação com extrato de acácia-negra reduziu a concentração de amônia ruminal ($P<0,05$), a excreção de nitrogênio urinário ($P<0,05$) e a liberação de metano em 13% ($P<0,001$).

Em relação às leguminosas (trevo vermelho e alfafa) adicionadas às dietas em substituição à gramínea, Carulla et al. (2005) não observaram efeito em relação ao suprimento de proteína metabolizável para os animais e ainda verificaram um aumento ($P<0,05$) na emissão de metano em base de matéria orgânica digerida, indicando que esta estratégia não contribui para a mitigação deste gás nos sistemas de produção animal.

Grainger et al. (2009) mensuraram o efeito de TC extraídos da casca de *Acacia mearnsii* sobre a produção de leite, emissão de metano e balanço de nitrogênio de vacas em lactação mantidas em pasto de azevém e recebendo 5 kg de concentrado, por meio dos tratamentos Controle, Tanino 1 (163g TC.dia^{-1} correspondendo a $0,50\text{g}$ do extrato tanífero. kg^{-1}PC , ou ainda $9,0\text{g}$ de $\text{TC.kg}^{-1}\text{MS}$ da dieta) ou Tanino 2 (326g de TC.dia^{-1} ou $18,1\text{g}$ de $\text{TC.kg}^{-1}\text{MS}$ da dieta, reduzindo-se para 244g de TC.dia^{-1} , ou seja, $0,80\text{g}$ do extrato tanífero. kg^{-1}PC ou $13,6\text{g}$ de $\text{TC.kg}^{-1}\text{MS}$ da dieta). Observaram que ambos os níveis de TC reduziram ($P<0,05$) as emissões de metano em 14 e 29%, respectivamente, o que representou cerca de 10 e 22% de redução em base de MS ingerida.

Entretanto, Grainger et al. (2009) verificaram que houve redução na produção de leite e nas percentagens de gordura e proteína do leite, em especial quando a dose de TC foi mais

elevada, concluindo-se que as quantidades de tanino adicionadas às dietas foram muito elevadas (valor absoluto), impactando na produtividade das vacas. Ainda neste trabalho obtiveram como efeito positivo da adição dos taninos nas dietas das vacas que a porcentagem de nitrogênio do alimento perdido na urina foi reduzida ($P < 0,05$) de 39% para 26% e 22%, respectivamente para Tanino 1 e Tanino 2.

Os dois trabalhos acima tiveram o extrato tanífero de acácia-negra como material de seus estudos e trazem dados iniciais importantes a respeito do potencial deste produto nas dietas de ruminantes, mas não mensuraram os efeitos na fermentação ruminal *in situ* (parâmetros de degradação) e na digestibilidade *in vivo* da dieta oferecida. Além disso, não foi encontrada na literatura a comparação deste extrato tanífero com um aditivo ionóforo como uma alternativa natural deste tanino em atuar como modulador da fermentação ruminal.

Outra justificativa é que os estudos sob condições controladas ainda precisam ser mais explorados, principalmente do ponto de vista de avaliação do produto padronizado e com teores elevados do princípio ativo, objetivando definir melhor o ponto crítico máximo de segurança dos TC como aditivo nas dietas, tendo em vista que os trabalhos, em sua grande maioria, utilizam as plantas contendo taninos e não os extratos destes vegetais, mais concentrados na substância.

Com exceção dos ionóforos, que já têm seu mecanismo de ação muito bem definido, existe a necessidade de mais estudos para estabelecer níveis adequados de suplementação, tipo de dieta, tipo de animal, entre outros fatores que podem influenciar o uso de novos aditivos. Grande parte dos efeitos dos bioprodutos na fermentação ruminal foi estabelecida *in vitro* e a confirmação dos resultados deve ser feita *in vivo*, para melhor definir a resposta do metabolismo animal.

Neste contexto, com os resultados obtidos no presente estudo, foram elaborados dois artigos intitulados: Artigo I – **“Extrato tanífero de acácia-negra como aditivo alternativo ao ionóforo para ovinos: digestibilidade e degradabilidade do feno de alfafa”** e Artigo II – **“Aditivo tanífero ou ionóforo no aproveitamento da fração nitrogenada da dieta fornecida a ovinos”** - redigidos conforme as normas da revista Ciência Rural com algumas adaptações referentes às normas para elaboração de dissertações e teses do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (FAMEZ/UFMS).

REFERÊNCIAS

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

AGARWAL, N.; KAMRA, D. N.; CHAUDHARY, L. C. Effect of *Sapindus mokerossi* extracts on *in vitro* methanogenesis and fermentation characteristics in buffalo rumen liquor. **Journal of Applied Animal Research**, v.31, p.1-4, 2006.

BAGLEY, C. P.; FEAZEL, J. I.; MORRISON, D. G.; LUCAS, D. M. 1988. Effects of salinomycin on ruminal characteristics and performance of grazing beef steers. **Journal of Animal Science**, v.66, p.792-797, 1988.

BARTON, M. D. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. **Nutrition Research Reviews**, v.13, p. 279–299, 2000.

BATTESTIN, V.; MATSUDA, L.K.; MACEDO, G.A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v.15, p.63-72, 2004.

BEART, J. E.; LILLEY, T. H.; HASLAM, E. Plant polyphenols-secondary metabolism and chemical defence: some observations. **Phytochemistry**, v.24, p.33-38, 1985.

BELTRAME, J. A. **Promotores de crescimento para bovinos de corte criados a pasto no período das águas**. 2013. 34f. Dissertação. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2013.

BENCHAAR, C.; PETIT, H. V.; BERTHIAUME, R. et al. Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial populations, milk production and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.886-897, 2007.

BRETSCHNEIDER, G.; ELIZALDE, J. C.; PÉREZ, F.A. The effect of feeding antibiotic growth promoters on the performance of beef cattle consuming forage based diets: a review. **Livestock Science**, v.114, p.135-149, 2008.

BROOKER, J. D. Priority Setting Discussion In: BROOKER, J.D. (Ed.) Proceedings of International Workshop on Tannins in Livestock and Human Nutrition. ACIAR, **Proceedings...**, n.92, p.14-23, 1999.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p.223-253, 2004.

BUSQUET, M.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A. et al. Effects of cinnamaldehyde, garlic oil on ruminal microbial fermentation in a dual flow continuous culture. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.2508-2516, 2005.

CALSAMIGLIA, S.; BUSQUET, M.; CARDOZO, P.W. et al. Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.2580-2595, 2007.

CANNAS, A. **Tannins**: fascinating but sometimes dangerous molecules. Ithaca: Cornell University, 1999. Disponível em:

<http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/tannin.html>. Acesso em: 10 nov. 2011.

CARNEIRO, A. C. O.; VITAL, B. R.; FREDERICO, P. G. U. et al. Propriedades de chapas de aglomerado fabricadas com adesivo tânico de angico-vermelho (*Anadenanthera peregrina*) e uréia-formadeído. **Revista Árvore**, v.33, 2009.

CARULLA, J. E.; KREUZER, M.; MACHMÜLLER, A. et al. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.56, p.961-970, 2005.

CHEEKE, P.R. Actual and potential applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition. **Journal of Animal Science**, v.77, p.1-10, 2000.

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

DEVANT, M.; ANGLADA, A.; BACH, A. Effects of plant extract supplementation on rumen fermentation and metabolism in young Holstein bulls consuming high levels of concentrate. **Animal Feed Science and Technology**, v.137, p.46-57, 2007.

FIB (FOOD INGREDIENTS BRASIL). A hora e a vez dos taninos condensados. **Revista FIB**, n. 19, p.3-4, 2011. Disponível em: <http://www.revista-fi.com/materias/205.pdf>. Acesso em: 10 mai. 2014.

FRANCO, G.L.; RIBEIRO, S.S. Produção de bovinos de corte e o meio ambiente: impactos potenciais e alternativas de manejo para reduzi-los. In: OLIVEIRA, R.L.; BARBOSA, M.A.A.F. (Orgs.) **Bovinocultura de corte: desafios e tecnologias**. EDUFBA, p. 478-507, 2007.

GALITZER, S.J.; OEHME, E.W.; BARTLEY, E.E. Lasalocid toxicity in cattle: acute clinicopathological changes. **Journal of Animal Science**, v. 62, 1308-1316, 1986.

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

GOEL, G.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Changes in microbial community structure, methanogenesis and rumen fermentation in response to saponin-rich fractions from different plant materials. **Journal of Applied Microbiology**, v.105, p. 770-777, 2008.

GOODRICH, R. D.; GARRET, J. E.; GAST, D. R. et al. Influence of monensin on the performance of cattle. **Journal of Animal Science**, v.58, p. 1484-1498, 1984.

GRAINGER, C; CLARKE, T; AULDIST, M. J et al. Potential use of *Acacia mearnsii* condensed tannins to reduce methane emissions and nitrogen excretion from grazing dairy cows. **Canadian Journal of Animal Science**, v.89, p.241-251, 2009.

GRIGOLETTI, A.; SANTOS, A. F.; HIGA, A. R. et al. **Cultivo da Acácia-Negra**. Colombo: Embrapa Florestas, Sistemas de Produção, n.3, 2003.

HERVÁS, G.; FRUTOS, P.; GIRÁLDEZ, F. J. et al. Effect of different doses of quebracho tannins extract on rumen fermentation in ewes. **Animal Feed Science and Technology**, v.109, p.65-78, 2003.

HESS, H. D.; KREUZER, M.; DÍAZ, T. E. et al. Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. **Animal Feed Science and Technology**, v.109, p.79-94, 2003.

HIGA, A.R.; RESENDE, M.D.V. Breeding *Acacia mearnsii* in Southern Brazil. In: _____. Australian tree species research in China. **Proceedings...**, 48., Canberra: ACIAR, p. 158-160, 1994.

HOLTER, J. B.; YOUNG, A. J. Methane production in dry and lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.2165-2175, 1992.

HOLTSHAUSEN, L.; CHAVES, A. V.; BEAUCHEMIN, K. A. et al. Feeding saponin containing *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* to decrease enteric methane production in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.2809-2821, 2009.

KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica dos Ruminantes**. 2. ed. Santa Maria: UFSM, 2009. p. 101-103.

KRUEGER, W. K.; GUTIERREZ-BANUELOS, H.; CARSTENS, G. E. et al. Effects of dietary tannin source on performance, feed efficiency, ruminal fermentation, and carcass and non-carcass traits in steers fed a high-grain diet. **Animal Feed Science and Technology**, v.159, p.1-9, 2010.

LEINMÜLLER, E.; STEINGASS, H.; MENKE, K. Tannin in ruminant feedstuffs. **Animal Research and Development**, v.33, p.9-62, 1991.

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

MAKKAR, H. P. S.; SEN, S.; BLUMMEL, M. et al. Effects of fractions containing saponins from *Yucca schidigera*, *Quillaja saponaria* and *Acacia auriculiformis* on rumen fermentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.4324-4328, 1998.

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.

MAPA, 2014. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Aditivos melhoradores de desempenho e anticoccidianos registrados na CPAA/DFIP**. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Alimenta%C3%A7%C3%A3o%20Animal/ADITIVOS%20AUTORIZADOS%20COMO%20MD%20e%20ANTICOCCIDIANOS%202014%20-%2001%20setembro%20-%20Portal%20MAPA.pdf. Acesso em: 10 set. 2014.

MASHUDI, I. M.; BROOKES, I. M.; HOLMES, C. W. et al. Effects of Mimosa bark extract containing condensed tannins on rumen metabolism in sheep and milk production by grazing cows. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v. 57, p.126-129, 1997.

McCAUGHEY, W.P.; WITTENBERG, K.; CORRIGAN, D. Methane production by steers on pasture. **Canadian Journal of Animal Science**, v.77, p.519-524, 1997.

McGUFFEY, R. K.; RICHARDSON, L. F.; WILKINSON, J. I. D. Ionophores for dairy cattle: current status and future outlook. **Journal of Dairy Science**, v.84, p. 194-203, 2001.

McINTOSH, F. M.; WILLIAMS, P.; LOSA, R. et al. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.5011-5014, 2003.

McLENNAN, S. R.; CALLAGHAN, M. J.; SWAIN, A. J. et al. Effect of monensin inclusion in supplements for cattle consuming low quality forage. **Animal Production Science**, v.52, p. 624-629, 2012.

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

MIN, B. R.; BARRY, T. N.; ATTWOOD, G. T.; The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants feed fresh temperate forages: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v.105, p. 3-19, 2003.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v.28, p.892-896, 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**. Jaboticabal: Funep, p.539-561, 2006.

MOSS, A.R.; JOUANY, J. P.; NEWBOLD, C. J. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. **Annales de Zootechnie**, v.49, p.231-235, 2000.

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

NEWBOLD, C. J.; WALLACE, R. J.; WALKER, N. D. The effect of tetronasin and monensin on fermentation, microbial numbers and the development of ionophore resistant bacteria in the rumen. **Journal of Applied Bacteriology**, v.75, p.129-134, 1993.

NEWBOLD, C.J.; McINTOSH, F. M.; WILLIAMS, P. et al. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, v.114, p.105-112, 2004.

NICODEMO, M. L. F. **Uso de aditivos na dieta de bovinos de corte**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, Documentos, n.106, 2002. Disponível em: <www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/doc/doc106/> Acesso em: 10 fev. 2012.

NORTON, B.W. The significance of tannins in tropical animal production. In: BROOKER, J.D. (Ed.) **Proceedings of International Workshop on Tannins in Livestock and Human Nutrition**. ACIAR Proceedings, n.92, p.14-23, 1999.

OENEMA, J.; KOSKAMP, G. J.; GALAMA, P. J. Guiding commercial pilot farms to bridge the gap between experimental and commercial dairy farm; the project 'cows & opportunities'. **Wageningen Journal of Life Sciences**, v.49, p.277-296, 2001.

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.

OJEU, 2003. Regulation EC n° 1831/2003 of the European Parliament and Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. **Official Journal of the European Union**, L268, p.29-43, 2003.

Disponível em: <http://irmm.jrc.ec.europa.eu/SiteCollectionDocuments/EC-1831-2003.pdf>. Acesso em 29 abr. 2014.

PACHECO, J. W. F. **Curtumes**. São Paulo : CETESB, 2005. 76 p. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br>>. Acesso em: 01 set. 2012.

PEN, B.; TAKAURA, K.; YAMAGUCHI, S. et al. Effects of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* with or without b 1-4 galacto-oligosaccharides on ruminal fermentation, methane production and nitrogen utilization in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v.138, p.75-88, 2007.

QUEIROZ, C. R. A.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). **Revista Árvore**, v.26, p. 493-497, 2002.

REIS, R. A.; MORAIS, J. A. S.; SIQUEIRA, G. R. Aditivos alternativos para a alimentação de ruminantes. In: _____. II Congresso Latino-Americano de Nutrição Animal, 2., CLANA. **Anais...** São Paulo: CBNA, 2006.

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

RODE, L. M.; LYSYK, T. J.; BEAUCHEMIN, K. A. Intake of lasalocid-containing mineral supplements by grazing beef heifers. **Canadian Journal of Animal Science**, v.74, p.77- 82, 1994.

RUSSELL, J.B.; STROBEL, H.J. Effect of ionophores on ruminal fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, p.1-6, 1989.

RUSSEL, J.B. Mechanisms of action of ionophores. In: _____. Cornell Nutrition Conference for feed manufacturers, 59, 1997. **Proceedings...** Ithaca: Cornell University, p. 88-92, 1997.

RUSSEL, J.B. The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.3222-3230, 1998.

SCHELLING, G. T. Monensin mode of action in the rumen. **Journal of Animal Science**, v.58, p.1518-1527, 1984.

SILVA, T. S. S. **Estudo de tratabilidade físico-química com uso de taninos vegetais em água de abastecimento e esgoto**.1999. 88f. Dissertação. Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, 1999.

SIMON, A. A. **Produção de mudas de acácia-negra**: plantio 1998. Montenegro: TANAGRO, 1999. 3p. (Relatório Técnico).

SINGLETON, V. L. Tannins and the qualities of wines. **Plant Polyphenols**, v.59, p.859-880, 1992.

STEINFELD, H.; GERBER, P.; WASSENAAR, T. et al. **Livestock's long shadow**: environmental issues and options. Rome: Food and Agriculture Organization of the United States - FAO, 2006. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/magazine/0612sp1.htm>>. Acesso em: 20 dez. 2006.

TAVENDALE, M. H.; MEAGHER, L. P.; PACHECO, D. et al. Methane production from *in vitro* rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa* and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. **Animal Feed Science and Technology**, v.123, 403-419, 2005.

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

UFMS (Universidade Federal de Santa Maria). **Herbário Florestal**, 2011. Disponível em: http://w3.ufsm.br/herbarioflorestal/especie_detalhes.php?nome_filtrado=acacia-negra Acesso em 10 mai. 2014.

VALDES, J. L.; McDOWELL, L. R.; WILKINSON, N. Lasalocid for grazing steers administered in a free-choice mineral mix. **Nutrition Reports International**, v.38, p.1-8, 1988.

VAN NEVEL, C.J.; DEMEYER, D.I. Manipulation of rumen fermentation. In: HOBSON, P.N. (Ed.) **The rumen microbial ecosystem**. New York: Elsevier Science Publishers, p.387-443, 1988.

VAN SOEST, P.J. Plant defensive chemicals. In: _____. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. Cap. 13, p. 196-212.

