

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

**Tiago Orlandi**

**IMPACTO NUTRICIONAL DA INCLUSÃO DE EXTRATO TANÍFERO  
DE ACÁCIA NEGRA (*Acacia mearnsii*) NA DIETA DE OVINOS E  
VACAS EM LACTAÇÃO**

**Santa Maria, RS  
2016**

**Tiago Orlandi**

**IMPACTO NUTRICIONAL DA INCLUSÃO DE EXTRATO TANÍFERO DE ACÁCIA  
NEGRA (*Acacia mearnsii*) NA DIETA DE OVINOS E VACAS EM LACTAÇÃO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Zootecnia**.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Vilmar Kozloski

Santa Maria, RS  
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Orlandi, Tiago

Impacto nutricional da inclusão de extrato tanífero de Acácia negra (*Acacia mearnsii*) na dieta de ovinos e vacas em lactação / Tiago Orlandi.-2016.

89 f.; 30cm

Orientador: Gilberto Vilmar Kozloski

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, RS, 2016

1. Excreção de nitrogênio 2. Gramínea 3. Leite 4. Metabolismo visceral 5. Tanino I. Kozloski, Gilberto Vilmar II. Título.

---

© 2016

Todos os direitos autorais reservados a Tiago Orlandi. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

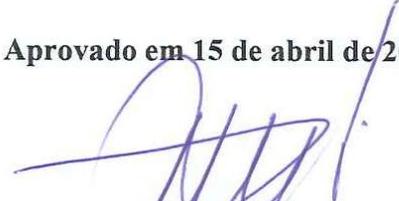
E-mail: tiagoorlandi@yahoo.com.br

Tiago Orlandi

**IMPACTO NUTRICIONAL DA INCLUSÃO DE EXTRATO TANÍFERO DE ACÁCIA  
NEGRA (*Acacia mearnsii*) NA DIETA DE OVINOS E VACAS EM LACTAÇÃO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação  
em Zootecnia, da Universidade Federal de  
Santa Maria (UFSM, RS), como requisito  
parcial para obtenção do título de **Doutor em  
Zootecnia.**

Aprovado em 15 de abril de 2016:



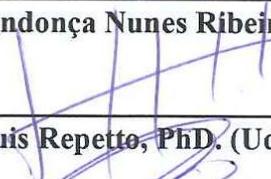
---

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



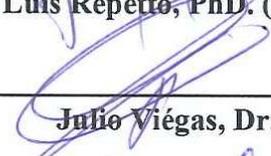
---

**Henrique Mendonça Nunes Ribeiro Filho, Dr. (UDESC)**



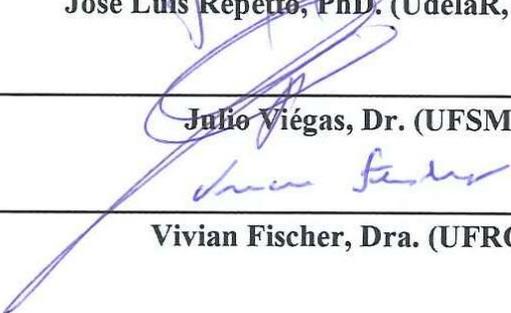
---

**José Luis Repetto, PhD. (UdelaR, Uruguay)**



---

**Julio Viégas, Dr. (UFSM)**



---

**Vivian Fischer, Dra. (UFRGS)**

Santa Maria, RS  
2016

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me guiar nesta caminhada e mostrar-me o caminho certo em todos os momentos de minha vida.

Aos meus pais Irineu e Terezinha pelo amor incondicional, incentivo e apoio ao tomar todas as decisões ao longo de minha vida.

Às minhas irmãs Tatiane e Iriane e meus cunhados Jorge e Adriano pela ajuda e preocupação em todos os momentos.

Aos meus sobrinhos Arthur e Joana que encheram minha vida de alegrias, que me fizeram amadurecer e perceber o real sentido da vida com um simples sorriso ou gargalhada.

Ao professor Gilberto pela orientação, ensinamentos e paciência ao longo destes anos em que fiz parte da equipe do laboratório.

Aos amigos, funcionários e estagiários do IRDeR/UNIJUÍ que me acolheram com muito carinho e não mediram esforços para que este trabalho fosse realizado da melhor forma possível. Obrigado pela amizade e paciência de cada um de vocês. Sempre lembrarei com muito carinho de cada um, pois foram minha segunda família durante o período em que convivemos juntos.

Aos colegas e amigos da pós-graduação e toda a equipe do laboratório, mesmo àqueles que já não estão mais presentes, mas que fizeram parte de minha vida, pela amizade e ajuda na realização deste trabalho sem medir esforços, independente do dia ou hora.

À Lisandre de Oliveira pelos ensinamentos, interesse e grande ajuda na condução dos ensaios. Agradeço imensamente por todo apoio e preocupação, sendo que muitas vezes abriu mão de compromissos particulares para me auxiliar nas atividades experimentais e na logística entre as universidades, utilizando dos próprios recursos financeiros.

À Olirta Giuliani, secretária do PPGZ, e a todos os professores da UFSM que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e pelos ensinamentos transmitidos durante minha formação.

A empresa Bioclin pela doação dos reagentes para análise bioquímica do plasma e urina.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para que eu alcançasse meu objetivo.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Muito obrigado a todos!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos  
não é senão uma gota de água no mar. Mas  
o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

(Madre Teresa de Calcutá)

## RESUMO

### IMPACTO NUTRICIONAL DA INCLUSÃO DE EXTRATO TANÍFERO DE ACÁCIA NEGRA (*Acacia mearnsii*) NA DIETA DE OVINOS E VACAS EM LACTAÇÃO

