

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

Christina Manfio Christmann

**IMPACTO DA INCLUSÃO DE TANINOS E TRATAMENTO TÉRMICO  
DO FARELO DE SOJA SOBRE SUA FERMENTAÇÃO E DIGESTÃO *IN*  
*VITRO***

Santa Maria, RS  
2021

**Christina Manfio Christmann**

**IMPACTO DA INCLUSÃO DE TANINOS E TRATAMENTO TÉRMICO DO  
FARELO DE SOJA SOBRE SUA FERMENTAÇÃO E DIGESTÃO *IN VITRO***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Zootecnia**.

Orientador: Dr. Gilberto Vilmar Kozloski

Santa Maria, RS  
2021

Christmann, Christina Manfio  
IMPACTO DA INCLUSÃO DE TANINOS E TRATAMENTO TÉRMICO DO  
FARELO DE SOJA SOBRE SUA FERMENTAÇÃO E DIGESTÃO IN VITRO  
/ Christina Manfio Christmann.- 2021.  
34 p.; 30 cm

Orientador: Gilberto Vilmar Kozloski  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós  
Graduação em Zootecnia, RS, 2021

1. Acacia mearnsii 2. Aditivo 3. Fermentação Ruminant  
4. Processamento térmico 5. Ruminantes I. Kozloski,  
Gilberto Vilmar II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

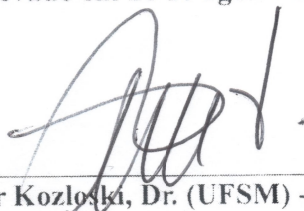
Declaro, CHRISTINA MANFIO CHRISTMANN, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Christina Manfio Christmann

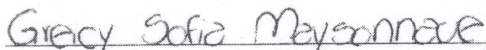
**IMPACTO DA INCLUSÃO DE TANINOS E TRATAMENTO TÉRMICO DO  
FARELO DE SOJA SOBRE SUA FERMENTAÇÃO E DIGESTÃO *IN VITRO***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Zootecnia**.

Aprovado em 26 de agosto de 2021



Gilberto Vilmar Kozloski, Dr. (UFSM) - Videoconferência  
(Presidente/Orientador)



Greicy Sofia Maysonnave, Dra. (SETA S.A.) - Videoconferência



Henrique Mendonça Nunes Ribeiro Filho, Dr. (UDESC) - Videoconferência

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus;

Aos meus pais, Adão e Marlise e a minha irmã, Christiane, pelo apoio e incentivo;

Aos meus padrinhos, Vergílio e Marilete, pelo acolhimento e carinho;

Ao professor Gilberto Kozloski, pela orientação e conhecimentos transmitidos;

Aos colegas da pós-graduação Camilla, Cláudio, Dérick, Gabriela, Letícia e Mariana, pela troca, incentivo nos momentos difíceis, paciência e amizade;

Aos técnicos de laboratório, Clóvis, Giseli, Renata e Vitor, pelo auxílio nas atividades laboratoriais;

Aos estagiários, Camila, Jailson, Luiz Eduardo, Mateus, Tainan e Thaís, pelo auxílio no experimento e parceria;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos;

Aos meus amigos, sempre incentivadores, pelo apoio, compreensão, acolhimento e ajuda durante esse período;

A minha psicóloga, Thais, de extrema importância nessa etapa desafiadora.

*“Compartilhar conhecimento é o mesmo que disseminar desenvolvimento”*

## RESUMO

### IMPACTO DA INCLUSÃO DE TANINOS E TRATAMENTO TÉRMICO DO FARELO DE SOJA SOBRE SUA FERMENTAÇÃO E DIGESTÃO *IN VITRO*

AUTOR: Christina Manfio Christmann  
ORIENTADOR: Gilberto Vilmar Kozloski

Na nutrição de ruminantes, a utilização de fontes proteicas com baixa degradabilidade ruminal constitui uma das formas de aumentar a eficiência do uso do nitrogênio alimentar e o aporte de proteína metabolizável para o animal. Dentre as estratégias promissoras para reduzir a degradação proteica ruminal dos alimentos usualmente utilizados, estão o processamento térmico de alimentos e o uso de extratos taníferos vegetais. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de níveis de inclusão de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* (SETA S/A, Estância Velha/RS) no farelo de soja associado a diferentes tratamentos térmicos sobre parâmetros de fermentação e digestão *in vitro*. Foram testados três níveis de inclusão do extrato tanífero (0, 2,5 ou 5,0% da matéria seca) no farelo de soja, três temperaturas de processamento (ambiente (Controle), 110°C ou 120°C) e três tempos de tratamento térmico (sem tratamento térmico (Controle), 15 ou 30 minutos), em um delineamento fatorial 3×3×3, com umidade da mistura fixada em 20%. O material foi incubado *in vitro* e os parâmetros analisados foram produção de gases e concentração de N amoniacal em 24, 36 e 48 horas de incubação. Adicionalmente, as amostras foram incubadas *in situ* durante 16 horas e posteriormente o resíduo foi submetido à hidrólise *in vitro* com proteases com o objetivo de medir a degradabilidade ruminal (DR), a digestibilidade intestinal (DI) e a digestibilidade total (DT) dos compostos nitrogenados. Foram realizados três ensaios para cada variável sendo cada ensaio considerado uma replicata. Não houve interação significativa entre taninos e temperatura para as variáveis. Após 48 horas de fermentação *in vitro* a produção de gases foi em média 5 e 9,1% menor pela inclusão de 2,5 e 5,0% de extrato tanífero, respectivamente. O tratamento térmico a 110°C resultou em produção de gases 2,5% maior comparado à temperatura ambiente ou 120°C, enquanto que o tempo de exposição ao tratamento térmico não interferiu significativamente no volume de gases. A liberação de amônia no meio de incubação foi reduzida 24,5% pela adição de 5% de extrato tanífero e 9,2% pelo tratamento térmico a 120°C. O tempo de tratamento térmico ou o tratamento a 110°C, assim como a adição de 2,5% de extrato tanífero no farelo de soja, não afetaram a liberação de amônia no meio de incubação. A degradabilidade ruminal do farelo de soja não foi afetada pela adição de taninos e nem pelo tempo de tratamento térmico, mas reduziu 16,3% pelo tratamento a 120°C. Quanto a digestibilidade intestinal da PNDR, a inclusão de taninos afetou negativamente, reduzindo-a. Não houve efeito de tempo ou temperatura. A digestibilidade total do N foi afetada apenas pela inclusão de taninos, diminuindo-a. O tratamento com 5% de tanino, a 120°C durante 30 minutos, tem maior efeito na redução da produção de gás e concentração de amônia, resulta em menor DR e mínimo impacto na DI e DT.

Palavras-chave: *Acacia mearnsii*. Aditivo. Fermentação Ruminal. Amônia. Ruminantes. Taninos.

## ABSTRACT

### IMPACT OF TANNIN INCLUSION AND HEAT TREATMENT OF SOYBEAN MEAL ON ITS *IN VITRO* FERMENTATION AND DIGESTION

AUTHOR: Christina Manfio Christmann

ADVISOR: Gilberto Vilmar Kozloski

In ruminant nutrition, the use of protein sources with low ruminal degradability is one of the ways to increase the efficiency of the use of dietary nitrogen and the supply of metabolizable protein to the animal. Among the promising strategies to reduce ruminal protein degradation of the foods usually used, are the thermal processing of food and the use of vegetable tannin extracts. This study aimed to evaluate the effect of inclusion levels of *Acácia mearnsii* tannin extract (SETA S/A, Estância Velha/RS) in soybean meal associated with different heat treatments on fermentation and *in vitro* digestion parameters. Three levels of inclusion of the tannin extract (0, 2.5 or 5.0% of dry matter) were tested in the soybean meal, three processing temperatures (environment (Control), 110°C or 120°C) and three times of heat treatment (without thermal treatment (Control), 15 or 30 minutes), in a 3×3×3 factorial design, with the moisture content of the mixture fixed at 20%. The material was incubated *in vitro* and the parameters analyzed were gas production and ammoniacal N concentration at 24, 36 and 48 hours of incubation. Additionally, the samples were incubated *in situ* for 16 hours and then the residue was subjected to *in vitro* hydrolysis with proteases in order to measure the ruminal degradability (DR), intestinal digestibility (DI) and total digestibility (DT) of the compounds nitrogenous. Three tests were carried out for each variable, each test being considered a replicate. There was no significant interaction between tannins and temperature for the variables. After 48 hours of *in vitro* fermentation, gas production was on average 2.8 and 7.0% lower by the inclusion of 2.5 and 5.0% of tannin extract, respectively. The heat treatment at 110°C resulted in gas production 3.5% higher compared to room temperature or 120°C, while the time of exposure to the heat treatment did not significantly affect the volume of gases. Ammonia release in the incubation medium was reduced 22% by the addition of 5% tannin extract and 8% by heat treatment at 120°C. The heat treatment time or the treatment at 110°C, as well as the addition of 2.5% tannin extract in soybean meal, did not affect the ammonia release in the incubation medium. The ruminal degradability of soybean meal was not affected by the addition of tannins or by the heat treatment time, but reduced 15% by the treatment at 120°C. As for PNDR intestinal digestibility, the inclusion of tannins affected negatively, reducing it. There was no effect of time or temperature. The total N digestibility was affected only by the inclusion of tannins, decreasing it. Treatment with 5% tannin at 120°C for 30 minutes has greater effect on reducing gas production and ammonia concentration, resulting in lower DR and minimal impact on DI and DT.