VITTI, D. M. S. S.; ABDALA, A. L.; BUENO, I. C. S. et al. Do all tannins have similar nutritional effects? A comparison of three Brazilian fodder legumes. **Animal Feed Science and Technology**, v.119, p.345-361, 2005.

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

WANG, Y.; DOUGLAS, G. B.; WAGHORN, G. C. et al. Effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* upon lactation performance. **The Journal of Agricultural Science**, v.126, p.353-362, 1996.

WANG, Y.; McALLISTER, T. A.; NEWBOLD, L. M. et al. Effects of *Yucca schidigera* extract on fermentation and degradation of steroidal saponins in the rumen simulation technique (RUSITEC). **Animal Feed Science and Technology**, v.74, p.143-153, 1998.

WINA, E.; MUETZEL, S.; BECKER, K. The impact of saponins or saponin-containing plant materials on ruminant productions: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.8093-8105, 2005.

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

YANG, C. M.; 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.

**Extrato tanífero de acácia-negra como aditivo alternativo ao ionóforo para ovinos:
digestibilidade e degradabilidade do feno de alfafa**
**Black wattle tannin extract as an alternative additive instead of ionophore for sheep:
digestibility and degradability of alfalfa hay**
Simone da Silva Ribeiro^I & Gumercindo Lorian Franco^{II}

^I Aluna do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, FAMEZ/UFMS, Campo Grande, MS, Brasil.

^{II} Professor Adjunto, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), Campo Grande, MS, Brasil. E-mail: gumercindo.franco@ufms.br - Autor para correspondência.

RESUMO - Objetivou-se comparar o efeito de três dosagens de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* De Wild. (acácia-negra) com um aditivo ionóforo e um placebo adicionados ao rúmen de ovinos sobre a digestibilidade e degradabilidade *in situ* da matéria seca (MS) e dos nutrientes do feno de alfafa. Em gaiolas individuais, cinco borregos de $40,3 \pm 2,8$ kg, canulados no rúmen foram organizados em um delineamento quadrado latino 5 x 5, com 21 dias cada período. Os tratamentos foram Controle: placebo; Tan 1: $0,60 \text{ g.kg}^{-1}$ de peso corporal (PC), Tan 2: $1,20 \text{ g.kg}^{-1}$ PC, Tan 3: $1,80 \text{ g.kg}^{-1}$ PC de extrato tanífero comercial de acácia-negra; Ionóforo: monensina a $0,75 \text{ mg.kg}^{-1}$ PC. A dieta base foi o feno de alfafa restrito a 3,0% do PC, suplemento mineral e água *ad libitum*. Houve diferença significativa para as digestibilidades dos nutrientes ($P < 0,05$) entre os tratamentos contendo extrato tanífero, sendo que Tan 3 ($1,80 \text{ g.kg}^{-1}$ PC) resultou nos menores valores de digestibilidade da MS, proteína bruta (PB) e fibra em detergente neutro (FDN), reduzindo cerca de $15 \pm 2\%$ o aproveitamento destes nutrientes da dieta pelos animais em comparação ao controle experimental. O Controle, o Ionóforo e o Tan 1, não diferiram entre si e apresentaram as maiores médias de degradações ruminais da MS e da FDN do feno de alfafa ($P < 0,05$). A inclusão de $0,60 \text{ g.kg}^{-1}$ PC de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* De Wild. não intervém na digestibilidade ou na degradação ruminal dos nutrientes do feno de alfafa oferecido a ovinos.

Palavras-chave: bioproductos, monensina, nutrição, polifenóis, ruminantes, taninos condensados

ABSTRACT – This study aimed to compare three doses of tannin of *Acacia mearnsii* of extract (black wattle) with an ionophore and a placebo group added to the rumen of sheep on the digestibility and *in situ* degradability of dry matter (DM) and nutrients of alfalfa hay. In individual cages, cannulated on rumen, five wethers with $40,3 \pm 2,8$ kg were arranged in a latin square design 5 x 5, periods of 21 days each. Treatments were: placebo; Tan 1: 0.60 g.kg^{-1} of body weight (BW), Tan 2: 1.20 g.kg^{-1} BW and Tan 3: 1.80 g.kg^{-1} BW commercial tannin extract of black wattle; Ionophore: monensin 0.75 mg.kg^{-1} BW. Alfalfa hay restricted to 3.0% of BW, mineral supplement and water *ad libitum* were the basal diet. There was a significant difference ($P < 0.05$) in nutrients digestibility and the Tan 3 treatment (1.80 g.kg^{-1} BW) had the lowest DM, crude protein (CP), neutral detergent fiber (NDF) digestibilities, with a reducing about $15 \pm 2\%$ the use of nutrients by animals when are compared to the control group. The Control, the Ionophore and the Tan 1 treatments, did not differ from each

other and showed the highest values of DM and NDF rumen degradability of alfalfa hay ($P < 0.05$). The inclusion of 0.60 g.kg^{-1} of BW *Acacia mearnsii*'s tannin extract has not affected the nutrients digestibility and rumen degradability.

Keywords: bioproducts, condensed tannins, monensin, nutrition, polyphenols, ruminants

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos houve demanda crescente de estudos acerca de aditivos alternativos aos ionóforos e os produtos oriundos de substâncias naturais têm sido pesquisados no sentido de manipular a fermentação ruminal e melhorar a eficiência produtiva, destacando-se os taninos condensados (TC) para os ruminantes.

Os taninos podem complexar proteínas e atuar de maneira benéfica ou adversa no organismo. A resposta animal dependerá de fatores como a dose administrada, espécie e estado fisiológico, além da composição da dieta. São compostos polifenólicos que podem atuar como inibidores do crescimento microbiano e apesar do mecanismo não ser bem conhecido, provavelmente a influência destes aditivos sobre a degradação ruminal dos nutrientes é dependente da formação de complexos entre taninos e os componentes da dieta do seu efeito tanto sobre a população microbiana quanto na atividade enzimática da mesma (McSWEENEY et al., 2001).

Em geral, o efeito dos taninos é dependente da dose, sendo que concentrações de TC entre 20 a $45 \text{ g.kg}^{-1}\text{MS}$ podem produzir efeitos benéficos, enquanto valores iguais ou superiores a $55 \text{ g.kg}^{-1}\text{MS}$ são responsáveis por alguns prejuízos ao metabolismo animal, como redução no consumo voluntário e na taxa de crescimento dos ruminantes (MIN et al., 2003).

O uso de TC em baixas dosagens tem se mostrado um aditivo capaz de modular positivamente a fermentação ruminal, causando benefícios na utilização dos nutrientes, seja por meio da inibição de algumas bactérias (BELE et al., 2010), ou por meio da complexação da proteína alimentar, diminuindo a degradabilidade ruminal (MEZZOMO et al., 2011) e aumentando a disponibilidade de proteína alimentar no duodeno.

Na análise de novos aditivos como potenciais substitutos dos ionóforos nas dietas de ruminantes devem-se levar em consideração possíveis efeitos deletérios que prejudicam o desempenho dos animais, ainda mais quando se trata de um aditivo que, apesar de natural, tem um limite já preconizado, por se tratar, antes de tudo, de um potente fator antinutricional quando administrado em altas dosagens.

Neste aspecto, alguns trabalhos (BEELEN et al., 2006a; OZKOSE et al., 2011) têm realizado ensaios *in vitro* utilizando taninos naturais de plantas com baixa concentração. Os

ensaios de laboratório baseiam-se na adição de tanino em meio de cultivo onde as bactérias anaeróbias são incubadas, para testar o seu efeito, sem qualquer adaptação inicial de dosagens e isto pode resultar somente como um inibidor do crescimento.

Por esta razão são necessárias mais informações como análises da digestibilidade *in vivo* dos alimentos utilizados nas dietas para estudo dos efeitos dos taninos em animais gradativamente adaptados a esse aditivo, efetuando-se a comparação entre o aditivo mais tradicionalmente utilizado e o alternativo, buscando-se estabelecer a quantidade adequada para melhorar o aproveitamento dos nutrientes oferecidos.

Assim, supõe-se que há uma quantidade de extrato tanífero de acácia-negra cujos taninos condensados atuam como aditivo nutricional, modulando a fermentação de forma a reduzir a degradação ruminal do feno de alfafa, com mínimo de interferência na digestibilidade total dos nutrientes do alimento.

Realizou-se este trabalho com o objetivo de comparar três quantidades de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* De Wild. (acácia-negra) com o aditivo ionóforo sobre a digestibilidade e degradabilidade *in situ* da matéria seca e dos nutrientes do feno de alfafa.

MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Metabolismo Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ) na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), campus de Campo Grande, durante os meses de abril a agosto de 2013.

Utilizaram-se cinco ovinos mestiços, castrados e portadores de cânula permanente no rúmen, com peso corporal (PC) médio inicial de $40,3 \pm 2,8$ kg, que alojados em gaiolas metálicas individuais, adequadas para ensaios de digestibilidade *in vivo*, providas de comedouros, bebedouros e cocho próprio para suplemento mineral.

O delineamento experimental foi um quadrado latino 5x5, com cinco tratamentos e cinco períodos de 21 dias, sendo dez dias de adaptação aos tratamentos e 11 dias de coletas de dados. Os animais receberam feno de alfafa (*Medicago sativa*) triturado grosseiramente (Tabela 1), restrito a 30 g.kg^{-1} (3,0%) do PC em base de matéria seca (MS) dividido em dois tratamentos, às 7:00 horas e às 17:00 horas, com água e suplemento mineral para ovinos *ad libitum*. A quantidade de feno ofertada visou atender a exigência para crescimento de borregos de oito meses (40 kg) com maturidade tardia (NRC, 2007).

Tabela 1 - Composição do feno de alfafa (*Medicago sativa*) e do extrato tanífero (*Acacia mearnsii* De Wild.) utilizados no experimento

Ingrediente	MS (g.kg ⁻¹)	Composição químico-bromatológica (g.kg ⁻¹ de MS)								
		MO	MM	PB	EE	FDNcp	CNF	NDT	Fenóis totais	Taninos condensados
Feno de alfafa	859,7	899,9	100,1	189,5	18,4	457,8	234,2	576,8	12,5 ¹	0,3 ¹
Extrato tanífero	930,0	973,7	26,3	22,0	1,3	-	-	-	750,0 ²	725,0 ²

¹ Valores aproximados, encontrados por Nozella (2001).

² Produto comercial (Tanfood, Tanac S.A., Montenegro, RS, Brasil).

MS: material seca; MO: matéria orgânica; MM: matéria mineral (cinzas); PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo; FDNcp: fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína da FDN ((FDN-(CIDN+PIDN)), (SNIFFEN et al.,1992); CNF: carboidratos não fibrosos ((100-(Cinzas + PB + FDNcp + EE)), (SNIFFEN et al.,1992); NDT= nutrientes digestíveis totais (Controle); TC=Taninos condensados.

Os níveis de garantia do suplemento mineral utilizado foram: 150 g.kg⁻¹ de cálcio, 90 g.kg⁻¹ de fósforo, 72 g.kg⁻¹ de sódio, 50 g.kg⁻¹ de enxofre, 900 mg.kg⁻¹ de flúor, 20 mg.kg⁻¹ de cobalto, 250 mg.kg⁻¹ de cobre, 28 mg.kg⁻¹ de iodo, 600 mg.kg⁻¹ de manganês, 9,0 mg.kg⁻¹ de selênio e 1800,0 mg.kg⁻¹ de zinco.

No momento do trato da manhã, forneceram-se, diariamente, mediante infusão intraruminal, os seguintes tratamentos: Controle: placebo, ou seja, apenas água destilada (200 mL); Tan 1: 0,60 g.kg⁻¹PC, Tan 2: 1,20 g.kg⁻¹PC, Tan 3: 1,80 g.kg⁻¹PC de extrato tanífero diluído em água destilada qsp. obtenção do volume de 200 mL em todos os tratamentos; Ionóforo: monensina a 0,75 mg.kg⁻¹PC (controle positivo com a quantidade de água igual ao controle, adicionada logo após o ionóforo).

Como fonte de taninos condensados utilizou-se o extrato solúvel comercial obtido da casca da *Acacia mearnsii* De Wild. (acácia-negra), que contém 72,5% de TC, ou seja, 725 g.kg⁻¹MS de extrato tanífero (Tanfood, Tanac S.A., Montenegro, RS, Brasil).

A quantidade máxima pressuposta de TC de 55 g.kg⁻¹MS da dieta (MIN et al., 2003; VITTI et al., 2005), que corresponderia a 2,30 g.kg⁻¹PC de extrato tanífero nas condições do presente estudo, não foi ultrapassada na concepção dos tratamentos experimentais. Baseado no consumo inicialmente estimado de 1,2 kg de MS por dia de feno pelos ovinos pesando 40,3 kg, as quantidades estudadas nos tratamentos contendo taninos foram equivalentes a 14,6 (Tan 1); 29,2 (Tan 2) e 43,8 g de TC.kg⁻¹MS da dieta (Tan 3).

Em relação à quantidade de ionóforo, esta foi estabelecida de acordo com valores preconizados por Bretschneider et al. (2008), em amplo estudo envolvendo comparações dose-efeito de diferentes aditivos promotores de crescimento adicionados às dietas contendo volumosos como base alimentar.

Por ocasião do alojamento nas gaiolas e ao início de cada período experimental foi feito o exame parasitológico de contagem de ovos por grama de fezes (OPG), e foi necessária a aplicação de anti-helmíntico somente na entrada dos animais durante adaptação às gaiolas experimentais.

Cada período experimental teve duas fases, uma fase de adaptação dos animais às dietas com duração de dez dias (d1-d10), e a fase de coleta de dados de seis dias (d11-d16), destinada à coleta das amostras para digestibilidade (feno oferecido, sobras, fezes totais), além de cinco dias para o ensaio de degradabilidade *in situ* (d17-d21).

Apesar do fornecimento do feno de alfafa ter sido mantido restrito a 3,0% do PC, houve sobras de alguns animais durante os diferentes períodos do experimento, que foram recolhidas antes do trato matinal e armazenadas para análises futuras. A cada novo período, os animais eram pesados em jejum de sólidos de 16 horas para adequar seus requerimentos de ingestão de feno e os fornecimentos dos tratamentos e ainda, após cada período, os ovinos eram redistribuídos, de forma que ao final do experimento todos haviam passado pelos cinco tratamentos.

As fezes foram captadas diretamente em bolsas coletoras adaptadas aos animais por meio de fivelas reguláveis, sendo coletadas duas vezes ao dia, antes do manejo alimentar. Adotou-se a coleta total de fezes em que os pesos de cada coleta do dia foram anotados em planilha e depois elas foram amostradas (10% do total), acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados e congeladas para análises posteriores. Ao final dos períodos experimentais as amostras foram pré-secas, pesadas e homogeneizadas, procedendo-se então a moagem e encaminhamento para as análises químico-bromatológicas.

No Laboratório de Nutrição Animal da FAMEZ/UFMS procedeu-se às análises das fezes, dos alimentos e das sobras, para MS, matéria orgânica (MO), cinzas ou matéria mineral (MM), proteína bruta (PB) e extrato etéreo (EE), segundo Silva & Queiroz (2002).

Empregou-se a técnica dos saquinhos filtrantes para as análises de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) com saquinhos 5×5 cm e gramatura 100 g.m⁻² (tecido não tecido - TNT), nos quais foram adicionados 0,50 g de amostras em triplicatas mais o branco. Realizou-se a análise da FDN, desta maneira, também para o material proveniente da degradação ruminal *in situ* (resíduo) em todos os horários, analisando-se a fibra submergindo os saquinhos com amostras em solução detergente (VAN SOEST et al., 1991) em extrator de fibra (Tecnal, TE-149; Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil).

Procedeu-se à correção da FDN (para obter-se o FDNcp) dos alimentos, fezes e sobras para a proteína da parede celular e cinzas insolúvel em detergente neutro (PIDN e CIDN,

respectivamente). Os carboidratos não fibrosos foram calculados de acordo com Sniffen et al. (1992), usando $CNF = 100 - (PB + Cinzas + FDN_{cp} + EE)$. Já os nutrientes digestíveis totais (NDT) foram estimados com base no ensaio de digestibilidade realizado, onde, $NDT = PB_{digestível} + FDN_{cp}_{digestível} + 2,25 * EE_{digestível} + CNF_{digestível}$ (SNIFFEN et al., 1992).

Obtiveram-se as ingestões (fornecidos – sobras) e os coeficientes de digestibilidade aparente (nutriente ingerido-nutriente excretado/nutriente ingerido) da MS, MO, PB, FDN_{cp}, FDA, EE, CNF e NDT.

As degradabilidades da MS e da FDN do feno de alfafa foram estimadas pela técnica *in situ* com sacos de náilon de 5 x 10 cm de área livre, porosidade de 50 µm, que foram pesados vazios e depois preenchidos com feno de alfafa (pré-seco a 55 °C e moído utilizando-se moinho com peneira de crivos de 2 mm). Os saquinhos foram pesados de forma a manter-se uma relação de 25 mg.cm⁻² e foram fechados e atados em argolas, sendo incubados em duplicatas diretamente no rúmen dos ovinos adicionando-se para cada horário um saquinho branco, sem amostra.

Para incubação no rúmen, nos cinco últimos dias de cada período de coletas, os saquinhos foram presos a uma corrente de metal inoxidável (50 g), ligada a uma pequena âncora de aproximadamente 100 g, de modo que os saquinhos ficassem sempre imersos na digesta ruminal.