AUTOR: Tiago Orlandi

ORIENTADOR: Gilberto Vilmar Kozloski

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial do uso dietético do extrato tanífero de *Acacia mearnsii* em reduzir a excreção de nitrogênio (N), melhorar a eficiência nutricional e o desempenho produtivo de vacas em lactação recebendo dietas à base de gramínea temperada ou gramínea tropical, e avaliar o seu efeito sobre os processos de digestão, excreção de N, e o fluxo de metabólitos através do sistema portal e fígado de ovinos recebendo dietas à base de feno de gramínea temperada ou gramínea tropical. Foram conduzidos dois ensaios com ovinos e dois ensaios com vacas em lactação. No ensaio 1, foram utilizados seis ovinos em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema de reversão simples, em dois períodos de 21 dias, para avaliar o consumo, a digestibilidade e a excreção de N. As dietas foram constituídas de feno de Tifton 85 e concentrado sem inclusão de extrato tanífero ou adição de 1% de extrato tanífero (base MS). No ensaio 3, cinco ovinos foram utilizados em um DIC em esquema de reversão simples, em dois períodos de 21 dias, para avaliar o consumo, a digestibilidade, a excreção de N e o fluxo de metabólitos sanguíneos através do sistema portal e fígado. As dietas foram constituídas de feno misto de aveia e azevém e concentrado sem inclusão de extrato tanífero ou adição de 2% de extrato tanífero. Nos ensaios 2 e 4 foram utilizadas 14 vacas em lactação em cada um dos ensaios através de um delineamento em blocos ao acaso. Os experimentos tiveram duração de 49 dias, divididos em dois períodos. Nos primeiros 21 dias todas as vacas receberam a mesma dieta para padronização e, posteriormente, foi atribuído aleatoriamente às vacas, dentro de cada bloco, um dos tratamentos. No experimento 2, as vacas foram mantidas em pastagem de Tifton 85 e suplementadas com concentrado contendo 1% ou não (controle) de extrato tanífero. No experimento 4, as vacas foram mantidas em pastagem mista de aveia e azevém, e suplementadas com concentrado contendo 2% ou não (controle) de extrato tanífero. Nos ensaios com ovinos foram coletadas amostras de alimentos, sobras, fezes, urina, e também amostras de sangue arterial, portal e hepático no ensaio 3. Nos ensaios com vacas foram coletadas amostras de alimentos, sobras, fezes, urina, leite e sangue através da veia coccígea. Os dados foram submetidos à análise de variância e o efeito de tratamento comparado pelo teste F através do programa estatístico SAS. Valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados significativos e  $0,05 < P \leq 0,10$  foram considerados tendência. No ensaio 1 a inclusão de tanino na dieta promoveu redução na digestibilidade verdadeira do N e na excreção de N endógeno ( $P \leq 0,05$ ), sem influenciar no consumo, excreção fecal e urinária de N e digestibilidade das demais frações da dieta ( $P > 0,05$ ). No ensaio 2 o extrato tanífero não promoveu nenhuma alteração ( $P > 0,05$ ) no consumo, produção e composição do leite, eficiência de utilização do N para síntese das proteínas do leite, bem como nas concentrações de ureia plasmática. No entanto, houve aumento na excreção de N através da urina e, conseqüentemente, redução na eficiência de uso geral do N. No ensaio 3 houve redução ( $P \leq 0,05$ ) das digestibilidades aparente e verdadeira do N e da excreção de ureia através da urina, sem afetar os parâmetros de consumo, digestibilidade da matéria orgânica, fibra em detergente neutro e síntese de compostos nitrogenados microbianos ruminais. As concentrações de N-ureia nas amostras de sangue arterial, portal e hepático reduziram ( $P \leq 0,05$ ) e a concentração de glicose hepática tendeu a reduzir ( $P = 0,065$ ) devido à ingestão do extrato tanífero. Entretanto, houve redução no fluxo de N-ureia apenas nos tecidos viscerais totais ( $P = 0,053$ ) e, nem as concentrações, nem os fluxos de N-NH<sub>3</sub> foram alterados ( $P > 0,05$ ). No ensaio 4 a ingestão de taninos pelos animais não afetou nenhum dos parâmetros de produção e composição do leite, assim como as concentrações plasmáticas de ureia. Entretanto, promoveu aumento ( $P \leq 0,05$ ) no consumo de pasto e na excreção de N fecal pelos animais e tendeu a reduzir ( $P \leq 0,10$ ) a excreção de N através da urina, sem alterar a eficiência de uso deste nutriente. A inclusão de 2% de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* no concentrado fornecido a vacas em lactação na proporção de aproximadamente 25% da dieta à base de gramíneas temperadas promove aumento do consumo de forragem e tem o potencial de reduzir o impacto ambiental pela menor proporção de N excretado através da urina, sem interferir na produção e composição do leite em curto prazo. Além disso, com base no estudo com ovinos, o fornecimento de até aproximadamente 40% deste concentrado na dieta promove uma redução mais acentuada na excreção de N urinário e pode apresentar reflexos positivos sobre as concentrações de ureia no leite e no plasma. Nos ensaios com gramínea tropical a inclusão de tanino na dieta não apresentou resultados que justificam o uso deste aditivo nas condições dietéticas avaliadas.

**Palavras-chave:** Excreção de nitrogênio. Gramínea. Leite. Metabolismo visceral. Tanino.

## ABSTRACT

### NUTRITIONAL IMPACT OF INCLUSION OF BLACK WATTLE (*Acacia mearnsii*) TANNIN EXTRACT IN DIET OF SHEEP AND LACTATING COWS

AUTHOR: Tiago Orlandi

ADVISING PROFESSOR: Gilberto Vilmar Kozloski

This study aimed to evaluate the effect of tannin extract from *Acacia mearnsii* in the reduction of total and urinary nitrogen (N) excretion, in optimizing nutritional and productive performance of lactating cows grazing on temperate or tropical pastures, and also aimed to evaluate its effects on the digestive process, N excretion as well as the flow of metabolites through the portal system and liver of sheep fed temperate grass or tropical grass based diets. Four assays were carried out, two with sheep and two with lactating cows. In assay 1, six sheep were used in a crossover design for two 21-day periods to evaluate the intake, digestibility and N excretion. The diets were composed of Tifton hay 85 and concentrate either without the inclusion of tannin extract (control) or with the addition of 1% tannin extract (dry matter (DM) basis). In assay 3, five sheep were used in a crossover design for two 21-day periods to evaluate the intake, digestibility, N excretion and the flow of blood metabolites through the portal system and liver. The diets were a mixture of oats and ryegrass hay and concentrate either without the addition of tannin extract (control) or with the addition of 2% tannin extract. In assays 2 and 4 were used 14 lactating cows in each assay through a random block design. The experiments lasted for 49 days, and were divided into two periods. In the first 21 days all cows received, for standardization, the same diet and were later randomly assigned, within each block, one of the treatments. In experiment 2, cows were grazing on Tifton 85 pasture and supplemented with concentrate containing 1%, or not (control), of tannin extract. In experiment 4, the cows were kept in mixed oats and ryegrass pasture, and supplemented with concentrate either with the addition of 2% tannin extract or without (control) the addition of tannin extract. For the sheep assays were collected food, scraps, feces, urine and samples as well as arterial, liver and portal blood samples, for assay 3. For assays with cows were collected food scraps, feces, urine and milk samples as well as blood samples from the coccygeal vein. The data were submitted to variance analysis and the effect of treatment compared by F test using the SAS statistical program.  $P \leq 0.05$  values were considered significant and  $0.05 < P \leq 0.10$  were considered trend. In assay 1 the inclusion of tannin in the diet promoted a reduction in the true digestibility of N and endogenous N excretion ( $P \leq 0.05$ ), without affecting consumption, fecal and urinary excretion of N and digestibility of other dietary fractions ( $P > 0.05$ ). In assay 2 the tannin extract did not cause any changes ( $P > 0.05$ ) in consumption, and milk yield or composition, or the N use efficiency for synthesis of milk proteins, as well as in plasma urea concentrations. There was, however, an increase in N excretion via urine and hence reduction in the overall N use efficiency. In assay 3 there was a reduction ( $P \leq 0.05$ ) of the true and apparent N digestibility and urea excretion by urine without affecting the parameters of intake, digestibility of organic matter, neutral detergent fiber and synthesis of microbial rumen nitrogenous compounds. The N-urea concentrations in arterial, portal and hepatic blood samples reduced ( $P \leq 0.05$ ) and hepatic glucose concentration tended to decrease ( $P = 0.065$ ) due to the intake of the tannin extract. However, there was a reduction in N-urea flow only in total visceral tissue ( $P = 0.053$ ), and neither concentrations nor the N-NH<sub>3</sub> flow changed ( $P > 0.05$ ). In assay 4 the intake of tannins did not affect any milk yield and composition parameters, neither plasma concentrations of urea. It did, however, promote increase ( $P \leq 0.05$ ) pasture intake and fecal N excretion and tended to decrease ( $P \leq 0.10$ ) N excretion through urine without altering the N use efficiency. The inclusion of 2% tannin extract of *Acacia mearnsii* in the concentrate fed to dairy cows in the proportion of approximately 25% of the diet based on temperate grasses promotes increased fodder consumption and has the potential to reduce the environmental impact due to the reduction of urinary N excretion, without short term interference in milk yield and composition. Furthermore, based on the study with sheep, offer of up to 40% of concentrate in the diet promotes a more marked reduction in urinary N excretion and may have positive effects on the concentrations of urea in milk and plasma. In assays with tropical grass the inclusion of tannin in the diet did not show results that justify the use of this additive in the assessed dietary conditions.