Keywords: *Acácia mearnsii*. Additive. Rumen fermentation. Ammonia. Ruminants. Tannins.



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito da inclusão de taninos no farelo de soja convencional sobre a produção de gases <i>in vitro</i> . .....	22
Tabela 2 – Efeito da temperatura de processamento do farelo de soja sobre a produção de gases <i>in vitro</i> . .....	23
Tabela 3 – Efeito do tempo de processamento térmico do farelo de soja sobre a produção de gases <i>in vitro</i> . .....	23
Tabela 4 – Efeito da inclusão de taninos no farelo de soja convencional sobre a concentração de amônia no meio de incubação <i>in vitro</i> . .....	23
Tabela 5 – Efeito da temperatura de processamento do farelo de soja sobre a concentração de amônia no meio de incubação <i>in vitro</i> . .....	23
Tabela 6 – Efeito do tempo de processamento térmico do farelo de soja sobre a concentração de amônia no meio de incubação <i>in vitro</i> . .....	24
Tabela 7 – Efeito da inclusão de taninos no farelo de soja, sobre a degradabilidade ruminal <i>in situ</i> (DR), digestibilidade intestinal (DI) <i>in vitro</i> e digestibilidade total (DT) dos compostos nitrogenados. ....	24
Tabela 8 – Efeito da temperatura de processamento do farelo de soja, sobre a degradabilidade ruminal <i>in situ</i> (DR), digestibilidade intestinal (DI) <i>in vitro</i> e digestibilidade total (DT) dos compostos nitrogenados. ....	24
Tabela 9 – Efeito do tempo de processamento térmico do farelo de soja, sobre a degradabilidade ruminal <i>in situ</i> (DR), digestibilidade intestinal (DI) <i>in vitro</i> e digestibilidade total (DT) dos compostos nitrogenados. ....	25

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CH <sub>4</sub>	Metano
CN	Compostos nitrogenados
MS	Matéria seca
N	Nitrogênio
NH <sub>3</sub>	Amônia
N-NH <sub>3</sub>	Nitrogênio amoniacal
NNP	Nitrogênio não-proteico
PB	Proteína bruta
PDR	Proteína degradável no rúmen
PM	Proteína metabolizável
Pmic	Proteína microbiana
PNDR	Proteína não degradável no rúmen
TC	Taninos condensados
TH	Taninos hidrolisáveis

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>10</b>
2.1	DEGRADAÇÃO RUMINAL DA PROTEÍNA.....	10
2.2	MODULAÇÃO DA DEGRADAÇÃO RUMINAL.....	11
2.3	TANINOS .....	12
2.4	PROCESSAMENTO TÉRMICO DOS ALIMENTOS .....	16
<b>3</b>	<b>HIPÓTESES .....</b>	<b>18</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>22</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>26</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>28</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>29</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Em se tratando de nutrição de ruminantes e eficiência dos sistemas produtivos, um dos desafios é ofertar a quantidade adequada de nutrientes aos animais, em termos de proteína e energia metabolizável, de modo a suprir a sua demanda, com as menores perdas possíveis e diminuindo o impacto ambiental da atividade. A proteína metabolizável (PM) é representada pela soma da proteína não degradável no rúmen (PNDR) com a proteína microbiana ruminal (Pmic) (PATRA; SAXENA, 2011).

O manejo da composição da dieta é uma estratégia, que permite, dentre outros, aumentar a eficiência do uso do nitrogênio alimentar (MEZZOMO et al., 2017). As dietas utilizadas nos sistemas brasileiros de produção de carne e leite usualmente contêm alta proporção de proteína degradável no rúmen (PDR), o que limita a oferta de aminoácidos e resulta em significativas perdas de nitrogênio urinário, contribuindo no aumento da emissão dos gases de efeito estufa. A utilização de fontes proteicas com baixa degradabilidade ruminal – como o farelo de algodão e o farelo de glúten de milho, constitui uma das formas para aumentar o aporte de PM (DALLASTRA et al., 2018; NEUMANN et al., 2020). Porém, essas fontes são pouco acessíveis, tanto em termos de disponibilidade quanto em termos econômicos.

Dentre as estratégias promissoras para reduzir a degradação proteica ruminal dos alimentos usualmente utilizados, existe o tratamento térmico de alimentos e o uso de extratos taníferos vegetais na dieta. De acordo com Reed (1995), há um consenso geral de que os taninos diminuem a degradação da proteína no rúmen através dos complexos formados. Isso é constatado em diversos estudos (MAKKAR, 2003; KOZLOSKI et al., 2012; ÁVILA et al., 2015; ORLANDI et al., 2015; MEZZOMO et al., 2015; MEZZOMO et al., 2017).

Além disso, o processamento térmico dos alimentos também parece ser uma forma eficaz de reduzir a degradabilidade ruminal da proteína, modificando a estrutura dos alimentos e desnaturando a proteína, tornando mais resistente ao ataque enzimático, conforme Camire et al. (1990). Vários estudos constataram essa redução (NOWAK et al., 2005; SOLANAS et al., 2008; GIALLONGO et al., 2015; BRAND; JORDAAN, 2020), buscando além de entender o efeito, determinar a temperatura ótima de processamento.

Entretanto, devido à elevada oscilação das condições dietéticas ao longo do tempo em um mesmo sistema produtivo, ou entre sistemas produtivos, os resultados obtidos em estudos prévios não possibilitam definir uma recomendação dietética definitiva destas variáveis. Além disso, não se sabe o impacto dessas estratégias sobre a digestibilidade intestinal dos compostos nitrogenados (CN) e, portanto, no aporte de aminoácidos para os animais. O uso de extratos

taníferos contendo quantidade definida de taninos têm sido utilizados para padronizar dose, mas mesmo esses extratos mais padronizados, quando fornecidos misturados à dieta total, apresentam efeitos ambíguos sobre o desempenho de ruminantes (GERLACH et al., 2018). De outro modo, em vez de usar tanino como aditivo na dieta total, de composição química complexa e variada, a complexação prévia dos taninos com ingredientes específicos relevantes poderia ser uma alternativa de controlar e prever seu impacto na digestão.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo obter um farelo de soja tanificado com menor degradabilidade ruminal que o farelo de soja original, e com potencial de aumentar a oferta de proteína metabolizável no intestino delgado. Para tal, foi testado o efeito de níveis de inclusão de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* associado a diferentes tratamentos térmicos do farelo de soja sobre parâmetros de sua fermentação e digestão *in vitro*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 DEGRADAÇÃO RUMINAL DA PROTEÍNA

As proteínas são os principais compostos nitrogenados (CN) na alimentação dos ruminantes e sua concentração e degradação varia entre os diversos tipos de alimentos (KOZLOSKI, 2011). A proteína dietética divide-se em PDR e PNDR, sendo a PDR composta por proteína verdadeira e nitrogênio não proteico (NNP) (BACH et al., 2005). A PDR é degradada a peptídeos e aminoácidos e esses podem ser desaminados ou incorporados diretamente a Pmic. A PNDR e a Pmic compõem a proteína metabolizável (PM), que representa os nutrientes que vão ser efetivamente absorvidos pelo animal, evidenciando a importância da quantidade de proteína que flui do rúmen para a produtividade dos animais (PATRA; SAXENA, 2011).

