

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E DIGESTIBILIDADE
IN VITRO DE LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS
TROPICAIS COM FOCO NO EFEITO DE
COMPOSTOS FENÓLICOS E IDADE DA PLANTA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ana Carolina Fluck

Santa Maria, RS, Brasil

2011

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* DE LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS TROPICAIS COM FOCO NO EFEITO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E IDADE DA PLANTA

por

Ana Carolina Fluck

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Zootecnia**

Orientador: Gilberto Vilmar Kozloski

Santa Maria, RS, Brasil

2011

F646c Fluck, Ana Carolina
Caracterização química e digestibilidade in vitro de leguminosas forrageiras tropicais com foco no efeito de compostos fenólicos e idade da planta / por Ana Carolina Fluck. – 2011.
81 f. ; il. ; 30 cm

Orientador: Gilberto Vilmar Kozloski
Coorientador: Luis Maria Bonnacarrère Sanchez
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, RS, 2011

1. Zootecnia 2. Aderência bacteriana 3. Compostos fenólicos 4. Idade da planta 5. Digestibilidade in vitro 6. Leguminosas tropicais I. Kozloski, Gilberto Vilmar II. Sanchez, Luis Maria Bonnacarrère III. Título.

CDU 633.31/.37

Ficha catalográfica elaborada por Cláudia Terezinha Branco Gallotti – CRB 10/1109
Biblioteca Central UFSM

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Departamento de Zootecnia
Programa de Pós-Graduação Zootecnia**

A comissão examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E DIGESTIBILIDADE *IN VITRO*
DE LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS TROPICAIS COM FOCO NO
EFEITO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E IDADE DA PLANTA**

elaborada por
Ana Carolina Fluck

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia

COMISSÃO EXAMINADORA



Gilberto Vilmar Kozloski, Dr.
(Presidente, Orientador)

Clair Jorge Oliyo, Dr. (UFSM)

Harold Ospina Patino, Dr. (UFRGS)

Santa Maria, 24 de fevereiro de 2011

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo apoio, incentivo, compreensão e amor em todos os momentos;

A minha família por todo apoio, e incentivo;

Ao Olmar, por simplesmente todos os dias que estive do meu lado, sem medir esforços para ajudar em todos os momentos;

Ao Gilberto por todos os ensinamentos, incentivos, a ajuda, compreensão e “puxões de orelha”;

Aos professores Bonne e Clair pela disposição, e opiniões sempre construtivas para este trabalho;

A todos os estagiários do Laboratório de Bromatologia e Nutrição de Ruminantes, em especial a minha equipe, Andressa, que desde o início foi meu apoio em todos os momentos, sempre sendo uma amiga, ao Filipe, sempre bem disposto, que veio mais tarde compor este trio que passou por muitos apertos! Ao Cristiano, Tiago Orlandi, Simone, Thaís, Pablo, Leandro, Duane, Suélen e Mariana. Ao Éder, que mesmo em pouco tempo, teve papel fundamental para esse trabalho ser executado;

Aos alunos de Pós-Graduação do LabRumen, Roberta, Franciso e Tiago Alves, pela descontração nos momentos difíceis;

A Glaucia, Carla e Lisandre, pelos ensinamentos, apoio em muitas escolhas;

Aos meus colegas da ATZ 2008, em especial a Aline e Ana Kátia, que em todos esses anos sempre estiveram ao meu lado;

Ao CNPq, pelo apoio financeiro;

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade Federal de Santa Maria

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* DE LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS TROPICAIS COM FOCO NO EFEITO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E IDADE DA PLANTA.

Autora: ANA CAROLINA FLUCK

Orientador: GILBERTO VILMAR KOZLOSKI

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 24 de fevereiro de 2011.

Foi avaliado a produção de gás de leguminosas tropicais com potencial forrageiro, incluindo crotalárias (*Crotalaria juncea* e *Crotalaria spectabilis*), feijão guandu (*Cajanus cajan*), java (*Macrotyloma axillare*), mucuna preta (*Mucuna aterrina*), calopogônio (*Calopogonium mucunoides.*), estilosantes Campo Grande (*Stylosantis sp.*) e feijão de porco (*Canavalia ensiformis*) cortadas de plantas com diferentes idades de crescimento (47, 68, 89 e 110 dias) e incubadas *in vitro* (aproximadamente 1 g de amostra parcialmente seca/frasco) durante até 96 horas. O grau de aderência bacteriana sobre estas amostras foi avaliado pelo teor de fósforo no resíduo após 24 horas de incubação *in vitro*. Ensaio também foram conduzidos para avaliar o efeito da adição de polietilenoglicol (PEG) e de extrato tanífero de acácia sobre a fermentação *in vitro* das leguminosas e de substratos puros (amido, celulose (Avicel) e caseinato de cálcio). O volume de gás (entre 89mL e 110mL), a taxa de fermentação (entre 2,92%/h e 3,96%/h) e o lag time (entre 0,3hs e 5,09hs), assim como o grau de aderência bacteriana (entre 0,14mg de P/g de MS residual e 1,07mg de P/g de MS residual), variaram entre as leguminosas e com a idade da planta. A taxa de degradação ($R=-0,72$ e $P<0,0001$) e o grau de aderência bacteriana ($R=-0,70$ e $P<0,0001$) foram negativamente afetados pelo teor de lignina das leguminosas tropicais. Por outro lado, o teor de taninos das leguminosas, ou a adição de extrato tanífero em amostras de substratos puros não apresentaram efeito claro sobre a fermentação *in vitro*. A adição de PEG, por sua vez, afetou significativamente todos os parâmetros da cinética de produção de gás, o que indica que o uso desta substância como agente inibidor dos taninos em ensaios *in vitro* necessita ser melhor avaliado.

Palavras-chave: aderência bacteriana, compostos fenólicos, digestibilidade *in vitro*, idade da planta e leguminosas tropicais.

ABSTRACT

Dissertation of Mastership
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

CHEMICAL AND *IN VITRO* DIGESTIBILITY OF TROPICAL FORAGE LEGUMES FOCUSING ON THE EFFECT OF PHENOLIC COMPOUNDS AND PLANT AGE.

Author: ANA CAROLINA FLUCK

Advisor: GILBERTO VILMAR KOZLOSKI

Date and Defense's Place: Santa Maria, February 24th, 2011.

It were evaluated the gas production from tropical legumes with forage potential, including sun hemp (*Crotalaria juncea*), indian rattlebox (*Crotalaria spectabilis*), pigeon pea (*Cajanus cajan*), perennial horse gram (*Macrotyloma axillare*), cowage (*Mucuna aterrina*) wild groundnut (*Calopogonium mucunoides*) stylosanthes Campo Grande (*Stylosantis* sp .) and jack-bean (*Canavalia ensiformis*), with different ages (47, 68, 89 and 110 days) and incubated *in vitro* (approximately 1 g dried matter sample / bottle) for up to 96 hours. The degree of bacterial adherence on these samples was measured by phosphorus content in the residue after 24 hours *in vitro* incubation. Assays were also conducted to evaluated the effect of adding polyethyleneglycol (PEG) and tanniferous extract of acacia on *in vitro* fermentation of legumes and pure substrates (starch, cellulose (Avicel) and calcium caseinate). The volume of gas (between 110ml and 89mL), the rate of fermentation (between 2,92% / h and 3,96% / h) and lag time (between 0.3 hours and 5.09 hours) as well as the degree of bacterial adherence (from 0,14 mg P / g residual DM and 1,07 mg P / g residual DM) varied between legumes and plant age. The degradation rate ($R=-0.72$, $P < 0.0001$) and degree of bacterial adherence ($R = -0,70$ and $P < 0.0001$) were negatively affected by the lignin content of tropical legumes. Moreover, the tannin content of legumes, or any tanniferous extract in samples of pure substrates showed no clear effect on *in vitro* fermentation. The addition of PEG, in turn, affected significantly all parameters of kinetics of gas production, which indicates that the use of this substance as a tannin inhibitor on *in vitro* assays need to be evaluated.

Keywords: bacterial adherence, phenolic compounds, *in vitro* digestibility, plant age and tropical legumes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Concentração de N-amoniaco (mg/dL) e produção de gás (mL) após 48 hs de incubação <i>in vitro</i> de amostras de Mucuna Preta e Feijão Guandu incubadas com ou sem adição de PEG. Resultados são médias de diferentes idades das duas espécies de leguminosas. Barras nas colunas indicam o desvio padrão das médias onde n = 24. Efeito de PEG sobre N-amoniaco e volume de gases = $P < 0,001$	37
Figura 2 - Volume de gás (mL) produzido por leguminosas tropicais incubadas <i>in vitro</i> durante em 96 hs. Valores são médias de todas as amostras de leguminosas. Barras sobre as colunas indicam o desvio padrão onde n = 126 por tratamento. $P = 0,0001$	40
Figura 3 - Taxa de degradação de leguminosas tropicais incubadas <i>in vitro</i> durante em 96 hs. Valores são médias de todas as amostras de leguminosas. Barras sobre as colunas indicam o desvio padrão onde n = 126 por tratamento. $P = 0,0004$	41
Figura 4 - Lag time de leguminosas tropicais incubadas <i>in vitro</i> durante em 96 hs. Valores são médias de todas as amostras de leguminosas. Barras sobre as colunas indicam o desvio padrão onde n = 126 por tratamento. $P < 0,0001$	42
Figura 5 - Concentração do volume de gás (mL) produzido em 48 hs de incubação <i>in vitro</i> de amostras de caseína incubadas com ou sem adição de PEG. Barras nas colunas indicam o desvio padrão das médias onde n = 3. Efeito de PEG sobre volume de gás = $P < 0,001$	45
Figura 6 - Concentração de N-amoniaco (mg/dL) em 48 hs de incubação <i>in vitro</i> de amostras de caseína incubadas com ou sem adição de PEG. Barras nas colunas indicam o desvio padrão das médias onde n = 3. Efeito de PEG sobre N-amoniaco e volume de gases = $P < 0,001$	46
Figura 7 - Relação entre teor de FDN e taxa de degradação <i>in vitro</i> de leguminosas forrageiras tropicais.	49
Figura 8 - Relação entre teor de FDA e volume de gás <i>in vitro</i> de leguminosas forrageiras tropicais.	50
Figura 9 - Relação entre teor de FDA e taxa de degradação <i>in vitro</i> de leguminosas forrageiras tropicais.	51
Figura 10 - Relação entre teor de N total e volume de gás <i>in vitro</i> de leguminosas forrageiras tropicais.	52
Figura 11 - Relação entre teor de N total e lag time de leguminosas forrageiras tropicais.	52
Figura 12 - Relação entre teor de LDA e taxa de degradação <i>in vitro</i> de leguminosas forrageiras tropicais.	53

Figura 13 - Relação entre teor de LDA e aderência bacteriana de leguminosas forrageiras tropicais.	53
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teor de matéria orgânica (% na matéria seca) de leguminosas tropicais cortadas com diferentes idades de crescimento.	29
Tabela 2 - Teor de fibra em detergente neutro (% na matéria seca) de leguminosas tropicais cortadas com diferentes idades de crescimento.	30
Tabela 3 - Teor de fibra em detergente ácido (% na matéria seca) de leguminosas tropicais cortadas com diferentes idades de crescimento.	30
Tabela 4 - Teor de lignina em detergente ácido (% na matéria seca) de leguminosas tropicais cortadas com diferentes idades de crescimento.	31
Tabela 5 - Teor de Nitrogênio total (% na matéria seca) de leguminosas tropicais cortadas com diferentes idades de crescimento.	31
Tabela 6 - Teor de nitrogênio insolúvel em detergente neutro (% no Ntotal) de leguminosas tropicais cortadas com diferentes idades de crescimento.	32
Tabela 7 - Teor de nitrogênio insolúvel em detergente ácido (% no N total) de leguminosas tropicais† cortadas com diferentes idades de crescimento.	32
Tabela 8 - Teor de nitrogênio solúvel (% no N total) de leguminosas tropicais cortadas com diferentes idades de crescimento.	33
Tabela 9 - Teor de fenóis totais (g/kg de MS) leguminosas tropicais cortadas com diferentes idades de crescimento.	33
Tabela 10 - Teor de taninos totais (g/kg de MS) leguminosas tropicais cortadas com diferentes idades de crescimento.	34
Tabela 11 - Teor de taninos condensados (g/kg de MS) leguminosas tropicais cortadas com diferentes idades de crescimento.	34
Tabela 12 - Teor de compostos fenólicos† (g/kg de MS) de diferentes partes de leguminosas tropicais cortadas com 94 dias de crescimento.	35
Tabela 13 - Produção de gás (mL) de leguminosas tropicais† cortadas com diferentes idades de crescimento e incubadas <i>in vitro</i> durante 48 horas.	36
Tabela 14 – Concentração de N-amoniaco (mg/dl) no fluído após 48 horas de incubação <i>in vitro</i> de amostras de leguminosas tropicais† cortadas com diferentes idades de crescimento.	36
Tabela 15 - Produção de gás (mL) de leguminosas tropicais† cortadas com diferentes idades de crescimento e incubadas <i>in vitro</i> durante 96 horas.	38

Tabela 16 - Taxa de degradação de leguminosas tropicais† cortadas com diferentes idades de crescimento e incubadas <i>in vitro</i> durante 96 horas.....	38
Tabela 17 - Lag time de leguminosas tropicais† cortadas com diferentes idades de crescimento e incubadas <i>in vitro</i> durante 96 horas.....	39
Tabela 18 – Parâmetros da cinética de degradação <i>in vitro</i> gases da amostra de celulose incubada pura ou com adição de PEG e níveis de extrato tanífero de acácia.....	43
Tabela 19 – Parâmetros da cinética de degradação <i>in vitro</i> gases da amostra de amido incubada pura ou com adição de PEG e níveis de extrato tanífero de acácia.....	44
Tabela 20 - Parâmetros da cinética de degradação <i>in vitro</i> gases da amostra de caseinato de cálcio incubada pura ou com adição de PEG e níveis de extrato tanífero de acácia.	44
Tabela 21 - Aderência bacteriana ruminal (mg de P/g de matéria seca residual) de leguminosas tropicais† incubadas 24 hs <i>in vitro</i>	47
Tabela 22 - Presença de PEG sobre a aderência bacteriana ruminal (mg de P/g de matéria seca residual) de leguminosas tropicais† incubadas 24 hs <i>in vitro</i>	47
Tabela 23 - Correlações entre a composição química de leguminosas tropicais forrageiras, parâmetros da cinética de fermentação ruminal e aderência bacteriana.....	48

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A - Composição da solução tamponante ¹	68
---	----

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A - Aderência microbiana (mg de P/g de MS residual) em amostras de espécies leguminosas tropicais, cortadas em diferentes idades de rebrota, incubadas <i>in vitro</i> com ou sem a presença de polietilenoglicol (PEG).....	70
APÊNDICE B - Volume de gás (ml), taxa de degradação (%/h) e lag time (h), em amostras de espécies leguminosas tropicais, cortadas em diferentes idades de rebrota, incubadas <i>in vitro</i> /gases com ou sem a presença de polietilenoglicol (PEG).....	75

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 HIPÓTESES	16
3 OBJETIVOS	17
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
4.1 Leguminosas tropicais	17
4.2 Taninos.....	18
4.3 Efeito da idade da planta sobre o valor nutricional das forrageiras	20
4.4 Aderência bacteriana e fermentação ruminal.....	21
5 MATERIAL E METODOLOGIA	23
5.1 Local e período	23
5.2 Material experimental e análises químicas	23
5.3 Digestibilidade <i>in vitro</i> /gases	25
5.3.1 Amostras de leguminosas tropicais	25
5.3.2 Amostras de substratos puros	26
5.4 Aderência bacteriana sobre amostras de leguminosas tropicais	27
5.5 Análise estatística	28
6 RESULTADOS	29
6.1 Caracterização química de leguminosas forrageiras tropicais.	29
6.2 Digestibilidade <i>in vitro</i> /gases.....	35
6.2.1 Amostras de leguminosas tropicais	35
6.2.2 Amostras de substratos puros	43
6.3 Aderência bacteriana sobre as amostras de leguminosas tropicais.....	46
6.4 Correlações entre a composição química de leguminosas forrageiras tropicais e parâmetros da cinética de fermentação ruminal.....	48
7 DISCUSSÃO	54
7.1 Composição química de leguminosas tropicais forrageiras.....	54
7.2 Degradabilidade e aderência bacteriana <i>in vitro</i>	55
7.3 Efeito do extrato tanífero e do PEG sobre a digestibilidade <i>in vitro</i>	57
8 CONCLUSÕES	59
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
10 ANEXOS	67
11 APÊNDICES	69

1 INTRODUÇÃO

A atividade pecuária brasileira é desenvolvida majoritariamente em sistemas extensivos de produção, com base no uso de gramíneas tropicais sob pastejo. A produtividade destes sistemas tem sido limitada tanto por deficiências de manejo que restringem a oferta e o consumo de forragem pelos animais, bem como pela baixa qualidade das espécies forrageiras normalmente presentes naquelas condições. Por outro lado, já há vários anos, esforços de pesquisa vêm sendo feitos no sentido de melhorar a produtividade destes sistemas pela introdução de leguminosas tropicais (BARCELLOS & VILELA, 1994).

As leguminosas tropicais diferem de outras espécies forrageiras em relação à composição químico-bromatológica, digestibilidade e presença de compostos antinutricionais, como lignina e taninos. Comparado às gramíneas, têm maiores teores de proteína bruta e de lignina, menores teores de parede celular, e um declínio da qualidade menos acentuado com a maturidade, do ponto de vista bromatológico (VAN SOEST, 1994). As leguminosas tropicais caracterizam-se também por apresentarem teores variáveis, mas muitas vezes significativos, de taninos. O conteúdo de taninos nas plantas depende do solo, clima, espécie, idade e parte da planta. Estes compostos podem interferir negativamente no consumo voluntário dos animais e indiretamente na fermentação ruminal, pela formação de complexos com as proteínas e fibras, ou diretamente, pela ligação com enzimas digestivas, inibindo sua ação catalítica (GODOY, 2001). Por outro lado, os taninos também podem ter efeitos positivos quando associados às dietas com altos teores de proteína degradável, reduzindo o risco de incidência de timpanismo e diminuindo as perdas de nitrogênio na forma de amônia (REED, 1995).

No entanto, a variabilidade do teor de tanino entre as espécies leguminosas a diferentes idades de rebrota e/ou em diferentes partes da planta ainda não são claramente conhecidos. Também ainda não está elucidado de que maneira e em que grau o teor de tanino afeta a atividade microbiana ruminal e a degradação da matéria orgânica e da proteína bruta.

2 HIPÓTESE

A taxa e a extensão da degradação das leguminosas forrageiras tropicais, assim como o grau de colonização bacteriana nas partículas de forragem, são negativamente afetadas pelo aumento da idade da planta e do teor de taninos.

3 OBJETIVOS

1. Avaliar a relação entre idade da planta e constituintes químicos das leguminosas, particularmente dos taninos, sobre variáveis da degradação *in vitro/gases* e sobre a aderência bacteriana às partículas de forragem;

2. Avaliar o efeito dos taninos sobre a digestibilidade *in vitro/gases* de amostras de substratos puros (caseína, amido e celulose).

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Leguminosas tropicais

As leguminosas são distribuídas entre as famílias Fabaceae, Mimosoideae e Caesalpinioideae. As mais importantes leguminosas tropicais no Brasil são espécies dos gêneros *Arachis*, *Aeschynomene*, *Calopogonium*, *Centrosema*, *Cratylia*, *Desmodium*, *Leucaena*, *Macroptilium*, *Neonotonia*, *Pueraria*, *Stylosanthes*, *Vigna* e *Zornia*.

Constituem uma forragem de alta qualidade e dentre as vantagens de seu uso destaca-se o aumento na produção animal, devido à melhoria nos níveis de proteína, da digestibilidade, no consumo de forragem, melhor distribuição da pastagem ao longo do ano, melhoria na fertilidade do solo (N) e conteúdos de minerais mais elevados (BARCELLOS & VILELA, 1994).