**Keywords:** Grass. Milk. Nitrogen excretion. Tannin. Visceral metabolism.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química dos alimentos e proporção dos ingredientes nos concentrados.....	27
Tabela 2 – Composição química dos alimentos utilizados .....	32
Tabela 3 – Composição química dos alimentos utilizados .....	39
Tabela 4 – Composição química dos alimentos utilizados .....	46
Tabela 5 – Consumo e digestibilidade total da matéria seca (MS), matéria orgânica (MO) e fibra em detergente neutro (FDN) em ovinos alimentados com feno de tifton (0,62) mais concentrado (0,38) com ou sem inclusão de extrato tanífero .....	48
Tabela 6 – Digestibilidade total, excreção fecal e urinária, nitrogênio microbiano e balanço de nitrogênio em ovinos alimentados com feno de tifton (0,62) mais concentrado (0,38) com ou sem inclusão de extrato tanífero.....	49
Tabela 7 – Peso e escore de condição corporal de vacas mantidas em pastagem de tifton e suplementadas com concentrado com ou sem inclusão de 1,0% de extrato tanífero de <i>Acacia mearnsii</i> no concentrado (0,21% da dieta) .....	49
Tabela 8 – Consumo por vacas mantidas em pastagem de tifton e suplementadas com concentrado com ou sem inclusão de 1,0% de extrato tanífero de <i>Acacia mearnsii</i> no concentrado (0,21% da dieta).....	50
Tabela 9 – Produção e composição do leite de vacas mantidas em pastagem de tifton e suplementadas com concentrado com ou sem inclusão de 1,0% de extrato tanífero de <i>Acacia mearnsii</i> no concentrado (0,21% da dieta) .....	51
Tabela 10 – Eficiência alimentar, eficiência de utilização do N e concentração de N-ureia no plasma de vacas mantidas em pastagem de tifton e suplementadas com concentrado com ou sem inclusão de 1,0% de extrato tanífero de <i>Acacia mearnsii</i> no concentrado (0,21% da dieta).....	53
Tabela 11 – Consumo e excreção de N por vacas mantidas em pastagem de tifton e suplementadas com concentrado com ou sem inclusão de 1,0% de extrato tanífero de <i>Acacia mearnsii</i> no concentrado (0,21% da dieta) .....	54
Tabela 12 – Excreção de derivados de purinas e síntese de N microbiano por vacas mantidas em pastagem de tifton e suplementadas com concentrado com ou sem inclusão de 1,0% de extrato tanífero de <i>Acacia mearnsii</i> no concentrado (0,21% da dieta) .....	55
Tabela 13 – Consumo e digestibilidade total da matéria seca (MS), matéria orgânica (MO) e fibra em detergente neutro (FDN) em ovinos alimentados com feno de aveia e azevém (0,61) mais concentrado (0,39) com ou sem inclusão de extrato tanífero .....	56
Tabela 14 – Digestibilidade total, excreção fecal e urinária e síntese de nitrogênio microbiano em ovinos alimentados com feno de aveia e azevém (0,61) mais concentrado (0,39) com ou sem inclusão de extrato tanífero.....	57

Tabela 15 – Concentração plasmática arterial, portal e hepática de glicose, N-amônia (N-NH <sub>3</sub> ) e N-ureia em ovinos alimentados com feno de aveia e azevém (0,61) mais concentrado (0,39) com ou sem inclusão de extrato tanífero .....	57
Tabela 16 – Fluxo de plasma e fluxo líquido de glicose, N-amônia (N-NH <sub>3</sub> ) e N-ureia através dos tecidos drenados pela veia porta, fígado e tecidos viscerais totais em ovinos alimentados com feno de aveia e azevém (0,61) mais concentrado (0,39) com ou sem inclusão de extrato tanífero .....	58
Tabela 17 – Peso e escore de condição corporal de vacas mantidas em pastagem mista de aveia e azevém e suplementadas com concentrado com ou sem inclusão de 2,0% de extrato tanífero de <i>Acacia mearnsii</i> no concentrado (0,49% da dieta) .	59
Tabela 18 – Consumo por vacas mantidas em pastagem mista de aveia e azevém e suplementadas com concentrado com ou sem inclusão de 2,0% de extrato tanífero de <i>Acacia mearnsii</i> no concentrado (0,49% da dieta) .....	60
Tabela 19 – Produção e composição do leite de vacas mantidas em pastagem mista de aveia e azevém e suplementadas com concentrado com ou sem inclusão de 2,0% de extrato tanífero de <i>Acacia mearnsii</i> no concentrado (0,49% da dieta) .	61
Tabela 20 – Eficiência alimentar, eficiência de utilização do N e concentração de N-ureia no plasma de vacas mantidas em pastagem mista de aveia e azevém e suplementadas com concentrado com ou sem inclusão de 2,0% de extrato tanífero de <i>Acacia mearnsii</i> no concentrado (0,49% da dieta) .....	63
Tabela 21 – Consumo e excreção de N por vacas mantidas em pastagem mista de aveia e azevém e suplementadas com concentrado com ou sem inclusão de 2,0% de extrato tanífero de <i>Acacia mearnsii</i> no concentrado (0,49% da dieta) .....	63
Tabela 22 – Excreção de derivados de purinas e síntese de N microbiano por vacas mantidas em pastagem mista de aveia e azevém e suplementadas com concentrado com ou sem inclusão de 2,0% de extrato tanífero de <i>Acacia mearnsii</i> no concentrado (0,49% da dieta).....	65

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2 ESTUDO BIBLIOGRÁFICO</b> .....	<b>12</b>
2.1 NUTRIÇÃO PROTEICA DE RUMINANTES EM SISTEMAS SEMIPASTORIS.....	12
2.2 EXCREÇÃO DE NITROGÊNIO E IMPACTO AMBIENTAL.....	14
2.3 TANINOS NA NUTRIÇÃO DE RUMINANTES.....	16
<b>2.3.1 Impacto no consumo, digestão e excreção de nitrogênio</b> .....	<b>16</b>
<b>2.3.2 Impacto na produção e composição química do leite</b> .....	<b>18</b>
<b>2.3.3 Impacto no metabolismo intermediário</b> .....	<b>21</b>
<b>3 HIPÓTESES</b> .....	<b>24</b>
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
4.1 OBJETIVO GERAL.....	25
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
5.1 LOCAL E ÉPOCA .....	26
5.2 EXTRATO TANÍFERO EM DIETAS À BASE DE GRAMÍNEA TROPICAL.....	26
<b>5.2.1 Experimento 1 – Ensaio de digestibilidade com ovinos</b> .....	<b>26</b>
5.2.1.1 Animais, dietas e delineamento experimental .....	26
5.2.1.2 Condução do experimento .....	28
5.2.1.3 Coleta de amostras .....	28
5.2.1.4 Análises químicas .....	29
5.2.1.5 Cálculos .....	29
5.2.1.6 Análises estatísticas .....	30
<b>5.2.2 Experimento 2 – Ensaio com vacas em lactação</b> .....	<b>31</b>
5.2.2.1 Animais, dietas e delineamento experimental .....	31
5.2.2.2 Variáveis relacionadas à produção de forragem.....	32
5.2.2.3 Estimativa do consumo e excreção fecal.....	33
5.2.2.4 Avaliações e coletas de fluidos corporais .....	35
5.2.2.5 Cálculos .....	37
5.2.2.6 Análises estatísticas.....	37
5.3 EXTRATO TANÍFERO EM DIETAS À BASE DE GRAMÍNEA TEMPERADA .....	38
<b>5.3.1 Experimento 3 – Ensaio de metabolismo visceral com ovinos</b> .....	<b>38</b>
5.3.1.1 Animais, dietas e delineamento experimental .....	38
5.3.1.2 Condução do experimento .....	39
5.3.1.3 Coleta de amostras .....	40
5.3.1.4 Análises químicas .....	41
5.3.1.5 Cálculos.....	43
5.3.1.6 Análises estatísticas.....	44
<b>5.3.2 Experimento 4 – Ensaio com vacas em lactação</b> .....	<b>45</b>
<b>6 RESULTADOS</b> .....	<b>48</b>
6.1 EXPERIMENTO 1 .....	48
6.2 EXPERIMENTO 2 .....	49
6.3 EXPERIMENTO 3 .....	56
6.4 EXPERIMENTO 4 .....	58
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	<b>66</b>
7.1 EXTRATO TANÍFERO EM DIETAS À BASE DE GRAMÍNEA TROPICAL.....	66
7.2 EXTRATO TANÍFERO EM DIETAS À BASE DE GRAMÍNEA TEMPERADA .....	72
<b>8 CONCLUSÕES</b> .....	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>81</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os sistemas de produção de ruminantes vêm sendo cada vez mais desafiados não somente em relação à sua eficiência econômico-financeira ou ao fornecimento de produtos que atendam critérios de qualidade e segurança alimentar, mas também em relação ao seu impacto ambiental (O'MARA, 2011). Este impacto pode ser direto, como pela excreção de nitrogênio (N) urinário ou indireto, pelo uso de recursos naturais. Desse modo, entre os principais desafios ou objetivos da pesquisa nesta área do conhecimento, inclui-se a avaliação de estratégias nutricionais que aumentem a eficiência energética e do uso do N alimentar e potencializem o uso de coprodutos industriais na alimentação animal.