Foram então retirados conforme o tempo de incubação de 0, 3, 8, 16, 24, 48, 72 e 96 horas, com tempo 0 correspondendo à fração solúvel (a) em água a 38°C durante uma hora. Adotou-se o seguinte esquema de manuseio dos saquinhos: “d17” às 7 horas incubação dos sacos de 96, 72 e 24 horas; “d18” às 7 horas incubação dos sacos de 48 horas e retirada dos sacos de 24 horas; “d20” às 7 horas incubação dos sacos de 8 e 3 horas e retirada dos sacos de 72 e 48, às 10 horas retiraram-se os sacos das 3 horas e às 15 horas retiraram-se os das 8 horas e acrescentam-se os das 16 horas; “d21” às 7 horas retirada dos sacos remanescentes, de 96 e 16 horas.

Após cada retirada do rúmen, os sacos foram colocados em água gelada e depois lavados em máquina tipo tanquinho por três ciclos de cinco minutos cada, em seguida foram secos em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas e pesados após estabilizar com a temperatura ambiente. A diferença deste valor obtido em relação ao material incubado foi utilizada para os cálculos das degradabilidades da MS nos referidos tempos de incubação e o extrator de fibra foi empregado para as avaliações da FDN do material incubado e do residual, utilizando o saquinho 5x5 de TNT, possibilitando o cálculo das estimativas da degradabilidade potencial da FDN em cada tempo de permanência no rúmen.

Estimaram-se também as degradabilidades efetivas da MS e da FDN e ainda, para o cálculo das respectivas taxas de degradação destas frações por hora, “c”, foi subtraída da fração potencialmente degradável (fração *b*) a parte solúvel (fração “a”) e a insolúvel (parte não degradada). A estes resultados foi aplicado o logaritmo neperiano “ln” e realizou-se uma regressão linear simples, utilizando-se os horários de incubação para os valores de “x” e o “ln” dos valores de degradação para “y”. A fração “c” foi considerada como o valor da inclinação da reta obtida. Calculou-se a degradabilidade efetiva (DE) de acordo com Ørskov & McDonald (1979), em que $DE = a + (b \times c) / (c + k)$, sendo “k” a taxa de passagem de sólidos estimada no rúmen, considerada, no presente estudo como 5% por hora, conforme sugerem Huntington & Givens (1995).

Considerou-se como degradação potencial do feno de alfafa aquela obtida no momento em que ocorre a estabilidade no desaparecimento do substrato nos tempos de incubação ruminal.

Os dados de digestibilidade foram avaliados segundo o modelo: $Y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + A_k + e_{ijk}$. Posto que, Y_{ijk} = observação do efeito do tratamento *i* no período *j*, do animal *k*, μ média geral, T_i = efeito do tratamento *i*, em que *i* = 1 (Controle), 2 (Tan 1), 3 (Tan 2), 4 (Tan 3) ou 5 (Ionóforo); P_j = efeito do período *j* (*j* = 5 períodos experimentais); A_k = efeito do animal *k* (*k* = 5 animais) e e_{ijk} = erro aleatório associado a cada observação.

Para avaliação dos dados de degradação consideraram-se os fatores: período experimental, animal, tratamento, tempo de incubação, além da interação tratamento com o tempo. O modelo estatístico utilizado foi o seguinte: $Y_{ijkl} = \mu + T_i + B_j + A_k + P_l + (TB)_{ij} + e_{ijkl}$, em que, Y_{ijkl} = observação do efeito do tratamento *i* para tempo de incubação *j* no período *k*; μ = média geral T_i = efeito do tratamento (*i* = 1 (Controle), 2 (Tan 1), 3 (Tan 2), 4 (Tan 3), 5 (Ionóforo)); B_j = efeito do tempo de incubação no rúmen (*j* = 1, ..., 7); A_k = efeito do animal (*k* = 1, ..., 5), P_l = efeito do período (*l* = 1, ..., 5); TB_{ij} = interação entre o tratamento *i* e o tempo de incubação *j* e e_{ijkl} = erro aleatório associado a cada observação.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o Proc GLM (Procedimento *General Linear Models*) do pacote estatístico SAS (*Statistical Analysis System*) versão 8.0. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente experimento, apesar da restrição quantitativa da dieta base em 3,0% da MS em relação ao PC dos animais ao início de cada período experimental, a ingestão média observada de MS foi de 2,82% ($\pm 0,05\%$) em relação ao PC, pois no decorrer do experimento ocorreram sobras de feno nos cochos de alguns animais (Tabela 2).

Tabela 2 - Ingestão (I) média diária do feno de alfafa e quantidades infundidas de extrato tanífero (MS tan) em ovinos submetidos aos diferentes tratamentos

Ingestão ¹	Tratamentos ²					CV (%)	Valor P	
	Controle	Tan 1	Tan 2	Tan 3	Ionóforo			
	g							
IMS feno	1163,00	1189,60	1213,37	1256,46	1169,27	5,71	0,2524	
MS tan ³	0,00 ^d	24,40 ^c	51,20 ^b	80,00 ^a	0,00 ^d	10,62	<0,0001	
IMS total	1163,00 ^b	1214,00 ^{ab}	1264,57 ^{ab}	1336,46 ^a	1169,27 ^b	5,56	0,0107	
IMO feno	1047,13	1070,59	1092,44	1130,69	1051,57	5,66	0,2439	
IPB feno	223,53	230,13	234,44	232,05	225,61	5,37	0,6228	
IEE feno	16,52	16,79	17,13	17,75	16,76	5,62	0,3446	
IMM feno	115,87	119,01	120,93	125,77	117,71	6,84	0,4155	
IFDNcpfeno	520,80	533,71	543,41	558,73	523,15	5,32	0,2650	
ICNF feno	286,28	289,96	297,47	322,16	286,05	8,16	0,1653	
INDT feno	670,60	662,90	635,08	639,94	666,80	6,46	0,5800	
	g.kg ⁻¹ PC							
IMS feno	28,69	28,28	28,35	27,94	28,16	2,72	0,6368	
MS tan ³	0,00 ^d	0,58 ^c	1,20 ^b	1,78 ^a	0,00 ^d	4,32	<0,0001	
IMS total	28,69	28,86	29,54	29,72	28,16	2,67	0,0548	
IMO feno	25,83	25,46	25,54	25,14	25,34	2,79	0,6441	
IPB feno	5,53	5,46	5,46	5,16	5,43	4,61	0,2169	
IEE feno	0,41	0,40	0,40	0,40	0,40	2,57	0,4911	
IMM feno	2,86	2,82	2,81	2,80	2,82	3,53	0,8773	
IFDNcpfeno	12,86	12,69	12,75	12,41	12,62	3,41	0,5755	
ICNF feno	7,03	6,91	6,92	7,17	6,88	3,65	0,3935	
INDT feno	16,56	14,93	15,57	14,09	16,26	8,96	0,0882	

MS= matéria seca, MO= matéria orgânica, PB = proteína bruta, EE = extrato etéreo, MM = matéria mineral, FDNcp = fibra em detergente neutro livre de cinzas e proteína bruta, CNF = carboidratos não fibrosos, NDT = nutrientes digestíveis totais, PC= peso corporal.

^{a,b,c} Nas linhas médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$); CV (%)= Coeficiente de variação.

¹ Total = oriundo do volumoso ingerido somado ao nutriente originário do extrato tanífero infundido no rúmen;

² Tratamentos foram: Controle (placebo); Tan 1 (0,60 g.kg⁻¹PC de extrato tanífero); Tan 2 (1,20 g.kg⁻¹ PC de extrato tanífero); Tan 3 (1,80 g.kg⁻¹PC de extrato tanífero); Ionóforo (0,75 mg.kg⁻¹PC do princípio ativo monensina);

³ Tan = quantidade em MS do extrato tanífero infundido no rúmen;

Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre as ingestões de MS e dos nutrientes do feno oferecido aos animais, tanto na quantidade diária ingerida (g.dia⁻¹) como nas ingestões relativas ao peso corporal dos animais (g.kg⁻¹ PC), mostrando que os diferentes tratamentos foram igualmente beneficiados quando se leva em consideração a qualidade da dieta basal oferecida e consumida pelos animais.

Quanto às quantidades infundidas de extrato tanífero (MS tan) houve diferença significativa ($P < 0,0001$) que pode ser explicada pelos tratamentos que tiveram quantidades distintas de extrato tanífero infundido, que levou a diferenças significativas ($P < 0,05$) na IMS total em g.dia⁻¹, não afetando, entretanto, as quantidades totais de MS ingerida nos tratamentos (Tan 1, Tan 2 e Tan 3) que continham a fonte de tanino.

Apesar da inclusão crescente do extrato tanífero ter resultado em maior contribuição na fração de MS total ingerida, esta inclusão não afetou ($P > 0,05$) as ingestões totais dos demais nutrientes, tal como a proteína bruta, já que o teor deste nutriente no tanino utilizado é relativamente baixo (2,2%). Quando se compararam os valores em relação ao PC dos animais (g.kg⁻¹PC), mesmo no nível de tanino mais elevado, não ocorreu influência do tratamento sobre as ingestões totais, nem mesmo da MS e MO. Em geral, o consumo observado, em média 1,2 kg.dia⁻¹, foi muito próximo do esperado (1,3 kg.dia⁻¹) de acordo com o NRC (2007).

Vários trabalhos revisados por Makkar (2003) relataram o efeito depressor no consumo de animais recebendo dietas contendo taninos, principalmente devido à sua adstringência. Entretanto, há na literatura trabalhos cujos efeitos na ingestão de alimentos não foram afetados pela presença de taninos na dieta, como por exemplo, Krueger et al. (2010), que ao fornecerem TC de mimosa a 14,9 g.kg⁻¹MS (na dieta total com alta proporção de grãos) a novilhos de corte em terminação não observaram diferença no consumo quando comparado com o controle experimental.

Entretanto, no presente estudo, este efeito não pode ser avaliado devido à via de administração dos tratamentos que foi a intraruminal, visando garantir o consumo total destes. Apesar de se utilizar esta via, os animais não apresentaram qualquer sintoma de intoxicação, inferindo-se que o limite de toxidez não foi atingido por estes tratamentos. Efeitos tóxicos após cinco dias de experimento foram observados por Hervás et al. (2003) quando forneceram 166 g.kg⁻¹MS de TC de extrato comercial de quebracho para ovinos.

A quantidade de extrato tanífero nos tratamentos foi de 20,5; 42,2 e 63,7 g.kg⁻¹MS do feno ingerido, para Tan 1, 2 e 3, respectivamente, sendo que destes, 725 g.kg⁻¹ (Tanfood, Tanac S.A., Montenegro, RS, Brasil) corresponde à composição de TC neste extrato, ou seja, a quantidade total em TC nos tratamentos contendo este aditivo foi de até 14,9; 30,6 e 46,2 g.kg⁻¹MS ingerida, correspondente aos níveis 0,60, 1,20 e 1,80 g.kg⁻¹PC de extrato tanífero, respectivamente.

Estes valores não ultrapassaram o informado por Min et al. (2003) de 55 g.kg⁻¹ MS da dieta em termos de TC, a partir do qual poderia comprometer o crescimento e produção dos animais que recebem este tipo de substância na dieta.

Quanto aos coeficientes de digestibilidades aparentes, observa-se que houve diferença significativa (P<0,05) para todos os nutrientes analisados, sendo que, em geral, o tratamento com maior nível de tanino (1,80 g.kg⁻¹PC, Tan 3) resultou nas menores digestibilidades, exceto para o extrato etéreo digestível que pode originar-se de um erro analítico, provavelmente pela grande influência de componentes não lipídicos como pigmentos, ceras e vitaminas lipossolúveis em análises de forrageiras, tendo em vista a baixa quantidade de gorduras nos volumosos, o que eleva a variação dos desvios proporcionais à média dado o maior coeficiente de variação observado para este parâmetro em relação aos demais (Tabela 3).

Tabela 3 - Coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca (MS) e conteúdos digestíveis dos componentes nutricionais da dieta oferecida aos ovinos

Digestibilidade	Tratamentos ¹					CV(%)	Valor P
	Controle	Tan 1	Tan 2	Tan 3	Ionóforo		
MS (fração 0-1)	0,608 ^a	0,588 ^{ab}	0,552 ^{bc}	0,531 ^c	0,600 ^a	3,49	0,0002
	Quantidade digestível (g.kg ⁻¹ MS)						
MO	637,69 ^a	615,50 ^{ab}	576,71 ^{bc}	560,45 ^c	632,28 ^a	3,19	0,0001
PB	747,20 ^a	713,68 ^{ab}	672,58 ^{bc}	634,41 ^c	752,38 ^a	3,60	<0,0001
FDNcp	523,07 ^a	490,47 ^{ab}	446,65 ^{bc}	434,23 ^c	501,28 ^a	5,31	0,0006
FDA	516,78 ^a	456,48 ^a	382,56 ^b	325,75 ^b	507,24 ^a	8,16	<0,0001
EE	153,81 ^b	185,77 ^{ab}	224,49 ^{ab}	255,99 ^a	171,78 ^{ab}	24,26	0,0315
CNF	786,37 ^{ab}	789,20 ^{ab}	753,60 ^{bc}	740,52 ^c	799,55 ^a	2,60	0,0025
NDT	576,80 ^a	557,31 ^{ab}	523,52 ^{bc}	508,84 ^c	571,75 ^a	3,19	0,0002

^{ab,c} Nas linhas médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,05); CV (%)= Coeficiente de variação.

¹ Tratamentos foram: Controle (placebo); Tan 1 (0,60 g.kg⁻¹PC de extrato tanífero); Tan 2 (1,20 g.kg⁻¹ PC de extrato tanífero); Tan 3 (1,80 g.kg⁻¹PC de extrato tanífero); Ionóforo (0,75 mg.kg⁻¹PC do princípio ativo monensina).

As digestibilidades aparentes observadas no tratamento contendo ionóforo não diferiram (P>0,05) daquelas obtidas no Controle, mostrando que a monensina oferecida na proporção de 0,75 mg.kg⁻¹PC não melhorou o aproveitamento dos nutrientes advindos do feno de alfafa pelos animais. Isto possibilita inferir que não houve redução na degradabilidade ruminal da proteína do feno pela adição do ionóforo.

Inferiu-se, então, que não houve redução na degradabilidade ruminal dos nutrientes do feno pela adição do ionóforo, possivelmente pela ausência de gradiente de concentração de potássio entre o meio ruminal e intracelular microbiano, impossibilitando a saída do potássio do interior que é uma etapa determinante do início da ação ionofórica, como resultado do provável elevado teor de potássio geralmente observado na alfafa.

Este resultado concorda com o obtido por Rodrigues et al. (2001) que forneceram uma quantidade de 40 mg por dia de monensina (que correspondeu a cerca de $0,71 \text{ mg.kg}^{-1}\text{PC}$ deste ionóforo) a ovinos distribuídos em um arranjo fatorial 2x3, com ou sem o aditivo e três diferentes proporções de concentrado na dieta total, e não verificaram efeito significativo deste aditivo sobre a digestibilidade da matéria seca, extrato etéreo, da FDN e sobre os nutrientes digestíveis totais.

Em geral, os melhores coeficientes de digestibilidade foram obtidos com o tratamento Controle (placebo), com Ionóforo e com o tratamento com a menor quantidade de tanino (Tan 1), embora as médias deste último não tenham diferido estatisticamente daquelas obtidas no tratamento contendo quantidade intermediária de tanino adicionado (Tan 2), exceto para FDA.

Pode ser observado que, dentre os componentes estudados, as frações que mais reduziram os coeficientes de digestibilidade em decorrência do aumento da quantidade de extrato tanífero foram a fibrosa (FDNcp e FDA) e a proteica (PB), refletindo nos valores de digestibilidade dos carboidratos não fibrosos (CNF) que foram menos afetados por este aumento. Estes resultados permitem inferir que os TC do Tan 3 afetaram a degradação ruminal dos componentes fibrosos da parede celular (FDNcp e FDA) e da PB no rúmen e intestino delgado.

Esperava-se que houvesse uma melhoria na digestibilidade da PB, tendo em vista os relatos de que a adição dos taninos pode reduzir a degradação ruminal proteica protegendo este nutriente da ação microbiana e aumentando a sua disponibilidade para a absorção pós-ruminal (MAKKAR, 2003).

Entretanto, a redução na digestibilidade também ocorreu em experimento conduzido por Dawson et al. (1983) que observaram um aumento na excreção fecal de ovinos recebendo dietas contendo taninos e tiveram cerca de 14% mais produção de MS fecal ($P < 0,001$) do que os animais no tratamento controle. Apesar disso, estes autores verificaram que pode ocorrer aumento da reciclagem de nitrogênio e, portanto, menor excreção deste na urina.

De acordo com trabalhos conduzidos por Perez-Maldonado & Norton (1996), ovinos e caprinos recebendo TC provenientes de *Desmodium* (1%) ou *Calliandra* (2,3%) apresentaram maiores excreções de nitrogênio nas fezes (14%), porém o aditivo não afetou a digestão pós ruminal deste nutriente ($P > 0,05$), já que os animais que receberam TC absorveram mais nitrogênio (19%) por quilograma de matéria orgânica digerida em relação à dieta controle (apenas capim pangola), provavelmente pela ação intestinal (elevado pH e ação detergente dos sais biliares) que rompeu as ligações tanino-proteína.

Outro fator a ser considerado é que, em decorrência da complexação do tanino com a proteína, ocorre uma maior passagem deste nutriente dietético para o intestino delgado, mas este benefício deve ser avaliado tendo em vista a possibilidade de aumento das perdas endógenas de proteína pela ação dos TC (McSWEENEY et al., 2001).