A maior parte da proteína ingerida pelo animal, denominada proteína bruta (PB), sofre intensa degradação ruminal devido a capacidade de fermentação das bactérias ruminais (MEZZOMO et al., 2015), em sinergia com fungos e protozoários, que estão presentes em menor quantidade no rúmen. A degradação das proteínas inicia extracelularmente, uma vez que são estruturas complexas de alto peso molecular, indisponíveis às células bacterianas ruminais. Então, essas moléculas são previamente degradadas em estruturas menores, que entram na célula para serem metabolizadas. Assim, as proteínas serão degradadas a oligopeptídeos e a aminoácidos, através de hidrólise catalisada por enzimas (proteases) (KOZLOSKI, 2011).

De forma mais específica, a degradação ocorre através da aderência e colonização das partículas pelas células bacterianas, o que permite a aproximação das enzimas aos substratos. Essa aderência não é específica no início, ocorrendo através do glicocalix e se torna específica e induzida com o passar do tempo, através de ligantes ou adesinas, que reconhecem receptores na partícula. Há proliferação celular e formação de colônias bacterianas (biofilmes) sobre essas partículas de alimentos (MCALLISTER et al., 1994; KOZLOSKI, 2011). Alguns fatores importantes que interferem na degradação são o substrato que está sendo fermentado, o tipo de proteína, o pH ruminal, a população microbiana predominante, as interações entre nutrientes e interações entre microrganismos (BACH et al., 2005).

Uma vez degradadas em moléculas menores, a célula bacteriana capta esses nutrientes liberados pela hidrólise, ou seja, aminoácidos e pequenos peptídeos. Os aminoácidos podem ser incorporados diretamente na Pmic ou desaminados, liberando amônia (NH<sub>3</sub>). O destino dentro da célula depende da energia disponível, o que está relacionado a quantidade de matéria

orgânica fermentável no rúmen. Ou seja, a disponibilidade de nitrogênio (N) é essencial para os microrganismos sintetizarem proteína, porém, quando a energia é insuficiente ou quando a taxa de degradação dos peptídeos excede a capacidade de assimilação dos microrganismos, há excessiva produção de  $\text{NH}_3$ , que é captada pelo sistema sanguíneo, transportada ao fígado, convertida em uréia, parte dela é excretada na urina e leite e a outra parte é reciclada e retorna para o rúmen (WALLACE, 1996).

Se faltar  $\text{NH}_3$  no rúmen, as bactérias diminuem sua taxa de crescimento, o que acarreta em menor atividade fermentativa e queda no consumo de matéria seca pelos animais. Porém, o comum em animais alimentados com forrageiras ricas em proteína solúvel ou suplementados com concentrados proteicos que usualmente tem alta degradabilidade ruminal, é que haja um excesso de proteína, representando uma perda para o sistema e impactando negativamente no meio ambiente.

Em suma, uma vez que o valor proteico dos alimentos para ruminantes depende da quantidade de proteína que chega ao intestino e de sua digestibilidade e do valor biológico dos aminoácidos absorvidos (SOLANAS et al., 2008), apesar da alta PB das dietas, há uma deficiência em PM, não atendendo a demanda do animal e, portanto, o conhecimento sobre a degradação da proteína dos alimentos no rúmen e as estratégias para modular essa degradação é fundamental. Além disso, evitar perdas excessivas de N na forma de uréia pela urina é relevante a medida que se reduz custos de produção e impactos causados ao meio ambiente.

## 2.2 MODULAÇÃO DA DEGRADAÇÃO RUMINAL

A manipulação do ecossistema microbiano ruminal visando aumentar a eficiência do metabolismo, melhorar o desempenho animal e reduzir a produção de metano ( $\text{CH}_4$ ) e a excreção de N por ruminantes é um dos objetivos mais relevantes no que se refere a produção animal (PATRA; SAXENA, 2011). A utilização de fontes proteicas com baixa degradabilidade ruminal é uma abordagem que possibilita aumentar a quantidade de PM (DALLASTRA et al., 2018). Reduzir a degradabilidade ruminal de fontes de proteína usualmente utilizadas sem afetar sua digestibilidade intestinal é outra abordagem que está entre os atuais desafios da pesquisa (ORLANDI et al., 2015).

O farelo de soja é a fonte de proteína mais utilizada na alimentação de ruminantes, sendo um dos principais concentrados proteicos vegetais disponíveis no mercado brasileiro, possuindo, no entanto, alta degradabilidade ruminal (em torno de 70%). É um dos componentes dietéticos que mais encarece o sistema. Para aumentar o aporte de PM, é desejável uma menor

degradação da proteína ruminal, sem que isso afete a digestão intestinal da mesma (NEUMANN et al., 2020). Isso porque o excesso de PDR aumenta a excreção de nitrogênio urinário, sem aumentar o aporte de PM para o animal (DALLASTRA et al., 2018).

As fontes de proteína de origem animal possuem baixa degradabilidade ruminal, mas seu uso na alimentação de ruminantes está proibido no Brasil, de acordo com a Instrução Normativa nº 8 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (24/03/2004). Algumas fontes de proteína de origem vegetal, de baixa degradação ruminal, que podem ser utilizadas são o farelo de algodão e o farelo de glúten de milho (protenose), porém, essas fontes são de alto custo e baixa disponibilidade no mercado nacional (DALLASTRA et al., 2018).

Dentre as estratégias utilizadas para reduzir a degradabilidade ruminal da proteína, está o de submeter estes concentrados a tratamento pelo calor, que desnatura a proteína, tornando-a mais resistente ao ataque enzimático (CAMIRE et al., 1990). Além disso, há aditivos como os ionóforos, muito utilizados na nutrição, que atuam sobre microrganismos ruminais e visam melhorar a utilização de nutrientes, existindo, no entanto, uma preocupação quanto a presença de resíduos nos produtos de origem animal, o que estimula a busca por alternativas naturais (PATRA; SAXENA, 2011). Assim, o uso de plantas ou extratos vegetais que contém óleos essenciais, taninos, entre outros, como moduladores da fermentação ruminal também tem sido pesquisado, principalmente buscando mitigar as emissões de CH<sub>4</sub>, obtendo resultados promissores conforme McGrath et al. (2018).

### 2.3 TANINOS

Os taninos são compostos secundários do metabolismo das plantas, com conhecida habilidade de diminuir a proteólise natural, reconhecidos como agentes antimicrobianos que atuam na população de bactérias, protozoários e fungos (NEUMANN et al., 2020). Os compostos fenólicos são os principais componentes ativos. Esses compostos têm sido amplamente utilizados por seu efeito antimicrobiano, modulando a fermentação ruminal.

Antes considerados compostos antinutricionais – em virtude dos seus efeitos adversos no consumo de matéria seca e utilização de nutrientes, os taninos passaram a ser estudados como moduladores da fermentação ruminal para melhorarem o aproveitamento da proteína (PATRA; SAXENA, 2011). Em revisão sobre as estratégias na alimentação de ruminantes, McGrath et al. (2018), destacam o potencial dos extratos vegetais para melhorar a utilização de nutrientes em alternativa aos antibióticos.



Além de serem capazes de modular o ambiente ruminal (SALLAM et al., 2010; RIRA et al., 2015), plantas e extratos de plantas com altas concentrações parecem ser candidatos potenciais para redução da produção de CH<sub>4</sub>, o que é muito relevante atualmente (PATRA; SAXENA, 2011; MOUMEN et al., 2016).

Enquanto metabólitos secundários de plantas, os taninos são produzidos para defesa celular (atividade antimicrobiana e antioxidante), sendo encontrados, portanto, em abundância na natureza. Presentes em árvores e arbustos tropicais, bem como em leguminosas forrageiras, dão origem aos extratos contendo quantidade definida de taninos. Originalmente, eram usados na indústria na produção de couro, no curtimento de peles de animais. Atualmente, o extrato vem sendo explorado como aditivo alimentar na nutrição de ruminantes. Em virtude dos seus diversos usos, esse extrato possui grande importância para a economia e a para a indústria.

O tanino poder ser extraído, dentre outros, da casca da árvore popularmente conhecida como Acácia negra (*Acácia mearnsii*). O plantio florestal de *Acácia mearnsii* é um dos mais expressivos no Brasil, sendo explorado por um grande número de produtores rurais e empresas. A Acácia é a terceira espécie florestal mais plantada no país, superada apenas por espécies dos gêneros *Eucalyptus* e *Pinus*. A maior unidade de produção de extratos vegetais tanantes do mundo está localizada no sul do Brasil (SBS, 2008).