As leguminosas forrageiras, em geral, possuem alta degradabilidade e alta taxa de degradação em relação às gramíneas (BRODERICK, 1995). Também possuem teores mais elevados de proteína, cálcio e fósforo, o que lhes confere maior valor nutritivo, e assim destaca-se a importância para a condução de estudos referentes à sua utilização nos sistemas de produção, uma vez que a proteína é um dos fatores mais limitantes na alimentação dos animais. Quando incluídas leguminosas em dietas de ruminantes, foi observada uma redução da eliminação de metano por estes animais (McCAUGHEY et al. 1999).

As leguminosas diferem entre si em relação às taxas de fermentação ruminal (OSUJI & ODENYO, 1997) e em relação à digestibilidade intestinal da proteína não degradada no rúmen. É uma importante fonte forrageira para os ruminantes, com elevado teor de proteína bruta, no entanto, essa fração pode estar parcialmente indisponível aos microorganismos ruminais devido à presença de elevados teores de taninos em algumas das espécies (MUPANGWA et al., 2000).

A principal expectativa do uso de leguminosas em pastagens é a melhoria da produção animal em relação à pastagem de gramínea exclusiva com redução dos custos de produção, quando comparados com estas mesmas pastagens submetidas à adubação com nitrogênio mineral. Na Grécia antiga já eram conhecidas as vantagens das leguminosas em aumentar o rendimento agrícola de espécies forrageiras não leguminosas (TISDALE et al., 1993).

Este benefício é reportado como sendo efeito da participação direta da leguminosa melhorando e diversificando a dieta do animal e também do aumento da disponibilidade de forragem pelo aporte de nitrogênio ao sistema, através da sua reciclagem e transferência para a gramínea acompanhante (ALMEIDA et al., 2001). Mais uma vantagem das leguminosas é uma menor variação estacional no seu valor nutritivo, quando comparadas a gramíneas forrageiras (MONTEIRO et al., 1998).

4.2 Taninos

Os taninos são compostos fenólicos provenientes do metabolismo secundário das plantas (BUTLER et al, 1984), mas que podem exercer grande influência no valor nutritivo das forragens. Ocorrem em uma ampla variedade de plantas, sendo considerado como um dos meios de defesa da planta contra fungos patogênicos, bactérias, vírus e contra o ataque de insetos e herbívoros. (TAKECHI, et al., 1985).

São encontrados principalmente nos vacúolos das plantas, não interferindo no metabolismo destas. Também podem ser definidos como polímeros fenólicos, solúveis em água, que precipitam proteínas (HASLAM 1989). São considerados inibidores de enzimas em função de sua complexação com proteínas enzimáticas (DESHPANDE, 1986) formando complexos com estas, podendo interagir também com outras macromoléculas, como carboidratos, membrana celular das bactérias e íons metálicos (LEINMÜLLER & KARLHEIZ, 1991).

A complexação dos taninos com as proteínas é a base principal do efeito biológico, sendo esta complexação dependente do pH e reversível, envolvendo ligações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio (HASLAM, 1996).

Podem ser classificados em dois grupos (REED, 1995): taninos hidrolisáveis e taninos condensados. O primeiro grupo, ao sofrer hidrólise em condição ácida ou básica, produz carboidratos e ácidos fenólicos. O tanino hidrolisado ocorre principalmente em cascas de frutas ou galhos, sendo raramente encontrado em plantas forrageiras (MIN et al.2003) e, ao contrário do tanino condensado, seus produtos de degradação podem ser absorvidos no intestino delgado dos animais (REED, 1995), podendo ser tóxicos, especialmente se ingeridos

em grande quantidade sem que haja tempo suficiente para a adaptação da flora microbiana. (WAGHORN 2008).

Os taninos condensados são resistentes a hidrólise. São oligômeros dos grupos flavan-3-ols ou flavan 3,4-diols (SALUNKHE et. al, 1990). Estes oligômeros e polímeros de flavonóides estão ligados por pontes carbono-carbono (HAGERMAN & BUTLER, 1991). É a forma mais comum de tanino encontrada, estando presentes no vacúolo celular de leguminosas forrageiras, árvores e arbustos. (MIN et al. 2003).

Na nutrição animal, os taninos podem ser benéficos ou ter efeitos adversos dependendo a quantidade que é consumida, os componentes de sua estrutura e seu peso molecular, e a fisiologia da espécie consumida (HAGERMAN & BUTLER, 1991). Como efeito positivo, quando associados a dietas com altos teores de proteína degradável, este reduz o risco de incidência de timpanismo, diminuindo assim, as perdas de nitrogênio na forma de amônia (REED, 1995).

Entre os efeitos adversos, destaca-se a redução no consumo, efeito da baixa palatabilidade causada pela adstringência (ocasionada pela formação de complexos entre os taninos e glicoproteínas salivares) que os taninos causam nos animais (CANNAS, 1999), podendo aumentar a salivação e diminuir a aceitabilidade do alimento. Também a redução na digestibilidade, inibição de enzimas digestivas, decréscimo na utilização de nutrientes pelo organismo, em particular da proteína, perda de proteínas endógenas, redução no crescimento e toxicidade causada pelos produtos dos taninos hidrolisáveis ao serem absorvidos pelo organismo animal (MAKKAR, 2003).

Devido à complexa estrutura dos taninos, vários métodos têm sido desenvolvidos para realizar sua determinação. Nenhum deles é completamente satisfatório, entretanto as determinações mais citadas na literatura são aquelas baseadas em métodos colorimétricos, onde há combinação dos taninos com íons metálicos, ou com outras substâncias (LEINMÜLLER & KARL-HEIZ, 1991).

Um fator de alta relevância na determinação destes compostos é a preparação das amostras, tendo uma grande influência na determinação de taninos e na relação com os polifenóis das plantas (REED, 1995). A extração dos taninos dos tecidos vegetais é difícil, pois eles podem estar ligados a carboidrato, proteína, parede celular ou são insolúveis (SALUNKHE et. al, 1990). Reed (1995) ainda cita que a temperatura de secagem adequada deve ser maior que 40°C evitando oxidação pela paralização enzimática, e menor que 60°C,

para não haver perdas com a polimerização. A capacidade de reação com carboidratos, membranas e íons metálicos também podem agravar os problemas metodológicos.

4.3 Efeito da idade da planta sobre o valor nutricional das forrageiras

Vários fatores afetam o valor nutricional de forrageiras. Com o avanço da maturidade fisiológica, as forrageiras acumulam maior quantidade de matéria seca, ganhando altura pelo alongamento do caule e folhas. Além disso, outras alterações, como a modificação na relação folha:colmo e a de material verde:morto, são observadas. Nos tecidos, observa-se a redução do lume das células e espessamento da parede celular, com a conseqüente ampliação da área ocupada pelo tecido vascular lignificado (WILSON, 1993; ALVES DE BRITO, 1997). Já o incremento na deposição de lignina e a redução no teor de proteína bruta parecem ser as principais alterações químicas observadas na composição da matéria seca.

De acordo com Norton (1991), com o avanço da idade fisiológica das plantas, ocorre substituição do conteúdo celular por parede celular, assim como transformação da parede, devido ao surgimento da parede secundária, havendo maior participação de celulose e lignina. Além disso, inicia-se o processo de senescência, que acelera ainda mais o aumento do teor de fibra.

Minson (1990), cita que há redução nos teores de proteína bruta das forrageiras durante o processo de envelhecimento, pois este promove aumento da proporção de talos e dos teores de fibra e redução da proporção de folhas.

Compostos fenólicos diminuem a qualidade nutricional das forrageiras, formando agregados altamente condensados, ou ainda se associar a carboidratos (SARKANEN & LUDWIG, 1971; JUNG, 1989). Admite-se que, nas plantas imaturas, o menor grau de condensação de compostos fenólicos compromete menos a digestão dos tecidos. Entretanto, a maturação fisiológica do vegetal possibilita a formação de complexos de elevado peso molecular, os quais envolvem a hemicelulose e a celulose. Sua associação com a hemicelulose impede a ação das enzimas que atuam na degradação do carboidratos, já que dificulta tanto o acesso quanto o adequado acoplamento ao substrato (carboidrato) (AKIN, 1982; CHESSON et al., 1982; VAREL & JUNG, 1986; AKIN et al., 1988).

Fick et al. 1994 observou em um estudo meta-analítico que a digestibilidade e a composição química da alfafa, em vez de modificar-se linearmente, varia quadraticamente com a idade de rebrota da planta. Não está estabelecido, contudo, se isto ocorre também com outras leguminosas, particularmente as tropicais.

4.4 Aderência bacteriana e fermentação ruminal

Os alimentos ingeridos pelo animal chegam ao rúmen como estruturas moleculares complexas e de alto peso molecular, indisponíveis às células bacterianas ruminais. A aderência bacteriana é o início da degradação destas macromoléculas, sendo necessária para atender as necessidades nutricionais bacterianas, degradando extracelularmente até porções monoméricas, passíveis de entrarem na célula e serem metabolizadas (WHITERS, 1992).

O processo de aderência e colonização bacteriana é afetado por fatores relacionados às bactérias, ao substrato e ao ambiente ruminal (KOZLOSKI, 2009). No substrato de leguminosas ricas em taninos, há uma barreira impedindo a aderência e a ação hidrolítica das bactérias ruminais.

Esta barreira deve-se a habilidade dos taninos de se complexar fortemente com proteínas, sendo este o aspecto mais importante dos seus efeitos nutricionais (HAGERMAN & BUTLER, 1981). Esta complexação pode prejudicar na digestão das frações fibrosas, podendo reduzir a digestibilidade da parede celular quando se liga a enzimas bacterianas e formam complexos indigestíveis com a parede celular de carboidratos (BARRY et al., 1986), prejudicando a ação dos microorganismos ruminais ao substrato.

A degradação da proteína dos alimentos no rúmen tem grande importância no suprimento de aminoácidos para os animais ruminantes, e ocorre através da ação de enzimas (proteases, peptidases e deaminases) secretadas pelos microorganismos ruminais. A proteína degradada no rúmen (PDR) fornece peptídeos, aminoácidos livres e amônia para o crescimento microbiano, sendo a principal fonte de aminoácidos que chegam ao intestino delgado, representando 45 a 55% da proteína metabolizável. A proteína não degradada no rúmen (PNDR) pode significar uma segunda fonte de aminoácidos disponíveis ao animal.

O conhecimento sobre a degradação da proteína dos alimentos é fundamental para que se chegue a níveis ideais de PDR, o que otimizará o crescimento microbiano e levaria a

encontrar quantidades de PNDR que complementar as exigências nutricionais dos ruminantes (NRC, 2001).

Vários são os fatores que afetam a degradabilidade protéica ruminal, tais como a composição química e física da proteína bruta, a atividade proteolítica microbiana, o acesso microbiano à proteína, o tempo de retenção do alimento no rúmen, o pH ruminal, o processamento do alimento, a temperatura ambiente e a presença de compostos secundários no alimento, como os taninos.

O grau de aderência, e os fatores que o afetam, sobre leguminosas tropicais não foi ainda estudado.

5 MATERIAL E METODOLOGIA

5.1 Local e período

Os ensaios *in vitro* e as análises de laboratório foram realizadas nas instalações do Laboratório de Bromatologia e Nutrição de Ruminantes pertencente ao Departamento de Zootecnia, da Universidade Federal de Santa Maria, no período de 2009 à 2010.

5.2 Material experimental e análises químicas

Foram avaliadas amostras de leguminosas tropicais com potencial forrageiro que inclui crotalárias (*Crotalaria juncea* e *Crotalaria spectabilis*), feijão guandu (*Cajanus cajan*), java (*Macrotyloma axillare*), mucuna preta (*Mucuna aterrina*), calopogônio (*Calopogonium mucunoides.*), estilosantes Campo Grande (*Stylosantis sp.*) e feijão de porco (*Canavalia ensiformis*). As amostras foram obtidas de coleções implantadas na UFSM na segunda quinzena do mês de outubro de 2007, onde foram realizados cortes após 46, 68, 89 e 110 dias de crescimento das plantas. Em função de ter um ciclo relativamente mais tardio de crescimento foram obtidas amostras de estilosantes Campo Grande somente a partir de 68 dias. Em situação oposta, foram obtidas amostras de feijão de porco somente até os 68 dias. Após realizados os cortes, essas amostras foram separadas em dois grupos, sendo um seco em estufa à 50°C (para análise dos taninos) e outro seco em estufa a 55°C (utilizadas nas demais análises), moídas (0,5 mm para taninos e 1 mm para as demais análises) e armazenadas para posterior incubação *in vitro* e/ou análise bromatológica.

Foram determinados os teores de matéria seca (MS) por secagem em estufa a 105°C durante 8 horas e cinzas por queima em mufla a 600°C durante 3 horas. O teor de matéria orgânica (MO) foi calculado como MS – cinzas. O teor de nitrogênio total (N) foi determinado pelo método de Kjeldahl (método 984.13, AOAC, 1995), modificado por usar uma solução de ácido bórico 4% (p/v) como receptor da amônia livre durante a destilação,

uma solução de 0,2% (p/v) de verde de bromocresol e 0,1% (p/v) de vermelho de metila como indicador, e uma solução padrão de ácido sulfúrico para titulação.

Os teores de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), lignina em detergente ácido (LDA) foram determinados utilizando autoclave conforme Senger et. al (2008). Os teores de nitrogênio solúvel em detergente neutro (NIDN), nitrogênio não protéico e nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) foram determinados de acordo com Licitra et al. (1996). Os teores de extrato etéreo (EE) das amostras foram obtidos por extração com éter etílico em um sistema de refluxo a 180°C durante 2 horas (Soxtherm, Gerhardt).

As determinações de compostos fenólicos foram feitas conforme descrito por Makkar (2000). Para extração dos taninos, foram pesadas aproximadamente 200 mg de amostra parcialmente seca e moída (peneira de 0,5 mm de porosidade) em tubos de centrífuga de 15 mL, e adicionado 5 mL de uma solução de éter etílico contendo 1% de ácido acético, agitado vigorosamente, centrifugado por 5 minutos a 4000 x g sendo o sobrenadante descartado. Este procedimento teve o objetivo de eliminar pigmentos que poderiam interferir nas análises de colorimetria. O resíduo foi então tratado com 10 mL de uma solução de acetona a 70% (v/v), submetido a tratamento com ultrassom por 20 minutos e centrifugado por 10 minutos a 5000 x g. O sobrenadante foi recolhido para um balão volumétrico de 25 mL. Este tratamento com acetona foi repetido duas vezes, acumulando-se o sobrenadante no mesmo balão de 25 mL. O volume do balão foi então completado com a solução de acetona a 70%.

Para análise dos fenóis totais, 50 µl do sobrenadante foi misturado em um tubo de ensaio com 450 µl de água, 250 µl do reagente Folin Ciocalteu 1 N e 1,25 mL de solução de carbonato de sódio 7,4% (p/v). A mistura foi agitada e, após 40 minutos em temperatura ambiente, foi feita a leitura da absorbância em 725 nm contra um branco que inclui água destilada em vez de amostra. O teor de fenóis totais foi calculado como equivalente de ácido tânico, o qual foi utilizado para obtenção da curva de calibração. Para determinação dos taninos totais foram pesadas em um tubo de ensaio 100 mg de polivinilpirrolidona (PVPP), adicionando 1 mL do sobrenadante e 1 mL de água destilada. Esta mistura foi imediatamente centrifugada a 5000 x g por 15 minutos e coletado o sobrenadante. O PVPP foi usado com o propósito de precipitar os taninos. O teor de fenóis deste sobrenadante foi determinado como descrito acima. O teor de taninos totais foi calculado como a diferença entre o teor de fenóis totais sem e com a presença de PVPP.

Para análise do teor de taninos condensados foi adicionado, em tubos de ensaio com tampa de rosca, 500 µl do sobrenadante da extração da amostra com acetona, 3 mL do reagente butanol-HCL (95% de butanol e 5% de HCl (v/v)) e 250 µl de reagente férrico (2 % de sulfato de ferro e amônio em solução de HCl 0,2N (p/v)). Em seguida os tubos foram colocados em banho-maria a 90°C por 40 minutos. Após este período, foram resfriados em água gelada e lido a absorbância em 550 nm contra um branco contendo, em vez de amostra, solução de acetona a 70%. O teor de taninos condensados foi calculado com base em uma equação pré-definida por Makkar (2000), onde: Taninos condensados (% na MS) = (absorbância × 78,26 × fator de diluição)/% de MS na amostra.

5.3 Digestibilidade *in vitro*/gases

5.3.1 Amostras de leguminosas tropicais

Amostras de planta total das leguminosas crotalaria spectabilis, feijão guandu, java, mucuna preta, estilosantes Campo Grande e feijão de porco foram submetidas à três ensaios de digestão *in vitro*/gases (MAURÍCIO et al., 1999). Em cada ensaio foi pesada, em duplicata, aproximadamente 1 g de cada amostra em frascos de vidro com capacidade para 160 ml e incubada com 100 mL de fluído ruminal tamponado (THEODOROU et al., 1994). Para avaliar o efeito da presença dos taninos, as amostras também foram incubadas em duplicatas com a adição de duas gramas de polietilenoglicol (PEG), um polímero sintético capaz de formar complexos com os taninos (NOZELLA, 2001). Foi utilizado uma relação tampão/fluído ruminal de 8:2 e a solução tampão foi preparada de modo a ter uma concentração de N de 8 mg/dL (HÄRTER, 2009). O líquido ruminal foi obtido de um bovino fistulado no rúmen, alimentado com pastagem de azevém (*Lolium multiflorum*) à vontade. Após a coleta, o líquido foi filtrado através de duas camadas de gaze e mantido em banho-maria a 39°C, sob injeção contínua de CO₂, até a incubação. Os frascos foram vedados e incubados a 39°C em estufa de ar forçado. A pressão originada na parte superior dos frascos foi medida nos tempos 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48, 72 e 96 horas após a incubação, utilizando um transdutor de pressão conectado a uma válvula de três saídas. A primeira saída

foi conectada a uma agulha (0,6 mm), a qual foi inserida na tampa de borracha, a segunda ao transdutor de pressão e a terceira permanecia livre sendo utilizada para retirada dos gases do interior dos frascos a cada leitura, até pressão nula. Os valores de pressão foram convertidos em volume de gás utilizando equação previamente determinada (SENGER, 2005):

$$y = - 0,0593x^2 + 5,01x - 0,4694.$$

A produção de gás em cada tempo foi corrigida para a produção de gás média obtida de frascos contendo fluido ruminal tamponado sem amostra (brancos). As curvas de produção de gás ao longo do tempo de incubação foram ajustadas ao modelo logístico unicompartimental de Schoefield, et. al (1994) para estimativa dos parâmetros da cinética de degradação da matéria orgânica (i.e., tempo de colonização (lag time), taxa de produção de gás e volume total de gás).

Nos horários 0, 12, 24, 36, 48 horas foi retirada uma alíquota de 500 µl do meio de incubação com auxílio de uma seringa, a qual foi misturada com 4,5 mL de H₂SO₄ 2% (v/v) e mantida em congelador para posterior análise. Neste fluido acidificado foi determinado a concentração de amônia por colorimetria (WEATHERBURN, 1967).

5.3.2 Amostras de substratos puros

Foi conduzido um ensaio de digestibilidade *in vitro*/gases para avaliar o efeito da adição de taninos sobre a degradação de substratos puros e também avaliar se o polímero sintético PEG estaria interferindo no meio de incubação. Para isso, foi pesado aproximadamente 1 g de celulose, amido ou caseinato de cálcio, em triplicata, em frascos de vidro com capacidade para 160 ml, com ou sem a adição de 0, 2, 4 ou 6% de extrato tanífero de acácia negra (*Acacia mearnsii*), e com ou sem a adição 2 g de PEG, os quais foram incubados utilizando os mesmos procedimentos descritos anteriormente para as amostras de leguminosas tropicais, utilizando um arranjo fatorial 3x2. Nos frascos contendo caseinato de cálcio foi coletado 1 ml do meio de incubação nos horários 0, 12, 24, 36, e 48 hs de

incubação, misturado com 4 ml de H₂SO₄ a 2%, e analisado o teor de amônia como descrito previamente.