Vacas em lactação, por exemplo, que produzem acima de 20 litros/dia e são alimentadas com forrageiras bem manejadas e ricas em compostos nitrogenados solúveis e/ou suplementadas com concentrados proteicos de origem vegetal, os quais usualmente têm alta degradabilidade ruminal, apesar de consumirem altas quantidades de proteína bruta, têm deficiência em proteína metabolizável, apresentam altas concentrações séricas de ureia, altas taxas de excreção urinária de N, baixa eficiência do uso do N da dieta e baixa eficiência reprodutiva (FOX et al., 2004). No Brasil, o principal concentrado proteico vegetal disponível e utilizado nos sistemas de produção animal é o farelo de soja, caracterizado por ter proteína com alta degradabilidade ruminal (NRC, 2001). Porém, para aumentar a oferta de aminoácidos no intestino delgado com baixa inclusão de concentrados com esta característica na dieta de ruminantes, e obter baixos níveis de perda urinária de N, seria necessário processá-los de modo a diminuir a degradabilidade ruminal da sua proteína sem reduzir sua digestibilidade intestinal.

Uma alternativa é submeter estes alimentos ao tratamento pelo calor. No entanto, este processo usualmente reduz a digestibilidade intestinal da proteína devido à ocorrência da reação de Maillard (VAN SOEST, 1994). Outra opção é a utilização de componentes naturais de plantas com conhecida habilidade em reduzir a proteólise ruminal como, por exemplo, os taninos (WAGHORN e MCNABB, 2003). É conhecido o efeito dos taninos presentes em leguminosas forrageiras sobre o crescimento bacteriano (MCSWEENEY et al., 2001) e a redução da degradação ruminal das proteínas e carboidratos (WAGHORN et al., 1987). No entanto, a estrutura química, concentração e efeitos biológicos dos taninos são amplamente variáveis dentro e entre espécies forrageiras, o que dificulta a manipulação dietética destes compostos. Portanto, uma fonte concentrada de taninos pode ser uma alternativa na tentativa de melhor controlar os efeitos desta substância e assim obter os resultados positivos de

desempenho e melhor eficiência de utilização do N por ruminantes, como citado em experimentos utilizando forrageiras ricas em taninos. O extrato tanífero de Acácia Negra (*Acacia mearnsii*) pode ser uma opção viável para este uso no Brasil, visto que o seu plantio está entre os mais expressivos entre as espécies florestais no país (MARTINEZ, 2006).

Alguns estudos (ÁVILA et al., 2015; CARULLA et al., 2005; GRAINGER et al., 2009; GRIFFITHS et al., 2013; KOZLOSKI et al., 2012; ORLANDI et al., 2015) foram conduzidos para avaliar o efeito do extrato tanífero da *Acacia mearnsii* sobre a digestibilidade, excreção de N, fluxo intestinal de nutrientes e/ou desempenho de ruminantes. Contudo, em nenhum destes estudos foi avaliado detalhadamente a produção e qualidade do leite, o uso do N e o *status* metabólico de vacas leiteiras em sistema semi-intensivo de produção sob pastejo em gramínea temperada ou gramínea tropical e em ovinos confinados. Outra demanda de informação está associada ao potencial impacto que os taninos possam exercer sobre os processos envolvendo a digestão e dinâmica de fluxo de metabólitos pelos órgãos que constituem o sistema visceral (trato gastrintestinal e fígado), que impactam sobre a quantidade e perfil de nutrientes absorvidos, excretados ou disponíveis ao sistema periférico.

Além disso, na maior parte dos estudos em que foi avaliado este extrato tanífero, os animais foram mantidos em confinamento ou sob pastejo em gramíneas de estação fria. No entanto, em regiões do Sul da América, a maior parte dos ovinos e vacas em lactação é mantida em áreas de pastagem tropical ou temperada e recebendo suplementação quando a disponibilidade de forragem é limitada. Entretanto, o impacto deste aditivo em dietas à base de gramíneas tropicais ou gramíneas temperadas ainda não é claro, uma vez que, o efeito depende de como ele interage com os constituintes alimentares e da dinâmica digestiva em cada uma das situações dietéticas. Dessa forma, é esperado que o efeito da suplementação seja diferente em animais alimentados com gramínea tropical comparado àqueles alimentados com gramínea temperada, independentemente da espécie animal. Gramíneas temperadas usualmente apresentam uma maior digestibilidade e maior conteúdo de N total e N solúvel que gramíneas tropicais de média a boa qualidade. Assim, suporta-se a hipótese que o uso deste extrato tanífero pode apresentar resultados positivos em ambas as situações dietéticas, mas, mais expressivos, principalmente quanto à eficiência de utilização do N dietético e na redução da excreção urinária de N pelos animais alimentados com dietas à base de gramíneas temperadas. Sendo assim, é necessário avaliar o uso deste aditivo sobre os benefícios ou efeitos adversos ao metabolismo e meio ambiente, uma vez que, ainda não estão bem estabelecidos os reais efeitos da ingestão deste extrato por vacas em lactação e ovinos nestas duas situações dietéticas.

## 2 ESTUDO BIBLIOGRÁFICO

### 2.1 NUTRIÇÃO PROTEICA DE RUMINANTES EM SISTEMAS SEMIPASTORIS

A proteína é um nutriente de alto impacto no desempenho produtivo dos animais. Conforme dados de um estudo envolvendo análises de regressão multivariada apresentados no NRC (2001), a produção de leite aumentou 0,75 kg/dia quando a proteína bruta (PB) da dieta passou de 15% para 16% e 0,35 kg/dia quando a PB da dieta passou de 19% para 20%, sendo que a produção de leite máxima foi atingida com 23% de PB na dieta. Resultados similares foram reportados por Ipharraguerre e Clark (2005) utilizando um banco de dados com 112 estudos publicados de 1981 a 2003. Os autores estimaram aumentos em produção de leite da ordem de 0,94 e 0,42 kg/dia quando a PB da dieta passou de 15% para 16% e de 19% para 20%, respectivamente. A máxima produção de leite neste estudo foi obtida em dietas com 22,8% PB.

Por outro lado, Imaizumi et al. (2010) revisaram 13 estudos sobre quantidade de proteína na dieta de vacas em lactação, publicados de 2005 a 2009, e relataram que a produção de leite foi aumentada consistentemente quando os teores de PB da dieta abaixo de 15% foram elevados para 15-17%. Em 7 dos 13 estudos, as vacas produziram entre 36,3 e 43,3 kg/dia. Para essas vacas de alta produção, o aumento da PB na dieta de 16,2-17,2% para 20% não provocou respostas em produção e não aumentou o consumo de matéria seca em 5 dos 7 estudos. Não foi observado aumento em produção de proteína do leite em 6 dos 7 trabalhos, mas o nitrogênio uréico do leite (NUL) foi elevado nos 7 estudos e a eficiência de uso do nitrogênio (EUN) foi reduzida em 6 estudos.

Apesar disso, produtores de leite geralmente oferecem dietas com alto teor de PB para as vacas em lactação no intuito de garantir o aporte de proteína metabolizável necessário para máxima produção de leite e proteína. Comercialmente no Brasil, os concentrados fornecidos para vacas em lactação variam de 16 a 24% de PB. No entanto, a maior disponibilidade de ingredientes proteicos no mercado brasileiro para formulação destes concentrados, principalmente na região Sul, é de ingredientes de média a alta degradabilidade proteica ruminal.