Observou-se uma redução ($P < 0,05$) em cerca de 17% na digestibilidade da FDN para o tratamento de maior quantidade de tanino ($1,80 \text{ g.kg}^{-1}\text{PC}$, Tan 3) se comparado ao tratamento controle e de quase 12% comparando-se Tan 3 com Tan 1 ($0,60 \text{ g.kg}^{-1}\text{PC}$), isto mostra que no rúmen as bactérias fibrolíticas também podem ter sua atividade reduzida devido à possível interação com o tanino adicionado, seja por meio de sua ligação com o substrato, seja pela inibição direta da célula bacteriana (McSWEENEY et al., 2001), ou ainda, pela complexação com as enzimas extracelulares liberadas na degradação ruminal dos carboidratos (BAE et al., 1993).

Então, como a dieta foi a base de volumoso (feno), o pH ruminal provavelmente não sofreu grandes variações, 6,8-7,2, faixa que, apesar de não prejudicar a ação das bactérias fibrolíticas, permite maior complexação das proteínas pelos taninos, repercutindo na redução na digestibilidade das frações fibrosas possivelmente pela redução na adesão, crescimento ou à ação enzimática destas bactérias em realizar a degradação ruminal da celulose e hemicelulose potencialmente digestíveis contidas na FDNcp.

Os coeficientes de digestibilidade dos nutrientes, em geral, foram menores para o Tan 3 do que para o Controle ($P < 0,05$), então, considerando-se que os consumos de MS e MO não diferiram entre os tratamentos ($P > 0,05$), confirma-se que Tan 3 apresentou as maiores quantidades de nutrientes excretados nas fezes, não diferindo do Tan 2 (Tabela 4). Os tratamentos Controle, Ionóforo e Tan 1 não diferiram entre si ($P < 0,05$) e tiveram as menores excreções fecais dos nutrientes avaliados.

Quando se avaliou a excreção total dos nutrientes nas fezes foi verificado que os tratamentos contendo extrato tanífero tiveram, em média, maiores produções fecais (541,0 g; 75,5 g e 295,6 g de MS, PB e FDNcp, respectivamente, excretados diariamente) em relação ao tratamento controle, que correspondeu a cerca de 18% a mais tanto para a MS como para a FDNcp excretadas nas fezes, enquanto a PB média excretada nestes tratamentos com TC superou em quase 34% a do tratamento controle (com excreção fecal diária de 457,0 g; 56,4 g e 248,6 g de MS, PB e FDNcp, respectivamente).

Tabela 4 – Excreções fecais diárias dos nutrientes nos tratamentos experimentais contendo extrato tanífero ou ionóforo fornecido a ovinos

Excreções	Tratamentos ¹					CV (%)	Valor P
	Controle	Tan 1	Tan 2	Tan 3	Ionóforo		
	G						
MS	456,99 ^c	490,68 ^c	543,51 ^b	588,92 ^a	468,14 ^c	10,59	<0,0001
MO	379,70 ^b	411,60 ^b	462,20 ^a	496,44 ^a	386,54 ^b	11,74	<0,0001
PB	56,37 ^d	65,71 ^c	76,23 ^b	84,47 ^a	55,57 ^d	11,90	<0,0001
FDNcp	248,61 ^b	271,29 ^b	300,32 ^a	315,31 ^a	260,05 ^b	11,63	<0,0001
EE	13,98 ^a	13,67 ^a	13,26 ^a	13,19 ^a	13,88 ^a	11,73	0,2097
MM	77,29 ^b	79,08 ^b	81,31 ^b	92,47 ^a	81,61 ^b	12,22	<0,0001
FDA	257,82 ^c	296,80 ^b	343,20 ^a	367,33 ^a	264,72 ^c	11,66	<0,0001
CNF	60,75 ^c	60,94 ^c	72,39 ^b	83,47 ^a	57,04 ^c	14,59	<0,0001
	g.kg ⁻¹ PC						
MS	11,26 ^b	11,65 ^b	12,67 ^a	13,08 ^a	11,26 ^b	10,94	<0,0001
MO	9,36 ^b	9,78 ^b	10,80 ^a	11,03 ^a	9,33 ^b	11,04	<0,0001
PB	1,39 ^c	1,56 ^b	1,78 ^a	1,88 ^a	1,34 ^c	11,49	<0,0001
FDNcp	6,12 ^b	6,46 ^b	7,01 ^a	7,02 ^a	6,28 ^b	11,14	<0,0001
EE	0,34 ^a	0,32 ^{ab}	0,31 ^{bc}	0,29 ^c	0,33 ^{ab}	11,56	<0,0001
MM	1,90 ^{ab}	1,87 ^b	1,87 ^b	2,05 ^a	1,93 ^{ab}	12,02	<0,0001
FDA	6,35 ^c	7,06 ^b	8,01 ^a	8,16 ^a	6,38 ^c	11,06	<0,0001
CNF	1,50 ^c	1,45 ^c	1,70 ^b	1,85 ^a	1,37 ^c	12,81	<0,0001

MS= matéria seca , MO= matéria orgânica, PB = proteína bruta, EE = extrato etéreo, MM = matéria mineral, FDNcp = fibra em detergente neutro livre de cinzas e proteína bruta, CNF = carboidratos não fibrosos, NDT = nutrientes digestíveis totais, PC= peso corporal.

^{a,b,c} Nas linhas médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,05); CV (%)= Coeficiente de variação.

¹ Tratamentos foram: Controle (placebo); Tan 1 (0,60 g.kg⁻¹PC de extrato tanífero); Tan 2 (1,20 g.kg⁻¹ PC de extrato tanífero); Tan 3 (1,80 g.kg⁻¹PC de extrato tanífero); Ionóforo (0,75 mg.kg⁻¹PC do princípio ativo monensina).

O resultado acima concorda com o conceito de que ocorre maior afinidade dos taninos com a proteína em relação aos demais nutrientes devido à forte ligação que ocorre entre o hidrogênio da molécula de tanino e o oxigênio do grupo carbonila dos peptídeos (McLEOD, 1974). Isto mostra claramente a maior relevância do efeito da complexação da PB e da FDN pelos taninos em detrimento do efeito inibitório destes sobre as bactérias.

A respeito das estimativas das variáveis ruminais de degradação da MS e da FDN do feno incubado nos animais recebendo os diferentes tratamentos, podem-se avaliar alguns fatores associados à degradação ruminal *in situ* (Tabela 5).

Não foi observada interação (P>0,05) entre os tratamentos e os tempos de permanência do material incubado intraruminalmente. Houve efeito significativo dos tratamentos (P<0,05) sobre as frações potencialmente degradáveis (b) da MS e da FDN, e também sobre as médias das degradações observadas (DMS e DFDN) após os tempos de incubação do feno de alfafa no rúmen dos ovinos.

Tabela 5 - Estimativas das variáveis de degradação ruminal da MS e da FDN do feno de alfafa em função dos tratamentos

Variáveis Ruminais ²	Tratamentos					CV(%)	Valor P
	Controle	Tan 1	Tan 2	Tan 3	Ionóforo		
	MS (a ¹ =24,15%)						
b (%)	52,53 ^{ab}	53,00 ^a	50,93 ^{bc}	50,11 ^c	52,67 ^{ab}	1,90	0,0021
c (%/h)	11,64	11,72	14,65	11,80	11,65	27,90	0,5837
DE (5%/h)	77,53	77,65	79,29	74,67	77,45	6,30	0,6811
DMS	71,13 ^a	69,67 ^a	66,23 ^b	63,56 ^c	70,96 ^a	4,35	<0,0001
	FDN						
b (%)	59,88 ^a	59,01 ^{ab}	57,79 ^{ab}	55,39 ^b	59,94 ^a	3,12	0,0100
c (%/h)	10,92	11,82	11,46	9,97	10,63	20,12	0,7160
DE (5%/h)	41,53	41,91	40,67	37,18	41,29	6,84	0,1082
DFDN	52,48 ^a	50,59 ^a	47,29 ^b	43,39 ^c	53,02 ^a	7,43	<0,0001

^{abc} Médias nas linhas com letras distintas diferem (P<0,05) pelo teste Tukey; CV (%) = coeficiente de variação;

¹ a = fração solúvel do feno de alfafa incubado;

² estimativas da fração insolúvel potencialmente degradável (b), da taxa de degradação (c) e da degradação efetiva (DE) da matéria seca (MS) ou da fibra em detergente neutro (FDN) a uma taxa de passagem de 5%/h no rúmen; DMS ou DFDN= médias gerais das degradações da MS ou da FDN, respectivamente, obtidas após 3,8,16,24,48,72 e 96 horas de incubação;

Verifica-se ainda que as estimativas da taxa de degradação (c) e da degradabilidade efetiva, tanto da MS como da FDN não foram alteradas em função dos tratamentos (P>0,05).

Em geral, o Controle, Ionóforo e o Tan 1 (com extrato tanífero a 0,60 g.kg⁻¹PC) apresentaram as maiores frações potencialmente degradáveis no rúmen (estimativa b) bem como os maiores valores observados das médias de degradação após 3, 8, 16, 24, 48,72 e 96 horas de permanência do material *in situ*, observando-se o oposto para os tratamentos Tan 2 e Tan 3, com 1,20 e 1,80 g.kg⁻¹PC de extrato tanífero adicionado, respectivamente, os quais prejudicaram a degradação da MS e da FDN do feno de alfafa.

Assim, observou-se por meio da adição do Tan 1, correspondente a cerca de 20 g.kg⁻¹ de MS ingerida de extrato tanífero (ou seja, 14,6 g.kg⁻¹MS de TC), que não há prejuízo na degradação da matéria seca do feno de alfafa em decorrência da adição do tanino como aditivo, sendo este valor muito próximo ao intervalo sugerido por Min et al. (2003) de 20-45 g.kg⁻¹MS de TC, em que poderiam ocorrer efeitos benéficos quando administrado à dieta de ruminantes.

Estes resultados estão de acordo com Hervás et al. (2003) que adicionaram extrato de quebracho contendo TC às dietas de ovelhas Merino e observaram que a menor dose administrada (0,50 g.kg⁻¹PC desse extrato por dia) não resultou em efeitos adversos sobre a digestibilidade *in vitro* e sobre a fermentação ruminal *in situ* após 24 horas de incubação de três diferentes substratos.

Os TC de algumas espécies de leguminosas (*Mimosa caesalpinifolia*, *Mimosa hostilis* e *Bauhinia cheilantha*) estudadas por Beelen et al. (2006b) também reduziram a degradabilidade ruminal da MS, da PB e da FDN do volumoso formulado com iguais proporções destas plantas, quando não se adicionava o polietilenoglicol nas dietas, um potente inibidor da ação dos taninos. Além disso, esses autores verificaram que os TC reduziram a adesão microbiana e a atividade enzimática da endoglucanase no conteúdo ruminal de caprinos da raça Saanen, quando oferecidos em dieta com 60% de volumoso a base das leguminosas estudadas, totalizando um teor de 159 g.kg^{-1} de taninos na dieta.

No caso da avaliação dos diferentes tempos de incubação, observam-se nas Figuras 7 e 8 que houve diferença estatística ($P < 0,05$) apenas entre os tempos de 3 a 24 horas de incubação, aumentando o desaparecimento da MS e da FDN à medida que se avançou as horas, atingindo a degradação potencial, momento que o desaparecimento estabiliza-se já a partir das 48 horas de exposição das amostras ao ambiente ruminal.

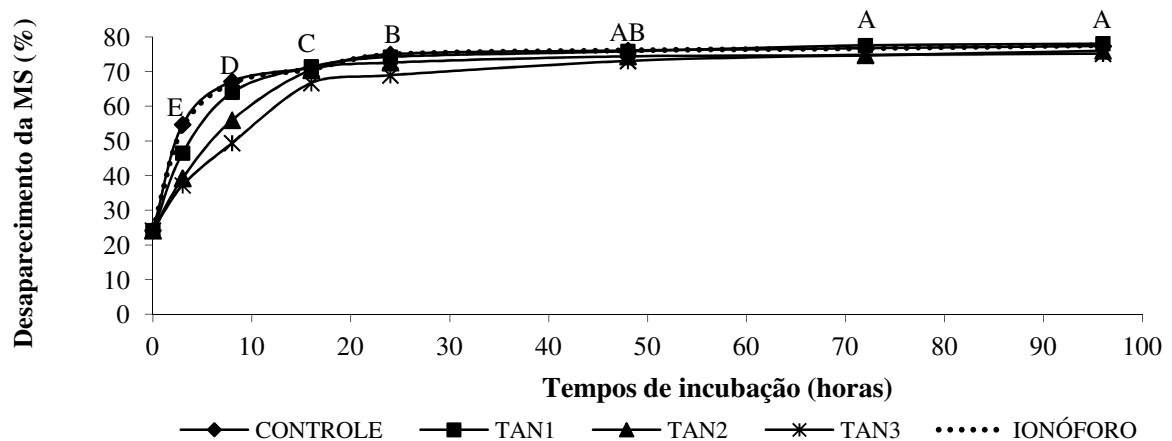


Figura 7- Curva de desaparecimento da matéria seca (MS) do feno de alfafa em função do tempo de incubação *in situ* no rúmen dos ovinos. Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$ e $CV = 4,34\%$).

Após 96 horas de permanência no rúmen, quase 77% da MS do feno de alfafa desapareceu, enquanto 61% da fração fibrosa (FDN) foi degradada neste período de tempo. A rápida degradação da FDN era esperada, tendo em vista o baixo teor de FDN ($543,3 \text{ g.kg}^{-1}$ MS) do feno utilizado, considerado de alta qualidade.

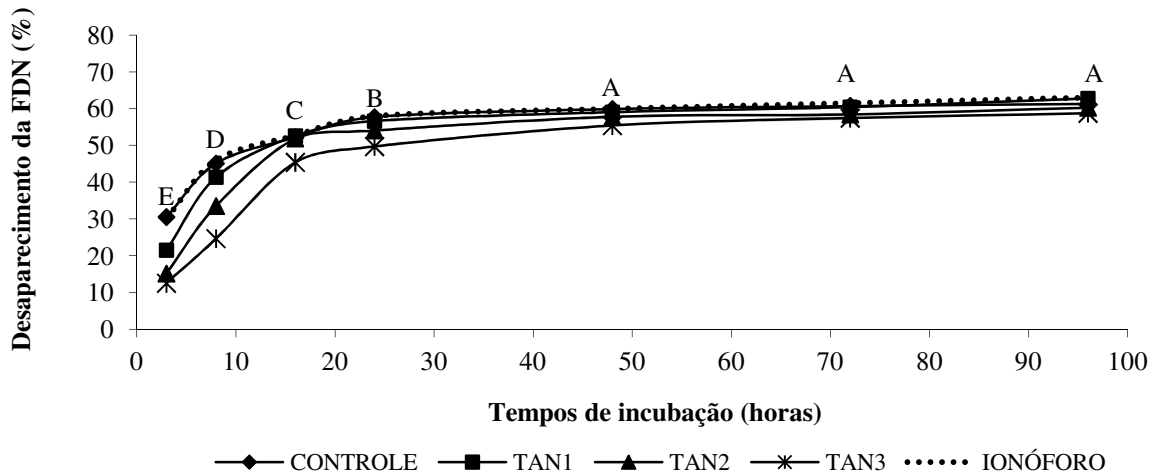


Figura 8 - Curva de desaparecimento da fibra em detergente neutro (FDN) do feno de alfafa em função do tempo de incubação *in situ* no rúmen dos ovinos. Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$ e $CV = 7,43\%$).

Tanto para a degradação da MS (Figura 7) como da FDN (Figura 8) verificou-se que as curvas de degradação do tratamento Ionóforo, compreendidas entre os tempos de 3 e 24 horas de incubação, chegam a sobrepor-se àquelas curvas que representam a degradação do Controle, sendo que a curva do Tan 1 (menor nível de tanino) aproxima-se muito de ambas.

No presente estudo os tratamentos com as duas maiores quantidades de taninos apresentaram os efeitos mais adversos, tanto na digestibilidade como na degradabilidade do feno de alfafa, por um provável aumento na complexação dos componentes nutricionais e redução na adesão bacteriana. Conforme concluíram Ozkose et al. (2011) os taninos podem apresentar efeitos inibitórios sobre algumas bactérias ruminais anaeróbicas, principalmente devido ao prejuízo na atividade das enzimas celulolítica e hemicelulolítica (carboximetilcelulase e xilanase), conforme se adicionam diferentes concentrações desta substância em meio de cultivo (de 0,1 a 0,6%).

Avaliando-se a presença de taninos purificados (50, 100, 200 e 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, oriundos de três leguminosas arbustivas do semiárido brasileiro) em um meio de cultura, Beelen et al. (2006a) encontraram que o crescimento bacteriano da *Ruminococcus flavefaciens*, bem como a atividade da endoglucanase e a digestão de celulose foram inibidos pela presença dos TC purificados, além disso, a intensidade da inibição foi variável em função da espécie da leguminosa e da concentração de tanino.

Apesar disso podem ocorrer alguns mecanismos adaptativos da microbiota ruminal ao longo do tempo de exposição aos taninos, processo que ainda não foi elucidado, mas que poderia auxiliar o processo de resistência e melhorar a função ruminal ao mesmo tempo que

os TC continuariam com ação efetiva ligando-se a polipeptídeos livres, reforçando a proposição de que o efeito de complexação destes componentes é mais relevante do que o efeito inibitório bacteriano.