5.4 Aderência bacteriana sobre amostras de leguminosas tropicais

Foram conduzidos três ensaios de digestibilidade *in vitro* convencional, utilizando-se método adaptado de GOERING e VAN SOEST (1970). Em cada ensaio aproximadamente 1 g de cada amostra previamente seca e moída (peneira com porosidade de 1 mm) foi pesada em saquinho de poliéster (tamanho 5 x 5, porosidade de 50 µ) e incubada durante 24 horas em frascos de vidro com capacidade para 2 L, equipados com válvula de Bunsen e mantidos em banho-maria a 39°C em um sistema de agitação lenta. O meio de incubação e os procedimentos de coleta e processamento do fluído ruminal foram os mesmos descritos anteriormente. Em cada frasco foi adicionado 1 L de meio de incubação e dez saquinhos (i.e. equivalente a 1 g de amostra/ 100 mL do meio de incubação). Cada amostra foi incubada em duplicata em dois frascos, sendo um sem PEG e outro contendo 20 g de PEG. Após 24 horas de incubação os saquinhos foram lavados com água corrente e, posteriormente, mantidos em solução fisiológica durante 5 minutos e lavados novamente em água destilada. Em dois ensaios os saquinhos contendo material residual foram colocados diretamente em estufa com ventilação forçada à 55°C durante três dias. No terceiro ensaio, após a incubação os saquinhos foram tratados com solução em detergente neutro a 110°C, durante 40 minutos em autoclave (SENGER et al, 2008), lavados em água corrente e secos em estufa com ventilação forçada à 55°C durante três dias. Após a secagem, foi pesado aproximadamente 200 mg do material residual em um béquer com capacidade de 20 mL e queimado em mufla à 600° C por três horas. Após, foi adicionado 10 mL de uma solução ácida contendo três partes de HCl 10% (p/v) e uma parte de HNO₃ 10% (p/v), colocado em uma chapa de aquecimento coberto por esfera de vidro e deixado em fervura durante até 60 minutos. A seguir, foi retirado a esfera de vidro, deixado evaporar o conteúdo do béquer até restar um volume residual de aproximadamente 2 mL. Este conteúdo foi transferido, lavando-se com água destilada, para um balão volumétrico de 25 ml e completado o volume com água destilada. Esta solução foi então filtrada em papel de filtração rápida para posterior determinação colorimétrica de fósforo. Para tal, foi pipetado em um tubo de ensaio, 1000 µl do filtrado, 1000 µl de uma

solução complexante (0,38% molibdato de amônio (p/v), 7,1% HCl (v/v) e 0,5% ácido bórico (v/v)), 100 µl de solução redutora (0,05% ácido aminonaftolsulfônico (p/v), 0,1% sulfito de sódio (p/v) e 2,92% metabissulfito de sódio (p/v)). Este meio de reação foi mantido durante 20 minutos em temperatura ambiente e a absorbância em 660 nm foi lida contra um branco que incluiu água destilada em vez do filtrado. A curva padrão foi feita com uma solução de fosfato monobásico de potássio contendo 22,8 % de P (p/v). A aderência bacteriana foi expressa como mg de P/g de MS residual, utilizando-se os resultados do terceiro ensaio para corrigir os resultados dos dois primeiros ensaios para o teor de P residual da amostra. Nesse caso, foi assumido que o material solúvel em detergente neutro era de origem bacteriana e, o insolúvel, originário da planta.

5.5 Análise estatística

Para análise foi utilizado a média das replicatas de cada ensaio de digestibilidade. O modelo incluiu os efeitos de amostra, idade, PEG e das interações amostra vs. idade, amostra vs. PEG e idade vs. PEG. A análise de variância dos dados do ensaio com substratos puros incluiu no modelo os efeitos de amostra, PEG, tanino e das interações amostra vs. PEG, amostra vs. tanino e tanino vs. PEG, além do erro experimental. Quando o efeito de amostra foi significativo as leguminosas tropicais foram comparadas entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Quando significativo pela análise de variância, os efeitos de idade da planta e do nível de inclusão de extrato tanífero foram analisados por regressão. O efeito dos taninos foi avaliado por comparar os resultados das variáveis de degradação *in vitro* obtidos com ou sem a inclusão de PEG pelo teste t para dados pareados. Estas análises foram realizadas utilizando o programa estatístico SAS (2001).

Foram feitas também correlações entre a composição química das leguminosas e os parâmetros da cinética de degradação e aderência. Quando a correlação foi significativa ($P < 0,05$) e acima de 0,50, as variáveis foram analisadas por regressão linear e não linear, utilizando o programa Excel.

6 RESULTADOS

6.1 Caracterização química de leguminosas forrageiras tropicais.

A caracterização da composição química das diferentes leguminosas tropicais são apresentados nas tabela 1 (MO) ,2 (FDN), 3 (FDA), 4 (LDA), 5 (N total), 6 (NIDN), 7 (NIDA), 8 (N solúvel), 9 (fenóis totais), 10 (taninos totais), 11 (taninos condensados) e 12 (teor de compostos fenólicos em diferentes partes da planta).

Tabela 1 – Teor de matéria orgânica (% na matéria seca) de leguminosas tropicais cortadas com diferentes idades de crescimento.

Leguminosa	Idade			
	47	68	89	110
Calopogônio	89,5	92,5	94,0	94,2
Crotalaria Juncea	91,0	91,7	92,8	94,5
Crotalaria Spectabilis	89,0	92,3	92,1	94,0
Estilosantes CG	-	90,5	90,6	92,7
Feijão Guandu	92,2	94,4	95,7	96,0
Feijão de Porco	90,1	91,3	-	-
Java	90,5	93,5	95,0	94,2
Mucuna Preta	90,3	92,9	93,3	94,0

Tabela 2 - Teor de fibra em detergente neutro (% na matéria seca) de leguminosas tropicais cortadas com diferentes idades de crescimento.

Leguminosa	Idade			
	47	68	89	110
Calopogônio	40,7	39,2	45,0	42,7
Crotalaria Juncea	37,4	46,4	41,7	49,9
Crotalaria Spectabilis	36,7	41,4	37,0	47,4
Estilosantes CG	-	43,0	41,0	47,7
Feijão Guandu	45,4	44,9	41,7	51,3
Feijão de Porco	40,0	38,5	-	-
Java	38,7	39,4	39,5	40,3
Mucuna Preta	42,7	43,0	44,4	48,0

Tabela 3 - Teor de fibra em detergente ácido (% na matéria seca) de leguminosas tropicais cortadas com diferentes idades de crescimento.

Leguminosa	Idade			
	47	68	89	110
Calopogônio	24,0	29,7	30,2	22,7
Crotalaria Juncea	23,2	32,0	26,3	28,7
Crotalaria Spectabilis	20,3	27,2	23,0	27,3
Estilosantes CG	-	23,9	22,8	27,2
Feijão Guandu	30,7	29,0	31,2	30,4
Feijão de Porco	23,5	22,7	-	-
Java	25,9	23,9	24,2	22,5
Mucuna Preta	27,0	25,0	26,3	28,2

Tabela 4 - Teor de lignina em detergente ácido (% na matéria seca) de leguminosas tropicais cortadas com diferentes idades de crescimento.

Leguminosa	Idade			
	47	68	89	110
Calopogônio	4,92	7,52	7,38	8,33
Crotalaria Juncea	4,71	6,74	6,74	7,51
Crotalaria Spectabilis	3,48	4,93	4,85	7,11
Estilosantes CG	-	7,75	7,77	8,79
Feijão Guandu	8,78	10,31	11,86	11,78
Feijão de Porco	5,40	4,89	-	-
Java	7,27	6,47	6,49	7,65
Mucuna Preta	8,70	6,32	7,69	8,81

Tabela 5 - Teor de Nitrogênio total (% na matéria seca) de leguminosas tropicais cortadas com diferentes idades de crescimento.

Leguminosa	Idade			
	47	68	89	110
Calopogônio	3,84	2,65	2,47	2,22
Crotalaria Juncea	3,75	2,56	2,76	2,39
Crotalaria Spectabilis	3,63	2,46	2,58	1,73
Estilosantes CG	-	2,41	1,42	1,14
Feijão Guandu	3,29	2,78	2,42	1,98
Feijão de Porco	3,51	2,90	-	-
Java	2,77	2,34	1,99	2,05
Mucuna Preta	4,01	3,65	3,56	2,89

Tabela 6 - Teor de nitrogênio insolúvel em detergente neutro (% no Ntotal) de leguminosas tropicais cortadas com diferentes idades de crescimento.

Leguminosa	Idade			
	47	68	89	110
Calopogônio	13,9	21,7	11,9	15,6
Crotalaria Juncea	9,58	7,41	15,7	6,70
Crotalaria Spectabilis	25,1	43,4	35,7	29,2
Estilosantes CG	-	20,5	22,9	20,2
Feijão Guandu	14,4	12,6	17,3	20,2
Feijão de Porco	9,82	9,13	-	-
Java	15,7	13,5	26,6	28,5
Mucuna Preta	24,2	19,6	26,5	38,2

Tabela 7 - Teor de nitrogênio insolúvel em detergente ácido (% no N total) de leguminosas tropicais† cortadas com diferentes idades de crescimento.

Leguminosa	Idade			
	47	68	89	110
Calopogônio	8,82	10,6	6,06	5,40
Crotalaria Juncea	4,53	4,90	6,51	5,23
Crotalaria Spectabilis	8,00	7,50	8,12	7,80
Estilosantes CG	-	10,2	7,80	10,1
Feijão Guandu	9,00	8,10	12,1	8,10
Feijão de Porco	6,00	4,50	-	-
Java	8,70	6,20	8,26	7,32
Mucuna Preta	8,72	10,8	7,60	10,7

Tabela 8 - Teor de nitrogênio solúvel (% no N total) de leguminosas tropicais cortadas com diferentes idades de crescimento.

Leguminosa	Idade			
	47	68	89	110
Calopogônio	58,1	61,9	68,7	96,8
Crotalaria Juncea	66,9	63,7	68,9	77,2
Crotalaria Spectabilis	62,5	57,6	59,1	60,7
Estilosantes CG	-	66,4	64,0	-
Feijão Guandu	54,3	57,4	54,2	50,0
Feijão de Porco	55,0	54,7	-	-
Java	55,2	59,6	61,4	63,0
Mucuna Preta	58,9	57,7	69,9	22,7

Tabela 9 - Teor de fenóis totais (g/kg de MS) leguminosas tropicais cortadas com diferentes idades de crescimento.

Leguminosa	Idade			
	47	68	89	110
Calopogônio	10,8	10,5	10,9	7,10
Crotalaria Juncea	7,25	9,15	8,75	-
Crotalaria Spectabilis	17,8	11,4	10,3	12,0
Estilosantes CG	-	11,5	14,8	15,7
Feijão Guandu	10,2	10,1	11,2	10,6
Feijão de Porco	9,30	9,65	-	-
Java	9,35	10,4	7,65	7,05
Mucuna Preta	14,2	29,2	25,3	28,5

Tabela 10 - Teor de taninos totais (g/kg de MS) leguminosas tropicais cortadas com diferentes idades de crescimento.

Leguminosa	Idade			
	47	68	89	110
Calopogônio	2,61	2,20	2,67	0,21
Crotalaria Juncea	0,06	0,94	2,83	-
Crotalaria Spectabilis	5,30	2,65	1,64	1,70
Estilosantes CG	-	2,18	3,35	4,20
Feijão Guandu	2,69	2,14	2,81	3,58
Feijão de Porco	0,64	0,20	-	-
Java	0,81	1,88	0,78	0,41
Mucuna Preta	2,10	15,6	16,40	17,7

Tabela 11 - Teor de taninos condensados (g/kg de MS) leguminosas tropicais cortadas com diferentes idades de crescimento.

Leguminosa	Idade			
	47	68	89	110
Calopogônio	0,29	0,28	0,11	0,23
Crotalaria Juncea	0,20	0,15	0,29	-
Crotalaria Spectabilis	0,59	0,28	0,38	0,26
Estilosantes CG	-	0,22	0,38	0,49
Feijão Guandu	0,36	0,91	1,76	1,95
Feijão de Porco	0,36	0,31	-	-
Java	0,35	0,39	0,31	0,41
Mucuna Preta	1,13	5,83	4,84	9,42

Tabela 12 - Teor de compostos fenólicos† (g/kg de MS) de diferentes partes de leguminosas tropicais cortadas com 94 dias de crescimento.

Amostra	Parte da planta	FT	TT	TC
Feijão Guandu	Caule Base	5,00	1,60	0,40
Feijão Guandu	Folha Aérea	17,7	8,40	8,40
Feijão Guandu	Folha Base	14,8	6,80	6,70
Feijão Guandu	Pecíolo Caule Aéreo	8,88	1,40	1,30
Feijão Guandu	Pecíolo Caule Base	7,50	4,00	3,60
Crot.Juncea	Caule Aéreo	4,80	0,50	0,10
Crot.Juncea	Caule base	5,30	2,00	0,00
Crot.Juncea	Folha Aérea	19,1	5,00	0,40
Crot.Juncea	Folha Base	18,0	4,50	0,70

† FT=fenóis totais; TT=taninos totais e TC=taninos condensados.

6.2 Digestibilidade *in vitro*/gases

6.2.1 Amostras de leguminosas tropicais

Os resultados de produção de gás e concentração de N-amoniaco até 48 horas de digestão *in vitro* das diferentes leguminosas tropicais são apresentados nas tabelas 13 e 14, respectivamente.

Estes dois parâmetros não apresentaram efeito de interações, mas foram diferentes entre as leguminosas ($P < 0,05$). A produção de gás foi menor para mucuna preta e feijão guandu, enquanto que as menores concentrações de N-amoniaco foi observado nas amostras de crotalaria spectabilis, estilosantes Campo Grande e java. A idade afetou positivamente e linearmente a produção de gás da java mas não das demais amostras de leguminosas. De outra forma, exerceu efeito linear e quadrático ($P < 0,05$) sobre a concentração de amônia na amostra de crotalaria spectabilis ($P < 0,05$) mas não nas demais amostras.

Tabela 13 - Produção de gás (mL) de leguminosas tropicais[†] cortadas com diferentes idades de crescimento e incubadas *in vitro* durante 48 horas.

Leguminosa	Idade				Média	DP [‡]	Probabilidade [‡]	
	47	68	89	110			L	Q
CS	97	102	108	98	101 ^{ab}	16,7	0,6456	0,1238
ES	-	111	108	121	113 ^a	18,7	0,1973	0,2655
FG	74	87	86	78	81 ^c	17,6	0,5892	0,0486
FP	95	109	-	-	101 ^{ab}	19,6	0,1063	-
JV	96	108	118	116	109 ^a	22,0	0,0157	0,2545
MP	81	99	94	100	93 ^{bc}	21,0	0,0605	0,3522

a, b, c: médias das leguminosas na mesma coluna com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

[†]CS: *Crotalaria Spectabilis*; ES: Estilosantes Campo Grande; FG: Feijão Guandu; FP: Feijão de Porco; JV: Java e MP: Mucuna Preta;

[‡] Desvio padrão das médias onde n=8 por espécie leguminosa

[‡] Probabilidade do efeito linear (L) ou quadrático (Q) da idade da planta pela análise de regressão.

Tabela 14 – Concentração de N-amoniacal (mg/dl) no fluido após 48 horas de incubação *in vitro* de amostras de leguminosas tropicais[†] cortadas com diferentes idades de crescimento.

Leguminosa	Idade				Média	DP [‡]	Probabilidade [‡]	
	47	68	89	110			L	Q
CS	34,5	26,9	25,5	27,2	28,5 ^{bc}	7,77	0,0025	0,0458
ES	-	24,3	28,1	24,2	25,5 ^c	8,42	0,9954	0,2112
FG	36,9	32,1	33,2	30,1	33,3 ^{ab}	9,19	0,1603	0,6329
FP	37,3	34,6	-	-	35,9 ^a	10,1	0,5164	-
JV	28,8	26,4	26,7	24,3	26,5 ^c	7,76	0,1961	0,9942
MP	36,4	34,9	33,9	29,2	33,6 ^{ab}	10,3	0,0998	0,6050

Não houve diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) entre as espécies

[†]CS: *Crotalaria Spectabilis*; ES: Estilosantes Campo Grande; FG: Feijão Guandu; FP: Feijão de Porco; JV: Java e MP: Mucuna Preta;

[‡] Desvio padrão das médias onde n=8 por espécie leguminosa

[‡] Probabilidade do efeito linear (L) ou quadrático (Q) da idade da planta pela análise de regressão.

O efeito do PEG sobre produção de gás e concentração de N-amoniaco até 48 horas de incubação das várias amostras de leguminosas é apresentado na figura 1. A inclusão de PEG no meio de incubação diminuiu a concentração de amônia e aumentou a produção de gases pelas leguminosas ($P < 0,05$).

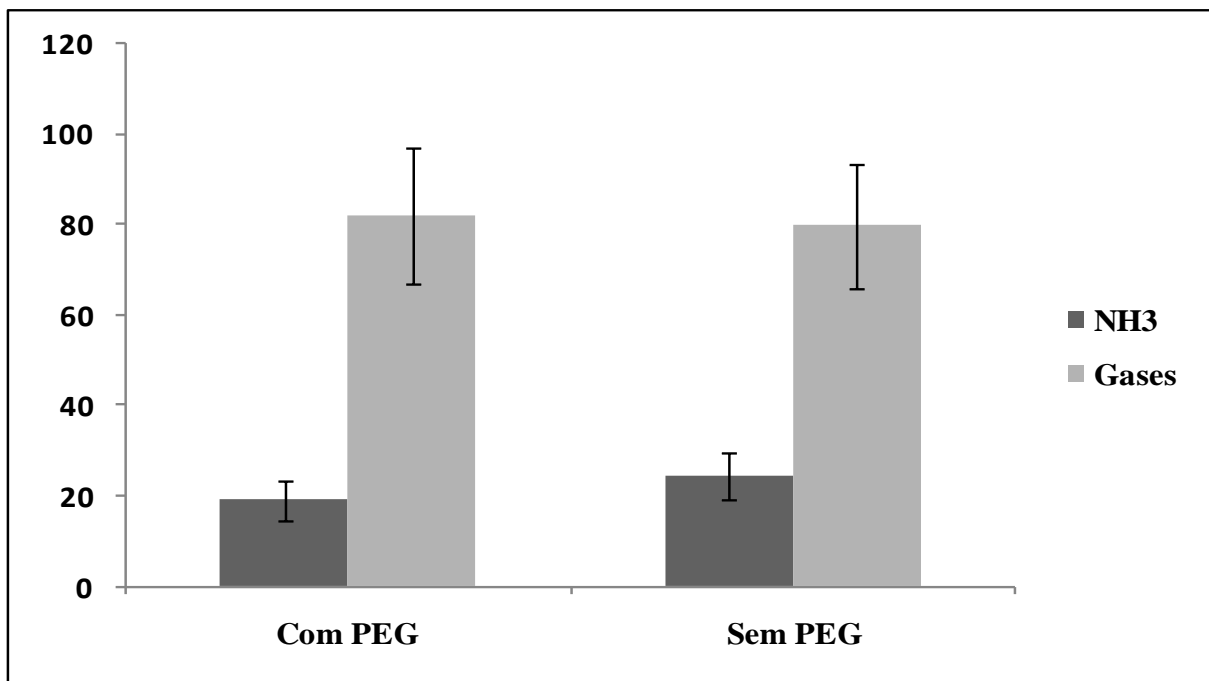


Figura 1 - Concentração de N-amoniaco (mg/dL) e produção de gás (mL) após 48 hs de incubação *in vitro* de amostras de Mucuna Preta e Feijão Guandu incubadas com ou sem adição de PEG. Resultados são médias de diferentes idades das duas espécies de leguminosas. Barras nas colunas indicam o desvio padrão das médias onde $n = 24$. Efeito de PEG sobre N-amoniaco e volume de gases = $P < 0,001$.

Os resultados das variáveis de cinética de produção de gases ao longo de 96 horas de incubação das amostras de leguminosas são apresentados nas tabelas 15 (volume de gás), 16 (taxa de degradação) e 17 (lag time). A taxa de degradação e lag time apresentaram interação ($P < 0,05$) amostra \times idade. O volume da gás, por sua vez, foi afetado pela amostra e idade das plantas ($P < 0,05$).