Os taninos fazem parte do grande grupo de compostos fenólicos, com peso molecular e complexidade variável, que se distinguem de outros polifenóis por sua capacidade de formar complexos e precipitar proteínas, reduzindo sua degradação no rúmen (MAKKAR, 2003; MEZZOMO et al., 2015). A grande quantidade de grupos hidroxila fenólicos é o que possibilita a formação desses complexos principalmente com proteínas e em menor proporção com carboidratos (MAKKAR, 2003). A formação de complexos com proteínas salivares é o que causa a sensação de adstringência característica dos taninos, responsável por diminuir sua palatabilidade impactando negativamente no consumo de matéria seca (CMS) (PATRA; SAXENA, 2011; NAUMANN et al., 2017) em níveis altos de inclusão. Além disso, parece haver uma reação direta com receptores gustativos.

Usualmente, os taninos são divididos em dois grupos de acordo com a sua resistência a hidrólise, que são: taninos hidrolisáveis (TH) e taninos condensados (TC) (PATRA; SAXENA, 2011). Os THs são mais solúveis em água e consistem de um núcleo poliol, como a glicose, parcialmente ou totalmente esterificados com um grupo fenólico, ou seja, ácido gálico (galotaninos) ou ácido elágico (elagiotaninos). O composto modelo é o ácido tânico (C<sub>76</sub>H<sub>52</sub>O<sub>46</sub> – p-penta-O-galloyl-D-glucose) e eles são mais suscetíveis a hidrólise. Os TCs incluem oligômeros e polímeros compostos por unidades de flavan-3-ols (proantocianidinas) como

catequina, epicatequina e galocatequina. São grandes polímeros de flavonoides, com alto peso molecular, geralmente maior que dos THs.

THs e THs podem estar presentes na mesma planta, mas a composição varia e um tipo específico podem predominar. Os efeitos desses compostos são altamente variáveis e dependem da sua natureza, estrutura química, concentração, espécie e estado fisiológico do animal que está consumindo, composição da dieta, forma de administração, entre outros (MAKKAR, 2003; PILUZZA et al., 2014; PATRA; SAXENA, 2011). Mesmo nos extratos mais padronizados, os efeitos sobre o desempenho de ruminantes são ambíguos, isso porque são fornecidos misturados a dieta total, de composição química complexa e variada (GERLACH et al., 2018). Além disso, essa interação com outros constituintes da dieta é particularmente relevante no Brasil, devido à alta variabilidade de dietas entre sistemas e ao longo do tempo em um mesmo sistema.

Os taninos possuem uma maior afinidade pelas proteínas, devido a ligações entre o O<sub>2</sub> do grupo carboxila e grupos fenólicos dos taninos. A formação de complexos com proteínas, predominantemente por meio de ligações de hidrogênio, é um dos mecanismos pelo qual o uso de taninos diminui a proteólise ruminal. Outro mecanismo é pela inibição do crescimento de determinadas bactérias. Essa é a forma pela qual, provavelmente, os taninos reduzem a produção de CH<sub>4</sub> (PATRA; SAXENA, 2011).

A redução da produção de CH<sub>4</sub> é constatada em diversos estudos, como no desenvolvido por Carulla et al. (2005), com cordeiros em pastagem de azevém suplementados com 4,1% de taninos na MS (2,5% de TC), onde a liberação de metano diminuiu em 13% quando os taninos foram adicionados à dieta. Ainda conforme os autores, os mecanismos não são bem elucidados, sugerindo-se que a redução da metanogênese foi em virtude da menor degradação da fibra. Outros resultados desse estudo foram aumento no consumo de forragem e queda na digestibilidade da matéria orgânica (MO). Além disso, constataram que a concentração de amônia no líquido ruminal diminuiu 9% em média nos animais suplementados com taninos, sugerindo que menos proteína foi degradada no rúmen.

Esses complexos formados entre taninos e proteínas são estáveis no pH ruminal, mas se dissociam quando o pH cai abaixo de 3,5 (como no abomaso, pH 2,5 – 3) ou é maior que 8 (condição do intestino) (SILANIKOVE et al., 2001), permitindo o aproveitamento da proteína ao longo do trato gastrointestinal, porém, pouco se sabe sobre esse processo, uma vez que se os taninos diferem em sua capacidade de se ligar as proteínas no pH ruminal, a reversibilidade desse processo pós-ruminal também pode diferir (MAKKAR, 2003).

Utilizando o sistema *in vitro* gases, que estima a degradação da matéria orgânica pela quantidade de gases liberados pela fermentação da amostra, Sallam et al. (2010) avaliaram a

bioatividade de taninos de arbustos tropicais, através do uso de agente complexante, o polietilenoglicol (PEG), que inibe a ação dos taninos. Sem a adição de PEG, a produção de gases foi menor para acácia (49,2 ml/g MS) e maior para alfafa (136,4 ml/g MS). Quando o PEG foi adicionado, houve aumento de 87,4% da produção de gases da acácia, mas não da alfafa.

Kozloski et al. (2012) conduziram ensaio de digestibilidade com ovinos alimentados com azevém, infundindo ruminalmente extrato tanífero de acácia nas doses de 0, 2, 4 e 6% da MS, constatando redução do consumo e da digestibilidade da forragem. Também observaram diminuição linear da degradabilidade ruminal do N dietético com o aumento da inclusão de taninos. O efeito do extrato tanífero tanto no consumo de MS quanto na digestibilidade parece estar fortemente correlacionado com a concentração do extrato na ração, conforme Dallastra et al. (2018). Orlandi et al. (2015) avaliaram a inclusão de 0,9, 1,8 e 2,7% do mesmo extrato na dieta de novilhos alimentados com alta quantidade de concentrado, constatando diminuição linear da concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) do fluido ruminal.

Posteriormente, Ávila et al. (2015), testaram a inclusão de 1,5% da MS do extrato tanífero na dieta de novilhos recebendo ração totalmente misturada e duas fontes de proteína – farelo de canola e farelo de soja, constatando redução da degradabilidade dos CN, da digestibilidade aparente e verdadeira da MO, além de menor concentração de N-NH<sub>3</sub> no fluido ruminal quando o farelo de canola foi a fonte utilizada. Porém, a digestibilidade total desses compostos também diminuiu, indicando que a extensão da digestão da MO ao longo do intestino não compensou completamente a redução da digestão no rúmen. Grainger et al. (2009) observaram que um extrato semelhante oferecido a uma taxa de 1,9% da MS para vacas leiteiras em pastagem de azevém diminuiu consumo e digestibilidade da MO.

Mezzomo et al. (2015), desenvolveram experimentos *in vitro* e *in situ*, constatando aumento da PNDR para alguns alimentos proteicos ao usar misturas de TC e TH, incluindo 0, 1, 2,5 e 5% da MS. Dos alimentos avaliados, o farelo de soja apresentou a maior quantidade de PNDR. Em experimento posterior, Mezzomo et al. (2017) enfatizaram que o uso de farelo de soja complexado com taninos pode ser uma estratégia para aumento da PNDR dietética e conseqüentemente, melhora da eficiência metabólica de utilização das proteínas. O experimento testou níveis de substituição do farelo de soja (0, 33, 66 e 100%) pelo farelo de soja previamente tratado com taninos (2,5% de inclusão na MS).

Em experimento, Orlandi et al. (2015) constataram redução linear da degradabilidade ruminal do N para inclusão de 0,9, 1,8 e 2,7% do extrato tanífero na dieta de novilhos alimentados com alta quantidade de concentrado. Em estudo mais recente, Dallastra et al.

(2018), avaliaram o efeito do extrato tanífero de Acácia em ovelhas lactantes recebendo ração totalmente misturada, na concentração de 2% da MS, não identificando impacto sobre a digestibilidade aparente do N.

Min et al. (2003) afirmam que são diversos e pouco elucidados os mecanismos pelos quais os taninos modificam a digestão e a utilização dos CN em ruminantes. De acordo com os autores, os taninos têm a capacidade de reduzir a degradação de proteínas ruminal, sem reduzir a quantidade de proteína microbiana, aumentando o fluxo de proteína duodenal quando fornecidos em doses moderadas de 2 a 4,5% da MS.