De acordo com Brooker et al. (1999), os mecanismos de resistência envolvem vários fatores: tolerância dos microrganismos, degradação de alguns taninos e adaptação do trato intestinal, sendo que estudos bioquímicos mostraram que as bactérias ruminais podem produzir polissacarídeos extracelulares que atuam na proteção das membranas em resposta a um aumento do nível de tanino no meio.

No presente experimento verificou-se que o extrato tanífero de acácia-negra em quantidade igual ou superior a $1,20 \text{ g.kg}^{-1}$ PC pode levar a redução na digestibilidade *in vivo* e na degradação *in situ* do volumoso de alta qualidade, o que poderia prejudicar o seu aproveitamento, mas é necessário que se averiguem em pesquisas futuras outros fatores relacionados à inclusão deste aditivo nas dietas de ovinos, como o aproveitamento da fração nitrogenada do alimento com alta proporção de proteína de boa qualidade e com elevado potencial de degradação ruminal, visando verificar os possíveis efeitos benéficos da adição dos TC deste vegetal.

CONCLUSÃO

A inclusão de $0,60 \text{ g.kg}^{-1}$ PC de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* De Wild. não intervém na digestibilidade ou na degradação ruminal dos nutrientes do feno de alfafa oferecido a ovinos.

Este extrato, quando fornecido a ovinos a uma quantidade de $1,80 \text{ g.kg}^{-1}$ PC, reduz a digestibilidade e a degradabilidade dos nutrientes da dieta, enquanto o ionóforo monensina, fornecido a $0,75 \text{ mg.kg}^{-1}$ PC, não interfere nestas variáveis.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Projeto 2011/0168. Protocolo 255/11. Aprovado com Parecer 480/12.

REFERÊNCIAS

BAE, H. D., MCALLISTER, T. A., YANKE, J. et al. 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.

BEELEN, P. M. G.; BERCHIELLI, T. T.; BUDDINGTON, R. et al. Efeito dos taninos condensados de forrageiras nativas do semi-árido nordestino sobre o crescimento e atividade

celulótica de *Ruminococcus flavefaciens* FD1. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 910-917, 2006a.

BEELEN, P. M. G.; BERCHIELLI, T. T.; BEELEN, R. et al. Influence of condensed tannins from Brazilian semi-aride legumes on ruminal degradability, microbial colonization and enzymatic activity. **Small Ruminant Research**, v. 61, n. 1, p. 35-44, 2006b.

BELE, A.A.; JADHAV, M.V.; KADAM, V.J. Potential of tannins: a review. **Asian Journal of Plant Sciences**, v.9, p.209-214. 2010.

BRETSCHNEIDER, G.; ELIZALDE, J. C.; PÉREZ, F.A. The effect of feeding antibiotic growth promoters on the performance of beef cattle consuming forage based diets: a review. **Livestock Science**, v.114, p.135-149, 2008.

BROOKER, J. D. Priority Setting Discussion In: BROOKER, J.D. (Ed.) **Proceedings of International Workshop on Tannins in Livestock and Human Nutrition**. ACIAR Proceedings, n.92, p.14-23, 1999.

DAWSON, K. A.; BOLING, J. A. Monensin-resistant bacteria in the rumen of calves on monensin-containing and unmedicated diets. **Applied and Environmental Microbiology**, v.46, p.160-164, 1983.

HERVÁS, G.; FRUTOS, P.; GIRÁLDEZ, F. J. et al. Effect of different doses of quebracho tannins extract on rumen fermentation in ewes. **Animal Feed Science and Technology**, v.109, p.65-78, 2003.

HUNTINGTON, G. B.; GIVENS, D. I. The in situ technique for studying the rumen degradation of feeds: A review of the procedure. **Nutrition Abstract and Reviews**, v.65, p.63-93, 1995.

KRUEGER, W. K.; GUTIERREZ-BANUELOS, H.; CARSTENS, G. E. et al. Effects of dietary tannin source on performance, feed efficiency, ruminal fermentation, and carcass and non-carcass traits in steers fed a high-grain diet. **Animal Feed Science and Technology**, v.159, p.1-9, 2010.

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.

McLEOD, M. N. Plant tannins: their role in forage quality. **Nutrition Abstract and Reviews**, v.44, p.803-812, 1974.

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

MEZZOMO, R.; PAULINO, P. V. R.; DETMANN, E. et al. 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.; The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants feed fresh temperate forages: a review . **Animal Feed Science and Technology**, v.105, p. 3-19, 2003.

NOZELLA, E. F. **Determinação de taninos em plantas com potencial forrageiro para ruminantes**. 2001. 58f. Dissertação. Centro de Energia Nuclear na Agricultura, USP, Piracicaba, 2001.

NRC - National Research Council. **Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids**. Washington, DC: The National Academies Press, 2007. 362p.

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

OZKOSE, E.; KULOĞLU, R.; COMLEKCIOGLU, U. et al. Effects of tannic acid on the fibrolytic enzyme activity and survival of some ruminal bacteria. **International Journal of Agriculture and Biology**, v.13, p.386–390, 2011.

PEREZ-MALDONADO, R.A; NORTON, B.W. The effects of condensed tannins from *Desmodium intortum* and *Calliandra calothyrsus* on protein and carbohydrate digestion in sheep and goats. **British Journal of Nutrition**, v.76, p.515–533, 1996.

RODRIGUES, P. H. M.; MATTOS, W. R. S.; MELOTTI, L. et al. Monensina e digestibilidade aparente em ovinos alimentados com proporções de volumoso/concentrado. **Scientia Agricola**, v.58, p. 449-455, 2001.

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

SNIFFEN, C.J.; CONNOR, J.D.; VAN SOEST, P. A net carbohydrate and protein system for evaluation cattle diets. II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science** , v.70, p.3562-3577, 1992.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal Animal Science**, v.74, n.10, p.3583-3597, 1991.

VITTI, D. M. S. S.; ABDALA, A. L.; BUENO, I. C. S. et al. Do all tannins have similar nutritional effects? A comparison of three Brazilian fodder legumes. **Animal Feed Science and Technology**, v.119, p.345-361, 2005.

**Aditivo tanífero ou ionóforo no aproveitamento da fração nitrogenada da dieta
fornecida a ovinos**
**Tannin additive or ionophore making effective use of the nitrogen fraction of the diet
provided to sheep**

Simone da Silva Ribeiro^I & Gumercindo Lorian Franco^{II}

^I Aluna do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, FAMEZ/UFMS, Campo Grande, MS, Brasil.

ii Professor Adjunto, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), Campo Grande, MS, Brasil. E-mail: gumercindo.franco@ufms.br - Autor para correspondência.

RESUMO – Objetivou-se comparar os efeitos de três quantidades distintas de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* De Wild. (acácia-negra) e do aditivo ionóforo e um placebo adicionados ao rúmen de ovinos sobre as variáveis ruminais (pH e nitrogênio amoniacal), balanço de nitrogênio (N) e parâmetros sanguíneos. Em gaiolas individuais os borregos portadores de cânulas permanentes no rúmen foram organizados em delineamento quadrado latino 5 x 5, com 21 dias por período experimental. Os cinco tratamentos foram o Controle: placebo; Tan 1: 0,60 g.kg⁻¹ de peso corporal (PC), Tan 2: 1,20 g.kg⁻¹PC, Tan 3: 1,80 g.kg⁻¹PC de extrato tanífero; e Ionóforo: monensina a 0,75 mg.kg⁻¹PC. A dieta base foi o feno de alfafa restrito a 3,0% do PC, suplemento mineral e água *ad libitum*. Os valores pH (entre 6,27 e 7,12) situaram-se dentro da faixa normal no líquido ruminal. Os maiores valores de nitrogênio (N) amoniacal foram observados logo após os dois horários de fornecimento do volumoso e, no tempo de 10 horas o Tan 3 foi inferior (12,17 mg.dL⁻¹), em cerca de 11% (P<0,05), em relação ao Controle (13,65 mg.dL⁻¹). O balanço de N teve efeito significativo (P<0,05), sendo que o Tan 2 e Tan 3 levaram às menores quantidades de N absorvido em relação ao N ingerido. O N excretado via urina foi maior para o Ionóforo (0,46 g.kg⁻¹PC) e os menores para o Tan 2 e Tan 3 (ambos 0,35 g.kg⁻¹PC), alterando-se a via de eliminação de N pela adição dos taninos. Dos dez analitos sanguíneos dosados ou calculados, somente a alanina aminotransferase (ALT) foi modificada em função do tratamento aplicado (P<0,05), com os maiores valores para os tratamentos com extrato tanífero, mantendo-se, porém, dentro do intervalo de referência da espécie. As maiores quantidades de extrato tanífero (1,20 e 1,80 g.kg⁻¹PC) aumentam a proporção do N ingerido perdido nas fezes ao passo que reduzem o volume urinário e o N perdido na urina. Até a quantidade de 1,80 g.kg⁻¹PC de extrato tanífero de acácia-negra, os ovinos não sofrem efeitos adversos nas variáveis sanguíneas que poderiam ser indícios de intoxicação.

Palavras-chave: acácia-negra, balanço de nitrogênio, monensina, nitrogênio amoniacal, polifenóis, variáveis sanguíneas

ABSTRACT – The effects of three different amounts of tannin extract of *Acacia mearnsii* De Wild (black wattle) were comparing to ionophore additive and a placebo that were added to the rumen of sheep on the rumen variables (pH and ammonia nitrogen), the nitrogen balance (N) and on the blood parameters. Five cannulated wethers were put in individual cages and were organized in a 5 x 5 Latin Square for 21 days of each trial period. The five treatments were Controlling: placebo; Tan 1: 0.60 g.kg⁻¹ of body weight (BW), Tan 2: 1.20 g.kg⁻¹BW, Tan 3: 1.80 g.kg⁻¹BW with tannin extract and Ionophore: monensin 0.75 mg.kg⁻¹BW. The basal diet was alfalfa hay restricted at 3.0% of BW, plus mineral supplement plus *ad libitum* water. The pH values (between 6.27 and 7.12) remained in a normal range in the ruminal fluid. The highest values of nitrogen (N) ammonia were observed after two forage supply schedules and, in a period of 10 hours, the Tan 3 was lower (12.17 mg.dL⁻¹), at about 11% (P<0.05), in than the trial Controlling (13.65 mg.dL⁻¹). The N balance had a significant effect (P<0.05); Tan 2 and Tan 3 led to the smallest amounts of absorbed N in relation to the intake N. The nitrogen excreted in urine was greater to Ionophore (0.46 g.kg⁻¹BW) and lower to Tan 2 and Tan 3 (both 0.35 g.kg⁻¹BW), changing the route of elimination of N by adding the tannin. Only alanine aminotransferase (ALT) was modified as a function of the applied treatment (P <0.05) of the ten measured or calculated blood analytes, with the highest values for treatments with tannin extract, remaining, nevertheless, within the range reference for this species. The conclusion is that the great amounts of tannin extract (1.20 and 1.80 g.kg⁻¹BW)

increase the N fecal losses while urinary volume and N lost are reduce in the urine. The sheep do not suffer the poisoning effects of black wattle tannin until amount of 1,80 g.kg⁻¹BW.

Keywords: ammonium nitrogen, black wattle, blood variables, nitrogen balance, monensin, polyphenols

INTRODUÇÃO

Nos ruminantes, o complexo processo de degradação e fermentação microbiana é responsável por grande parte do suprimento proteico e energético para o animal hospedeiro. Sua modulação tem sido foco de pesquisas, pois, em decorrência das reações químicas e interações biológicas que ocorrem no ambiente ruminal e das inter-relações com o metabolismo destes animais é que se explicam os resultados produtivos obtidos nos diferentes sistemas.

Os processos podem ficar mais ou menos eficientes, a depender do tipo de população microbiana presente no rúmen. Quando ineficientes, podem ocorrer perdas energéticas importantes que poderiam ser revertidas em carne, leite ou outro produto animal. Neste contexto, para torná-los eficientes a tentativa é reduzir a eliminação de gases (eructação, digestão) e nutrientes (via fezes ou urina) para o meio ambiente, por meio do uso dos aditivos nutricionais ionóforos ou promotores de crescimento.

Entretanto, nos últimos anos, há uma preocupação quanto à comercialização de produtos de origem animal cujos sistemas utilizam estes tipos de aditivos, pois alguns países já não admitem mais o uso dos antibióticos com objetivo não terapêutico. As pesquisas com aditivos naturais que possam trazer os mesmos benefícios vêm ao encontro deste novo cenário e os taninos, metabólitos polifenólicos das plantas, podem ter resultados promissores (WALKER et al., 2005).

O efeito principal dos taninos condensados (TC) na nutrição de ruminantes é a capacidade de formar complexos com as proteínas, diminuindo sua degradação ruminal (MAKKAR, 2003).

Considerado originalmente como um fator antinutricional dos vegetais, principalmente para monogástricos, a proposta como aditivo tem como pressuposto a menor dose necessária para produzir os efeitos desejáveis, sendo que o limite atualmente aceito para ruminantes situa-se na faixa de 55 g.kg⁻¹MS da dieta, a partir do qual alguns efeitos deletérios poderiam ocorrer (MIN et al., 2003).

De acordo com McSweeney et al. (2001), a ação antimicrobiana dos taninos é devida à capacidade dos compostos polifenólicos ligarem-se à membrana celular bacteriana e com as enzimas extracelulares secretadas dificultando a proteólise ruminal e, assim, pode possibilitar

aumento da proporção de proteína da dieta que chega aos compartimentos inferiores do trato gastrointestinal, sem sofrer desaminação.

No que se refere à retenção de nitrogênio (N), os ruminantes são relativamente ineficientes, agravando os efeitos das emissões globais deste nutriente, pois cerca de 70% do ingerido diariamente é excretado na urina ou fezes destes animais. Assim, um aditivo como o TC que pode promover redução da ação microbiana no rúmen sobre os alimentos e minimizar principalmente o N excretado pela urina, via mais prejudicial ao meio ambiente do que a fecal (WALKER et al., 2005), seria de grande importância nos sistemas de produção.

Deste modo, o TC adicionado à dieta pode levar ao benefício análogo obtido pelo ionóforo de forma a permitir que ocorra um melhor aproveitamento da fração nitrogenada do alimento oferecido. A indicação do uso desta estratégia como prática requer a avaliação do impacto dos taninos sobre as variáveis ruminais e sobre o balanço de nitrogênio, levando-se também em consideração a saúde dos animais, ou seja, não provocar intoxicação.

Assim, objetivou-se comparar o efeito do extrato tanífero de *Acacia mearnsii* De Wild. (acácia-negra) com o aditivo ionóforo sobre as variáveis ruminais e sanguíneas e o balanço de nitrogênio em ovinos alimentados com feno de alfafa.

MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida no período de abril a agosto de 2013, no Laboratório de Metabolismo Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ) na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), campus de Campo Grande, com temperaturas que variaram de 17,6 a 28,6°C durante as semanas de coletas.

Foram utilizados cinco ovinos mestiços, castrados e portadores de cânula permanente no rúmen, com peso corporal (PC) médio inicial de $40,3 \pm 2,8$ kg, os quais receberam anti-helmínticos após os exames de contagem de ovos por grama de fezes (OPG). Os animais foram alojados em galpão de alvenaria e mantidos em gaiolas metálicas individuais, providas de comedouro, bebedouro e cocho próprio para suplemento mineral, apropriadas para estudos de metabolismo e equipadas com coletores de urina, transcorrendo-se 14 dias (fase pré-experimental) de adaptação inicial dos animais sem os tratamentos.

Após esta fase, realizou-se a pesagem destes animais em jejum de sólidos de 16 horas iniciando-se o primeiro período experimental. O delineamento experimental foi um quadrado latino 5x5, com cinco tratamentos e cinco períodos de 21 dias, sendo dez dias de adaptação aos tratamentos e 11 dias de coletas de dados.

Os animais receberam feno de alfafa (*Medicago sativa*) com teor de proteína bruta (PB) de 189,5 g.kg⁻¹ de matéria seca (MS) e de nutrientes digestíveis totais (NDT) de 576,8 g.kg⁻¹MS (Tabela 1), triturado grosseiramente, restrito a 30 g.kg⁻¹ do PC (3,0%) em base de matéria seca (MS) dividido em dois tratos, às 7:00 horas e às 17:00 horas, e ainda água e suplemento mineral para ovinos *ad libitum*.

Tabela 1 - Composição do feno de alfafa (*Medicago sativa*) e do extrato tanífero (*Acacia mearnsii* De Wild.) utilizados no experimento

Ingrediente	MS (g.kg ⁻¹)	Composição químico-bromatológica (g.kg ⁻¹ de MS)								
		MO	MM	PB	EE	FDNcp	CNF	NDT	Fenóis totais	Taninos condensados
Feno de alfafa	859,7	899,9	100,1	189,5	18,4	457,8	234,2	576,8	12,5 ¹	0,3 ¹
Extrato tanífero	930,0	973,7	26,3	22,0	1,3	-	-	-	750,0 ²	725,0 ²

¹ Valores aproximados, encontrados por Nozella (2001).

² Produto comercial (Tanfood, Tanac S.A., Montenegro, RS, Brasil).

MS: material seca; MO: matéria orgânica; MM: matéria mineral (cinzas); PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo; FDNcp: fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína da FDN ((FDN-(CIDN+PIDN)), (SNIFFEN et al.,1992); CNF: carboidratos não fibrosos ((100-(Cinzas + PB + FDNcp + EE)), (SNIFFEN et al.,1992); NDT= nutrientes digestíveis totais (Controle); TC=Taninos condensados.