Tabela 15 - Produção de gás (mL) de leguminosas tropicais† cortadas com diferentes idades de crescimento e incubadas *in vitro* durante 96 horas.

Leguminosa	Idade				Média [±]	DP [‡]	Probabilidade [¶]	
	47	68	89	110			L	Q
CS	102	107	113	105	107 ^{bc}	15,9	0,4277	0,1566
ES	-	116	115	128	120 ^a	17,3	0,1157	0,2849
FG	83	94	93	88	89 ^d	16,9	0,5628	0,0939
FP	101	113	-	-	107 ^{bc}	18,4	0,1119	-
JV	103	114	124	122	116 ^{ab}	20,1	0,0139	0,2264
MP	88	104	100	106	100 ^{cd}	19,9	0,0500	0,3577

a, b, c, d: médias das leguminosas na mesma coluna com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

†CS: Crotalaria Spectabilis; ES: Estilosantes Campo Grande; FG: Feijão Guandu; FP: Feijão de Porco; JV: Java e MP: Mucuna Preta;

[±] Média geral de todas as idades de cada leguminosa

[‡] Desvio padrão das médias onde n=48 por espécie leguminosa

[¶] Probabilidade do efeito linear (L) ou quadrático (Q) da idade da planta pela análise de regressão.

Tabela 16 - Taxa de degradação de leguminosas tropicais† cortadas com diferentes idades de crescimento e incubadas *in vitro* durante 96 horas.

Leguminosa	Idade				DP ^{2‡}	Probabilidade [¶]		r ²
	47	68	89	110		L	Q	
CS	3,95 ^a	3,72 ^a	3,77 ^a	3,00 ^{ab}	0,52	0,0002	0,0792	0,310
ES	-	3,32 ^{ab}	3,05 ^b	3,09 ^{ab}	0,47	0,2489	0,3715	0,060
FG	2,96 ^b	2,92 ^b	3,16 ^b	2,63 ^b	0,45	0,2011	0,0664	0,100
FP	3,39 ^{ab}	3,44 ^{ab}	-	-	0,54	0,8327	-	0,002
JV	3,17 ^b	3,31 ^{ab}	3,26 ^{ab}	3,28 ^a	0,58	0,6984	0,7274	0,006
MP	3,31 ^b	3,20 ^{ab}	3,12 ^b	3,26 ^a	0,50	0,7322	0,4029	0,020

a, b: médias das leguminosas na mesma coluna com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

† CA: Calopogonio; CJ: Crotalaria Juncea; CS: Crotalaria Spectabilis; ES: Estilosantes Campo Grande; FG: Feijão Guandu; FP: Feijão de Porco; JV: Java e MP: Mucuna Preta;

[‡] Desvio padrão das médias onde n=48 por espécie leguminosa

[¶] Probabilidade do efeito linear (L) ou quadrático (Q) da idade da planta pela análise de regressão.

A produção de gás da leguminosa mucuna preta apresentou um efeito linear ($P < 0,05$), enquanto feijão guandú teve uma tendência a um efeito quadrático ($P = 0,093$) com o aumento da idade das plantas. As demais leguminosas apresentaram um efeito não significativo ($P < 0,05$) ao aumento da idade. A estilosantes Campo Grande apresentou a maior produção de gás durante as 96 horas de incubação.

A taxa de degradação da leguminosa crotalária spectabilis apresentou um efeito linear ($P < 0,05$), e uma tendência a um efeito quadrático ($P = 0,079$) com o aumento da idade das plantas, enquanto feijão guandu também apresentou uma tendência a um comportamento quadrático ($P = 0,066$). As demais leguminosas apresentaram um efeito não significativo ($P < 0,05$) ao aumento da idade. A crotalária spectabilis apresentou as maiores taxas de degradação durante as 96 horas de incubação.

Tabela 17 - Lag time de leguminosas tropicais† cortadas com diferentes idades de crescimento e incubadas *in vitro* durante 96 horas.

Leguminosa	Idade				DP ^{2‡}	Probabilidade [¶]		r ²
	47	68	89	110		L	Q	
CS	4,63 ^a	3,01 ^a	2,82 ^a	0,89 ^{ab}	1,65	<0,0001	0,7438	0,39
ES	-	0,46 ^c	0,70 ^c	0,30 ^b	0,67	0,5546	0,1833	0,06
FG	5,09 ^a	1,63 ^{bc}	2,26 ^{ab}	1,64 ^a	1,91	0,0003	0,0137	0,33
FP	2,76 ^a	2,04 ^{ab}	-	-	1,43	0,2278	-	0,06
JV	2,96 ^a	1,28 ^{bc}	1,12 ^{bc}	0,79 ^{ab}	1,12	<0,0001	0,0421	0,36
MP	4,69 ^a	0,87 ^{bc}	0,97 ^{bc}	1,4 ^{ab}	1,37	<0,0001	<0,0001	0,57

a, b, c: médias das leguminosas na mesma coluna com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

† CA: Calopogonio; CJ: Crotalaria Juncea; CS: Crotalaria Spectabilis; ES: Estilosantes Campo Grande; FG: Feijão Guandu; FP: Feijão de Porco; JV: Java e MP: Mucuna Preta;

‡ Desvio padrão das médias onde n=48 por espécie leguminosa

¶ Probabilidade do efeito linear (L) ou quadrático (Q) da idade da planta pela análise de regressão.

O lag time da leguminosa crotalária spectabilis apresentou um efeito linear ($P < 0,05$), quando feijão guandu, java e mucuna preta apresentaram ambos efeitos linear e quadrático ($P < 0,05$) com o aumento da idade das plantas. As demais leguminosas apresentaram um efeito

não significativo ($P < 0,05$) ao aumento da idade. Em geral, os maiores valores de lag time foram encontrados para crotalária spectabilis, feijão guandu e mucuna preta.

O efeito do PEG sobre as variáveis de cinética de produção de gases ao longo de 96 horas de incubação das amostras de leguminosas é apresentado nas figuras 2 (volume de gás), 3 (taxa de degradação) e figura 4 (lag time). A inclusão de PEG aumentou o volume de gás de 101 para 110 mL ($P < 0,05$), a taxa de degradação de 3,14%/h para 3,36%/h ($P < 0,05$) e diminuiu o lag time de 2,53 h para 1,49 h ($P < 0,05$).

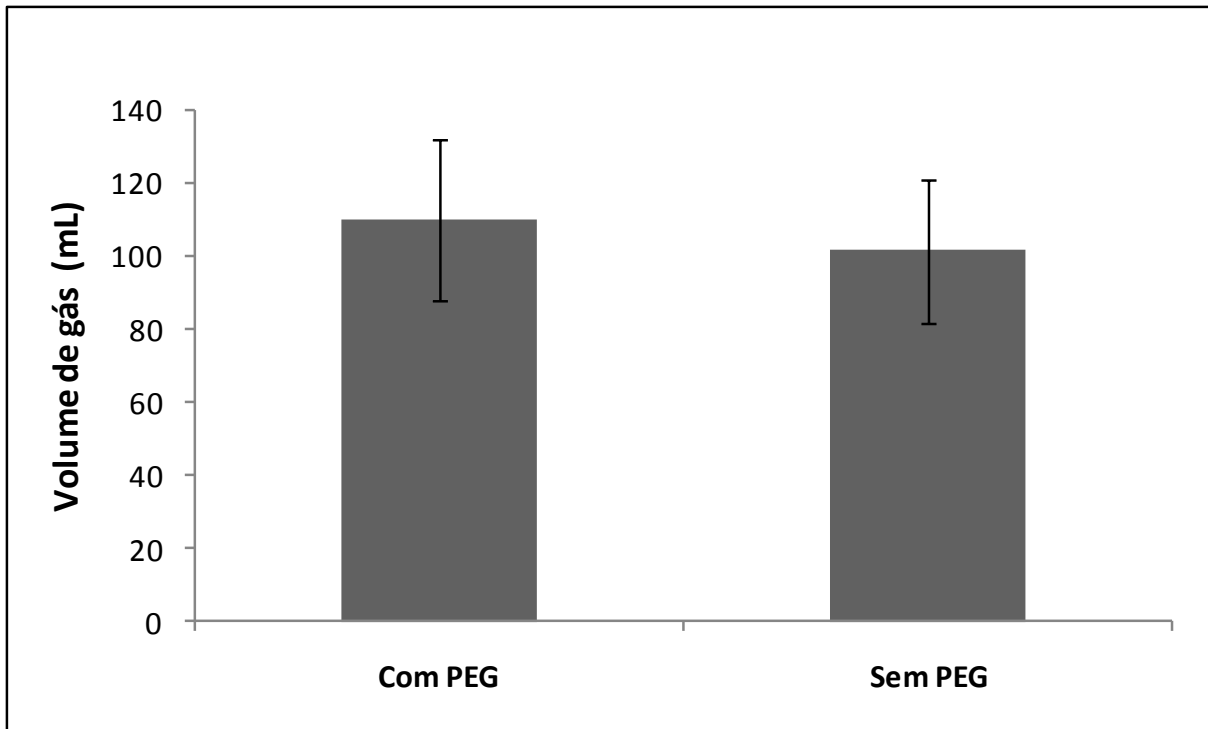


Figura 2 - Volume de gás (mL) produzido por leguminosas tropicais incubadas *in vitro* durante em 96 hs. Valores são médias de todas as amostras de leguminosas. Barras sobre as colunas indicam o desvio padrão onde $n = 126$ por tratamento. $P = 0,0001$.

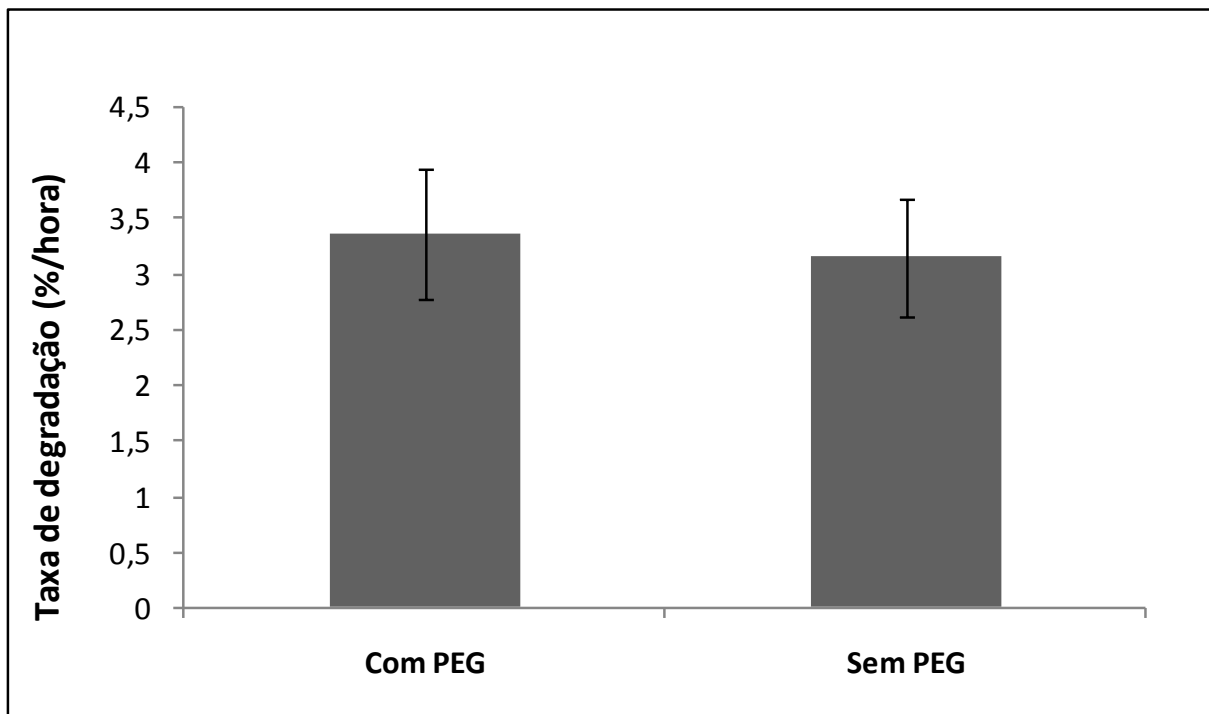


Figura 3 – Taxa de degradação de leguminosas tropicais incubadas *in vitro* durante em 96 hs. Valores são médias de todas as amostras de leguminosas. Barras sobre as colunas indicam o desvio padrão onde n = 126 por tratamento. P = 0,0004.

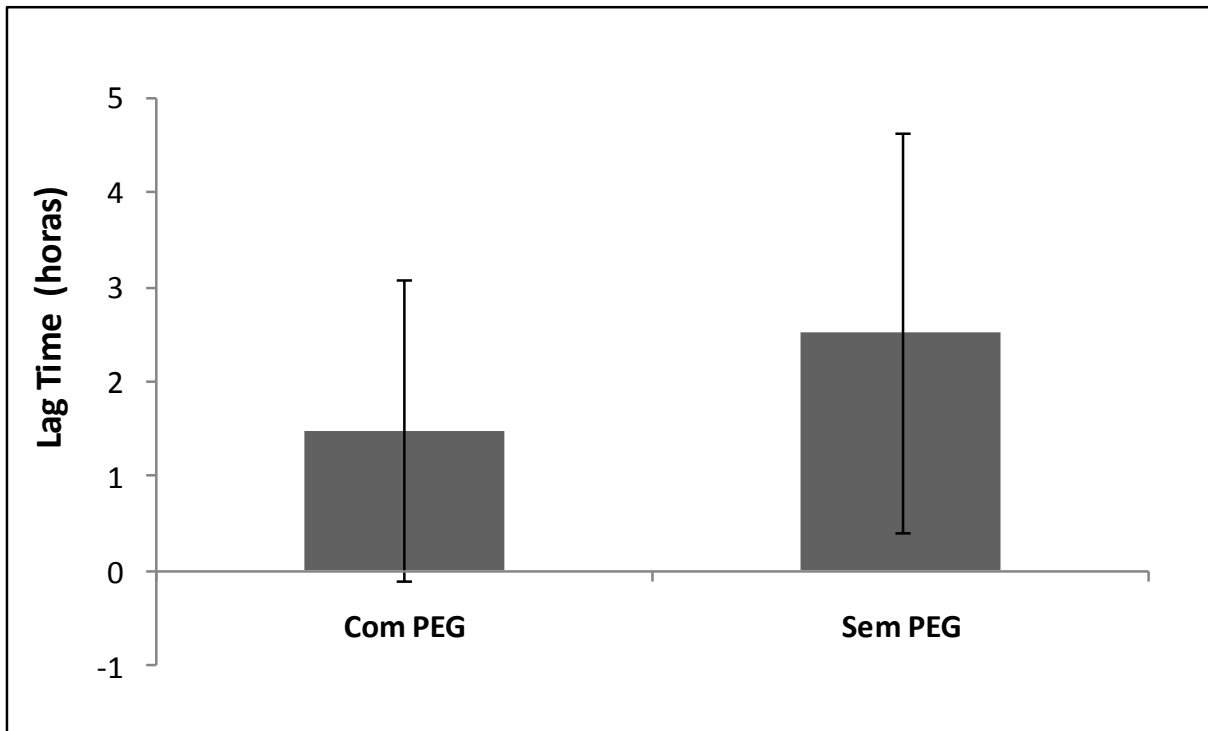


Figura 4 – Lag time de leguminosas tropicais incubadas *in vitro* durante em 96 hs. Valores são médias de todas as amostras de leguminosas. Barras sobre as colunas indicam o desvio padrão onde $n = 126$ por tratamento. $P < 0,0001$.

6.2.2 Amostras de substratos puros

Os resultados da cinética de degradação dos substratos puros incubados *in vitro* durante 96 horas são apresentados nas tabelas 18 (celulose), 19 (amido) e 20 (caseína).

Tabela 18 – Parâmetros da cinética de degradação *in vitro* gases da amostra de celulose incubada pura ou com adição de PEG e níveis de extrato tanífero de acácia.

%Tanino	Volume de gás(mL)		Taxa de degradação (%/h)		Lag time (hs)	
	Com PEG	Sem PEG	Com PEG	Sem PEG	Com PEG	Sem PEG
0	200*	183	3,10	3,01	13,56	13,9
2	205*	183	3,26*	2,89	12,16	15,3*
4	202*	171	2,89	2,77	13,03	20,8*
6	202*	169	2,89	2,68	13,43	21,9*
DP	7,05	21,7	0,11	0,16	0,9	3,92
P ¹	0,85	0,76	0,01	0,17	0,29	0,09

*Efeito do PEG ($P < 0,05$)

P¹ Probabilidade do efeito dos taninos pela ANOVA

A inclusão do PEG na incubação *in vitro/gases* da celulose aumentou o volume total de gases liberados independentemente do nível de extrato tanífero adicionado no meio de incubação ($P < 0,05$). Na taxa de degradação houve um aumento ($P < 0,05$) quando incluído no meio 2% nos tratamentos, com a adição de PEG. Houve uma diminuição ($P < 0,05$) no lag time quando incluído no meio de incubação somente extrato tanífero.

A inclusão do PEG na incubação *in vitro/gases* do amido aumentou ($P < 0,05$) o volume total de gases liberados quando incluído extrato tanífero, independente do nível de inclusão, já quando não havia extrato tanífero, o volume de gás foi maior sem o PEG. Também houve aumento da taxa de degradação ($P < 0,05$) nos tratamentos controle e com 2 ou 6% de extrato tanífero. O lag time diminuiu ($P < 0,05$) nos tratamento com 2% do extrato tanífero e aumentou ($P < 0,05$) no tratamento 4% de extrato tanífero.

Tabela 19 – Parâmetros da cinética de degradação *in vitro* gases da amostra de amido incubada pura ou com adição de PEG e níveis de extrato tanífero de acácia.

%Tanino	Volume de gás(mL)		Taxa de degradação (%/h)		Lag time (hs)	
	Com PEG	Sem PEG	Com PEG	Sem PEG	Com PEG	Sem PEG
0	221	229,3*	3,86*	3,54	5,97	5,45
2	225*	205,3	3,74*	3,49	5,43	6,76*
4	219*	210,6	3,32	4,01*	6,16*	5,31
6	222*	212,3	3,71*	3,56	5,2	5,6
DP	7,93	10,3	0,25	0,34	0,54	0,38
P ¹	0,85	0,09	0,12	0,29	0,18	<0,01

*Efeito do PEG (P<0,05)

P¹ Probabilidade do efeito dos taninos pela ANOVA

Tabela 20 - Parâmetros da cinética de degradação *in vitro* gases da amostra de caseinato de cálcio incubada pura ou com adição de PEG e níveis de extrato tanífero de acácia.

%Tanino	Volume de gás		Taxa de degradação (%/h)		Lag time (hs)	
	Com PEG	Sem PEG	Com PEG	Sem PEG	Com PEG	Sem PEG
0	80,7*	57,0	2,83	3,71*	10,3	9,80
2	80,7*	63,0	3,87	3,75	6,73	12,5*
4	92,7*	75,3	2,59	3,90*	8,00	8,10
6	95,7*	63,7	2,82	3,12*	5,26	10,2*
DP	9,34	8,3	0,52	0,253	2,61	2,27
P ¹	0,17	0,12	0,06	0,02	0,19	0,19

* Efeito o PEG (P<0,05)

¹ Probabilidade do efeito dos taninos pela ANOVA

A inclusão do PEG na incubação *in vitro*/gases da caseína aumentou o volume total de gases liberados independentemente do nível de extrato tanífero adicionado no meio de incubação ($P < 0,05$). Por outro lado, diminuiu a taxa de degradação ($P < 0,05$) nos

tratamentos controle e com 4 ou 6% de extrato tanífero, assim como diminuiu o lag time nos tratamentos com 2 e 6% do extrato tanífero.

O efeito do PEG sobre produção de gás e concentração de N-amoniaco até 48 horas de incubação na amostra de caseinato de cálcio incubada com a inclusão de diferentes teores de extrato tanífero de acácia é apresentado nas figuras 5 e 6, respectivamente. O volume de gás liberado (Figura 5) e a concentração de amônia no meio após 48 horas de incubação da caseína (Figura 6) foram afetados pela interação tanino x PEG ($P < 0,05$). A presença de PEG aumentou a produção de gás quando foi adicionado 2 e 6% de extrato tanífero e aumentou a concentração de amônia somente quando 6% de extrato tanífero foi adicionado no meio de incubação.