Outro resultado relatado na literatura é a mudança do sítio de excreção do N da urina para as fezes (CARULLA et al., 2005; ÁVILA et al., 2015; ORLANDI et al., 2015;), importante do ponto de vista ambiental, contribuindo para a redução na emissão de óxido nitroso pela urina.

Conforme descrito, os extratos têm sido utilizados para padronizar dose e prever resultados (GERLACH et al., 2018). Ainda assim, devido a sua interação com outros constituintes alimentares, é difícil prever a dinâmica digestiva em cada uma das situações dietéticas. Melhorar o potencial nutricional de alimentos como o farelo de soja através da adição de taninos pode se traduzir em um incremento na comercialização de rações, ou seja, na agregação de valor, também ao produtor dessa matéria prima, bem como pode aumentar a eficiência dos rebanhos, incrementando a renda de produtores.

## 2.4 PROCESSAMENTO TÉRMICO DOS ALIMENTOS

Como citado anteriormente, uma das formas de reduzir a degradabilidade ruminal da proteína, é submeter os alimentos ao processamento térmico, uma vez que o tratamento pelo calor desnatura a proteína, tornando-a mais resistente ao ataque enzimático (CAMIRE et al., 1990).

A extrusão é uma forma de processamento térmico, sendo um tipo de processamento em um reator de fluxo contínuo que envolve alta temperatura, umidade e pressão (processo HTST – *High Temperature, Short Time*) (CAMIRE et al., 1990). De acordo com experimento conduzido por Solanas et al. (2008), a extrusão é capaz de reduzir a degradabilidade ruminal tanto do grão de soja quanto do farelo de soja, além de aumentar a digestibilidade intestinal. No seu estudo, o efeito foi menor para o farelo de soja, provavelmente porque já passou por tratamento térmico no processo de extração de óleo e secagem. Essa redução, permite um uso mais eficiente dos alimentos com alta proporção de PDR (BRAND; JORDAAN, 2020).

Nowak et al. (2005), afirmam que os tratamentos térmicos parecem inclusive ser mais eficazes do que os químicos para proteger a proteína da degradação ruminal. Os autores realizaram experimento *in situ* com soja crua e extrusada a 145, 155 e 165°C, constatando que a extrusão da soja em todas as temperaturas diminuiu a degradabilidade efetiva da proteína. Para digestibilidade intestinal, os valores da soja extrusada foram maiores, mas as diferenças observadas entre os tratamentos não foram significativas. Apesar de não determinar nenhuma temperatura ótima de extrusão, os estudos indicam que a maior temperatura – 165°C, foi eficaz na proteção da proteína contra a degradação microbiana ruminal.

Em experimento conduzido por Stern et al. (1985), o tratamento térmico da soja por extrusão a 149 ° C diminuiu a degradabilidade ruminal da proteína em comparação com a soja não tratada, enquanto a extrusão a uma temperatura mais baixa (132 ° C) não foi benéfica para diminuir a degradabilidade ruminal da proteína.

Conforme Van Soest (1987), frações rapidamente degradáveis da proteína desnaturam com calor, se tornando frações intermediárias ou lentamente degradáveis. Frações que já são lentamente degradáveis responderiam a tratamentos pelo calor com temperaturas mais elevadas e se tornariam indisponíveis. Ainda de acordo com o autor, o resultado da ação da temperatura depende de vários fatores, como umidade do alimento e conteúdo de carboidrato e de proteína e, portanto, parâmetros ótimos de processamento térmico variam de uma proteína dietética para outra.

### **3 HIPÓTESES**

Existe um nível de inclusão de extrato tanífero vegetal e uma temperatura de processamento térmico do farelo de soja capaz de diminuir a degradabilidade ruminal da proteína, aumentando ou não interferindo na digestibilidade intestinal da mesma.

#### 4 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Bromatologia e Nutrição de Ruminantes (LABRUMEN), pertencente ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), localizado em Santa Maria, RS, Brasil.

A fonte proteica utilizada foi o farelo de soja, obtido no comércio local, que continha em torno de 47% de PB, determinado pelo método Kjeldahl. O extrato utilizado foi o extrato tanífero de *Acacia mearnsii* (SETA S.A., Estância Velha/RS/Brasil), com concentração de 718 g/kg de fenóis totais, 697 g/kg de taninos totais e 122 g/kg de taninos condensados. Assumiu-se que a diferença entre taninos totais e condensados é representada por taninos hidrolisáveis. Fenóis totais e taninos totais foram analisados por espectrofotometria, método de Folin-Ciocalteu, após extração com acetona aquosa (70%, v/v), seguindo os procedimentos de Makkar (2000). O ácido tânico foi utilizado como padrão para essa análise. Para quantificação de taninos totais, utilizou-se o polivinilpirrolidona (PVPP) para precipitar os taninos. A determinação de taninos condensados foi feita pelo método Butanol-HCl, calculado como equivalente leucocianidina, por meio de uma equação publicada (MAKKAR, 2000).

Foram testados três níveis de inclusão do extrato tanífero (0 (Controle), 2,5 ou 5,0% da matéria seca) no farelo de soja, três temperaturas de processamento (ambiente (controle), 110°C ou 120°C) e três tempos de tratamento térmico (sem tratamento térmico (Controle), 15 ou 30 minutos), em um delineamento fatorial  $3 \times 3 \times 3$ .

Para preparação das amostras, o farelo de soja foi moído a 2 mm. O extrato tanífero foi misturado com o material seco e posteriormente, a mistura foi umidificada com água, ajustando para 20% de umidade e mantida em repouso por 1 hora. Posteriormente, uma parte das amostras passou pelos diferentes tratamentos térmicos em autoclave. Uma vez que as amostras dos distintos tratamentos ficaram prontas, foram secas em estufa de circulação forçada de ar a 55°C, novamente moídas (1 mm) e armazenadas para posterior análises.

Numa primeira etapa, as amostras foram submetidas à fermentação pelo método *in vitro* gases (THEODOROU et al., 1994). Para tal, foram incubadas 0,5 g de amostra, em duplicata, em frascos de vidro âmbar (100 ml) contendo 40 ml de solução tampão (Kozloski et al., 2019) e 10 ml de inóculo ruminal a 39°C, em banho maria com agitação lenta, durante 72 h. O fluido ruminal utilizado foi coletado de um bovino fistulado no rúmen, mantido em pastagem, filtrado com duas camadas de gaze sob injeção contínua de CO<sub>2</sub>. As amostras foram incubadas em garrafas acopladas a um aparato contendo solução aquosa colorida que permite a medida do volume de gases pelo deslocamento da solução em uma pipeta graduada. Foram conduzidos

três ensaios, sendo cada ensaio uma repetição experimental. O volume de gases produzidos no interior dos frascos foi medida a 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 e 72 horas de incubação.

Para determinação de N amoniacal, foram coletados 0,5 mL do meio de incubação com o uso de uma seringa graduada de 1 mL nos tempos 6, 12, 24, 36, 48 e 72 horas. Essas amostras foram acondicionadas em potes contendo 4,5 mL de ácido sulfúrico a 2% (p/v) e armazenadas em congelador. Posteriormente, a concentração de N amoniacal foi determinada pelo método por método espectrofotométrico, utilizando kits Uréia UV, mas sem adição da solução contendo urease.

Numa segunda etapa, foi avaliado a digestibilidade intestinal da proteína potencialmente não degradável no rúmen do farelo de soja. Para tal, foi utilizada a técnica de três estágios de Calsamiglia e Stern (1995). Inicialmente, as amostras moídas a 1 mm foram pesadas (10 g) em triplicatas em sacos de poliéster (40 µm de porosidade, 10 x 10 cm) e incubadas *in situ* durante 16 horas. Foram conduzidos três ensaios, sendo cada ensaio uma repetição experimental. As amostras foram incubadas através de uma fistula ruminal de um bovino mantido em pastagem e recebendo suplementação concentrada, fixadas a uma corrente com peso na extremidade, permitindo sua imersão no conteúdo ruminal. Decorrido o tempo de incubação, os sacos foram retirados do rúmen e lavados em água corrente até a água sair limpa. Em seguida, foram mergulhados em solução salina (9 g/L de NaCl) contendo 1 g/L de Tween 80 (Polissorbato), 10 ml/L de metanol e 10 ml/L de butanol terciário, para retirada de bactérias aderidas. A solução tinha pH 2, ajustado com ácido clorídrico 1 N. O material permaneceu nessa solução por 24h, em geladeira. Posteriormente, foram lavados em água corrente, secos em estufa com ventilação forçada a 55°C e pesados. No material incubado e no resíduo foi determinado o N pelo método Kjeldahl.