A proteína oferecida em excesso na dieta é convertida em amônia no rúmen, absorvida para a corrente sanguínea, convertida em ureia no fígado e excretada pela urina ou reciclada para o trato digestivo. Na urina, a ureia é rapidamente hidrolisada para amônia e volatilizada para o ambiente, podendo acarretar problemas ambientais. Além disso, o excesso de PB na

dieta reduz a margem de lucro da propriedade, em virtude do alto custo relativo dos suplementos proteicos e da reduzida EUN em dietas com alto teor de PB (BRODERICK, 2003). Além da excreção de nitrogênio (N) no ambiente e do aumento no custo da alimentação, o excesso de proteína degradável no rúmen torna os animais menos eficientes no uso dos nutrientes, uma vez que parte da energia que deveria ser utilizada para produção de leite é utilizada para a excreção do N. Para cada grama de N excretado, são gastos 13,3 kcal de energia digestível (BRODERICK, 2003).

Portanto, fica clara a importância do correto balanceamento de N na dieta, estabelecendo adequadas quantidades e proporções de proteína degradável e proteína não degradável no rúmen, para melhorar a EUN e minimizar desperdícios de N e recursos financeiros na propriedade. Entretanto, a dinâmica do N no organismo animal é complexa, por envolver fatores ainda pouco estudados, como secreção de N endógeno e reciclagem interna de N. Dessa forma, pouco progresso tem sido conseguido no aumento da EUN. Stone et al. (1960) relataram EUN média de 23,7% no rebanho leiteiro norte-americano. Quarenta e oito anos depois, Huhtanen e Hristov (2009), em um estudo meta-analítico sobre o efeito do teor e degradabilidade da PB no desempenho de vacas leiteiras, observaram valores médios de EUN de 27,7%. Para vacas mantidas em pastagens, as dificuldades são ainda maiores, pois poucas são as informações que caracterizam a PB das forragens. Além disso, os dados de consumo de forragem são menos precisos do que os de animais confinados, dada a dificuldade de mensuração dessa variável.

Van Der Grinten et al. (1992) avaliaram a suplementação proteica em quatro sistemas de produção baseados em pastagens tropicais com a utilização de concentrados, e observaram que em todos os sistemas, as dietas apresentavam excesso de PB. Isto provavelmente vem ocorrendo em um grande número de sistemas de produção de leite no Brasil que utilizam tanto pastagens tropicais adubadas com doses altas de N e vacas com produções médias entre 12 a 20 kg/dia, como em vacas em pastejo em forragens temperadas. O uso de fontes proteicas de baixa degradabilidade ruminal para vacas em início de lactação com alta produção de leite, quando mantidas em pastagens tropicais com teores altos de PB é assunto ainda pouco estudado (SANTOS et al., 2005).

O monitoramento de valores de NUL é uma das ferramentas que permitem avaliar a adequação proteica da dieta consumida pelas vacas. O nitrogênio em excesso é convertido em ureia no fígado e transportado pela corrente sanguínea até os rins, onde é excretado pela urina ou reciclado via parede ruminal e saliva. Por ser uma molécula pequena, rapidamente passa para a glândula mamária drenada pela corrente sanguínea (GUSTAFSSON e PALMQUIST,

1993), fazendo com que maiores teores de NUL sejam indicativos de excesso de nitrogênio dietético, ou utilização ineficiente desse nutriente (BRODERICK e HUHTANEN, 2007).

Dessa forma, o NUL tem sido utilizado como ferramenta para monitorar o *status* proteico da dieta, bem como sua adequação da relação energia:proteína (HOF et al., 1997) e EUN (JONKER et al., 1998). O NUL apresenta elevada correlação com a concentração de nitrogênio na urina (BRODERICK e HUHTANEN, 2007) e, portanto, também tem sido utilizado para estimativas de excreção de N no ambiente (HUHTANEN e HRISTOV, 2009). Os intervalos de referência para NUL preconizados pela literatura variam de 8,5 a 16 mg/dL (KOHN et al., 2002) e foram obtidos a partir de estudos realizados na Suíça (OLTNER e WIKTORSSON, 1983) e EUA (KOHN et al., 2002), em condições de manejo, animais e dieta muito diferentes dos observados no Brasil.

Portanto, deve-se avaliar com cautela os intervalos recomendados para NUL, uma vez que, além das possíveis variações já citadas, o NUL sofre muita interferência do período em lactação, genética, manejo do rebanho, o que faz com que a variação entre animais e entre experimentos seja muito grande (BRODERICK e HUHTANEN, 2007). Dessa forma, o mais prudente a ser feito na utilização de valores de NUL para monitoramento da dieta é tomar como base o próprio histórico do rebanho e, assim, identificar mudanças bruscas que podem refletir alterações na EUN pelos animais.

## 2.2 EXCREÇÃO DE NITROGÊNIO E IMPACTO AMBIENTAL

As principais fontes de emissão de gases de efeito estufa do Brasil, estão concentradas em dois setores: o primeiro, o uso do solo, que contribui com 55%; e o segundo é a agropecuária, responsável por outros 25% da emissão total (BRASIL, 2004). Grande parte dessa remessa é creditada à pecuária, por emitir óxido nitroso, decorrente da deposição de dejetos dos animais (i.e., fezes e urina), que compreende 43% das emissões totais desse gás no país (BERCHIELLI et al., 2012). Além disso, parte do nitrogênio urinário que não é volatilizado é facilmente lixiviado através do solo, promovendo tanto a contaminação do solo como das águas superficiais e subterrâneas. Dessa forma, a busca por sistemas de produção eficientes, que reduzam a excreção de nitrogênio por unidade de produto, tem sido uma das perspectivas da pecuária mundial. Ou seja, cada vez mais os sistemas de produção animal vêm sendo desafiados por responder com uma maior eficiência produtiva e menor impacto ambiental (maior sustentabilidade dos sistemas de produção). Além disso, as exigências por

produtos de origem animal que atendam critérios de qualidade e segurança alimentar são crescentes no mercado mundial.

Neste contexto, preocupações ambientais recentes vinculadas às contribuições da pecuária para a contaminação do solo, água, emissões de gases com efeito estufa e do aquecimento global, exigem novas informações sobre as relações entre dietas dos animais, sistemas de produção, excreção de N, e do impacto global das estratégias alimentares e manejo dos rebanhos sobre os ciclos terrestre e atmosférico do N (POWELL et al., 2009). Dessa forma, a implementação de práticas de manejo do solo e alimentação animal utilizando princípios ecológicos para melhorar a eficiência na absorção de nutrientes e alcançar altos rendimentos é a principal forma de mitigar as emissões de dejetos contaminantes e atender as demandas na produção. Isto poderá ser capitalizado colocando os produtos brasileiros em vantagens competitivas num mercado internacional onde os mecanismos de desenvolvimento limpo são critérios cada vez mais utilizados para liberação de recursos, transferência de tecnologia e alocação de cotas de comercialização.

Uma diversidade de aditivos químicos utilizados na alimentação animal, tais como antibióticos, ionóforos, e agentes antimicrobianos têm sido introduzidos na nutrição de ruminantes para promover o crescimento, melhorar a utilização dos alimentos e diminuir a excreção de agentes contaminantes ao meio ambiente (PATRA e SAXENA, 2010). No entanto, as preocupações relacionadas à presença de resíduos químicos em produtos de origem animal e o desenvolvimento da resistência bacteriana aos antibióticos têm estimulado a busca por alternativas naturais mais seguras que poderiam ser aplicadas aos sistemas de produção (BARTON, 2000). Plantas ou extratos de plantas que contêm óleos essenciais, taninos, saponinas, flavonóides e muitos outros metabólitos secundários das plantas têm demonstrado melhorias no metabolismo ruminal, tais como diminuição da degradação da proteína no rúmen, aumento da produção de proteína microbiana e fluxo de proteína para o duodeno, agindo sobre populações específicas no rúmen (PATRA e SAXENA, 2009; WALLACE, 2004).