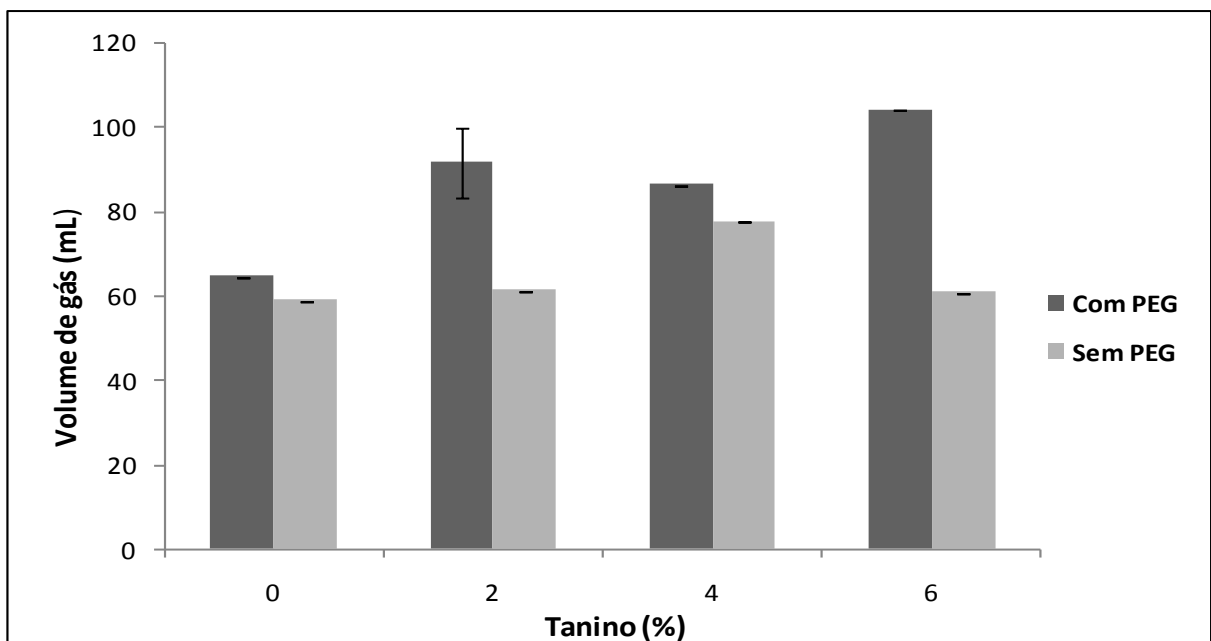


Figura 5 - Concentração do volume de gás (mL) produzido em 48 hs de incubação *in vitro* de amostras de caseína incubadas com ou sem adição de PEG. Barras nas colunas indicam o desvio padrão das médias onde $n = 3$. Efeito de PEG sobre volume de gás = $P < 0,001$.

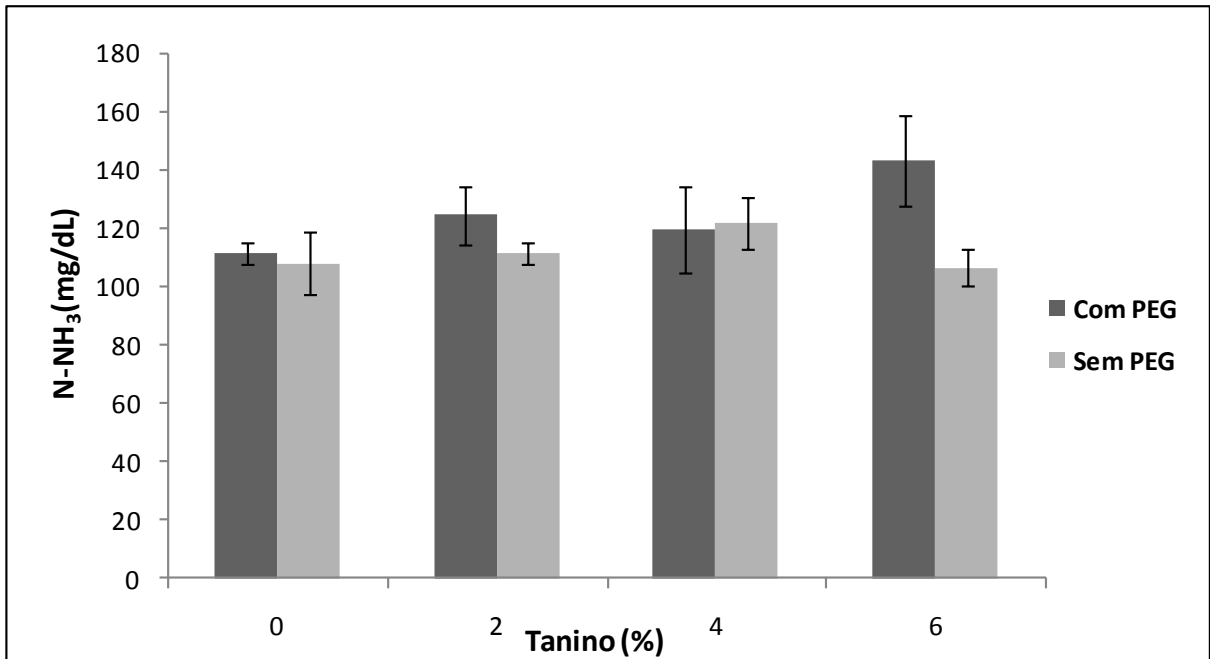


Figura 6 - Concentração de N-amoniaco (mg/dL) em 48 hs de incubação *in vitro* de amostras de caseína incubadas com ou sem adição de PEG. Barras nas colunas indicam o desvio padrão das médias onde $n = 3$. Efeito de PEG sobre N-amoniaco e volume de gases = $P < 0,001$.

6.3 Aderência bacteriana sobre as amostras de leguminosas tropicais

Os resultados de aderência bacteriana sobre as amostras de leguminosas incubadas *in vitro* durante 24 horas são apresentados na tabela 21 e, o efeito da adição de PEG sobre esta variável é apresentado na tabela 22. Houve interação amostra \times idade ($P < 0,05$) sobre a aderência bacteriana. Foi observada uma maior aderência nas leguminosas *Crotalaria spectabilis* e feijão de porco em todas as idades avaliadas ($P < 0,05$). A aderência variou linear e quadraticamente nas amostras de *Crotalaria spectabilis* e feijão guandu, linearmente no feijão de porco e Java e quadraticamente na mucuna preta ($P < 0,05$). A adição de PEG aumentou a aderência sobre as amostras de feijão de porco e diminuiu sobre as amostras de mucuna preta ($P < 0,05$).

Tabela 21 - Aderência bacteriana ruminal (mg de P/g de matéria seca residual) de leguminosas tropicais† incubadas 24 hs *in vitro*.

Leguminosa	Idade				DP [‡]	Probabilidade [‡]		r ²
	47	68	89	110		L	Q	
CS	0,89 ^a	0,66 ^a	0,58 ^a	0,65 ^a	0,20	0,0203	0,0456	0,26
ES	-	0,13 ^b	0,15 ^b	0,16 ^b	0,06	0,4094	0,9652	0,03
FG	0,23 ^b	0,15 ^b	0,08 ^b	0,14 ^b	0,03	<0,0001	<0,0001	0,68
FP	1,07 ^a	0,77 ^a	-	-	0,24	0,0262	-	0,30
JV	0,27 ^b	0,20 ^b	0,20 ^b	0,12 ^b	0,05	<0,0001	0,7557	0,52
MP	0,23 ^b	0,19 ^b	0,14 ^b	0,20 ^b	0,05	0,1184	0,0152	0,24

a, b: médias das leguminosas na mesma coluna com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

†CS: *Crotalaria Spectabilis*; ES: *Estilosantes Campo Grande*; FG: *Feijão Guandu*; FP: *Feijão de Porco*; JV: *Java* e MP: *Mucuna Preta*;

‡Desvio padrão das médias onde n=24 por espécie leguminosa

‡ Probabilidade do efeito linear (L) ou quadrático (Q) da idade da planta pela análise de regressão.

Tabela 22 - Presença de PEG sobre a aderência bacteriana ruminal (mg de P/g de matéria seca residual) de leguminosas tropicais† incubadas 24 hs *in vitro*.

Leguminosa	Com PEG	Sem PEG	DP [‡]	P* (PEG)
CS	0,74	0,66	0,193	0,243
ES	0,15	0,14	0,066	0,785
FG	0,15	0,15	0,028	0,711
FP	1,05	0,80	0,211	0,038
JV	0,19	0,21	0,036	0,148
MP	0,17	0,21	0,046	0,011

‡DP: desvio padrão das médias, onde n= 24 por espécie leguminosa

†CS: *Crotalaria Spectabilis*; ES: *Estilosantes Campo Grande*; FG: *Feijão Guandu*; FP: *Feijão de Porco*; JV: *Java* e MP: *Mucuna Preta*

*Probabilidade do efeito de PEG

6.4 Correlações entre a composição química de leguminosas forrageiras tropicais e parâmetros da cinética de fermentação ruminal

As correlações e regressões entre variáveis da composição química com parâmetros da cinética de fermentação e de aderência bacteriana são apresentadas na tabela 23 e nas figuras 7 a 13.

Tabela 23 - Correlações entre a composição química de leguminosas tropicais forrageiras, parâmetros da cinética de fermentação ruminal e aderência bacteriana.

	Volume de gás	Taxa de degradação	Lag time	Aderência Bacteriana
FDN	-0,31 (0,043)	-0,68 (<0,0001)	-0,33 (0,0340)	-0,41 (0,0063)
FDA	-0,59 (<0,0001)	-0,56 (<0,0001)	-0,01 (0,9321)	-0,43 (0,0043)
LDA	-0,41 (0,0067)	-0,73 (<0,0001)	0,25 (0,1143)	-0,71 (<0,0001)
Nt	-0,54 (0,0002)	0,31 (0,0444)	0,53 (0,0003)	0,28 (0,0710)
TC	-0,16 (0,3062)	-0,15 (0,3379)	-0,19 (0,1529)	-0,28 (0,0763)

FDN: Fibra Detergente Neutro; FDA: Fibra Detergente Ácido; LDA: Lignina Detergente Ácido, Nt: Nitrogênio Total e TC: Taninos Condensados.

Valores entre parentes probabilidade da correlação

Houve alta correlação negativa ($P < 0,0001$) entre FDN e a taxa de degradação (-0,68), assim como em relação a FDA (-0,56). A FDA também teve uma correlação negativa ($P < 0,0001$) com o volume de gás (-0,59). A aderência bacteriana somente teve uma correlação alta ($P < 0,0001$) com a LDA (-0,71). A LDA também apresentou uma correlação negativa ($P < 0,0001$) com a taxa de degradação (-0,73). O teor de N total apresentou uma correlação negativa ($P = 0,0002$) com o volume de gás (-0,54), enquanto apresentou uma correlação positiva ($P = 0,0003$) com o lag time (0,53). Já os taninos condensados apresentaram baixa correlação com todos os parâmetros avaliados.

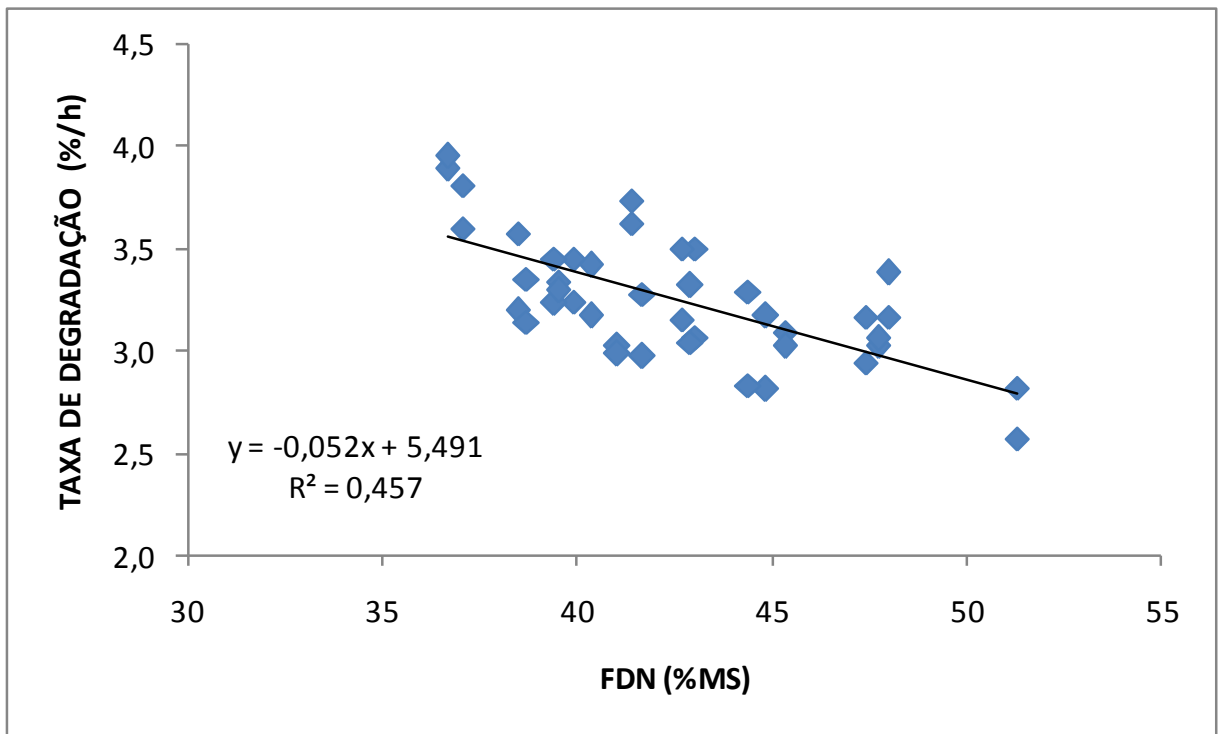


Figura 7 - Relação entre teor de FDN e taxa de degradação in vitro de leguminosas forrageiras tropicais.

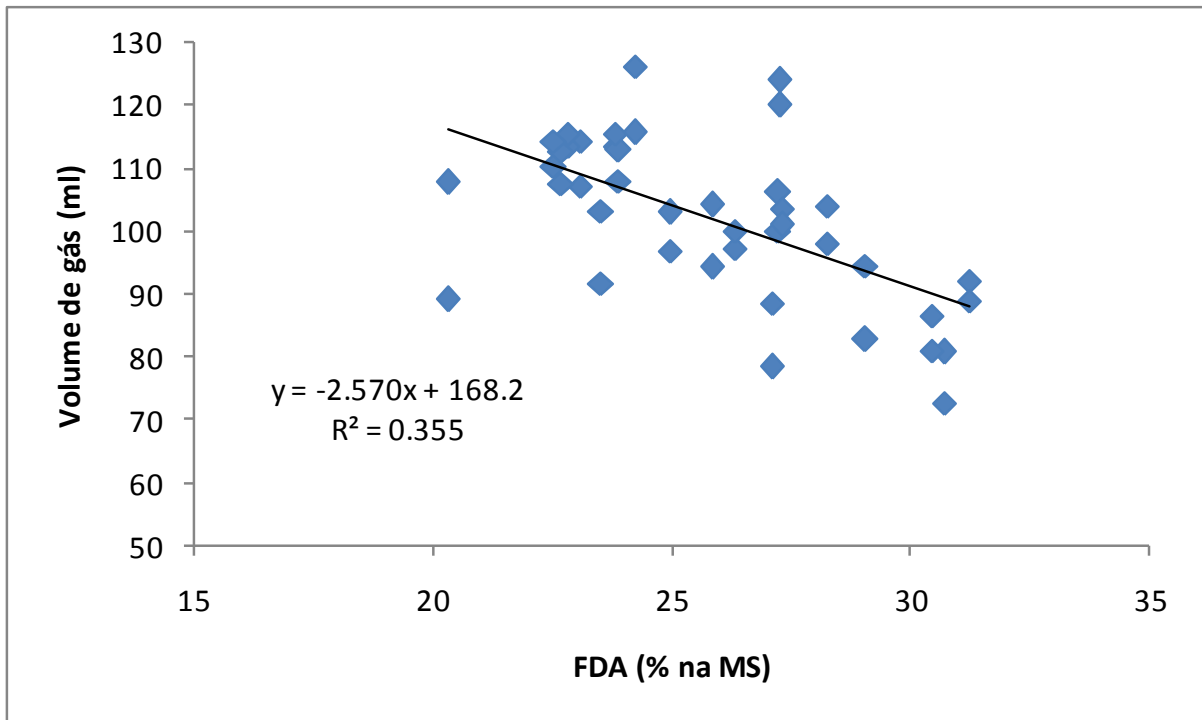


Figura 8 - Relação entre teor de FDA e volume de gás in vitro de leguminosas forrageiras tropicais.

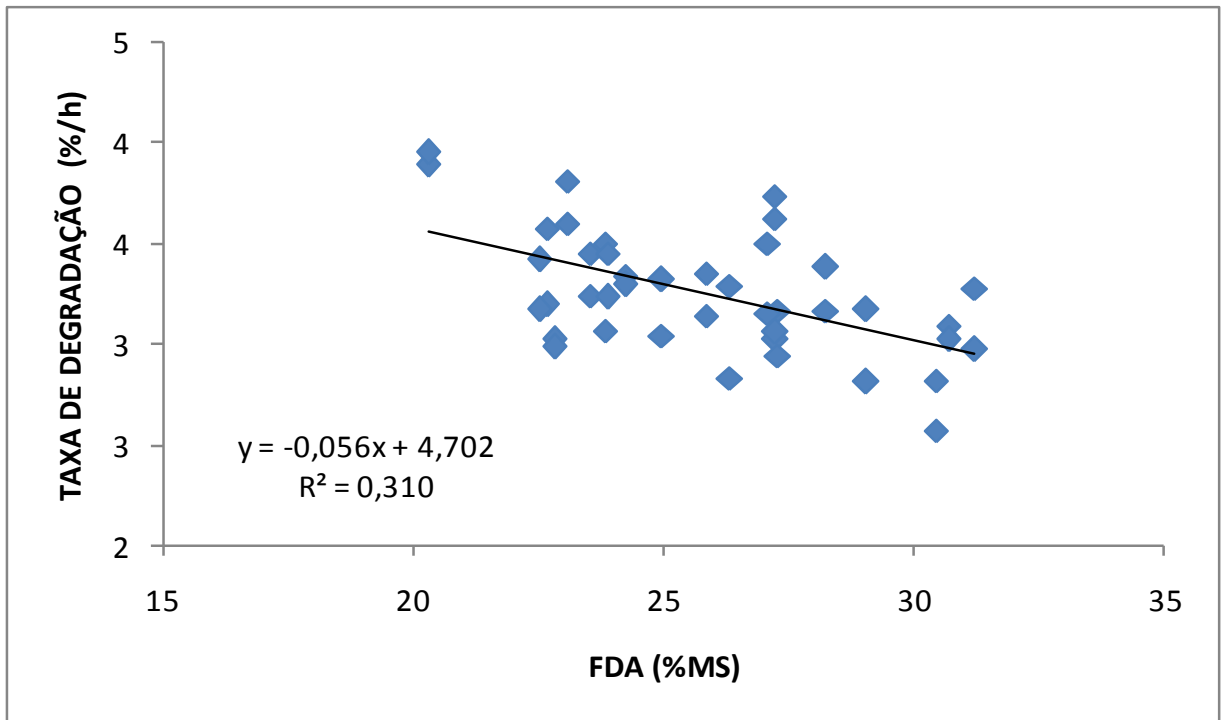


Figura 9 - Relação entre teor de FDA e taxa de degradação in vitro de leguminosas forrageiras tropicais.