A degradabilidade ruminal dos compostos nitrogenados foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{Degradabilidade ruminal (DR)} = \frac{(N \text{ incubado in situ} - N \text{ resíduo})}{N \text{ incubado in situ}} \times 100$$

O resíduo da incubação *in situ* foi então utilizado para determinação da digestibilidade intestinal da proteína residual, através de incubação com pepsina-pancreatina. Inicialmente, foram preparados sacos de poliéster (40 µm de porosidade, 3 x 4 cm), contendo 1 g do resíduo (duplicata por saco incubado no rúmen). Os sacos foram selados e incubados por 1h a 39°C, em frascos no incubador tipo Daisy, em solução pH 2 (ajustada com HCl, 0,1 N), contendo 1 g/L de pepsina (*Pepsin from porcine gastric mucosa 0.7 FIP-U/mg for biochemistry EC 3.4.23.1*).



Os sacos foram retirados dos frascos e lavados em água corrente. Posteriormente, foram incubados em solução pH 7,5, contendo fosfato monopotássico 0,5 M (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e 3g/L de pancreatina (*Pancreatin from porcine pancreas – P7545, 8× USP Specifications, Sigma-Aldrich Co., St. Luis, MO*) por 24h a 39°C. A seguir, foram lavados em água corrente e o N foi determinado pelo método Kjeldahl.

A digestibilidade intestinal dos compostos nitrogenados não degradados no rúmen foi calculado como:

$$\text{Digestibilidade intestinal (DI)} = \frac{(N \text{ pós rumen} - N \text{ pós pancreatina})}{N \text{ pós rumen}} \times 100$$

A digestibilidade dos compostos nitrogenados no trato digestivo total foi calculado como:

$$\text{Digestibilidade total} = DR + \left( (100 - DR) \times \left( \frac{DI}{100} \right) \right)$$

Os dados de produção de gás e concentração de amônia nas horas 24, 36 e 48 horas de incubação foram utilizados para análise estatística. Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando o procedimento GLM do SAS (v. 9.0 SAS Inst. Inc. Cary, NC), utilizando um modelo que incluiu os fatores tanino, tempo e temperatura, além das suas possíveis interações e erro experimental. As médias foram comparadas pelo teste *t Student*.

## 5 RESULTADOS

Com relação aos parâmetros de fermentação do farelo de soja, os resultados do efeito dos tratamentos sobre a produção de gás constam nas Tabelas 1, 2 e 3. Não houve interação entre os fatores e, desse modo, o efeito de cada fator foi analisado separadamente. Após 48 horas de fermentação *in vitro* a produção de gases foi em média 5 e 9,1% menor pela inclusão de 2,5 e 5,0% de extrato tanífero, respectivamente. Com relação à temperatura de processamento, o tratamento térmico a 110°C resultou em produção de gases 2,5% maior comparado à temperatura ambiente ou 120°C. O tempo de exposição da mistura ao tratamento térmico não interferiu significativamente no volume de gases.

O efeito da inclusão de taninos e do processamento térmico do farelo de soja na concentração de amônia no meio de incubação são apresentados nas Tabelas 4, 5 e 6. Também não houve interação entre os fatores testados. A liberação de amônia no meio de incubação foi reduzida em 30,1 e 24,5% pela adição de 5% de extrato tanífero, às 36 e 48 horas de incubação, respectivamente e 9,2% pelo tratamento térmico a 120°C. O tempo de tratamento térmico ou o tratamento a 110°C, assim como a adição de 2,5% de extrato tanífero no farelo de soja, não afetaram a liberação de amônia no meio de incubação.

Nas tabelas 7, 8 e 9 são apresentados os resultados do efeito da inclusão de taninos e processamento térmico do farelo de soja sobre a degradabilidade ruminal (DR), digestibilidade intestinal (DI) e digestibilidade total (DT) dos compostos nitrogenados. Também não houve interação entre os fatores para estas variáveis. A DR do farelo de soja não foi afetada por nenhum dos tratamentos. A DI e DT não foram afetadas pela temperatura ou tempo de tratamento térmico, mas reduziram 3,9 e 2,9% relativo ao tratamento Controle, respectivamente, pela adição de 5% de extrato tanífero.

Tabela 1 – Efeito da inclusão de taninos no farelo de soja convencional sobre a produção de gases *in vitro*.

	Tempo (h)	Controle*	Tanino (%)			D.P.	p-valor
			0**	2.5	5		
Produção de gases (ml)	24	167 <sup>b</sup>	181 <sup>a</sup>	169 <sup>b</sup>	158 <sup>c</sup>	7.4	<.0001
	36	187 <sup>c</sup>	206 <sup>a</sup>	195 <sup>b</sup>	184 <sup>c</sup>	6.3	<.0001
	48	196 <sup>c</sup>	219 <sup>a</sup>	208 <sup>b</sup>	199 <sup>c</sup>	5.5	<.0001

Diferentes letras estabelecem diferença entre as médias dos tratamentos para a variável analisada. Onde: DP: desvio padrão; p-valor <0.05.

\*médias do material que não passou por nenhum tipo de tratamento; \*\*médias incluem material sem tanino, que foi submetido ao tratamento térmico.

Tabela 2 – Efeito da temperatura de processamento do farelo de soja sobre a produção de gases *in vitro*.

	Tempo (h)	Controle*	Temperatura (°C)			D.P.	p-valor
			0**	110	120		
Produção de gás (ml)	24	167	170	173	163	10.8	0.054
	36	187	193	198	190	10.4	0.119
	48	196	206	211	206	9.5	0.066

Diferentes letras estabelecem diferença entre as médias dos tratamentos para a variável analisada. Onde: DP: desvio padrão; p-valor <0.05.

\*médias do material que não passou por nenhum tipo de tratamento; \*\*médias incluem o material com inclusão de tanino, mas que não foi submetido ao tratamento térmico.

Tabela 3 – Efeito do tempo de processamento térmico do farelo de soja sobre a produção de gases *in vitro*.

	Tempo (h)	Controle*	Tempo (minutos)			D.P.	p-valor
			0**	15	30		
Produção de gás (ml)	24	167	170	170	166	10.8	0.779
	36	187	193	195	193	11.0	0.717
	48	196	206	208	208	9.8	0.212

Diferentes letras estabelecem diferença entre as médias dos tratamentos para a variável analisada. Onde: DP: desvio padrão; p-valor <0.05. \*médias do material que não passou por nenhum tipo de tratamento; \*\*médias incluem o material com inclusão de tanino, mas que não foi submetido ao tratamento térmico.

Tabela 4 – Efeito da inclusão de taninos no farelo de soja convencional sobre a concentração de amônia no meio de incubação *in vitro*.

	Tempo (h)	Controle*	Tanino (%)			D.P.	p-valor
			0**	2.5	5		
Amônia (mg/dl)	24	28.4	33.1	30.4	24.3	7.8	0.115
	36	40.3 <sup>bc</sup>	50.9 <sup>a</sup>	44.9 <sup>ab</sup>	35.6 <sup>c</sup>	7.4	<.0001
	48	42.2 <sup>ab</sup>	48.2 <sup>a</sup>	44.8 <sup>a</sup>	36.4 <sup>b</sup>	7.5	0.002

Diferentes letras estabelecem diferença entre as médias dos tratamentos para a variável avaliada. Onde: D.P.: desvio padrão; p-valor <0.05. \*médias do material que não passou por nenhum tipo de tratamento; \*\*médias incluem material sem tanino, que foi submetido ao tratamento térmico.

Tabela 5 – Efeito da temperatura de processamento do farelo de soja sobre a concentração de amônia no meio de incubação *in vitro*.

	Tempo (h)	Controle*	Temperatura (°C)			D.P.	p-valor
			0**	110	120		
Amônia (mg/dl)	24	28.4	31.1	32.0	25.8	8.1	0.259
	36	40.3	45.5	44.1	40.7	9.5	0.608
	48	42.2	43.7	45.0	39.7	8.7	0.352

Diferentes letras estabelecem diferença entre as médias dos tratamentos para as variáveis avaliadas. Onde: D.P.: desvio padrão; p-valor <0.05. \*médias do material que não passou por nenhum tipo de tratamento; \*\*médias incluem o material com inclusão de tanino, mas que não foi submetido ao tratamento térmico.