Segundo Kumar e Vaithyanathan (1990) os taninos foram inicialmente considerados moléculas com efeitos antinutricionais devido aos seus efeitos adversos sobre o consumo de alimentos e a utilização dos nutrientes. No entanto, Patra e Saxena (2010) relatam que nos anos recentes eles têm sido reconhecidos como fitoquímicos úteis para modular beneficemente a fermentação microbiana ruminal e reduzir os níveis de excreção de nitrogênio no meio ambiente através da urina, caracterizada por ser uma das vias de excreção

com maior potencial contaminante para o solo, água e ar, por ser facilmente volatilizado e lixiviado através do solo.

## 2.3 TANINOS NA NUTRIÇÃO DE RUMINANTES

### 2.3.1 Impacto no consumo, digestão e excreção de nitrogênio

Em muitos sistemas de produção e práticas de alimentação, a ingestão de proteína degradável no rúmen (PDR) excede as exigências dos micro-organismos ruminais e alta proporção do nitrogênio do alimento é perdida como amônia, que é absorvida no rúmen e excretada como ureia na urina (KOZLOSKI e HENTZ, 2011). Desse modo, o desempenho animal pode ser comprometido devido à limitada oferta de proteína metabolizável. Porém, o uso de taninos pode ser uma alternativa para melhorar o desempenho de ruminantes e reduzir a excreção de compostos nitrogenados pelos animais e, desta forma, minimizar parte dos impactos ambientais causados pelo sistema de produção.

Os taninos são compostos polifenólicos de alto peso molecular (i.e., >3000 Da) (RUBANZA, 2005) e solúveis em água que se complexam, principalmente, com a proteína dietética e enzimas microbianas apresentando um potencial para reduzir as concentrações ruminais de amônia e aumentar o fluxo de aminoácidos para o intestino delgado. No entanto, eles podem reduzir o consumo e a digestibilidade dos alimentos (MAKKAR, 2003). Existem dois tipos de taninos, os hidrolisáveis e os taninos condensados (EL-WAZIRY et al., 2007). Taninos hidrolisáveis são mais solúveis em água e usualmente consistem de um núcleo poliol (como a glicose), parcialmente ou totalmente esterificado a ácido gálico ou ácido elágico, os quais são suscetíveis à hidrólise enzimática. Taninos condensados são polímeros de unidades flavan-3-ol (proantocianidinas) ligados por pontes carbono-carbono que não são suscetíveis à degradação enzimática anaeróbica (WAGHORN, 2008).

Os taninos podem complexar muitos outros substratos incluindo celulose, lipídios, minerais, ácidos nucleicos e aminoácidos, tornando estes substratos resistentes ao ataque microbiano (O'DONOVAN e BROOKER, 2001). Porém, o maior benefício dos taninos na alimentação dos ruminantes parece ser a proteção das proteínas da degradação ruminal, e o subsequente lançamento delas como proteínas disponíveis para a digestão e utilização pelo animal. No rúmen estes complexos são considerados estáveis, mas eles podem se dissociar após o rúmen em resposta ao baixo pH no abomaso, bem como o alto pH no intestino delgado (ANDRABI et al., 2005). Segundo Reed (1995) os taninos em baixas a moderadas

concentrações (i.e. 2 a 4% na matéria seca da dieta) podem ter efeitos positivos quando associados a dietas com altos teores de proteína degradável, diminuindo as perdas de nitrogênio na forma de amônia sem afetar negativamente o crescimento microbiano e a digestibilidade da fibra no rúmen e, conseqüentemente, aumentando o fluxo de aminoácidos para o duodeno.

Resultados de alguns estudos (BEAUCHEMIN et al., 2007; BENCHAAR et al., 2008; CARULLA et al., 2005) mostram a dificuldade em selecionar concentrações de taninos condensados para influenciar positivamente o metabolismo ruminal da proteína sem impor uma resposta negativa na digestibilidade total da dieta. É fundamental que o efeito dos taninos sobre o processo fermentativo ruminal não promova uma redução no consumo e degradabilidade ruminal da matéria orgânica da dieta, causando uma redução na oferta de energia metabolizável e na oferta de proteína microbiana no intestino delgado.

Estudos sobre o efeito dos taninos sobre o consumo de alimentos em ruminantes têm produzido inconsistentes resultados (DSCHAAK et al., 2011). Conforme Mueller-Harvey (2006) a diminuição no consumo de alimentos pode ser uma consequência da reduzida palatabilidade, possível redução na taxa de digestão e desenvolvimento de certa aversão ao alimento. O fornecimento de taninos condensados em relativamente altas concentrações podem ter efeitos negativos sobre o consumo alimentar em ruminantes, e o efeito pode variar muito entre as fontes de tanino.

Os efeitos negativos dos taninos condensados podem ser acentuados pela adstringência ou pela presença de taninos hidrolisáveis no extrato (GRAINGER et al., 2009). Tanto a análise do extrato tanífero ou pela pesquisa na literatura sugere que os taninos hidrolisáveis estão presentes na *Acacia mearnsii*, confirmado em uma comparação entre espécies de acácia por Ahmed et al. (2005). Além disso, Waghorn (2008) sugere que a adstringência, ou capacidade de ligação do extrato tanífero de *Acacia mearnsii* com proteínas parece ser mais alta do que os taninos em espécies forrageiras temperadas, onde até 4% de taninos condensados na MS não apresenta efeitos negativos à produção animal.

Entre os efeitos consistentemente reportados dos taninos incluem-se a redução da liberação e concentração de amônia ruminal e mudança do sítio de excreção do N urinário para o fecal (CARULLA et al., 2005; GRIFFITHS et al., 2013; POWELL et al., 2009; THEODORIDOU et al., 2010). A redução na excreção urinária de N pode resultar em menores impactos ambientais através da lixiviação do nitrato, volatilização da amônia, e emissão de óxido nitroso (PLACE e MITLOEHNER, 2010).

O resultado mais interessante no trabalho de Dschaak et al. (2011) foi que as vacas que receberam suplementação com extrato tanífero de quebracho (*Schinopsis balansae*) na dieta, diminuíram as concentrações de N amoniacal no rúmen e NUL sem perda na produção de proteína do leite. Isto indica que menos N ruminal foi perdido como amônia devido à redução da degradação da proteína bruta pelos micro-organismos ruminais em resposta à suplementação com tanino. Portanto, a manipulação dietética com o uso de extrato tanífero em dietas para vacas leiteiras pode alterar o metabolismo ruminal e a excreção de N na urina. Devido à falta de efeito sobre a EUN em alguns estudos, o benefício pode ser um aumento da excreção do N nas fezes, uma forma mais estável do N, influenciando a proporção de N fecal para N urinário, mas não a excreção total de N (DSCHAAK et al., 2011).

A redução da excreção de N através da urina e aumento da excreção através das fezes tem importantes implicações para o sistema pastoril. O N fecal está principalmente na forma orgânica e assim é menos volátil, ao passo que, o N urinário está principalmente na forma de ureia e assim sujeito a nitrificação e subsequente perdas para o solo (lixiviação) e pode contabilizar para cerca de 60% da emissão de óxido nitroso na pastagem (DE KLEIN e LEDGARD, 2005). A retenção líquida de N do solo pelas plantas é aumentada pelos taninos condensados (FOX et al., 1990; PALM e SANCHEZ, 1991) devido à mineralização dos complexos tanino-proteína ser inibida e as fezes contendo taninos decompõem mais lentamente do que as fezes que não contêm taninos (NIEZEN et al., 2002). A redução no N urinário (g/kg de N consumido) no estudo de Grainger et al. (2009) foi de 40 e 43% quando os animais consumiram 0,9 e 1,8% de extrato tanífero de acácia negra, respectivamente. Da mesma forma, Orlandi et al. (2015) relataram que a inclusão de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* na dieta de novilhos afetou positivamente a retenção de N, sendo que, a inclusão de 1,8% de extrato tanífero apresentou os valores mais baixos de excreção urinária, com menores efeitos sobre a excreção fecal. Similarmente, Ávila et al. (2015) verificaram que a inclusão de 1,5% de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* na dieta de novilhos aumentou a excreção fecal e reduziu a excreção urinária de N sem alterar a eficiência de utilização do N pelos animais.