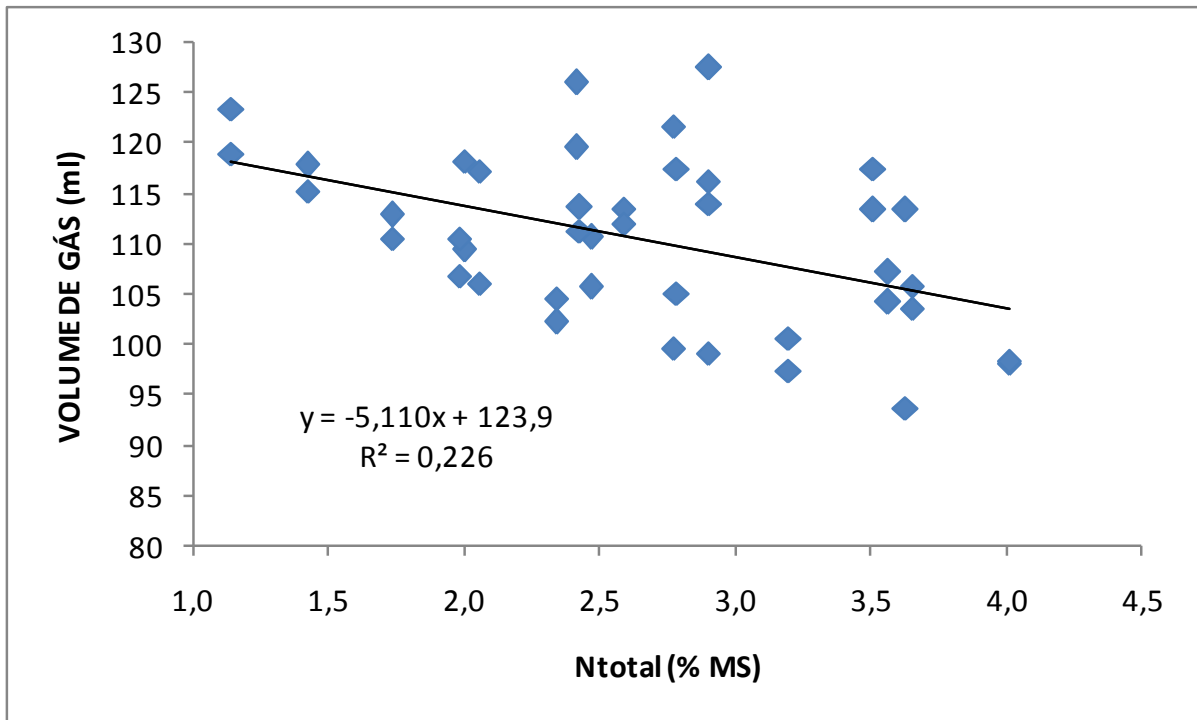


Figura 10 - Relação entre teor de N total e volume de gás in vitro de leguminosas forrageiras tropicais.

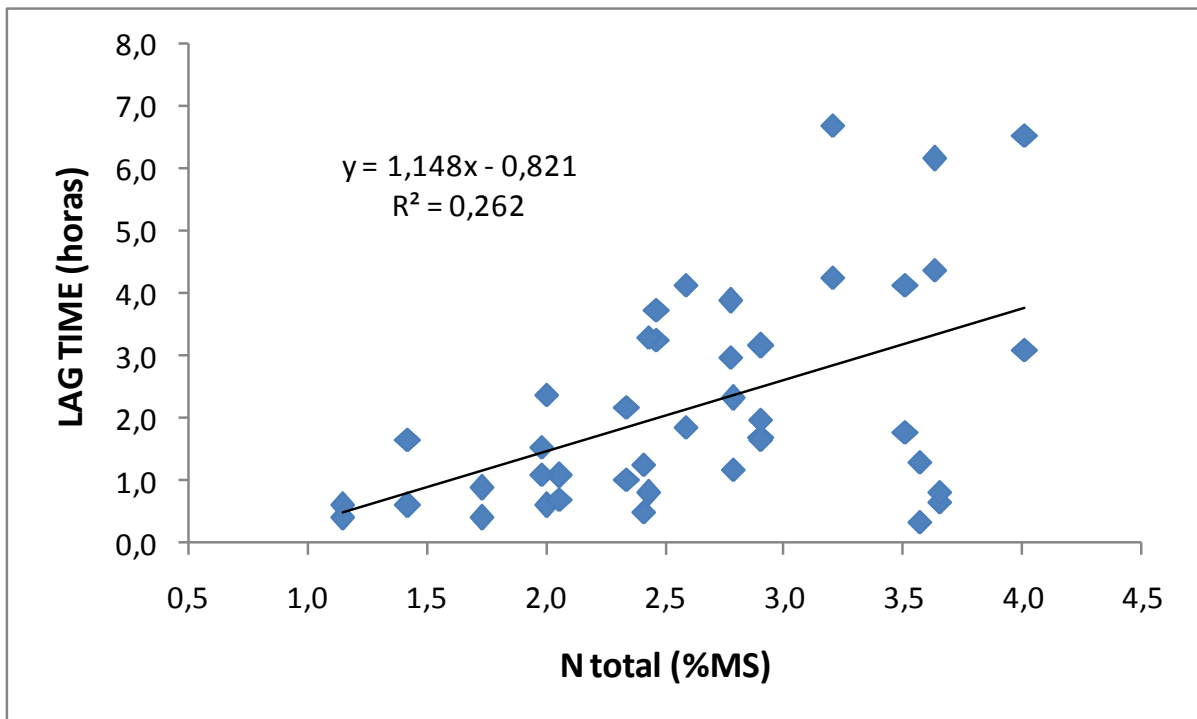


Figura 11 - Relação entre teor de N total e lag time de leguminosas forrageiras tropicais.

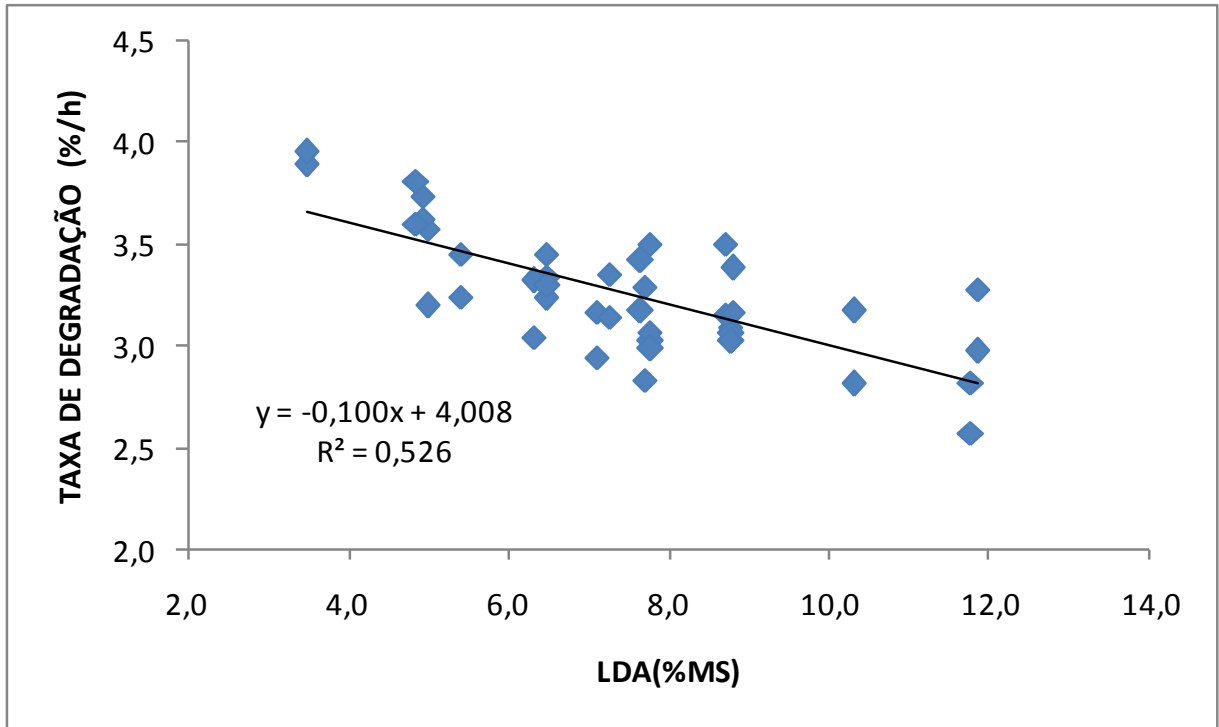


Figura 12 - Relação entre teor de LDA e taxa de degradação in vitro de leguminosas forrageiras tropicais.

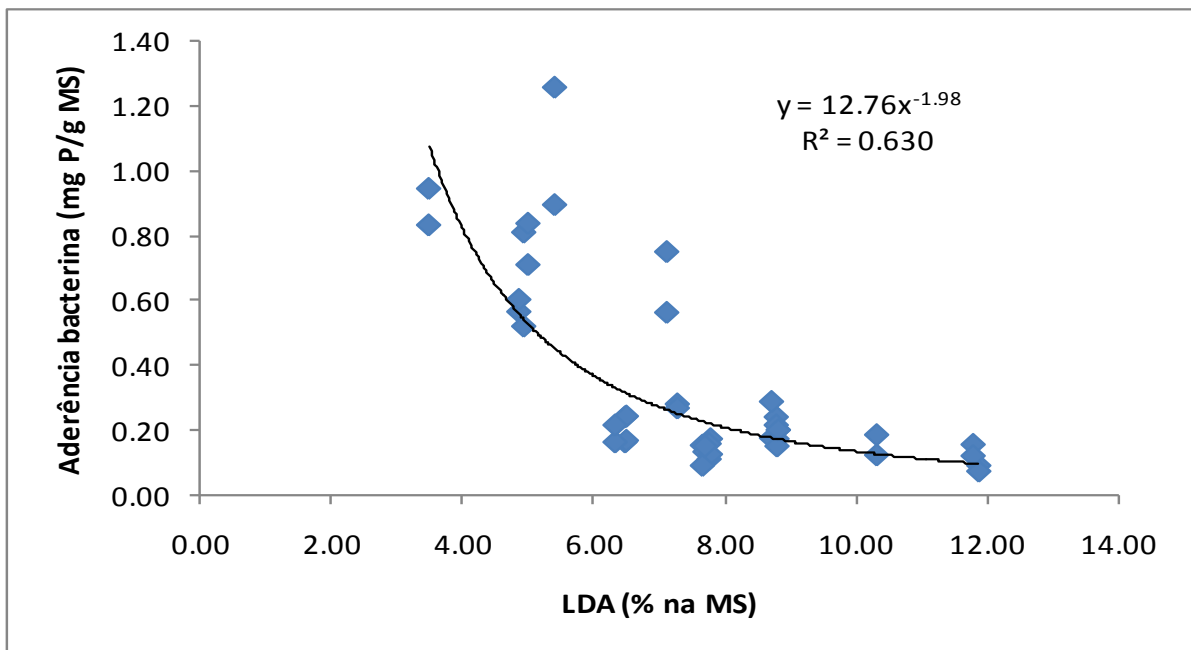


Figura 13 - Relação entre teor de LDA e aderência bacteriana de leguminosas forrageiras tropicais.

7 DISCUSSÃO

7.1 Composição química de leguminosas tropicais forrageiras

A maturidade é considerada um fator primário influenciando o valor nutricional das forrageiras (CORSI, 1990; WILSON, 1997). O envelhecimento dos tecidos vegetais e a conseqüente redução na digestibilidade são fenômenos intimamente associados. Com o avanço da maturidade fisiológica, as forrageiras acumulam maior quantidade de matéria seca, modificam a relação folha:colmo:material senescente e alteram sua composição química. Contudo, estas modificações são observadas mais intensamente em gramíneas tropicais, mas pode ser variável nas leguminosas. Por exemplo, Fick et al. (1994) analisou um banco de dados sobre alfafa e observou variação quadrática tanto da composição química quanto da digestibilidade desta forrageira em função da idade da planta. Além disso, o efeito da idade da planta varia entre espécies forrageiras que crescem em mesmas condições ambientais (HEATH et al., 1985; VAN SOEST, 1994). No presente estudo, o efeito da idade da planta sobre a composição química não foi avaliado estatisticamente pela falta de repetições, mas pode-se observar que houve grande variação entre as espécies de leguminosas. Por exemplo, enquanto que o teor de FDN da mucuna preta aumentou com o aumento da idade, na estilosantes a idade não influenciou esta variável.

Com o avanço da maturidade das plantas forrageiras normalmente observa-se redução no teor de N total e N solúvel (MINSON, 1990) e um aumento dos teores de NIDN, NIDA e FDN (BLASER, 1964). No presente estudo os teores de N total foram afetados negativamente pela idade da planta em todas as leguminosas avaliadas. Já a variação dos teores de FDN e NIDN dependeu da leguminosa avaliada e sua maturidade, mas os teores de NIDA não foram influenciados significativamente pela idade da planta.

O conteúdo de compostos fenólicos em plantas forrageiras pode variar com as condições do solo, clima e idade da planta, e apresenta uma composição química muito variada, sendo esta, muitas vezes, pouco conhecida (GODOY, 2001). Neste estudo foi observado que as leguminosas mucuna preta e feijão guandu apresentaram os mais altos teores de compostos fenólicos, aumentando estes teores com a idade da planta quando o calopogonio teve uma diminuição destes teores. Comparado a valores obtidos por Godoy

(2001), que encontrou teores superiores de taninos condensados para feijão guandu comparado para estas leguminosas. Cruz et al.(2007) relataram que teores de taninos condensados acima de 50g/kg de MS conforme encontrados em literatura passam ser prejudiciais a saúde do animais, o que indica que nenhuma leguminosa avaliada neste trabalho seria prejudicial .

7.2 Degradabilidade e aderência bacteriana *in vitro*

A degradabilidade da forrageira no rúmen inclui-se entre os principais fatores que afetam o seu valor nutricional, sendo afetada pela composição química, processamento, tempo de retenção do alimento no rúmen e, entre outros, pela presença de compostos secundários no alimento, como os taninos (VAN SOEST, 1994). Os taninos condensados, particularmente, podem reduzir sensivelmente a degradabilidade da MO e da proteína no rúmen (REED, 1995). A degradabilidade da MO e, conseqüentemente a produção de gases *in vitro*, também é inversamente relacionada com o teor de fibra ou com o teor de proteína das amostras (DETMANN et al., 2005). No presente estudo, a produção de gases *in vitro* foi variável entre as espécies leguminosas e foi relativamente coerente com a variação da sua composição química. Por exemplo, a mucuna preta e o feijão guandu apresentaram maiores valores de FDN, N total e taninos condensados e os menores valores de produção de gás durante a incubação, enquanto estilosantes Campo Grande teve os maiores valores de produção de gás.

Considera-se lag time o tempo que os microorganismos levam até se aderir a partícula de alimento e começar a degradá-lo, sendo assim, quanto maior o valor deste, mais tempo o alimento levará para ser degradado. Quando observados os valores de lag time, estes também foram maiores para as leguminosas com teores de taninos mais altos, embora a correlação encontrada entre todos os compostos fenólicos e os parâmetros da cinética de degradação não tenham sido expressivos, podendo-se atribuir esta menor produção de gás aos altos valores de FDN, FDA e LDA os quais tiveram alta correlação com o volume de gás produzido, pois com baixos valores de produção de gás e altos valores de lag time, para estas leguminosas a degradação do alimento seria mais lenta.

De forma inesperada, foi encontrada uma correlação positiva entre lag time e o teor de N total, podendo atribuir este resultado a hipótese de que estas leguminosas com maiores

teores de N, também teriam maiores valores de açúcares solúveis, o que indicaria que os microorganismos estariam utilizando primeiro à fonte de carboidratos prontamente fermentável, levando mais tempo para se aderir. Farenzena (2010) relata que o aumento na concentração de açúcares solúveis no meio disponibiliza carboidratos prontamente fermentáveis às células bacterianas ruminais, suprem a necessidade energética destes microorganismos e com isso podem reduzir a aderência de bactérias às partículas de alimento, aumentando assim o lag time.

A concentração de amônia no meio de incubação é positivamente relacionado com o teor de N total e N solúvel da amostra e com a atividade proteolítica e aminolítica bacteriana (HUNTINGTON, 1999). A atividade destas enzimas, por sua vez, depende do crescimento das populações bacterianas no meio e pode ser negativamente afetada pelos taninos (LONGLAND, et al., 1994). Em contrapartida, existe uma relação inversa entre a variação da concentração de amônia no meio de incubação e de produção de gases, em função da amônia captada pelas bactérias para síntese de suas proteínas (HUNTINGTON, 1999). Jung (1989), já cita que a liberação de amônia deve variar conforme o tecido examinado, a espécie e a idade da planta. Neste trabalho não houve influencia significativa da idade sobre a produção de volume de gás e liberação de amônia em 48 horas. Já entre as espécies, as leguminosas mucuna preta e feijão guandu apresentaram as maiores liberações de amônia, e em contraponto, os menores volumes de produção de gás em 48 horas, enquanto estilosantes Campo Grande apresentou valores inversos. Quando o PEG foi incluído, a liberação de amônia foi menor sem o PEG, reforçando a idéia de que taninos aumentam a perda de proteína endógena e inibem a atividade microbiana (MAKKAR et al., 1995; MCNEILL et al., 1998). Kaitho et al. (1998) também citam que compostos secundários das plantas, como os taninos e lignina, quando em concentrações mais altas, diminuem a digestibilidade e retenção de nitrogênio, modificando a fermentação ruminal.

A aderência e colonização das bactérias às partículas de alimento é um processo primário e necessário para a degradação dos alimentos no rúmen (WEIMER, 1996) e pode ser afetado por vários fatores, incluindo a presença de compostos fenólicos. Longland et al. (1994), indica que taninos condensados podem reduzir a digestibilidade da fibra e alterar a cinética da fermentação ruminal de leguminosas. Neste estudo, as maiores aderências foram apresentadas àquelas leguminosas que apresentavam um alto teor de tanino condensado e LDA, refletindo isto na produção de gás, a qual diminuiu, e na liberação de N-amoniaco, que aumentou, mas somente foi encontrada correção significativa entre LDA e aderência como já

observado por McAllister et al. (1994), os quais afirmam que fatores relacionados ao substrato, como grau de lignificação e proteção da cutícula formam uma barreira a adesão e degradação. Paciullo (2002) também relata que características comuns as gramíneas tropicais, como o alto teor de lignina e a elevada espessura da parede celular, aliado a sua estrutura anatomo histológica, inibem a aderência e a acessibilidade dos microorganismos ruminais as partículas do alimento e, conseqüentemente, a degradação da forrageira. Além de observado que para estas leguminosas, a aderência bacteriana apresentou um baixo valor, assim como baixa produção de gás, constata-se que a presença de lignina estava influenciando no processo de aderência e assim, diminuindo a degradabilidade da MO

Embora os teores de taninos condensados encontrados neste estudo sejam considerados baixos pela literatura (<50g/kg de MS), houve diferença quando avaliado o efeito do tanino nas leguminosas tropicas sobre os parâmetros da cinética de fermentação. Foi observado que, quando sem a inclusão do PEG, o lag time foi maior, também podendo atribuir a causa aos taninos, por estarem prejudicando a aderência das bactérias às partículas de substrato. Isto já havia sido constatado por Varel & Jung. (1986), os quais observaram que a presença de compostos fenólicos interfere diretamente na adesão de microorganismos à carboidratos estruturais.

7.3 Efeito do extrato tanífero e do PEG sobre a digestibilidade *in vitro*

Em estudos *in vitro* conduzidos para avaliar o efeito dos taninos sobre variáveis da fermentação ruminal o PEG é utilizado para neutralizar o efeito dos taninos. Makkar (2000) avalia o efeito dos taninos por meio de ensaios *in vitro/gases* de amostras na presença ou não de PEG indicando que quanto maior for o acréscimo na produção de gás pela amostra na presença de PEG, maior a reatividade dos taninos. Polímeros sintéticos como polivinil pirolidona (PVP), polivinil polipirolidona (PVPP) e notadamente o polietilenoglicol (PEG) contêm um número de moléculas de oxigênio suficientes para formar fortes ligações com os grupos fenólicos e hidroxilas dos taninos (SILANIKOVE et al., 2001). Nesse caso, é assumido que não existe efeito direto do PEG sobre a atividade fermentativa no meio de incubação.