Tabela 6 – Efeito do tempo de processamento térmico do farelo de soja sobre a concentração de amônia no meio de incubação *in vitro*.

	Tempo (h)	Controle*	Tempo (minutos)			D.P.	p-valor
			0**	15	30		
Amônia (mg/dl)	24	28.4	31.1	32.1	26.1	8.1	0.280
	36	40.3	45.5	43.5	41.5	9.6	0.771
	48	42.2	43.7	44.0	40.8	8.9	0.753

Diferentes letras estabelecem diferença entre as médias dos tratamentos para as variáveis avaliadas. Onde: D.P.: desvio padrão; p-valor <0.05. \*médias do material que não passou por nenhum tipo de tratamento; \*\*médias incluem o material com inclusão de tanino, mas que não foi submetido ao tratamento térmico.

Tabela 7 – Efeito da inclusão de taninos no farelo de soja, sobre a degradabilidade ruminal *in situ* (DR), digestibilidade intestinal (DI) *in vitro* e digestibilidade total (DT) dos compostos nitrogenados.

	Controle*	Tanino (%)			D.P.	P-valor
		0**	2.5	5		
DR <sup>1</sup>	58.1	60.3	61.1	54.0	12.6	0.441
DI <sup>2</sup>	83.0 <sup>a</sup>	83.7 <sup>a</sup>	82.0 <sup>a</sup>	79.8 <sup>b</sup>	1.6	<.0001
DT <sup>3</sup>	93.6 <sup>a</sup>	93.6 <sup>a</sup>	93.1 <sup>a</sup>	90.9 <sup>b</sup>	1.9	0.002

<sup>1</sup>Digestibilidade *in situ*;

<sup>2</sup>Digestibilidade intestinal da PNDR. Técnica de três estágios, de Calsamiglia e Stern (1995);

<sup>3</sup>DT = DR + (100 – DR) x DI / 100

Diferentes letras estabelecem diferença entre as médias dos tratamentos para a variável avaliada.

Onde: DR: Degradabilidade ruminal; DI: Digestibilidade intestinal; DT: Digestibilidade total; D.P.: desvio padrão; p-valor <0.05.

\*médias do material que não passou por nenhum tipo de tratamento; \*\*médias incluem o material com inclusão de tanino, mas que não foi submetido ao tratamento térmico.

Tabela 8 – Efeito da temperatura de processamento do farelo de soja sobre a degradabilidade ruminal *in situ* (DR), digestibilidade intestinal (DI) *in vitro* e digestibilidade total (DT) dos compostos nitrogenados.

	Controle*	Temperatura (°C)			D.P.	P-valor
		0**	110	120		
DR <sup>1</sup>	58.1	63.3	62.0	53.0	12.2	0.123
DI <sup>2</sup>	83.0	80.4	81.4	82.5	2.1	0.133
DT <sup>3</sup>	93.0	92.9	93.0	91.8	2.2	0.413

<sup>1</sup>Digestibilidade *in situ*;

<sup>2</sup>Digestibilidade intestinal da PNDR. Técnica de três estágios, de Calsamiglia e Stern (1995);

<sup>3</sup>DT = DR + (100 – DR) x DI / 100

Diferentes letras estabelecem diferença entre as médias dos tratamentos para a variável avaliada.

Onde: DR: Degradabilidade ruminal; DI: Digestibilidade intestinal; DT: Digestibilidade total; D.P.: desvio padrão; p-valor <0.05

\*médias do material que não passou por nenhum tipo de tratamento; \*\*médias incluem o material com inclusão de tanino, mas que não foi submetido ao tratamento térmico.

Tabela 9 – Efeito do tempo de processamento térmico do farelo de soja sobre a degradabilidade ruminal *in situ* (DR), digestibilidade intestinal (DI) *in vitro* e digestibilidade total (DT) dos compostos nitrogenados.

	Controle*	Tempo (minutos)			D.P.	P-valor
		0**	15	30		
DR <sup>1</sup>	58.1	63.3	60.2	54.9	12.7	0.458
DI <sup>2</sup>	83.0	80.4	81.7	82.2	2.2	0.294
DT <sup>3</sup>	93.0	92.9	92.8	92.0	2.2	0.710

<sup>1</sup>Digestibilidade *in situ*;

<sup>2</sup>Digestibilidade intestinal da PNDR. Técnica de três estágios, de Calsamiglia e Stern (1995);

<sup>3</sup>DT = DR + (100 – DR) x DI / 100

Diferentes letras estabelecem diferença entre as médias dos tratamentos para a variável avaliada.

Onde: DR: Degradabilidade ruminal; DI: Digestibilidade intestinal; DT: Digestibilidade total; D.P.: desvio padrão; p-valor <0.05

\*médias do material que não passou por nenhum tipo de tratamento; \*\*médias incluem o material com inclusão de tanino, mas que não foi submetido ao tratamento térmico.

## 6 DISCUSSÃO

A produção de gases é diretamente proporcional a fermentação microbiana do alimento, ou seja, estima a degradação da matéria orgânica pela quantidade de gases liberados pela fermentação da amostra. Como esperado, houve uma queda na produção de gases pela adição de tanino, uma vez que os taninos reduzem a ação microbiana através de sua complexação com os nutrientes e/ou com enzimas microbianas (MCALLISTER et al., 1994; REED, 1995). Porém, temperatura e tempo de tratamento térmico não foram eficazes em reduzir a produção de gases, divergindo do esperado, uma vez que, conforme Camire et al. (1990), o processamento térmico é capaz de modificar a estrutura dos alimentos, bem como desnaturar proteínas, tornando-a mais resistente ao ataque enzimático e, dessa forma, diminuindo a fermentação do substrato.

A liberação de amônia no meio de incubação foi reduzida pela adição de 5% do extrato tanífero e pelo tratamento térmico a 120°C, sugerindo que menos proteína foi degradada no rúmen, o que era esperado e corroborando com resultados descritos na literatura, como em estudo realizado por Carulla et al. (2005) com ovinos alimentados com azevém recebendo ou não suplementação com extrato tanífero de acácia na dose de 4,1% da MS (equivalente a 2,5% de TC), onde constataram que a concentração de amônia no líquido ruminal diminuiu 9% em média nos animais suplementados com taninos. Em pesquisa realizada por Giallongo et al. (2015), constataram queda nas concentrações de N-NH<sub>3</sub> ruminal nas vacas que foram alimentadas com farelo de soja processado termicamente. Conforme o estudo, o processo de extrusão diminuiu a parte degradável no rúmen da proteína dietética, além de aumentar a PNDR.

Com relação a degradabilidade ruminal do N, Reed (1995) afirma que há um consenso geral de que os taninos diminuem a degradação da proteína ruminal, principalmente através dos complexos formados, o que não ocorreu no presente estudo. Apesar das médias do material com tanino serem inferiores, as diferenças observadas entre os tratamentos não foram significativas. De acordo com Frutos et al. (2004), a alteração da digestibilidade do N em virtude do consumo de taninos está associada a mudanças no padrão de fermentação ruminal, seja através dos complexos formados, culminando em privação de substrato, seja por interferência na atividade enzimática ou ação direta sobre microrganismos ruminais.

Neumann et al. (2020) afirma que os taninos, hidrolisáveis ou condensados, possuem conhecida habilidade de diminuir a proteólise natural, sendo reconhecidos como agentes antimicrobianos que atuam na população de bactérias, protozoários e fungos. De acordo com

Patra e Saxena (2011), os taninos possuem uma maior afinidade pelas proteínas, devido a ligações entre o O<sub>2</sub> do grupo carboxila e grupos fenólicos dos taninos e a formação de complexos, predominantemente por meio de ligações de hidrogênio, é um dos mecanismos pelo qual o uso de taninos diminui a proteólise ruminal. Outro mecanismo é pela inibição do crescimento de determinadas bactérias. A grande quantidade de grupos hidroxila é o que possibilitaria a formação dos complexos principalmente com proteínas e em menor proporção com carboidratos (MAKKAR, 2003).