### **2.3.2 Impacto na produção e composição química do leite**

Benchaar et al. (2008) ao fornecerem 150 g/dia de extrato tanífero de quebracho (*Schinopsis balansae*) (contendo 70% de taninos condensados) a vacas da raça Holandesa durante os terços inicial e médio da lactação, e Cieslak et al. (2012) ao ofertarem 2 g de tanino de *Vaccinium vitis* por kg de MS para vacas leiteiras em lactação verificaram que a produção

e composição do leite não foram alteradas, embora a suplementação com taninos tenha provocado algumas alterações nas concentrações de ácidos graxos voláteis e amônia no fluido ruminal. Da mesma forma, Maamouri et al. (2011) não encontraram alterações na produção e composição do leite ao fornecer 2,8 g/dia de taninos de folhas secas e moídas de *Acacia cyanophylla* para ovelhas leiteiras mantidas em pastagem de azevém e recebendo concentrado. Porém, verificaram uma redução na excreção urinária de N e aumento na retenção de N, o que contribui para reduzir as perdas de N para o ambiente e, conseqüentemente, diminuir a poluição ambiental.

Estes estudos contrastam com os resultados de Wang et al. (1996) que relataram que taninos de *Lotus corniculatus* fornecido para ovelhas em lactação aumentaram a produção de leite em 21%, e o conteúdo de proteína e lactose. Uma das razões para estes efeitos poderia ser um aumento na oferta de proteína metabolizável pela proteína que se ligou aos taninos condensados (PATRA e SAXENA, 2010). No entanto, o efeito dos taninos sobre a produtividade dos ruminantes depende tanto da quantidade como da qualidade da proteína dietética.

Grainger et al. (2009) conduziram um estudo com 60 vacas leiteiras no início da lactação sob pastejo em azevém e suplementadas com tritcale e fornecimento de 0,9 ou 1,8% de tanino condensado de *Acacia mearnsii* da MS consumida. Verificaram que o fornecimento de tanino reduziu a produção de metano e mudou o sítio de excreção do N da urina para as fezes em vacas produzindo cerca de 30 kg de leite por dia e recebendo suplementação de 5 kg/dia. Contudo, 0,9% de tanino condensado na MS reduziu a produção de leite em 3,6%. A redução na produção de leite neste estudo pode ter sido devido aos efeitos combinados de redução do consumo de MS e reduzida digestibilidade dos compostos energéticos e dos compostos nitrogenados. Outros estudos, como aquele conduzido por Woodward et al. (2004), têm mostrado que os taninos condensados de *Lotus corniculatus* podem beneficiar a produção de leite em vacas ou ovelhas alimentadas com forragens frescas.

Dschaak et al. (2011) avaliaram a inclusão de 3% de extrato tanífero de quebracho (75% de taninos condensados) na MS de dietas com alta ou baixa proporção de volumoso para vacas leiteiras nos terços inicial e médio da lactação. Neste estudo, não foi observado efeito de tratamento, o que está de acordo com Benchaar et al. (2008) e Aguerre et al. (2010) com mais baixas inclusões deste extrato tanífero (0,64 e 1,8% da MS, respectivamente). Quando suplementando em diferentes níveis, Aguerre et al. (2010) relataram que a concentração de proteína verdadeira do leite aumentou com a suplementação de 0,45% de tanino na MS, no entanto, a suplementação com 1,8% de tanino diminuiu a concentração de

proteína verdadeira. O NUL reduziu em 7,2% em vacas suplementadas com extrato tanífero a 1,8% da MS, mas não em menores concentrações de 0,45% a 0,9% da MS. Da mesma forma, Benchaar et al. (2008) não observaram efeitos da suplementação com extrato tanífero a 0,64% da MS sobre o NUL.

Nelson (1996) sugeriu que quando a proteína total do leite for de 3,0 a 3,2% e a concentração de NUL for de 12 a 16 mg/dL, a fração degradável da proteína e a energia líquida de lactação estão, provavelmente, em balanço. Mais baixo NUL pela suplementação com extrato tanífero sugere que este aditivo na dieta de vacas em lactação pode reduzir a excreção de N pela urina, uma vez que, a excreção de N urinário tem sido mostrada ter uma relação linear positiva com o NUL (JONKER et al., 1998). No estudo de Dschaak et al. (2011), contrário ao efeito do tanino sobre o NUL, a eficiência do uso do N para síntese das proteínas do leite não foi afetada pela suplementação com tanino, provavelmente devido ao extrato tanífero não afetar a produção de proteína do leite.

Toral et al. (2011) verificaram que nem o consumo de MS nem a produção e composição do leite foram afetados pela suplementação dietética com 10 g/kg de MS de uma mistura de extrato tanífero. No estudo de Wang et al. (1996), depois de nove semanas recebendo o tratamento houve uma redução no conteúdo de gordura do leite. Contudo, em um experimento de 14 dias conduzido por Turner et al. (2005) com vacas leiteiras alimentadas com *Lotus corniculatus* um aumento de 13% na produção de leite não foi acompanhado por mudanças nas concentrações de gordura e lactose.

Além dos taninos condensados exercerem uma influência variável sobre o consumo, produção e composição química do leite, os taninos hidrolisáveis também parecem ser importantes no metabolismo oxidativo do animal. Liu et al. (2013) avaliaram a inclusão de 1% de extrato tanífero da casca da castanheira (*Castanea sativa*, o qual é rico em taninos hidrolisáveis) na dieta de vacas leiteiras no período de transição, sobre a produção e composição do leite e o *status* antioxidante dos animais. Foi verificado que o extrato tanífero não afeta o consumo de MS, o peso corporal e o escore de condição corporal, a produção e a composição do leite, mas reduz a concentração do radical livre malondialdeído e a contagem de células somáticas no leite, além de aumentar a atividade das enzimas antioxidantes no fígado e plasma.

Estes inconsistentes resultados são provavelmente relacionados à espécie, tempo recebendo a dieta, formulação da dita, tipo de tanino e dose. As diferenças químicas e estruturais entre os taninos hidrolisáveis e os taninos condensados pode ser a explicação para os diferentes efeitos biológicos e, portanto, resultados obtidos utilizando um tipo particular de

taninos não podem ser aplicados a outros. Além do mais, a falta de padronização da análise destes grupos de compostos fenólicos e o uso de diferentes padrões para expressar a concentração de taninos significa que as comparações entre os experimentos raramente podem ser feitas com confiança (MAKKAR, 2003).

### **2.3.3 Impacto no metabolismo intermediário**

Os taninos vêm sendo amplamente estudados como moduladores dos índices glicêmicos em seres humanos e animais de laboratório, uma vez que, estudos recentes têm demonstrado propriedades anti-hiperglicêmicas de muitos alimentos contendo compostos polifenólicos (MANZANO e WILLIAMSON, 2010). No entanto, a biodisponibilidade de polifenóis dietéticos é essencial para a ocorrência dos seus efeitos no metabolismo, e o conhecimento da absorção e metabolização destes compostos é muito importante para o entendimento de sua atividade (SCHULZE, 2014).

Os polifenóis são preferencialmente absorvidos como agliconas, pois são relativamente lipofílicos e podem se difundir passivamente através das membranas biológicas (SCHULZE, 2014). Contudo, muitos dos compostos polifenólicos apresentam-se como glicosídeos, ésteres ou polímeros que não podem ser absorvidos na sua forma original (SCHULZE, 2014). Assim, primeiro eles têm que ser hidrolisados pelas enzimas intestinais ou degradados pela microflora. Conforme Anhê et al. (2013) a habilidade dos polifenóis dietéticos com alto grau de polimerização como as proantocianidinas em interagir com os micro-organismos do trato gastrointestinal e induzir alterações na ecologia sugere que os fenólicos não precisam ser absorvidos para exercer efeitos sobre a glicemia ou concentrações plasmáticas de ureia, por exemplo.