Os níveis de garantia do suplemento mineral utilizado foram: 150 g.kg⁻¹ de cálcio, 90 g.kg⁻¹ de fósforo, 72 g.kg⁻¹ de sódio, 50 g.kg⁻¹ de enxofre, 900 mg.kg⁻¹ de flúor, 20 mg.kg⁻¹ de cobalto, 250 mg.kg⁻¹ de cobre, 28 mg.kg⁻¹ de iodo, 600 mg.kg⁻¹ de manganês, 9,0 mg.kg⁻¹ de selênio e 1800,0 mg.kg⁻¹ de zinco. A dieta fornecida visou atender à demanda para crescimento de borregos de oito meses (40 kg) com maturidade tardia (NRC, 2007).

Forneceram-se diariamente, durante o trato da manhã por meio de infusão intraruminal, os seguintes tratamentos: Controle: placebo, ou seja, apenas água destilada (200 mL); Tan 1: 0,60 g.kg⁻¹PC, Tan 2: 1,20 g.kg⁻¹PC, Tan 3: 1,80 g.kg⁻¹PC de extrato tanífero diluído em água destilada qsp. perfazendo-se o mesmo volume total em todos os tratamentos; Ionóforo: monensina a 0,75 mg.kg⁻¹PC + 200mL de água destilada separadamente (controle positivo). Como fonte de TC utilizou-se o extrato solúvel comercial obtido da casca da *Acacia mearnsii* De Wild. (acácia-negra), que contém 72,5% de TC, ou seja, 725 g.kg⁻¹MS de extrato tanífero (Tanfood, Tanac S.A., Montenegro, RS, Brasil).

Para as variáveis ruminais, nos dias 20 e 21 (d20 e d21) de cada período de coletas retiraram-se amostras de aproximadamente 200 mL de líquido ruminal às 7:00 horas (tempo 0, ou seja, antes de se fornecerem os tratamentos), depois às 2, 4, 6, 8, 10 (após o trato inicial) e 12 horas após o fornecimento da dieta matinal e infusão dos tratamentos (ou seja, duas horas após o segundo trato).

Imediatamente após cada coleta mensurou-se o pH ruminal das amostras utilizando-se um potenciômetro digital de bancada (pHmetro FE20 FiveEasy®, Mettler Toledo) devidamente calibrado com as soluções tampão (padrões) pH 4,0 e 7,0 e instalado no próprio ambiente do galpão dos animais, visando minimizar os efeitos de variação térmica do líquido ruminal amostrado. As amostras foram filtradas em gaze dupla e acidificou-se cerca de 50 mL desta com 1 mL de ácido sulfúrico 1:1 para fixação do nitrogênio da amostra, sendo congeladas para análise posterior.

No Laboratório de Nutrição Animal da FAMEZ, as amostras de líquido ruminal foram descongeladas e as estimativas do nitrogênio amoniacal (N-NH₃) realizadas por meio de destilação em tubos Kjeldahl da mistura de hidróxido de potássio (KOH, 2N) em meio aquoso juntamente com o sobrenadante de cada amostra, em duplicatas. Para a solução receptora utilizou-se como recipiente um erlenmeyer contendo ácido bórico a 2% com solução indicadora mista (verde de bromocresol mais vermelho de metila). Após, realizou-se a titulação com ácido clorídrico (HCl 0,005 N), método este adaptado de Fenner (1965).

Para a avaliação do balanço de compostos nitrogenados realizaram-se as coletas totais de urina e fezes entre os dias 11 e 16 de cada período experimental. A coleta de fezes foi feita utilizando-se bolsas coletoras individuais presas por meio de arreios e confeccionadas em material resistente de tapeçaria automotiva com revestimento interno antiaderente e zíper para facilitar coleta em sacos plásticos, que foram pesados e amostrados (10% do total excretado após homogeneização) duas vezes ao dia, após o fornecimento dos tratos.

A urina, após filtragem em tela de náilon, foi coletada em baldes contendo 100 mL de ácido sulfúrico a 5% (LASCANO et al., 1992), para diminuir o pH e preservar a composição química, além de evitar as perdas de nitrogênio (amônia) por volatilização. O volume de urina foi mensurado por meio de uma proveta de 2000 mL e amostrou-se (10% do volume total), duas vezes ao dia, após os procedimentos das coletas de fezes, separando-se em frascos da manhã e da tarde.

Todas as amostras foram devidamente identificadas e congeladas, obtendo-se uma amostra composta do período por animal. Coletaram-se ainda amostras do alimento fornecido e das sobras, em cada período.

Ao final do experimento as amostras do alimento fornecido, do extrato tanífero, das sobras e das fezes (após descongelar em temperatura ambiente), foram secas em estufa de ventilação forçada a 55° C por 72 horas e processadas em moinho de facas do tipo *Willey* utilizando peneira com crivos de 1,0 mm, procedendo-se às análises químico-bromatológicas

e ainda às análises dos teores de nitrogênio das amostras de urina (SILVA & QUEIROZ, 2002).

O nitrogênio (N) absorvido foi calculado pela diferença entre o N ingerido e o excretado nas fezes, enquanto o N retido foi obtido pela diferença entre o N ingerido e o excretado nas fezes e na urina.

O consumo dos nutrientes da dieta foi calculado pela diferença entre as quantidades oferecidas e as sobras destes. O consumo de água foi mensurado diariamente, pela manhã, por meio da diferença entre o fornecido e sobra nos recipientes de água acoplados às gaiolas, descontando-se o que foi evaporado de um recipiente idêntico aos demais, contendo o mesmo volume de água daqueles dos animais e colocado nas proximidades onde estes estavam instalados.

Já a coleta de sangue foi feita no último dia de cada período experimental, duas horas após a alimentação matinal, utilizando-se sistema de coleta a vácuo, por meio de punção do sangue da veia jugular dos animais em tubos *vacutainer* de polipropileno de 10 mL contendo gel separador. As amostras de sangue foram levadas imediatamente ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da FAMEZ, centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos para separação dos soros das amostras, os quais foram acondicionados em *eppendorfs* devidamente identificados e imediatamente congelados durante cinco dias.

Após, à temperatura ambiente, dosaram-se alguns analitos sanguíneos relacionados ao metabolismo proteico (albumina, proteínas totais e ureia) e ainda a creatinina, além de algumas enzimas séricas: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e γ -glutamil transferase (GGT) que poderiam fornecer dados para se inferir sobre as funções renal e hepática dos animais.

As análises destas variáveis bioquímicas sanguíneas foram realizadas por meio de um analisador semiautomático (TP Analyzer Plus[®], Thermoplate), utilizando-se *kits* comerciais e seus respectivos protocolos de uso (Labtest[®] Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil). A concentração de N ureico no soro foi obtida pela concentração de ureia sérica, multiplicada por 0,466, correspondente ao teor de nitrogênio na ureia. As globulinas foram estimadas pela diferença entre as proteínas totais e as albuminas séricas dosadas, calculando-se ainda a relação entre albuminas e globulinas do soro (A:G).

As variáveis ruminais, pH e N-NH₃ foram analisadas de acordo com o modelo: $Y_{ijk} = \mu + T_i + B_j + A_k + Pl + (TB)_{ij} + e_{ijkl}$, em que, Y_{ijk} = observação do efeito do tratamento i para tempo de coleta (horário) j no período k ; μ = média geral T_i = efeito do tratamento ($i = 1$ (Controle), 2 (Tan 1), 3 (Tan 2), 4 (Tan 3), 5 (Ionóforo)); B_j = efeito do tempo de coleta no

rúmen ($j = 1, \dots, 7$ horários diferentes); A_k = efeito do animal ($k = 1, \dots, 5$), P_l = efeito do período ($l = 1, \dots, 5$); AB_{ij} = interação entre o tratamento i e o tempo de coleta j e e_{ijkl} = erro aleatório associado a cada observação.

Já os dados do balanço de nitrogênio e analitos sanguíneos foram avaliados segundo o modelo: $Y_{ijk} = \mu + T_k + P_j + A_i + e_{ijk}$. Em que, Y_{ijk} = observação do efeito do tratamento i no período j , do animal k , μ média geral, T_i = efeito do tratamento i , em que $i = 1$ (Controle), 2 (Tan 1), 3 (Tan 2), 4 (Tan 3) e 5 (Ionóforo); P_j = efeito do período j ($j = 5$ períodos); A_k = efeito do animal k ($k = 5$ animais) e e_{ijk} = erro aleatório associado a cada observação.

Para as análises de variância, utilizou-se o Proc GLM (Procedimento *General Linear Models*) do pacote estatístico SAS (*Statistical Analysis System*), versão 8.0 e então, quando estas foram significativas, procedeu-se às comparações de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas mensurações do pH ruminal, tanto os tempos de coleta das amostras no rúmen como os tratamentos experimentais influenciaram significativamente ($P < 0,05$) nos resultados (Tabela 2), não havendo, entretanto, interação significativa ($P > 0,05$) entre estas variáveis.

Pode-se verificar que os valores de pH, observando-se as médias de todos os horários de coleta e dos diferentes tratamentos, situaram-se entre 6,27 e 7,12, e, em geral, os menores valores ocorreram nos tratamentos contendo taninos, enquanto os maiores foram observados para o Controle e o Ionóforo.

Porém, os valores médios encontrados para os tratamentos (entre 6,50 e 6,68) variaram pouco numericamente e estiveram sempre dentro da faixa considerada normal para a atividade fermentativa ruminal em dietas constituídas exclusivamente de volumoso, ou seja, levemente ácido ou muito próximo da neutralidade, entre 6,2 e 7,0 (OWENS & GOESTCH, 1988), já que o consumo de alimentos volumosos estimula a produção de saliva, que influencia no pH ruminal pela ação tamponante, durante os processos de ingestão e regurgitação.

Tabela 2- Médias de pH em diferentes momentos de coleta de amostra de líquido ruminal dos ovinos, a partir do tempo zero (imediatamente antes) até 12 horas após o fornecimento dos tratamentos

Tempo (horas) ²	Tratamentos ¹					Subparcelas ³
	Controle	Tan 1	Tan 2	Tan 3	Ionóforo	
0	7,12	7,07	7,00	6,96	7,12	7,05 ^a
2	6,54	6,44	6,40	6,48	6,58	6,49 ^{ed}

4	6,45	6,41	6,28	6,44	6,54	6,42 ^{ef}
6	6,54	6,43	6,44	6,65	6,63	6,54 ^{cd}
8	6,65	6,63	6,48	6,61	6,67	6,61 ^c
10	6,83	6,76	6,64	6,67	6,81	6,74 ^b
12	6,35	6,35	6,27	6,33	6,41	6,34 ^f
Parcelas ³	6,64 ^{ab}	6,58 ^b	6,50 ^c	6,59 ^b	6,68 ^a	

¹ Tratamentos: Controle= placebo; Tan 1= 0,60 g.kg⁻¹PC, Tan 2= 1,20 g.kg⁻¹PC, Tan 3= 1,80 g.kg⁻¹PC (extrato tanífero); Ionóforo = 0,75 mg.kg⁻¹PC (monensina);

² Tempo 0 = primeiro trato + tratamentos e Tempo 10= segundo trato;

³ Médias para cada tratamento (Parcelas) e médias para cada horário de coleta (Subparcelas); ^{abc} Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%; CV = 1,88%;

Sabe-se ainda que o pH ruminal também está altamente relacionado com os produtos finais da fermentação e em dietas ricas em volumosos geralmente é mais elevado, permitindo o crescimento das bactérias celulolíticas (CHURCH, 1979). Mould et al. (1983) indicaram que o pH ruminal abaixo de 6,2 reduziria a atividade de bactérias celulolíticas e a digestão da fibra, o que ocorreu em apenas duas (6,05 e 6,19) das 175 coletas realizadas neste estudo, não interferindo na magnitude geral dos tratamentos em que foram obtidos.

Quanto aos horários, os menores pH foram obtidos entre duas e quatro horas após a alimentação da manhã (tempo 2 e 4; pH 6,49 e 6,42, respectivamente) e da tarde (tempo 12; pH 6,34) o que reflete o acelerado processo fermentativo que ocorre neste período liberando rapidamente os ácidos graxos voláteis no rúmen como produtos finais.

Em relação à concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃), houve efeito significativo (P<0,05) para os tratamentos, para os tempos de coleta de amostra de líquido ruminal e ainda para a interação do tratamento com o tempo, o que tornou necessário o desdobramento dessas interações (Tabela 3).

Tabela 3 - Médias de N-amoniacal (mg.dL⁻¹) em diferentes momentos de coleta de amostra de líquido ruminal dos ovinos, a partir do tempo zero (imediatamente antes) até 12 horas após o fornecimento dos tratamentos

Tempo (horas) ²	Tratamentos ¹				
	Controle	Tan 1	Tan 2	Tan 3	Ionóforo
0	16,32 ^{Bc}	18,82 ^{Ac}	17,46 ^{Bc}	16,51 ^{Bcd}	16,28 ^{Bc}
2	30,38 ^{CDa}	32,25 ^{Aa}	30,78 ^{BCa}	29,30 ^{Da}	31,71 ^{Aba}
4	24,77 ^{Bb}	24,02 ^{Bb}	26,40 ^{Ab}	24,32 ^{Bb}	24,19 ^{Bb}
6	13,55 ^{Cd}	18,11 ^{Ac}	18,31 ^{Ac}	15,87 ^{Bd}	14,42 ^{Cd}
8	11,08 ^{Be}	11,51 ^{Bd}	14,65 ^{Ad}	13,95 ^{Ae}	11,58 ^{Be}

10	13,65 ^{ABd}	12,79 ^{BCd}	13,09 ^{Bd}	12,17 ^{Cf}	14,71 ^{AcD}
12	25,33 ^{Ab}	25,19 ^{Ab}	25,93 ^{Ab}	25,54 ^{Ab}	25,22 ^{Ab}

^{ABCabc} Médias seguidas por letras minúsculas distintas entre linhas (comparações de horários) e/ou por letras maiúsculas distintas entre colunas (comparações de tratamentos) diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%; CV = 9,41%.

¹ Tratamentos: Controle= placebo; Tan 1= 0,60 g.kg⁻¹PC, Tan 2= 1,20 g.kg⁻¹PC, Tan 3= 1,80 g.kg⁻¹PC (extrato tanífero); Ionóforo = 0,75 mg.kg⁻¹PC (monensina);

² Tempo 0 = primeiro trato + tratamentos e Tempo 10= segundo trato.

Os valores de N-NH₃ permaneceram, em todas as coletas, sempre acima de 10,0 mg.dL⁻¹ que, de acordo com Van Soest (1994a), seria a concentração mínima no fluido ruminal para a ocorrência de fermentação e crescimento microbiano adequados, mostrando que não houve efeito inibitório bacteriano pelos TC. Conforme se aumentou a quantidade de extrato tanífero adicionada (fonte de TC) a queda na produção de N-NH₃ foi pouco marcante evidenciando-se o maior efeito da complexação e efeito discreto ou ausente sobre inibição microbiana.

Em geral, os maiores valores foram encontrados duas horas após os horários de fornecimento do volumoso (tempos 2 e 12 horas), coincidindo com as coletas que tiveram os menores valores de pH indicando uma rápida degradação da fração proteica do feno de alfafa. Este volumoso possui um reconhecido elevado teor de proteína degradável no rúmen, confirmado pelos dados de Jobim et al. (2011), os quais obtiveram 94,0% e 71,11% de degradação potencial e degradabilidade efetiva (DE) da PB, respectivamente, considerando-se uma taxa de passagem de sólidos de 5% por hora para a DE.

Embora a magnitude da influência dos tratamentos sobre a concentração de nitrogênio (N) amoniacal ruminal tenha sido baixa, esta foi significativa (P<0,05) e observa-se que no desdobramento dos tratamentos no tempo do pico de N-NH₃, duas horas após alimentação da manhã, o Tan 3 foi o que apresentou a menor concentração (29,30 mg.dL⁻¹), não diferindo, entretanto, do Controle (30,38 mg.dL⁻¹) neste momento.

Já no tempo de 10 horas (ou seja, na coleta de líquido às 17 horas, imediatamente antes do novo trato), ocorreu o menor valor de N amoniacal (12,17 mg.dL⁻¹) para o tratamento com maior tanino (Tan 3) que foi inferior ao Controle (13,65 mg.dL⁻¹) e Ionóforo (14,71 mg.dL⁻¹), indicando um efeito positivo da adição de tanino na redução (em cerca de 11%) da desaminação ruminal quando se realiza o desdobramento dos efeitos dos tratamentos nos diferentes tempos de mensuração desta variável.

Driedger & Hatfield (1972), em um primeiro ensaio *in vitro* de seu trabalho, observaram que o tratamento com 10% de tanino adicionado no farelo de soja reduziu em 90% a desaminação ruminal, por um provável efeito sobre as bactérias proteolíticas do meio ou ainda dificultando a ação enzimática sobre a proteína deste alimento.

Tanto o ionóforo quanto os TC são aditivos que podem minimizar a concentração de amônia ruminal, por meio da inibição das bactérias proteolíticas (YANG & 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).

O efeito do aditivo tanífero em reduzir a concentração de N-NH₃ ruminal foi demonstrado por Carulla et al. (2005), que compararam a adição ou não de extrato tanífero de acácia-negra (0 ou 41 g.kg⁻¹, ou seja, 1,40 g.kg⁻¹PC) na matéria seca (MS) da dieta de ovinos recebendo três forragens distintas, e concluíram que os TC reduzem a concentração de amônia no fluido ruminal em 9% (de 20,7 para 18,9 mmol.L⁻¹).