No presente estudo, contudo, foi observado que o uso do PEG junto com amostras de leguminosas que não continham taninos resultou em respostas inesperadas. Por exemplo, a estilosantes Campo Grande apresenta baixos teores de taninos condensados, e apresentou uma aderência semelhante àquelas que apresentaram altos teores. Quando incubado com substratos puros, foi observado adicionalmente que o amido teve uma produção de gás superior a celulose e a caseína, independente do teor de extrato tanífero incubado. A adição do PEG aumentou o volume de gás produzido nos tratamentos com extrato tanífero, o que indica que estes compostos fenólicos podem ter efeito sobre a degradação de carboidratos solúveis, carboidratos estruturais e da proteína, mas inclusão de PEG deveria neutralizar os efeitos do tanino. De forma esperada o volume de gás aumentou e o Lag time diminuiu pela adição do PEG quando 2%, 4% e 6% foram incluídos no meio de incubação. Contudo a adição do PEG aumentou o volume de gases da celulose, mesmo na amostra sem tanino e não melhorou claramente a taxa de degradação nas amostras com alto teor de extrato tanífero. Tanto os efeitos do extrato tanífero quanto os do PEG foram diferentes dos obtidos com amido em relação à celulose, indicando que há diferenças do efeito dos taninos sobre estes substratos. Embora esse efeito de tanino foi claramente observado, para ambas amostras houve um efeito aparente direto do PEG sobre algumas variáveis da cinética de degradação *in vitro/gases*.

8 CONCLUSÕES

As variáveis de cinética de produção de gás e o grau de aderência bacteriana foram negativamente afetados pelo teor de lignina das leguminosas tropicais. Por outro lado, o teor de taninos das leguminosas, ou a adição de extrato tanífero em amostras de substratos puros não apresentaram claramente um efeito negativo sobre a fermentação *in vitro*. A adição de PEG, por sua vez, afetou significativamente todos os parâmetros da cinética de produção de gás, o que indica que o uso desta substância como agente inibidor dos taninos em ensaios *in vitro* necessita ser melhor avaliado.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIN, D.E. Forage cell wall degradation and p-coumaric, ferulic and sinapic acids. **Agronomy Journal**, v.74, n.3, p. 424-428, Madison, May. 1982.

AKIN, D.E.; RIGSBY, L.L.; THEODOROU, M.K. et al. Population changes of fibrolytic rumen bacteria in the presence of phenolic acids and plant extracts. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v.19, n.3, p. 261-275, Feb. 1988.

ALMEIDA, R. G.; et al. Pastagens consorciadas de braquiárias com estilosantes, no Cerrado. 2. Consumo, composição botânica e valor nutritivo da dieta. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: SBZ, p.64-65, Jul. 2001.

ALVES DE BRITO, C.J.F. **Organização estrutural e degradação in vitro de tecidos em Pennisetum purpureum Schum. (Poaceae)**. 119p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Paraná, 1997.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 12 ed. Washington, D.C. 1995.

BARCELLOS, A. O.; VILELA, L. Leguminosas forrageiras tropicais: Estado da arte e perspectivas futuras. In. CECATO, U.; SANTOS, G. T.; PRADO, I. N.; MOREIRA, I. (Eds.). **Simpósio Internacional de Forragicultura**. Maringá: UEM, p. 1-56, 1994.

BARRY, T.N.; et. al. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 4. Site of carbohydrate and protein digestion as influenced by dietary reactive tannin concentration. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.55, n.1, p.123-137, Jan. 1986.

BLASER, R.E. Symposium on forage utilization. Effects of fertility levels and stage of maturity on forage nutritive value. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.23, n.1, p. 246-253, Jan. 1964.

BRODERICK, G.A. Desirable characteristics of forage legumes for improving protein utilization in ruminants. **Journal of Animal Science**, Champaign v.73, n.9, p.2760-2773, Sep. 1995.

BUTLER, L. G. et. al. Interaction of proteins with sorghum tannin: mechanism specificity and significance. **Journal of American oil Chemistry Society**, Champaign, v.61, n.5, p.916-920, May. 1984.

CANNAS, A. Tannins: fascinating but sometime dangerous molecules. Ithaca: **Cornell University, Department of Animal Science, 1999**. Disponível em: <http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/tannin/tannin.html>. Acesso em 26 de outubro de 2009.

CHESSON, A.; STEWART, C.S.; WALLACE, R.J. Influence of plant phenolic acids on growth and cellulolytic activity of rumen bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, Washington D.C., v. 44, n.3, p.497-603, Sep. 1982

CORSI, M. Produção e qualidade de forragens tropicais. In: SBZ (ed.) **Novas Tecnologias de Produção Animal**, Piracicaba: FEALQ, p. 177-193, 1990.

CRUZ, S. E. S. B. S. ET al.. Caracterização dos taninos condensados das espécies maniçoba (*Manihot pseudoglazovii*), flor-de-seda (*Calotropis procera*), feijão-bravo (*Capparis flexuosa*, L) e jureminha (*Desmanthus virgatus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 59, n. 4, p.1038-1044, Jul. 2007.

DESHPANDE, S.S.;CHERIAN, M.; SALUNKHE, D.K. Tannin analysis of food products,1991. **CRC Critical Reviews IN: HAGERMAN A.E., BUTLER L.G..Food Science and Nutrition.**, California, v.24, n.4, p.401-449, Jan. 1986.

DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; VALADARES FILHO, S.C. Níveis de proteína em suplementos para terminação de bovinos em pastejo durante período de transição seca/águas: digestibilidade aparente e parâmetros do metabolismo ruminal e compostos nitrogenados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.34, n.4, p.1380-1391, Jul. 2005.

FARENZENA, R. **Aderência e atividade fibrolítica bacteriana ruminal:Efeito do pH e da concentração de açúcares solúveis**. 101p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

FICK, G.W.; WILKENS, P.W.; CHERNEY, J.H. Modeling forage quality changes in the growing crop. In: FAHEY JR, G. C. (Ed). **Forage quality, evaluation, and utilization**. Madison: ASA, CSSA, SSSA, p. 757-795, 1994.

GODOY, P. B. **Aspectos nutricionais de compostos fenólicos em ovinos alimentados com leguminosas forrageiras**. 90p. Tese (Doutorado em Ciências). Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) Piracicaba, USP, 2001.

GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. Forage fiber analysis: apparatus reagents, procedures and some applications. **Agriculture Handbook**, 379p. Washington D. C., 1970.

HAGERMAN A.E., BUTLER L.G.. Tannins and lignins. In: Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites, Vol I: The chemical participants, (Rosenthal G.A. and Berenbaum M.R., eds.), **Academic Press**, New York, p. 355-388, 1991.

HÄRTER, C. J. **Desenvolvimento e avaliação de um método *in vitro* para estimar a degradabilidade das proteínas no rúmen**. 96p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

HASLAM, E. Plant polyphenols-vegetable tannins revisited. **Cambridge University Press**, Cambridge, 1ed., p. 243, 1989.

HEATH, M. E.; BARNES, R. F.; METCALFE, D. S. Forage - **The science of grassland agriculture**. 643p. Iowa, 1985.

HUNTINGTON, G. B. Energy metabolism in the digestive tract and liver of cattle: influence of physiological state and nutrition. **Reproduction and Nutrition Development**, Paris, v.30, n.1, p.35-47, Jan. 1990.

JUNG, H.G. Forage lignins and their effects on fiber digestibility. **Agronomy Journal**, Madison, v.81, n.1, p.33-38, Jan. 1989.

KAITHO, R.J., et. al.. Utilization of browser supplements with varying tannin levels by Ethiopian Ming sheep. 1. Intake, digestibility and live weight changes. **Agroforestry Systems**, Dordrecht, v.39, n.1-3, p. 145-159, Jan. 1998.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos ruminantes**. 2. ed. Santa Maria: Ed. UFSM, 2009, 214p..

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

LICITRA, G.; et.al. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 57, n.4, p. 347-358, Mar. 1996.

LONGLAND, A.C., CARRUTHERS, J. AND LOW, A.G.. The ability of piglets 4 to 8 weeks old to digest and perform on diets containing two contrasting sources of non-starch polysaccharide. **Animal Production**, Bletchley, v.58, n.3, p.405-410, May. 1994.

MAKKAR, H. P. S. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 49; n.3, p. 241 – 256; Sep. 2003.

MAKKAR, H. P. S. **Quantification of Tannins in Tree Foliage**. (Laboratory manual) Vienna: FAO; IAEA, 2000.

MAKKAR, H. P. S.; BLUMMEL, L.; BECKER, K.. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in vitro techniques. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 73, n.6, p. 897-913; Jun. 1995.

MAURÍCIO, R.M., et.al. A semi – automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 79, n. 4, p. 321-330, Jun. 1999.

McALLISTER, T. A. et al. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, n. 11, p. 3004–3018, Nov. 1994.

McCAUGHEY, W. P.; et.al. Impact of pasture type on methane production by lactating beef cows. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v.79, n.4, p.221-226, Oct. 1999.

McNEILL, D.M.; et. al.. **Condense tannins in the Genus Leucena and their nutritional and farming system**. Canberra: ACIAR, p. 205-214, 1998.

MIN, B.R., et al. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.105, n1-4, p.3–19, Mar. 2003

MINSON, D.J. **Forage in ruminant nutrition**. Queensland: Academic Press, 4830.1990.

MUPANGWA, J. F.; et. al. Dry matter intake, apparent digestibility and excretion of purine derivatives in sheep fed tropical legume hay. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 36, n.3, p. 261-268, Jun. 2000.

MONTEIRO, H.C.F.; et al..Dinâmica de decomposição e mineralização de nitrogênio em função da qualidade de resíduos de gramíneas e leguminosas forrageiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.31, n.3, p.1092-1102, May. 1998.

NORTON, B.W. Differences in plant species in forage quality. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NUTRITIONAL LIMITS TO ANIMAL PRODUCTION FROM PASTURE. Proceedings... **Farnham Royal:Commonwealth Agricultural Bureaux**, 1982. Santa Lucia, p.89-110, 1991.

NOZELLA, E. F. **Determinação de taninos em plantas com potencial forrageiro para ruminantes**. 72p.Dissertação (Mestrado em Ciências). Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA). USP, Piracicaba, 2001.

NUTRITIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7^a Ed. Washington: National Academy Press, 381p, 2001.

ORSKOV, E.R.; McDONALD, I.; The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agriculture Science**, Cambridge, v.92, n.1, p. 499-503, Jan. 1979.

OSUJI, P. O.; ODENYO, A. A. The role of legume forages as supplements to low quality roughages - IRL experience. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 69, n.1-3, p. 27-38, Jan. 1997.

PACIULLO, D. S. C. Características anatômicas relacionadas ao valor nutritivo de gramíneas tropicais. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 2, p. 357-364, Abr. 2002.

REED, J. D. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.73, n.5, p.1516-1528, May. 1995.

SALUNKHE, P.K.; CHAVAN, J.K; KADAM S.S. **Dietary tanins: Consequences and remedies**. Boca Katon: CRC PRESS, 310p. 1990.

SARKANEN, K.V.; LUDWIG, C. H. Lignins: Occurrence, formation, structure and reactions. **Wiley-Interscience**, New York, 1971.

SAS. **Statistical Analysis Systems User's Guide**. Version 2001, SAS Institute, Cary, NC, 2001

SCHOEFIELD, P. et.al. Kinetics of fiber digestion from in vitro gás production. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.72, n.11, p.2980-2991, Nov.1994.

SENGER, C.C.D. **Comparação de técnicas na avaliação da qualidade de silagens de milho**. 126f. Tese de Doutorado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul/Porto Alegre, 126f., 2005.

SENGER, C.C.D. et. al. Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.146, p. 169–174, Sep. 2008.

SILANIKOVE, N., GILBOA, N., NITSAN, Z.,. Effect of polyethylene glycol on rumen volume and retention time of liquid and particulate matter along the digestive tract in goats fed tannin-rich carob leaves (*Ceratonia siliqua*). **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.40, n.1, p. 95-99, Apr. 2001.

TAKECHI, M.; et.al. Structure and antiherpetic activity among the tannins. **Phytochemistry**, New York, v.24, n.10, p.2245-2250, Oct.1985.

THEODOROU, M.K.; et.al. A simple gas production using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.48, n.3, p.185-197, Aug. 1994.

TISDALE, S.L.; et. Al. **Soil fertility and fertilizer**. New York : MacMillan. 634p, 1993.

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

VAREL, V.H., JUNG, H.G.. Influences of forage phenolics on ruminal fibrolytic bacteria and in vitro fiber degradation. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v.52, n.2, p. 275-280, Aug. 1986.

WAGHORN, G.C. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production—Progress and challenges. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.147, n.1 p.116–139, Nov. 2008.

WEATHERBURN, M.W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**, Washington D.C., v. 39, n.8, p. 971-974, Jul. 1967.

WEIMER, P. J. Why don't ruminal bacteria digest cellulose faster? **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, n. 8, p. 1496–1502, Aug. 1996.

WHITERS, P.C. **Comparative animal animal physiology**. New York: Saunders College Publishing., 1992, 949p..

WILSON, J. R. Forage intake from tropical pastures: Chemical composition and anatomical traits. In: Gomide, J. A. (Ed.) **Simpósio internacional sobre produção animal em pastejo**, UFV, Viçosa, p. 173-208, 1997.

10 ANEXOS

ANEXO A - Composição da solução tamponante ¹

Composição do Meio	
Ingredientes	Mililitro/Litro
Água destilada	520,30
Sol. Tampão	208,10
Sol. Macrominerais	208,10
Sol. Microminerais	0,11
Sol. Rezasurim	1,00
Meio B	62,40
Total	1000
Solução Tampão	
Reagentes	Gramas/Litro
NH ₄ HCO ₃	2,88
NaHCO ₃	35,0
Solução de Macrominerais	
Reagentes	Gramas/Litro
Na ₂ HPO ₄	9,45
KH ₂ HPO ₄	3,32
MgHSO ₄ 7 H ₂ O	0,60
Solução de Microminerais	
Reagentes	Gramas/Litro
CaCl ₂ 2 H ₂ O	132,00
MnCl ₂ 4 H ₂ O	100,00
CoCl ₂ 6 H ₂ O	10,00
FeCl ₃ 6 H ₂ O	80,00
Meio B	
Reagentes	Quantidade/1000 mL
Cysteine (grama)	6,25
Água destilada (mL)	950
NaOH 1M (mL)	40
Na ₂ S (grama)	6,25
Solução de rezasurina	
Reagentes	g/l
Rezasurina	1

¹ Adaptado de Dryhurst & Wood (1988), proposto por Härter (2009).

11 APÊNDICES

APÊNDICE A - Aderência microbiana (mg de P/g de MS residual) em amostras de espécies leguminosas tropicais, cortadas em diferentes idades de rebrota, incubadas *in vitro* com ou sem a presença de polietilenoglicol (PEG).

Ensaio	Amostra	Idade	PEG	Aderência microbiana
1	Crotalária Spectabilis	47	COM	0.81
1	Crotalária Spectabilis	47	COM	0.64
1	Crotalária Spectabilis	47	SEM	0.80
1	Crotalária Spectabilis	47	SEM	0.96
1	Crotalária Spectabilis	68	COM	0.86
1	Crotalária Spectabilis	68	COM	0.87
1	Crotalária Spectabilis	68	SEM	0.41
1	Crotalária Spectabilis	68	SEM	0.48
1	Crotalária Spectabilis	89	COM	0.77
1	Crotalária Spectabilis	89	COM	0.70
1	Crotalária Spectabilis	89	SEM	0.76
1	Crotalária Spectabilis	89	SEM	0.91
1	Crotalária Spectabilis	110	COM	0.57
1	Crotalária Spectabilis	110	COM	0.50
1	Crotalária Spectabilis	110	SEM	0.85
1	Crotalária Spectabilis	110	SEM	0.67
1	Feijão de Porco	47	COM	0.94
1	Feijão de Porco	47	COM	1.07
1	Feijão de Porco	47	SEM	0.93
1	Feijão de Porco	47	SEM	0.75
1	Feijão de Porco	68	COM	0.85
1	Feijão de Porco	68	COM	0.88
1	Feijão de Porco	68	SEM	0.42
1	Feijão de Porco	68	SEM	0.55
1	Feijão Guandu	47	COM	0.18
1	Feijão Guandu	47	COM	0.24
1	Feijão Guandu	47	SEM	0.21
1	Feijão Guandu	47	SEM	0.16
1	Feijão Guandu	68	COM	0.16
1	Feijão Guandu	68	COM	0.13
1	Feijão Guandu	68	SEM	0.17
1	Feijão Guandu	68	SEM	0.16
1	Feijão Guandu	89	COM	0.10

1	Feijão Guandu	89	COM	0.10
1	Feijão Guandu	89	SEM	0.10
1	Feijão Guandu	89	SEM	0.09
1	Feijão Guandu	110	COM	0.17
1	Feijão Guandu	110	COM	0.15
1	Feijão Guandu	110	SEM	0.14
1	Feijão Guandu	110	SEM	0.12
1	Java	47	COM	0.25
1	Java	47	COM	0.28
1	Java	47	SEM	0.25
1	Java	47	SEM	0.19
1	Java	68	COM	0.13
1	Java	68	COM	0.19
1	Java	68	SEM	0.28
1	Java	68	SEM	0.22
1	Java	89	COM	0.20
1	Java	89	COM	0.23
1	Java	89	SEM	0.25
1	Java	89	SEM	0.26
1	Java	110	COM	0.15
1	Java	110	COM	0.12
1	Java	110	SEM	0.10
1	Java	110	SEM	0.10
1	Mucuna Preta	47	COM	0.13
1	Mucuna Preta	47	COM	0.12
1	Mucuna Preta	47	SEM	0.24
1	Mucuna Preta	47	SEM	0.28
1	Mucuna Preta	68	COM	0.14
1	Mucuna Preta	68	COM	0.12
1	Mucuna Preta	68	SEM	0.20
1	Mucuna Preta	68	SEM	0.16
1	Mucuna Preta	89	COM	0.15
1	Mucuna Preta	89	COM	0.22
1	Mucuna Preta	89	SEM	0.12
1	Mucuna Preta	89	SEM	0.16
1	Mucuna Preta	110	COM	0.21
1	Mucuna Preta	110	COM	0.17
1	Mucuna Preta	110	SEM	0.22

1	Mucuna Preta	110	SEM	0.21
1	Estilosantes	68	COM	0.13
1	Estilosantes	68	COM	0.12
1	Estilosantes	68	SEM	0.15
1	Estilosantes	68	SEM	0.21
1	Estilosantes	89	COM	0.31
1	Estilosantes	89	COM	0.29
1	Estilosantes	89	SEM	0.13
1	Estilosantes	89	SEM	0.13
1	Estilosantes	110	COM	0.15
1	Estilosantes	110	COM	0.21
1	Estilosantes	110	SEM	0.22
1	Estilosantes	110	SEM	0.18
2	Crotalária Spectabilis	47	COM	0.84
2	Crotalária Spectabilis	47	COM	1.05
2	Crotalária Spectabilis	47	SEM	0.95
2	Crotalária Spectabilis	47	SEM	1.08
2	Crotalária Spectabilis	68	COM	0.71
2	Crotalária Spectabilis	68	COM	0.81
2	Crotalária Spectabilis	68	SEM	0.55
2	Crotalária Spectabilis	68	SEM	0.65
2	Crotalária Spectabilis	89	COM	0.31
2	Crotalária Spectabilis	89	COM	0.49
2	Crotalária Spectabilis	89	SEM	0.33
2	Crotalária Spectabilis	89	SEM	0.42
2	Crotalária Spectabilis	110	COM	1.04
2	Crotalária Spectabilis	110	COM	0.90
2	Crotalária Spectabilis	110	SEM	0.35
2	Crotalária Spectabilis	110	SEM	0.39
2	Feijão de Porco	47	COM	1.52
2	Feijão de Porco	47	COM	1.51
2	Feijão de Porco	47	SEM	1.01
2	Feijão de Porco	47	SEM	0.90
2	Feijão de Porco	68	COM	0.85
2	Feijão de Porco	68	COM	0.78
2	Feijão de Porco	68	SEM	1.01
2	Feijão de Porco	68	SEM	0.87
2	Feijão Guandu	47	COM	0.26