Quanto a digestibilidade intestinal e digestibilidade total dos compostos nitrogenados, esperava-se que os tratamentos não afetassem os valores ou aumentassem, isso porque os complexos formados com os taninos, estáveis em pH ruminal, se dissociariam em pH menor que 3,5, como no abomaso, ou maior que 8, ou seja, nas condições do intestino, permitindo que a proteína fosse aproveitada (SILANIKOVE et al., 2011). Porém, a digestibilidade intestinal e a digestibilidade total dos compostos nitrogenados diminuíram com a inclusão de taninos, sugerindo que pode não haver dissociação completa dos compostos ou ocorrer recompletação no intestino (MAKKAR, 2003). Conforme Dallastra et al. (2018), o efeito do extrato tanífero na digestibilidade parece estar fortemente correlacionado com a concentração do extrato na ração.

Além disso, os resultados obtidos no presente estudo podem indicar que a temperatura e o tempo de tratamento térmico podem ter sido insuficientes, uma vez que Nowak et al. (2005), trabalhando com a extrusão da soja em temperaturas mais altas (145, 155 e 165°C), constataram redução da degradabilidade efetiva *in situ* da proteína em todas as temperaturas. Apesar de não determinar nenhuma temperatura ótima de extrusão, o estudo indica que a maior temperatura – 165°C, foi eficaz na proteção da proteína contra a degradação microbiana ruminal.

Stern et al. (1985) mostraram que o tratamento térmico da soja por extrusão a 149 ° C diminuiu a degradabilidade ruminal da proteína em comparação com a soja não tratada, enquanto a extrusão a uma temperatura mais baixa (132 ° C) não foi benéfica para diminuir a degradabilidade ruminal da proteína.

De acordo com Van Soest (1987), frações rapidamente degradáveis da proteína desnaturam com calor, se tornando frações intermediárias ou lentamente degradáveis. Frações que já são lentamente degradáveis responderiam a tratamentos pelo calor com temperaturas mais elevadas e se tornariam indisponíveis. Ainda de acordo com o autor, o resultado da ação da temperatura depende de vários fatores, como umidade do alimento e conteúdo de carboidrato e de proteína e, portanto, parâmetros ótimos de processamento térmico variam de uma proteína dietética para outra.

## **7 CONCLUSÃO**

A degradabilidade ruminal do farelo de soja pode ser reduzida pela inclusão de tanino ou por tratamento térmico em autoclave. O tratamento com 5% de tanino, a 120°C durante 30 minutos tem maior efeito na produção de gás e concentração de amônia, reduzindo-as, e resulta em menor degradabilidade ruminal e mínimo impacto na digestibilidade intestinal e digestibilidade total.



## REFERÊNCIAS

- ÁVILA, S. C. et al. Impact of a tannin extract on digestibility, ruminal fermentation and duodenal flow of amino acids in steers fed maize silage and concentrate containing soybean meal or canola meal as protein source. **Journal of Agricultural Science**. v.153, p.943-953. 2015.
- BACH, A. et al. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**. v.88, p.9-21. 2005.
- BRAND, T.S.; JORDAAN, L. Effect of extrusion on the rumen undegradable protein fraction of lupins. **South African Journal Animal Science**. v.50, n.6, p.779-785. 2020.
- CALSAMIGLIA, S.; STERN, M. D. A three-step *in vitro* procedure for estimating intestinal digestion of protein in ruminants. **Journal of Animal Science**. v.73, p.1459–1465. 1995.
- CAMIRE, M.E. et al. Chemical and nutritional changes in foods during extrusion. Critical Reviews in **Food Science and Nutrition**. v.29, n.1, p.35-57. 1990.
- CARULLA, J.E. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. **Australian Journal of Agricultural Research**. v.56, p.961–970. 2005.
- DALLASTRA, L. J. H. et al. Tannin extract of *Acacia mearnsii* for lactating ewes. **Semina: Ciências Agrárias**. v.39, p.2741-2748. 2018.
- FRUTOS P. et al. Review: Tannins and ruminant nutrition. **Spanish Journal of Agricultural Research**. v.2, p.191–202. 2004.
- GERLACH, K. et al. Effect of condensed tannin supplementation on *in vivo* nutrient digestibilities and energy values of concentrates in sheep. **Small ruminant research**. v.161, p.57-62. 2018.
- GIALLONGO, F. et al. Extruded soybean meal increased feed intake and milk production in dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v.98, p.6471-6485. 2015.
- KOZLOSKI, G.V. et al. **Métodos físicos, químicos e biológicos de análise em nutrição animal**. 1 ed. Pelotas: UFPEL, 2019. v.1. 102p.
- KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica dos ruminantes**. 3º ed. Santa Maria, Editora da UFSM, 2011. 290 p.
- KOZLOSKI, G.V. et al. Intake, digestibility and nutrients supply to wethers fed ryegrass and intraruminally infused with levels of *Acacia mearnsii* tannin extract. **Small Ruminant Research**. v.106, p.125-130. 2012.
- MAKKAR, H. P. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. **Small Ruminant Research**. v.49, n.3, p.241–256. 2003.

- MAKKAR, H. P. S. **Quantification of Tannins in Tree Foliage**. Vienna: FAO/IAEA. 2000. 26 p.
- MCALLISTER, T.A. et al. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. **Journal of Animal Science**. v.72, p.3004–3018. 1994.
- MCGRATH J. et al. Nutritional strategies in ruminants: a lifetime approach. **Research in Veterinary Science**. v.116, p.28-39. 2018.
- MEZZOMO, R. et al. Protein dietary efficiency and methane emission in cattle fed soybean meal treated with tannins. **Animal Production Science**. v.58, p.2233-2241. 2017.
- MEZZOMO, R. et al. Tannin on non-degradable digestible protein from proteic sources in cattle rumen. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**. v.37, n.4, p.389-395. 2015.
- MIN, B. R. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. **Animal Feed Science and Technology**. v.106, p.3–19. 2003.
- MOUMEN, A. et al. The effects of livestock methane emission on the global warming: a review. **International Journal of Global Warming**, v.9, n.2, p.229–253. 2016.
- NAUMANN, H. D. et al. The role of condensed tannins in ruminant animal production: advances, limitations and future directions. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.46, n.12, p.929-949. 2017.
- NEUMANN, M. et al. Evaluation of degradability and ruminal kinetics of soybean meal subjected to strategies to maximize protein escape from the rumen. **Semina-Ciências Agrárias**. v.41, p.2721-2732. 2020.
- NOWAK W. et al. *In situ* evaluation of ruminal degradability and intestinal digestibility of extruded soybeans. **Czech Journal of Animal Science**, v.50, p.281–287. 2005.
- ORLANDI T. et al. Digestibility, ruminal fermentation and duodenal flux of amino acids in steers fed grass forage plus concentrate containing increasing levels of *Acacia mearnsii* tannin extract. **Animal Feed Science and Technology** v.210, p.37–45. 2015.
- PATRA, A.K.; SAXENA, J. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.91, n.1, p.24-37. 2011.
- PILUZZA, G. et al. Tannins in forage plants and their role in animal husbandry and environmental sustainability: a review. **Grass and Forage Science**. v.69, n.1, p.32–48, 2014.
- REED, J. D., Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. **Journal of Animal Science**. v.73, p.1516–1528. 1995.
- RIRA, M, et al. Potential of tannin-rich plants for modulating ruminal microbes and ruminal fermentation in sheep. **Journal of Animal Science**, v.93, n.1, p.334–347. 2015.

SALLAM, S.M.A.H. et al. Ruminal fermentation and tannins bioactivity of some browses using a semi-automated gas production technique. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v.12, p.1-10. 2010.

SILANIKOVE, N. et al. Use of tannin-binding chemicals to assay for tannins and 62 their negative postingestive effects in ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v.91, p.69–81, 2001.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA (SBS). Fatos e Números do Brasil Florestal. Sociedade Brasileira de Silvicultura. 2008. Disponível em: <http://sbs.org.br/FatoseNumerosdoBrasilFlorestal.pdf> . Acesso em: 18/01/2021

SOLANAS, E.M. et al. Effect of extrusion on *in situ* ruminal protein degradability and *in vitro* digestibility of undegraded protein from different feedstuffs. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.88, n.15, p.2589-2597. 2008.

STERN, M.D. et al. Protein degradation in rumen and amino acid absorption in the small intestine of lactating dairy cattle fed heat-treated whole soybeans. **Journal of Dairy Science.**, v. 68 p.45-56. 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**, v.48, p.185-197, 1994.

VAN SOEST P.J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. Cornell University Press, Ithaca, NY. 1987.

WALLACE, R.J. Ruminal microbial metabolism of peptides and amino acids. **The Journal of Nutrition**. v.126, p.1326–1334. 1996.