Já Beelen et al. (2006) observaram que a presença de TC provenientes de diferentes espécies de leguminosas na dieta foi capaz de reduzir a concentração de N-NH₃ em cerca de 3,7 mg.dL⁻¹ de líquido ruminal, quando compararam os seus efeitos no líquido ruminal de cabras com dietas tratadas ou não com polietilenoglicol (PEG), um potente inativador do efeito dos taninos.

As quantidades consumidas diárias de matéria seca total, o volume de água ingerido, as quantidades de excretas diárias e o balanço de nitrogênio tiveram efeito significativo (P<0,05) dos tratamentos (Tabela 4).

Constata-se que a adição das maiores quantidades de taninos na dieta de ovinos (Tan 2 e Tan 3) levou às maiores quantidades de fezes produzidas, enquanto o volume urinário foi inferior para estes tratamentos em relação aos demais. O tratamento Tan 1 não diferiu (P>0,05) do Controle e Ionóforo, e estes tratamentos repercutiram nos maiores volumes de urina e nas menores produções fecais.

Tabela 4 - Consumo, excreção e balanço de nitrogênio (N) em ovinos recebendo diferentes quantidades de extrato tanífero e monensina como aditivos

Variável	Tratamentos ¹					CV (%)	Valor P
	Controle	Tan 1	Tan 2	Tan 3	Ionóforo		
Quantidade consumida diária							
Dieta total (g MS)	1163,00 ^b	1214,00 ^{ab}	1264,57 ^{ab}	1336,46 ^a	1169,27 ^b	5,56	0,0107
Água (mL)	4031,20 ^a	3897,00 ^a	3489,00 ^b	4157,00 ^a	3526,00 ^b	12,16	<0,0001
Produção diária de excretas							
Fezes (g MS)		490,68	543,51 ^b	588,91 ^a	468,14 ^c	10,59	<0,0001

	456,99 ^c						
Urina total (mL)	1634,80 ^a	1591,30 ^a	1363,50 ^b	1275,43 ^b	1519,70 ^a	12,85	<0,0001
Balança de N							
g.dia ⁻¹							
N ingerido	35,76	36,91	37,69	37,41	36,10		0,5017
N fecal	9,02 ^d	10,51 ^c	12,20 ^b	13,52 ^a	8,89 ^d	5,35	
N absorvido		26,39 ^{ab}	25,49 ^b	23,89 ^c	27,21 ^a	11,91	<0,0001
N urinário total	26,75 ^{ab}					7,40	<0,0001
N fecal+urinário	15,47 ^c	16,93 ^b	14,84 ^c	15,79 ^{bc}	18,80 ^a	10,42	<0,0001
N retido	24,49 ^c	27,44 ^b	27,04 ^b	29,15 ^a	27,82 ^{ab}	7,57	<0,0001
	11,27 ^a	9,46 ^{bc}	10,65 ^{ab}	8,26 ^c	8,28 ^c	23,63	<0,0001
g.kg ⁻¹ N ingerido							
N absorvido	747,2 ^a	714,4 ^b	674,2 ^c	637,2 ^d	752,4 ^a	4,93	<0,0001
N retido	312,6 ^a	255,5 ^{bc}	275,4 ^{ab}	214,7 ^d		22,18	<0,0001
					222,3 ^{cd}		
g.kg ⁻¹ PC							
N ingerido	0,89 ^a	0,88 ^a	0,88 ^a	0,83 ^b	0,87 ^a	3,29	<0,0001
N fecal	0,22 ^c	0,25 ^b	0,28 ^a	0,30 ^a	0,21 ^c	11,57	<0,0001
N urinário total	0,38 ^b	0,40 ^b	0,35 ^c	0,35 ^c	0,46 ^a	10,65	<0,0001
N fecal+urinário	0,61 ^c	0,65 ^{ab}	0,63 ^{bc}	0,65 ^{ab}	0,67 ^a	7,92	<0,0001
N absorvido	0,66 ^a	0,63 ^b	0,59 ^c	0,53 ^d	0,66 ^a	6,51	<0,0001
N retido	0,28 ^a	0,23 ^{bc}	0,24 ^{ab}	0,18 ^d	0,20 ^{cd}	22,23	<0,0001

^{a,b,c} Nas linhas médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,05); CV (%)= Coeficiente de variação.

¹Tratamentos: Controle= placebo; Tan 1= 0,60 g.kg⁻¹PC, Tan 2= 1,20 g.kg⁻¹PC, Tan 3= 1,80 g.kg⁻¹PC (extrato tanífero); Ionóforo = 0,75 mg.kg⁻¹PC (monensina).

Em termos de nitrogênio excretado por dia, o Controle e Ionóforo foram os que tiveram as menores quantidades via fecal, sendo a maior excreção nitrogenada (13,52 g.dia⁻¹ ou ainda 0,30 g.kg⁻¹ de peso corporal, PC) por esta via foi para o tratamento com a maior quantidade de tanino, o Tan 3 (1,80 g.kg⁻¹PC), o que reduziu, conseqüentemente, o N absorvido, ou seja, obteve-se uma menor digestibilidade aparente da fração nitrogenada com a adição de taninos na dieta.

Em primeiro instante isto parece contrariar o pressuposto de que a adição de tanino melhoraria o aproveitamento da fração nitrogenada pelos animais recebendo dietas com fonte de proteína degradável no rúmen, pelo seu provável efeito na proteção deste nutriente da degradação ruminal (REED, 1995; MIN et al., 2003).

Em ruminantes, o conteúdo de proteína verdadeira nas fezes é muito baixo, então a contribuição dietética nas excreções nitrogenadas é provavelmente menor do que aquela oriunda da massa microbiana (VAN SOEST, 1994b). No presente experimento com a adição dos TC nas dietas, houve maior (P<0,0001) quantidade diária de nitrogênio fecal excretado,

logo, é possível que a contribuição do N metabólico fecal também tenha se elevado, considerando-se que não houve diferença significativa ($P>0,05$) na quantidade de N ingerido nos diferentes tratamentos.

Além disso, Van Soest (1994b) afirma que não se pode considerar que grandes quantidades de enzimas e outras secreções gastrintestinais dos animais compõem a proteína fecal já que quase toda a fração potencialmente degradável é absorvida, todavia, somente materiais mais resistentes como os resíduos da parede celular microbiana, poderiam permanecer e constituir parte do nitrogênio fecal.

A suposição é que este incremento no N fecal possa ser proveniente, pelo menos em parte, do acréscimo na produção de proteína microbiana, sendo que este aumento poderia resultar de maiores taxas de *turnover* líquido, como consequência do maior fluxo de saliva em animais que consomem taninos (VAN SOEST, 1994c).

O efeito da maior proporção de nitrogênio metabólico participando da excreção fecal total com a adição de taninos (NORTON, 1999), também poderia retornar a outra causa, como um possível aumento na descamação das membranas do trato gastrintestinal devido à capacidade de complexação dos TC quando em alta dosagem, até mesmo com as proteínas constituintes da mucosa, o que favoreceria o aumento das perdas nitrogenadas via fecal.

Deve-se assumir ainda que parte do nitrogênio passante ao intestino delgado complexado aos TC pode advir de componentes proteicos endógenos (McSWEENEY et al., 2001) e que o complexo pode não ser satisfatoriamente desfeito nesta parte do trato gastrintestinal.

Apesar disso, Perez-Maldonado & Norton (1996) verificaram que ovinos e caprinos recebendo TC provenientes de *Desmodium* (1%) ou *Calliandra* (2,3%) apresentaram maiores excreções de nitrogênio nas fezes (14%), porém o aditivo não afetou a digestão pós ruminal deste nutriente ($P>0,05$), já que os animais que receberam TC absorveram mais nitrogênio (19%) por quilograma de matéria orgânica digerida em relação à dieta controle (apenas capim pangola), provavelmente pela ação intestinal (elevado pH e ação detergente dos sais biliares) responsável pelo rompimento das ligações tanino-proteína.

Dawson et al. (1983), também observaram um aumento na excreção fecal de ovinos recebendo dietas contendo taninos, os quais tiveram cerca de 14% mais produção de MS fecal ($P < 0,001$) do que os animais no tratamento controle. Estes autores verificaram ainda que pode ocorrer aumento da reciclagem de nitrogênio e, portanto, menor excreção deste na urina.

Portanto, os TC também estão relacionados à redução da excreção nitrogenada via urinária, assim sendo, a avaliação da produção nitrogenada total, considerando-se a

quantidade eliminada na urina, bem como o balanço de nitrogênio total faz-se imprescindível na presente pesquisa. Neste contexto, observou-se que as maiores quantidades diárias de N excretado via urina ocorreram para o Ionóforo ($18,80 \text{ g.dia}^{-1}$ ou ainda $0,46 \text{ g.kg}^{-1}\text{PC}$), e as menores excreções urinárias para o Tan 2 e Tan 3 (ambos $0,35 \text{ g.kg}^{-1}\text{PC}$), que parecem estar associadas ao decréscimo no volume de urina para estes tratamentos (Tabela 4).

Verifica-se que houve uma alteração da via de eliminação de N por meio da adição dos taninos, o que pode ter um significado ambiental importante, pois este nutriente na urina é liberado mais facilmente para o meio por ser mais volátil do que quando presente nas fezes (WALKER et al., 2005). Isto porque o N fecal está principalmente na forma orgânica, menos volátil, enquanto o N urinário tem como metabólito principal a ureia, levando a uma nitrificação e lixiviação no solo e ainda participam em grande magnitude das emissões de N_2O , um potente gás de efeito estufa (KLEIN & LEDGARD, 2005 *apud* GRAINGER et al., 2009).

Os resultados obtidos para N retido, considerando-se as excreções por ambas as vias fecal e urinária, permitem afirmar que os aditivos (extrato tanífero e mesmo o ionóforo) não foram eficientes em melhorar a utilização do N ingerido, tendo em vista que o Controle superou ($P < 0,05$) quase todos os tratamentos tanto em g.dia^{-1} como em $\text{g.kg}^{-1}\text{PC}$, não diferindo, entretanto, do Tan 2.

Grainger et al. (2009), em um estudo que avaliou o metabolismo de vacas leiteiras recebendo duas quantidades de TC oriundo da acácia-negra (166 e 244 g.d^{-1} de TC, que correspondeu a $0,40$ e $0,60 \text{ g.kg}^{-1}\text{PC}$ de extrato tanífero por dia), além da dieta controle, sem o aditivo, não observaram diferença significativa para a retenção de N, entretanto também encontraram diferenças ($P < 0,001$) entre os tratamentos para as excreções nitrogenadas nas fezes e na urina, sendo que os tratamentos contendo taninos proporcionaram os maiores valores de N nas fezes (tanto em g.kg^{-1} do N ingerido como em $\text{g.kg}^{-1} \text{PC}^{0,75} \cdot \text{d}^{-1}$) e os menores valores de N excretado na urina.

Em geral, a eliminação de N via urinária é maior do que aquela pela via fecal em estudos que compararam estas vias de excreção em dietas isoproteicas para ovinos como Lavezzo et al. (1996) que obtiveram 523 e 244 g de N na urina e nas fezes, respectivamente, por kg do N ingerido, em dietas contendo 154 g.kg^{-1} de PB na MS, ou seja, a excreção urinária de N representou 68% do total excretado; e ainda por Zeoula et al. (2006), em rações com 147 g.kg^{-1} de PB na MS, observaram que os ovinos excretavam 357 g.kg^{-1} do N ingerido via urinária (70% do N total excretado), enquanto 204 g.kg^{-1} foi por via fecal.

No presente trabalho a via de excreção de N também foi prioritariamente a urina, com 433; 459; 394; 422 e 520 g.kg⁻¹ do N ingerido excretado via urinária (média de 446 g.kg⁻¹) e 252; 285; 326; 361 e 246 g.kg⁻¹ do N ingerido eliminado via fecal (média de 294 g.kg⁻¹), para o Controle, Tan 1, Tan 2, Tan 3 e Ionóforo, representando proporções de perdas de N urinário de 63, 62, 55, 54 e 68% do N excretado total, respectivamente. Percebe-se então um aumento da proporção do N ingerido que é perdido pelas fezes por meio da adição das duas maiores quantidades de extrato tanífero (Tan 2 e Tan 3).

Como as ingestões de N não diferiram entre os tratamentos e as quantidades de N perdido via urinária foi significativa, pode-se atribuir esse efeito aos diferentes aditivos utilizados, entretanto, apesar do tanino promover uma redução significativa no N urinário total (em g.kg⁻¹ PC), sua adição não foi suficiente para contrabalancear o aumento do N fecal e elevar o balanço de N final, o qual embora positivo para todos os tratamentos foi baixo para o tratamento com maior tanino (Tan 3) e ainda para o tratamento Ionóforo.

Conforme McNeill et al.(1999), em um de seus experimentos que avaliou doses de quebracho (0, 20, 40 e 60 g.dia⁻¹; 730 g.kg⁻¹ de TC) verificaram que com aumento da dose oferecida houve redução significativa na digestibilidade do N, aumentando sua excreção fecal e ainda reduziu a retenção de N em ovinos.

Carulla et al. (2005) testando três dietas basais (substituição parcial da gramínea por duas leguminosas, trevo ou alfafa) e a adição ou não de extrato tanífero de acácia-negra (41g.kg⁻¹MS da dieta, ou seja 1,40 g.kg⁻¹PC) verificaram que o tanino adicionado na dieta dos ovinos reduziu (P<0,05) a excreção urinária de nitrogênio (que decresceu de 600 para 519 g.kg⁻¹N ingerido). Apesar disso, não houve efeito significativo (P=0,99) da adição de tanino sobre a retenção de nitrogênio, já que embora a excreção urinária (expresso em g.kg⁻¹N ingerido) tenha reduzido em 13,5%, a excreção fecal de N aumentou 22,8%.

Por outro lado, Driedger & Hatfield (1972) avaliaram o tratamento com tanino (10%) do farelo de soja peletizado em comparação com o farelo de soja sem tratamento ou ureia como fontes proteicas nas dietas de cordeiros e observaram que o tratamento com tanino melhorou o aproveitamento do N da dieta (P<0,05), obtendo-se 10,6; 7,5 e 7,1 g. animal. dia⁻¹ de retenção média diária de N, respectivamente para os tratamentos acima, o que significou 423; 337 e 307 g.kg⁻¹N retido em relação ao N ingerido, demonstrando a superioridade do tratamento em que o tanino foi utilizado para proteger a proteína do farelo de soja.

No presente experimento, o complexo tanino-proteína pode não ter sido completamente desfeito no trato gastrointestinal pós-ruminal, elevando-se a participação nitrogenada nas fezes, principalmente para o Tan 3, que resultou, juntamente com o

tratamento contendo monensina, nos menores valores de N retido. Entretanto, o tratamento Ionóforo, ao contrário dos tratamentos com extrato tanífero adicionados, ocorreu a maior perda de N via urinária, já a excreção fecal deste nutriente não diferiu do Controle.

Enfim, as reduções no N retido dos tratamentos em relação ao tratamento controle podem ter ocorrido tanto pela perda de componentes nitrogenados não dietéticos nas fezes como pela capacidade comprometida na liberação da proteína dietética complexada pelos taninos no meio ácido do abomaso (McNEILL et al., 1999).

Algumas variáveis metabólicas sanguíneas podem informar sobre o *status* do metabolismo proteico mediante a aplicação dos diferentes tratamentos, sendo alteradas mais rapidamente ou ainda a médio ou longo prazo em função de uma alteração dietética (CONTRERAS et al., 2000). Para tanto, albumina (A), proteínas totais (PT) e a ureia (U) séricas foram dosadas e verificou-se que não houve efeito significativo ($P>0,05$) entre os tratamentos para estas variáveis, nem mesmo para as globulinas (G), relação A:G e nitrogênio ureico (N ureico) derivadas daquelas por meio de cálculos (Tabela 5).

Enquanto a albumina demonstra bem o *status* nutricional proteico do animal a longo prazo, a dosagem de ureia sanguínea informa sobre este em curto prazo (CONTRERAS et al., 2000). Assim, avaliando-se os resultados verifica-se que, a albumina sérica manteve-se dentro dos valores de referência em todos os tratamentos enquanto a ureia e N ureico no soro sanguíneo ficaram além do limite estabelecido nestas referências (Tabela 5) e, embora estas variáveis não tenham apresentado efeito significativo neste estudo, apenas os tratamentos Tan 1 e Tan 2 mantiveram-se dentro da faixa normal para a espécie.

Os valores de N ureico são alusivos à magnitude do aproveitamento do N ingerido em ruminantes, pois um aumento indica a quantidade de nitrogênio não utilizado circulante. Como os dados médios observados ($28,24 \pm 5,54 \text{ mg.dL}^{-1}$) para esta variável estavam muito próximos ao limite superior da referência de normalidade, então é provável que, em alguns momentos do ensaio, os animais não estavam sendo capazes de utilizar parte do nitrogênio consumido.

Todavia, os desvios em relação aos valores referência devem ser interpretados com cautela na avaliação das variáveis bioquímicas sanguíneas, principalmente levando-se em consideração as variações naturalmente existentes entre rebanhos, raças, categorias e estágios fisiológicos dos indivíduos dentro de uma mesma espécie.