2	Feijão Guandu	47	COM	0.29
2	Feijão Guandu	47	SEM	0.26
2	Feijão Guandu	47	SEM	0.24
2	Feijão Guandu	68	COM	0.10
2	Feijão Guandu	68	COM	0.11
2	Feijão Guandu	68	SEM	0.22
2	Feijão Guandu	68	SEM	0.20
2	Feijão Guandu	89	COM	0.09
2	Feijão Guandu	89	COM	0.08
2	Feijão Guandu	89	SEM	0.05
2	Feijão Guandu	89	SEM	0.06
2	Feijão Guandu	110	COM	0.15
2	Feijão Guandu	110	COM	0.16
2	Feijão Guandu	110	SEM	0.11
2	Feijão Guandu	110	SEM	0.12
2	Java	47	COM	0.32
2	Java	47	COM	0.28
2	Java	47	SEM	0.30
2	Java	47	SEM	0.34
2	Java	68	COM	0.18
2	Java	68	COM	0.16
2	Java	68	SEM	0.26
2	Java	68	SEM	0.21
2	Java	89	COM	0.13
2	Java	89	COM	0.12
2	Java	89	SEM	0.23
2	Java	89	SEM	0.24
2	Java	110	COM	0.19
2	Java	110	COM	0.16
2	Java	110	SEM	0.09
2	Java	110	SEM	0.08
2	Mucuna Preta	47	COM	0.26
2	Mucuna Preta	47	COM	0.20
2	Mucuna Preta	47	SEM	0.29
2	Mucuna Preta	47	SEM	0.35
2	Mucuna Preta	68	COM	0.20
2	Mucuna Preta	68	COM	0.20
2	Mucuna Preta	68	SEM	0.21

2	Mucuna Preta	68	SEM	0.30
2	Mucuna Preta	89	COM	0.07
2	Mucuna Preta	89	COM	0.10
2	Mucuna Preta	89	SEM	0.14
2	Mucuna Preta	89	SEM	0.19
2	Mucuna Preta	110	COM	0.23
2	Mucuna Preta	110	COM	0.20
2	Mucuna Preta	110	SEM	0.18
2	Mucuna Preta	110	SEM	0.20
2	Estilosantes	68	COM	0.10
2	Estilosantes	68	COM	0.10
2	Estilosantes	68	SEM	0.12
2	Estilosantes	68	SEM	0.16
2	Estilosantes	89	COM	0.05
2	Estilosantes	89	COM	0.05
2	Estilosantes	89	SEM	0.12
2	Estilosantes	89	SEM	0.13
2	Estilosantes	110	COM	0.16
2	Estilosantes	110	COM	0.18
2	Estilosantes	110	SEM	0.10
2	Estilosantes	110	SEM	0.11

APÊNDICE B - Volume de gás (ml), taxa de degradação (%/h) e lag time (h), em amostras de espécies leguminosas tropicais, cortadas em diferentes idades de rebrota, incubadas *in vitro*/gases com ou sem a presença de polietilenoglicol (PEG).

Ensaio	Amostra	Idade	PEG	Volume de gás	Taxa de degradação	Lag time
1	Crotalária Spectabilis	47	COM	90.3	3.34	4.12
1	Crotalária Spectabilis	47	COM	86.5	3.42	6.92
1	Crotalária Spectabilis	47	SEM	72.8	3.28	7.40
1	Crotalária Spectabilis	47	SEM	70.0	3.31	8.60
1	Feijão de Porco	47	COM	87.3	2.83	3.36
1	Feijão de Porco	47	COM	84.2	2.82	0.07
1	Feijão de Porco	47	SEM	71.3	2.64	5.40
1	Feijão de Porco	47	SEM	80.4	2.46	3.60
1	Feijão Guandu	47	COM	65.4	2.84	6.53
1	Feijão Guandu	47	COM	64.7	2.73	5.82
1	Feijão Guandu	47	SEM	52.4	2.56	10.7
1	Feijão Guandu	47	SEM	63.4	2.61	7.48
1	Java	47	COM	86.9	2.74	3.32
1	Java	47	COM	79.8	2.64	4.97
1	Java	47	SEM	82.6	2.54	5.10
1	Java	47	SEM	78.7	2.53	4.80
1	Mucuna Preta	47	COM	72.9	2.92	3.83
1	Mucuna Preta	47	COM	56.9	2.74	4.66
1	Mucuna Preta	47	SEM	66.9	2.64	7.40
1	Mucuna Preta	47	SEM	58.3	2.64	9.00
1	Crotalária Spectabilis	68	COM	89.9	3.20	4.77
1	Crotalária Spectabilis	68	COM	92.8	3.23	5.47
1	Crotalária Spectabilis	68	SEM	88.9	3.01	2.90
1	Crotalária Spectabilis	68	SEM	93.3	3.05	4.40
1	Feijão de Porco	68	COM	94.6	3.01	3.56
1	Feijão de Porco	68	COM	91.2	2.97	0.50
1	Feijão de Porco	68	SEM	88.0	2.81	2.65
1	Feijão de Porco	68	SEM	85.1	2.81	5.00
1	Feijão Guandu	68	COM	73.7	2.72	1.48
1	Feijão Guandu	68	COM	79.7	2.51	1.33

1	Feijão Guandu	68	SEM	68.4	2.30	3.90
1	Feijão Guandu	68	SEM	68.1	2.27	1.23
1	Java	68	COM	95.1	3.15	0.80
1	Java	68	COM	96.3	2.62	1.40
1	Java	68	SEM	91.6	2.60	1.81
1	Java	68	SEM	89.8	2.62	3.10
1	Estilosantes	68	COM	88.9	2.88	0.00
1	Estilosantes	68	COM	95.9	2.71	0.00
1	Estilosantes	68	SEM	95.9	2.75	1.58
1	Estilosantes	68	SEM	93.8	2.79	2.06
1	Mucuna Preta	68	COM	84.0	2.63	0.00
1	Mucuna Preta	68	COM	78.0	2.81	1.96
1	Mucuna Preta	68	SEM	76.6	2.44	0.00
1	Mucuna Preta	68	SEM	78.6	2.61	0.90
1	Crotalária Spectabilis	89	COM	97.6	3.18	3.88
1	Crotalária Spectabilis	89	COM	92.9	3.00	1.51
1	Crotalária Spectabilis	89	SEM	98.2	3.03	4.40
1	Crotalária Spectabilis	89	SEM	101.1	3.01	4.50
1	Feijão Guandu	89	COM	75.8	2.68	0.00
1	Feijão Guandu	89	COM	72.8	2.74	0.44
1	Feijão Guandu	89	SEM	74.1	2.53	3.98
1	Feijão Guandu	89	SEM	71.5	2.35	4.32
1	Java	89	COM	108.1	2.75	0.39
1	Java	89	COM	103.4	2.71	1.98
1	Java	89	SEM	99.1	3.04	2.82
1	Java	89	SEM	100.4	2.64	2.52
1	Estilosantes	89	COM	93.0	2.36	0.00
1	Estilosantes	89	COM	103.0	2.50	0.00
1	Estilosantes	89	SEM	102.9	2.65	1.18
1	Estilosantes	89	SEM	99.6	2.58	1.27
1	Mucuna Preta	89	COM	85.7	2.82	1.39
1	Mucuna Preta	89	COM	75.7	2.83	2.02
1	Mucuna Preta	89	SEM	81.3	2.16	0.00
1	Mucuna Preta	89	SEM	79.6	2.55	0.85
1	Crotalária Spectabilis	110	COM	83.5	2.86	2.98
1	Crotalária Spectabilis	110	COM	86.9	2.59	0.00
1	Crotalária Spectabilis	110	SEM	86.3	2.61	0.00
1	Crotalária Spectabilis	110	SEM	88.2	2.55	0.14

1	Feijão Guandu	110	COM	75.1	2.49	1.38
1	Feijão Guandu	110	COM	70.0	2.47	2.27
1	Feijão Guandu	110	SEM	65.8	2.22	2.08
1	Feijão Guandu	110	SEM	63.0	2.26	0.18
1	Java	110	COM	99.1	2.65	0.01
1	Java	110	COM	92.1	2.66	0.00
1	Java	110	SEM	95.1	2.65	0.48
1	Java	110	SEM	100.9	2.66	0.65
1	Estilosantes	110	COM	102.1	2.66	0.00
1	Estilosantes	110	COM	102.9	2.64	0.00
1	Estilosantes	110	SEM	104.1	2.59	0.00
1	Estilosantes	110	SEM	104.2	2.65	0.62
1	Mucuna Preta	110	COM	84.4	2.74	2.95
1	Mucuna Preta	110	COM	81.4	2.80	0.82
1	Mucuna Preta	110	SEM	76.2	2.91	2.26
1	Mucuna Preta	110	SEM	79.5	2.74	1.78
2	Crotalária Spectabilis	47	COM	127.1	4.52	2.94
2	Crotalária Spectabilis	47	COM	127.0	4.29	3.53
2	Crotalária Spectabilis	47	SEM	110.8	4.43	2.90
2	Crotalária Spectabilis	47	SEM	103.1	4.79	5.74
2	Feijão de Porco	47	COM	123.1	3.98	2.64
2	Feijão de Porco	47	COM	118.6	4.18	1.00
2	Feijão de Porco	47	SEM	99.5	3.96	4.12
2	Feijão de Porco	47	SEM	115.3	3.90	3.39
2	Feijão Guandu	47	COM	96.0	3.26	2.03
2	Feijão Guandu	47	COM	97.2	3.54	2.69
2	Feijão Guandu	47	SEM	87.1	3.45	5.83
2	Feijão Guandu	47	SEM	88.1	3.47	2.78
2	Java	47	COM	129.7	4.01	1.50
2	Java	47	COM	120.2	4.01	2.15
2	Java	47	SEM	100.1	3.85	3.33
2	Java	47	SEM	115.6	3.64	2.29
2	Mucuna Preta	47	COM	110.2	4.14	1.50
2	Mucuna Preta	47	COM	113.7	4.21	2.43
2	Mucuna Preta	47	SEM	99.6	3.64	4.25
2	Mucuna Preta	47	SEM	88.6	3.71	5.46
2	Crotalária Spectabilis	68	COM	120.5	4.10	1.48
2	Crotalária Spectabilis	68	COM	121.5	4.43	3.28

2	Crotalária Spectabilis	68	SEM	104.5	4.37	2.77
2	Crotalária Spectabilis	68	SEM	113.5	4.07	2.98
2	Feijão de Porco	68	COM	128.9	4.29	2.72
2	Feijão de Porco	68	COM	136.2	4.03	0.00
2	Feijão de Porco	68	SEM	120.4	3.72	2.97
2	Feijão de Porco	68	SEM	136.7	3.45	2.00
2	Feijão Guandu	68	COM	107.4	3.67	0.79
2	Feijão Guandu	68	COM	117.6	3.79	1.08
2	Feijão Guandu	68	SEM	96.3	3.23	2.96
2	Feijão Guandu	68	SEM	98.1	3.46	1.18
2	Java	68	COM	132.3	4.02	0.61
2	Java	68	COM	128.1	4.01	1.26
2	Java	68	SEM	124.3	3.93	1.43
2	Java	68	SEM	126.4	3.79	2.34
2	Estilosantes	68	COM	136.0	4.11	0.00
2	Estilosantes	68	COM	132.8	4.29	0.00
2	Estilosantes	68	SEM	144.5	3.38	0.30
2	Estilosantes	68	SEM	128.1	3.35	1.04
2	Mucuna Preta	68	COM	119.5	3.98	0.66
2	Mucuna Preta	68	COM	130.5	3.87	0.00
2	Mucuna Preta	68	SEM	121.6	3.48	0.17
2	Mucuna Preta	68	SEM	110.1	3.63	2.20
2	Crotalária Spectabilis	89	COM	130.1	4.52	0.51
2	Crotalária Spectabilis	89	COM	136.8	4.54	1.58
2	Crotalária Spectabilis	89	SEM	121.4	4.04	2.98
2	Crotalária Spectabilis	89	SEM	107.7	4.32	4.63
2	Feijão Guandu	89	COM	101.9	3.85	1.55
2	Feijão Guandu	89	COM	117.7	3.85	1.18
2	Feijão Guandu	89	SEM	106.1	3.43	2.81
2	Feijão Guandu	89	SEM	104.4	3.58	2.06
2	Java	89	COM	143.6	3.94	0.00
2	Java	89	COM	149.4	3.97	0.03
2	Java	89	SEM	132.9	3.84	1.83
2	Java	89	SEM	130.6	3.66	2.33
2	Estilosantes	89	COM	128.4	3.55	0.00
2	Estilosantes	89	COM	129.5	3.69	0.00
2	Estilosantes	89	SEM	125.6	3.48	2.05
2	Estilosantes	89	SEM	133.8	3.23	2.13

2	Mucuna Preta	89	COM	115.4	3.80	0.55
2	Mucuna Preta	89	COM	112.3	3.70	1.19
2	Mucuna Preta	89	SEM	121.4	3.28	0.00
2	Mucuna Preta	89	SEM	117.3	3.34	0.46
2	Crotalária Spectabilis	110	COM	130.4	3.65	0.00
2	Crotalária Spectabilis	110	COM	113.1	3.56	0.51
2	Crotalária Spectabilis	110	SEM	115.2	3.20	0.32
2	Crotalária Spectabilis	110	SEM	114.5	3.42	1.13
2	Feijão Guandu	110	COM	101.7	3.18	0.66
2	Feijão Guandu	110	COM	99.9	3.15	1.79
2	Feijão Guandu	110	SEM	98.7	2.97	2.04
2	Feijão Guandu	110	SEM	96.4	2.85	0.46
2	Java	110	COM	138.7	3.71	0.28
2	Java	110	COM	111.5	4.67	4.01
2	Java	110	SEM	131.4	3.69	0.43
2	Java	110	SEM	129.5	3.69	1.23
2	Estilosantes	110	COM	147.8	3.53	0.00
2	Estilosantes	110	COM	143.1	3.27	0.00
2	Estilosantes	110	SEM	136.8	3.68	0.53
2	Estilosantes	110	SEM	135.2	3.33	0.45
2	Mucuna Preta	110	COM	110.0	4.07	1.85
2	Mucuna Preta	110	COM	116.3	3.92	2.32
2	Mucuna Preta	110	SEM	118.8	3.48	1.51
2	Mucuna Preta	110	SEM	141.0	3.54	1.11
3	Crotalária Spectabilis	47	COM	117.4	4.13	2.20
3	Crotalária Spectabilis	47	COM	119.5	4.10	3.19
3	Crotalária Spectabilis	47	SEM	103.4	3.61	1.17
3	Crotalária Spectabilis	47	SEM	92.5	4.16	6.82
3	Feijão de Porco	47	COM	114.1	3.40	1.98
3	Feijão de Porco	47	COM	120.6	3.72	1.48
3	Feijão de Porco	47	SEM	96.4	3.44	3.00
3	Feijão de Porco	47	SEM	101.5	3.36	3.12
3	Feijão Guandu	47	COM	107.7	2.83	2.75
3	Feijão Guandu	47	COM	104.5	2.79	3.40
3	Feijão Guandu	47	SEM	80.9	2.57	8.37
3	Feijão Guandu	47	SEM	86.2	2.86	2.71
3	Java	47	COM	124.7	3.28	1.29
3	Java	47	COM	110.8	3.28	2.40

3	Java	47	SEM	102.0	2.80	2.24
3	Java	47	SEM	104.2	2.74	2.08
3	Mucuna Preta	47	COM	108.1	3.47	2.40
3	Mucuna Preta	47	COM	104.3	3.57	5.52
3	Mucuna Preta	47	SEM	89.2	3.13	4.86
3	Mucuna Preta	47	SEM	82.9	2.89	5.01
3	Crotalária Spectabilis	68	COM	118.8	4.00	1.81
3	Crotalária Spectabilis	68	COM	113.8	3.92	1.88
3	Crotalária Spectabilis	68	SEM	111.6	3.72	1.60
3	Crotalária Spectabilis	68	SEM	110.3	3.60	2.77
3	Feijão de Porco	68	COM	124.9	3.87	1.44
3	Feijão de Porco	68	COM	129.8	3.83	1.54
3	Feijão de Porco	68	SEM	110.3	3.31	0.99
3	Feijão de Porco	68	SEM	115.2	3.16	1.10
3	Feijão Guandu	68	COM	108.1	2.90	1.33
3	Feijão Guandu	68	COM	115.1	2.98	1.90
3	Feijão Guandu	68	SEM	97.4	2.44	2.42
3	Feijão Guandu	68	SEM	104.4	2.72	0.00
3	Java	68	COM	114.6	3.46	1.06
3	Java	68	COM	127.7	3.80	0.00
3	Java	68	SEM	118.8	2.85	0.67
3	Java	68	SEM	125.5	2.89	0.85
3	Estilosantes	68	COM	129.6	3.82	0.00
3	Estilosantes	68	COM	123.4	3.70	0.00
3	Estilosantes	68	SEM	115.0	3.07	0.15
3	Estilosantes	68	SEM	111.4	2.95	0.41
3	Mucuna Preta	68	COM	112.6	3.57	1.36
3	Mucuna Preta	68	COM	138.0	2.94	0.00
3	Mucuna Preta	68	SEM	103.9	3.22	1.70
3	Mucuna Preta	68	SEM	98.2	3.23	1.53
3	Crotalária Spectabilis	89	COM	120.9	4.20	2.39
3	Crotalária Spectabilis	89	COM	135.7	4.27	2.00
3	Crotalária Spectabilis	89	SEM	112.5	3.60	2.26
3	Crotalária Spectabilis	89	SEM	104.8	3.52	3.27
3	Feijão Guandu	89	COM	106.2	3.33	1.40
3	Feijão Guandu	89	COM	101.2	3.40	3.25
3	Feijão Guandu	89	SEM	83.7	2.97	3.75
3	Feijão Guandu	89	SEM	95.7	3.20	2.40

3	Java	89	COM	161.9	3.61	0.00
3	Java	89	COM	124.7	3.53	0.78
3	Java	89	SEM	117.9	2.74	0.54
3	Java	89	SEM	122.5	2.71	0.18
3	Estilosantes	89	COM	113.6	3.45	0.03
3	Estilosantes	89	COM	120.4	3.48	0.14
3	Estilosantes	89	SEM	113.7	2.91	0.52
3	Estilosantes	89	SEM	120.5	2.73	1.09
3	Mucuna Preta	89	COM	112.2	3.29	0.03
3	Mucuna Preta	89	COM	111.6	2.93	0.00
3	Mucuna Preta	89	SEM	99.2	3.38	2.55
3	Mucuna Preta	89	SEM	90.9	3.39	2.63
3	Crotalária Spectabilis	110	COM	123.8	2.82	0.00
3	Crotalária Spectabilis	110	COM	113.3	2.82	0.00
3	Crotalária Spectabilis	110	SEM	99.8	2.94	2.45
3	Crotalária Spectabilis	110	SEM	104.5	3.03	3.19
3	Feijão Guandu	110	COM	101.0	2.45	0.00
3	Feijão Guandu	110	COM	113.1	2.43	0.00
3	Feijão Guandu	110	SEM	84.5	2.52	5.25
3	Feijão Guandu	110	SEM	82.8	2.53	3.75
3	Java	110	COM	182.9	3.08	0.00
3	Java	110	COM	138.9	3.30	0.00
3	Java	110	SEM	116.8	3.06	1.32
3	Java	110	SEM	122.3	3.60	1.06
3	Estilosantes	110	COM	150.2	3.09	0.00
3	Estilosantes	110	COM	144.3	2.98	0.00
3	Estilosantes	110	SEM	134.6	3.41	1.10
3	Estilosantes	110	SEM	126.8	3.24	0.89
3	Mucuna Preta	110	COM	116.8	2.98	0.00
3	Mucuna Preta	110	COM	121.8	2.88	0.00
3	Mucuna Preta	110	SEM	112.5	3.59	1.09
3	Mucuna Preta	110	SEM	115.8	3.47	1.08