Tabela 5 - Variáveis metabólicas sanguíneas de ovinos submetidos aos tratamentos contendo taninos ou aditivo monensina e valores referência utilizados para a espécie

Variável ²	Ref. ³	Tratamentos ¹					CV(%)	Valor
		Controle	Tan 1	Tan 2	Tan 3	Ionóforo		
g.dL ⁻¹								
Albumina	2,6-4,2	3,27	3,38	3,77	2,88	3,34	22,34	0,4909
Globulina	3,1-5,1	4,36	3,32	3,20	4,44	3,83	26,36	0,2361
A:G	0,6-1,3	0,85	1,04	1,45	0,65	1,03	49,77	0,2053
PT	6,0-7,9	7,62	6,69	6,97	7,32	7,17	14,40	0,6802
mg.dL ⁻¹								
Creatinina	1,2-1,9	1,15	1,00	1,00	1,10	1,11	25,05	0,8450
Ureia	24,0-60,1	62,00	58,17	57,56	60,33	64,94	20,23	0,8728
N ureico	11,2-28,0	28,89	27,11	26,82	28,11	30,26	20,23	0,8726
U.I.L ⁻¹								
ALT	22-28	18,14 ^b	22,55 ^a			18,35 ^b	14,70	0,0276
AST	60,0-280,0	158,55	159,9	162,89	213,2	198,25	33,97	0,5052
GGT	20,0-52,0	70,11		74,96		66,99	22,70	0,9423

^{a,b,c} Nas linhas médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,05); CV (%)= Coeficiente de variação;

¹ Tratamentos: Controle= placebo; Tan 1= 0,60 g.kg⁻¹PC, Tan 2= 1,20 g.kg⁻¹PC, Tan 3= 1,80 g.kg⁻¹PC (extrato tanífero); Ionóforo = 0,75 mg.kg⁻¹PC (monensina).

² A:G = relação entre albumina e globulina; PT= proteínas totais; Globulina= PT - Albumina; N ureico= nitrogênio ureico sanguíneo (N ureico= Ureia * 0,466); ALT= alanina amino transferase; AST= aspartato amino transferase ;GGT=γ-glutamil transferase ou gama GT;

³ Valores de referência para a espécie ovina (CONTRERAS et al., 2000; RADOSTITS et al., 2002; KANEKO et al., 2008).

Neste sentido, Lumeij et al. (1988) *apud* Kaneko et al. (2008) afirmaram que, no caso de patologias associadas à degeneração celular no fígado ou ductos biliares, aumentos de cinco a dez vezes em relação à referência da espécie podem ser comumente encontrados e, ainda, como este intervalo referência é estabelecido entre mais ou menos dois desvios padrão do valor médio observado na população “normal”, assume-se que cerca de 2,5% dos indivíduos desta poderiam apresentar valores acima deste intervalo, sem, contudo, estarem com qualquer distúrbio.

Ao contrário do presente experimento, em que os tratamentos com os diferentes aditivos (taninos ou ionóforo) não influenciaram a ureia ou o N ureico sanguíneo (P>0,05), Carulla et al. (2005) verificaram que o N ureico no sangue de cordeiros castrados foi reduzido em 5%, indo de 18,0 para 17,1 mg.dL⁻¹, que embora pouco expressivo numericamente apresentou efeito significativo (P=0,003) devido à adição de 41 g.kg⁻¹MS de extrato tanífero (1,40 g.kg⁻¹PC), provavelmente pela menor dispersão dos dados obtidos por estes autores.

O balanço de nitrogênio (N retido) está relacionado com a eficiência de utilização deste nutriente pelos microrganismos ruminais, porém, esta não depende apenas da fonte de N utilizada, mas também da fonte de carboidrato, determinando se a sincronia entre esses nutrientes foi bem estabelecida. Deste modo, o aporte energético da dieta também poderia

influenciar na retenção de N, tendo em vista que sua deficiência eleva a liberação de amônia ruminal não aproveitada, aumentando a demanda para excreção na forma de ureia. Então, na via metabólica proteica, a concentração de amônia liberada no rúmen está diretamente relacionada com aumentos nos valores de ureia sanguínea (CONTRERAS et al., 2000).

Avaliaram-se ainda a creatinina sérica, além das enzimas alanina amino transferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e γ -glutamil transferase (GGT) que poderiam indicar, em conjunto, um distúrbio no metabolismo renal (creatinina e ureia) e hepático dos animais (ALT, AST e GGT), principalmente com intuito de se verificar se ocorreu alguma disfunção celular em decorrência da aplicação dos tratamentos. Destas, apenas a ALT foi modificada em função do tratamento aplicado ($P < 0,05$), com os maiores valores para os tratamentos em que o extrato tanífero foi adicionado.

Embora para animais de pequeno porte esta seja uma das enzimas de escolha para avaliar o seu comprometimento hepático, para animais de médio e grande porte como caprinos, ovinos, bovinos e equinos, a ALT, como parâmetro isolado, tem pouco valor diagnóstico, pois é encontrada em baixas concentrações no fígado destas espécies (SCHEFFER & GONZÁLES, 2014).

Conforme suscitado por Radostits et al. (2002), os animais sadios apresentam intervalos de 60,0 até 280,0 e de 22,0 até 28,0 UI.L⁻¹ para AST e ALT, respectivamente, sendo que valores acima destes poderiam indicar degeneração das células hepáticas, logo, os tratamentos mantiveram-se dentro dos valores de referência para estes analitos.

Por outro lado, o aumento da enzima GGT em relação aos seus valores referência geralmente associa-se à colestase com proliferação de ductos biliares, sendo um importante indicador das desordens hepatobiliares em ruminantes (RUSSEL & ROUSSEL, 2007).

Os valores médios encontrados nos diferentes tratamentos, embora não sejam estatisticamente distintos entre si ($P > 0,05$), superaram o valor tido como referência de 20 a 52 UI.L⁻¹, descrito por Kaneko et al. (2008).

Isto poderia indicar que houve colestase nos animais relacionada ou não à adição do extrato tanífero ao longo dos períodos experimentais, já que os níveis encontrados superaram duas vezes o desvio padrão à média populacional (valor referência), magnitude considerada significativa na avaliação do perfil metabólico de acordo com ROWLANDS & POCOOCK (1976) *apud* CONTRERAS et al. (2000). Contudo, os valores observados não ultrapassaram cinco a dez vezes os valores de referência da espécie, comuns em animais acometidos por doenças hepatobiliares (LUMEIJ et al., 1988 *apud* KANEKO et al., 2008).

Além dos animais do experimento não apresentarem sinais clínicos de icterícia, ou seja, a pele, esclera, urina e fezes com aparência e colorações normais, na avaliação de um perfil metabólico outros fatores devem ser considerados, como os níveis de proteínas séricas (A, PT e G), por exemplo, os quais estiveram dentro da faixa de normalidade, logo, não se tem evidências suficientes de que tenha ocorrido alguma doença hepática ou renal nos ovinos.

Ainda tem-se que a razão albumina:globulina (A:G) também se manteve dentro do valor referência e esta permite verificar a existência de alterações nestas proteínas séricas, o que, de acordo com Kaneko et al. (2008), seria o primeiro sinal de anormalidade relacionada às doenças hepática ou renal.

CONCLUSÃO

A eficiência de utilização da proteína do feno de alfafa por ovinos em crescimento não é melhorada pela adição do extrato tanífero ou mesmo da monensina.

As duas maiores quantidades de taninos condensados de acácia-negra oferecidas a ovinos (1,20 e 1,80 g.kg⁻¹PC) aumentam a proporção de nitrogênio perdido nas fezes ao passo que reduzem o volume urinário bem como o nitrogênio perdido na urina, enquanto o ionóforo aumenta a quantidade de nitrogênio excretado na urina sem alterar este nutriente na fração fecal, em relação ao peso corporal dos animais.

Até a quantidade de 1,80 g.kg⁻¹PC de extrato tanífero de acácia-negra, não houve efeito de intoxicação dos animais, ou seja, ausência sinais característicos para existência de lesões hepáticas e renais.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Projeto 2011/0168. Protocolo 255/11. Aprovado com Parecer 480/12.

REFERÊNCIAS

- BAE, H. D., MCALLISTER, T. A., YANKE, J. et al. 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.
- BEELEN, P. M. G.; BERCHIELLI, T. T.; BEELEN, R. et al. Influence of condensed tannins from Brazilian semi-aride legumes on ruminal degradability, microbial colonization and enzymatic activity. **Small Ruminant Research**, v.61, p.35-44, 2006.
- CARULLA J. E., KREUZER M., MACHMÜLLER, A. et al. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.56, p.961-970, 2005.

CHURCH, D. C. **Digestive physiology and nutrition of ruminants**. 3. ed. Oxford Press Inc., v.1, 1979. 350p.

CONTRERAS, P.; WITWER, F.; BOHMWALD, H. Uso dos perfis metabólicos no monitoramento nutricional dos ovinos. In: GONZÁLES, F. H. D.; BARCELLOS, J. O.; OSPINA, H. et al. (Eds.) **Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Porto Alegre: Gráfica UFRGS, p.75-88, 2000.

DAWSON, K. A.; BOLING, J. A. Monensin-resistant bacteria in the rumen of calves on monensin-containing and unmedicated diets. **Applied and Environmental Microbiology**, v.46, p.160-164, 1983.

DRIEDGER, A.; HATFIELD, E.E. Influence of tannins on the nutritive value of soybean meal for ruminants. **Journal of Animal Science**, v.34, p.465-468, 1972.

FENNER, H. Method for determining total volatile bases in rumen fluid by steam distillation. **Journal of Dairy Science**, v.48, p. 249-251, 1965.

GRAINGER, C; CLARKE, T; AULDIST, M. J et al. Potential use of *Acacia mearnsii* condensed tannins to reduce methane emissions and nitrogen excretion from grazing dairy cows. **Canadian Journal of Animal Science**, v.89, p.241-251, 2009.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. Appendixes VIII blood analyte reference values in large animals. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (Eds.) **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6. ed. San Diego: Academic Press, p. 882-888, 2008.

JOBIM, C. C.; FERREIRA, G.A.; BUMBIERIS JUNIOR, V. H.; CALIXTO JUNIOR, M.; SANTOS, G.T. Cinética de degradação ruminal dos fenos de alfafa e Tifton-85 e da silagem de milho. **Semina: Ciências Agrárias**, v.32, p. 747-758, 2011.

LASCANO, C. E.; BOREL, R.; QUIROZ, R. et al. Recommendations on the methodology for measuring consumption and *in vivo* digestibility. In: RUIZ, M.E., RUIZ, S.E. (Eds.) **"Ruminant Nutrition Research: Methodological Guidelines"**. San Jose: InterAmerican Network for Animal Production Systems Research, p.173-182, 1992.

LAVEZZO, O. E. N.; LAVEZZO, W.; BURINI, R. C. Efeitos nutricionais da substituição parcial do farelo de soja, em dietas de ovinos. Comparação da digestibilidade aparente e balanço de nitrogênio com a cinética do metabolismo da n-glicina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.25, p. 282-297, 1996.

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.

McNEILL, D.M.; KOMOLONG, M. K.; GOBIUS, N. et al. Influence of dietary condensed tannin on microbial crude protein supply in sheep. In: BROOKER, J.D. (Ed.) **Proceedings of International Workshop on Tannins in Livestock and Human Nutrition**. ACIAR Proceedings, n.92, p.67-71, 1999.

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

MEZZOMO, R.; PAULINO, P. V. R.; DETMANN, E. et al. 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. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants feed fresh temperate forages: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v.105, p. 3-19, 2003.

MOULD, F.L.; ØRSKOV, E.R.; MANN, S.O. Associative effects of mixed feeds. 2. The effect of dietary additions of bicarbonate salts on the voluntary intake and digestibility of diets containing various proportions of hay and barley. **Animal Feed Science and Technology**, v.10, p.15-25, 1983.

NORTON, B.W. The significance of tannins in tropical animal production. In: BROOKER, J.D. (Ed.) **Proceedings of International Workshop on Tannins in Livestock and Human Nutrition**. ACIAR Proceedings, n.92, p.14-23, 1999.

NRC - National Research Council. **Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids**. Washington, DC: The National Academies Press, 2007. 362p.

OWENS, F. N., GOETSCH, A. L. Ruminant fermentation. In: CHURCH, D. C. **The ruminant animal physiology and nutrition**. New Jersey: Prentice Hall, p.145-171, 1988.

PEREZ-MALDONADO, R.A; NORTON, B.W. The effects of condensed tannins from *Desmodium intortum* and *Calliandra calothyrsus* on protein and carbohydrate digestion in sheep and goats. **British Journal of Nutrition**, v.76, p.515–533, 1996.

RADOSTITS, O.M.; MAYHEW, I.G.J.; HOUSTON, D.M. **Exame clínico e diagnóstico em veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 591p.

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

RUSSELL, K. E.; ROUSSEL, A. J. Evaluation of the ruminant serum chemistry profile. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, v.23, p. 403–426, 2007.

SCHEFFER, J. F. S.; GONZÁLEZ, F. H. D. Enzimologia Clínica em Medicina Veterinária. Disponível em <http://www6.ufrgs.br/bioquimica/index.htm>. Acesso em: 25 jul. 2014.

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

VAN SOEST, P.J. Microbes in the gut. In: _____. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994a. Cap. 16, p. 253-280.

VAN SOEST, P.J. Nitrogen metabolism. In: _____. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994b. Cap. 18, p. 290-311.

VAN SOEST, P.J. Plant defensive chemicals. In: _____. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994c. Cap. 13, p. 196-212.

WALKER, N. D.; NEWBOLD, C. J.; WALLACE, R. J. **Nitrogen metabolism in the rumen**. In: PFEFFER, E.; HRISTOV, A. (Eds.) Nitrogen and phosphorus nutrition of cattle. Washington: CABI, p.71-115, 2005.

YANG, C. M.; 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.

ZEOULA, L. M.; FERELI, F.; PRADO, I. N. et al. Digestibilidade e balanço de nitrogênio de rações com diferentes teores de proteína degradável no rúmen e milho moído como fonte de amido em ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 5, p. 2179-2186, 2006.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A quantidade de $0,60 \text{ g.kg}^{-1}$ PC de extrato tanífero de acácia-negra bem como o tratamento Ionóforo (monensina a $0,75 \text{ mg.kg}^{-1}$ PC) não influenciam negativamente a digestibilidade nem as degradabilidades efetivas da matéria seca e da fibra em detergente neutro do feno de alfafa oferecido aos animais. Contudo, estas variáveis foram reduzidas em decorrência dos tratamentos experimentais com as duas maiores quantidades de taninos adicionadas.

Quanto ao aproveitamento da proteína dietética conclui-se que os aditivos aplicados nas quantidades testadas não foram eficientes em reduzir as perdas de nitrogênio por meio das excreções totais, apresentando valores de N retido iguais ou até inferiores à dieta controle, sem aditivo.

Em um primeiro instante, a provável causa pode ter sido em relação ao nitrogênio oriundo da descamação das membranas do trato gastrointestinal e do microbiano em decorrência da presença das quantidades aplicadas de taninos, que acabaram aumentando a participação do nitrogênio metabólico nas fezes, principalmente como reflexo da alta capacidade complexante das moléculas de tanino com as proteínas, neste caso, não só dietéticas, mas também endógenas, como as enzimas, inibindo-as.

Todavia, o complexo enzimático do rúmen manteve-se ativo, confirmado pelos valores de N-NH_3 sempre acima do preconizado como mínimo necessário para o suprimento do ambiente ruminal para todos os tratamentos. Além disso, estes valores pós-prandial, foram ligeiramente inferiores para o Tan 3, sugerindo-se que, por meio da adição de taninos, o mecanismo de ação mais provável é o da complexação da proteína do que o inibitório enzimático. Ainda, este processo de complexação é confirmado à medida que se aumentou a

quantidade de extrato tanífero adicionado e a PB, FDN e a FDA excretadas nas fezes também foram elevadas.

O balanço de nitrogênio foi positivo para todos os tratamentos, sendo superior para o Controle que não diferiu do tratamento contendo extrato tanífero em quantidade intermediária. O tratamento com a maior quantidade de tanino foi inferior aos demais, não diferindo do Ionóforo.

Pode-se admitir ainda um provável desbalanço em termos de relação proteína:energia dietéticos, já que o feno de alfafa com proteína de alta qualidade superou as exigências para a categoria animal avaliada, enquanto a energia ficou um pouco aquém, pois esta foi totalmente oriunda dos carboidratos fibrosos do volumoso oferecido.

Deste modo, mesmo partindo-se do pressuposto de que a síntese microbiana pode ser aumentada com a presença de taninos na dieta, esta pode não ter sido suficiente para contrabalancear os efeitos da redução da degradabilidade e fermentação ruminal como consequência do aumento da quantidade do extrato tanífero.

Algumas condições de dieta ainda devem ser estabelecidas antes que os TC sejam efetivamente utilizados, pois os complexos de tanino-proteína devem permanecer estáveis no ambiente ruminal. Porém, é fundamental que estes complexos sejam desfeitos no abomaso e intestinos de modo que não interfiram negativamente na digestão proteica pós-ruminal.

Além disso, estudos com os taninos em situações de maior suprimento de carboidrato não fibroso no rúmen, garantindo energia para os processos de síntese, bem como pesquisas com os procedimentos para o fornecimento de TC diretamente nos suplementos ou rações dos animais com adequação de dose que não prejudique a digestão celulolítica ruminal microbiana ou ainda, o uso destas substâncias para protegerem as fontes proteicas agregando-se a estes ingredientes como envoltórios (cápsulas ou *pellets*), por exemplo, ainda podem ser exploradas.