A modulação dos polifenóis pelas bactérias intestinais (ou ruminais) ocorre por muitos mecanismos incluindo hidrólise, clivagem de anel, descarboxilação, redução e desmetilação e somente uma pequena percentagem chega à circulação sistêmica e tecidos, e muito pouco dos compostos absorvidos mantém sua estrutura original (CLIFFORD et al., 2004). Durante ou depois da absorção através do epitélio intestinal, os polifenóis e seus metabólitos microbianos sofrem  $\beta$ -glicuronidação, sulfatação e metilação. Os glicuronídeos, por exemplo, são uma das formas predominantes de flavonóides encontrados na circulação sanguínea (ZHANG et al., 2007). Os conjugados de polifenóis formados dentro dos enterócitos atingem o fígado onde eles são mais uma vez metabolizados e então direcionados para excreção urinária, armazenados nos tecidos, ou podem também ser secretados através da bile, possibilitando a

reciclagem, depois da desconjugação através da circulação enterohepática (MARTIN, 2010). A maior parte dos polifenóis circulantes ocorre como conjugados glicuronados e/ou sulfatados (CRESPY et al., 2001).

A ação anti-hiperglicêmica dos polifenóis é baseada na redução da absorção intestinal de carboidratos dietéticos, na melhoria da liberação e sensibilidade à insulina, bem como na redução da inflamação e estresse oxidativo (HANHINEVA et al., 2010). Os polifenóis dietéticos também podem influenciar no metabolismo da glicose estimulando a absorção periférica de glicose por tecidos sensíveis e não sensíveis à insulina (ANHÊ et al., 2012). Além disso, a supressão da gliconeogênese hepática tem sido descrita como um possível mecanismo para o efeito antidiabético de muitos polifenóis (JUNG et al., 2008). Segundo Hanhineva et al. (2010) os polifenóis podem exercer um importante efeito na redução dos níveis de glicose sanguínea pelo aumento da absorção de glicose pelo músculo e adipócitos. O mesmo autor relata que os polifenóis podem, também, aumentar a atividade das glicoquinases hepáticas, as quais aumentam a utilização de glicose para a síntese de glicogênio, reduzindo a liberação de glicose hepática (gliconeogênese). No entanto, a propriedade mais bem conhecida dos polifenóis sobre o metabolismo dos carboidratos é a inibição da  $\alpha$ -glicosidase (maltase) e  $\alpha$ -amilase, as enzimas chave responsáveis pela digestão dos carboidratos em glicose (SCHULZE, 2014).

Segundo Gonçalves et al. (2011) o efeito inibitório dos polifenóis sobre a  $\alpha$ -amilase parece ser mais acentuado conforme aumenta o grau de polimerização da molécula. Silva et al. (2014) reportaram que entre os taninos, um dos mais extensivamente estudados quanto sua propriedade inibidora da enzima  $\alpha$ -amilase, é extraído da *Acacia mearnsii*, e é rico em catequinas (flavan-3-ol), capazes de inibir também  $\alpha$ -glicosidases e lípases.

Em estudos com animais ruminantes as informações referentes às concentrações sanguíneas de glicose são contraditórias. Grande parte dos estudos realizados até então, foram desenvolvidos com espécies monogástricas, por isso ainda não se conhece exatamente os reais efeitos destas substâncias no metabolismo de ruminantes nem, por exemplo, a estrutura dos metabólitos absorvidos e a principal via de absorção. O melhor entendimento destes fatores poderia auxiliar na previsão dos possíveis efeitos de aditivos ou alimentos taníferos no metabolismo visceral e intermediário de ruminantes.

O efeito dos taninos sobre a síntese hepática de ureia em ruminantes tem sido mais documentado e melhor compreendido entre os pesquisadores. Segundo Jolazadeh et al. (2015), existe uma correlação positiva entre a concentração de amônia no rúmen e a concentração de ureia no sangue. Até então, acredita-se que a menor síntese hepática de ureia

pelo fígado por animais que ingerem taninos é resultante de um menor fluxo de amônia pelo sistema portal, consequência da menor concentração e absorção ruminal de amônia devido à redução na degradação da proteína dietética no rúmen.

A síntese hepática de ureia é um processo necessário ao organismo animal, uma vez que níveis elevados de amônia circulante no sangue podem ser tóxicos. No entanto, este processo requer energia e, quando as concentrações ruminais de amônia são elevadas, o custo energético para a ureagênese e excreção do nitrogênio pode impactar negativamente na eficiência produtiva dos animais. Além disso, a ureia por ser uma pequena molécula neutra que se difunde facilmente pelas membranas e, uma vez que o leite é secretado pelas células alveolares da glândula mamária, se difunde para dentro ou para fora das células secretoras, entrando em equilíbrio com a ureia plasmática (JONKER et al., 1998). Por isso, os taninos têm sido estudados como importantes agentes promotores da redução dos níveis de ureia do leite, além do já conhecido efeito sobre a redução na excreção de nitrogênio através da urina. Entretanto, os dados da literatura são amplamente variáveis e ainda não está bem estabelecido o potencial do extrato tanífero de *Acacia mearnsii* sobre o metabolismo intermediário de ovinos e vacas em lactação.

No entanto, com base nos dados apresentados nesta revisão, é possível inferir que o uso dos taninos, mais especificamente uma fonte concentrada de taninos, pode ser uma alternativa viável para melhorar o desempenho animal, e eficiência alimentar dos rebanhos, bem como melhorar a qualidade dos produtos de origem animal. Além disso, os benefícios sobre o meio ambiente relacionados ao uso dos taninos parecem ser mais expressivos que os resultados de desempenho animal. Dessa forma, o potencial benéfico do uso dos taninos na alimentação de vacas leiteiras e ovinos parece ser maior que os efeitos adversos, o que põem os taninos em evidência na atualidade como um promissor aditivo para alimentação animal, visando maior sustentabilidade e eficiência dos sistemas de produção.

Assim, o estudo da aplicabilidade do extrato tanífero de *Acacia mearnsii* na nutrição de vacas leiteiras nas condições que refletem os reais sistemas de produção semi-intensivos baseados em pastejo em gramíneas de clima tropical e gramíneas de clima temperado, e o conhecimento do efeito dos taninos no metabolismo intermediário é fundamental para se estabelecer os reais efeitos desta substância e sua inter-relação entre espécie forrageira e dose de tanino. Isto poderá representar uma alternativa eficiente, econômica e nutricionalmente, além de contribuir para a sustentabilidade de toda a cadeia produtiva.

### 3 HIPÓTESES

A inclusão de extrato tanífero de Acácia Negra (*Acacia mearnsii*) no suplemento de vacas em lactação sob pastejo em gramínea de clima temperado ou gramínea de clima tropical é capaz de alterar o sítio de excreção de nitrogênio da urina para as fezes, aumentar a eficiência do uso do nitrogênio dietético pelos animais, sem afetar negativamente o consumo de matéria seca, o desempenho produtivo e qualidade do leite, bem como o *status* metabólico dos animais.

Além disso, o extrato tanífero de Acácia Negra é capaz de reduzir a excreção urinária de nitrogênio por ovinos alimentados com dietas à base de feno de gramínea de clima temperado ou gramínea de clima tropical, como consequência da redução na absorção e no fluxo de amônia através do sistema portal e menor síntese hepática de ureia pelos animais, sem interferir negativamente na digestibilidade da matéria orgânica. E, independentemente da espécie animal, a inclusão deste extrato tanífero em dietas à base de gramínea de clima temperado apresenta resultados positivos mais expressivos sobre o metabolismo do nitrogênio àqueles quando incluído em dietas à base de gramínea de clima tropical.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial do uso dietético do extrato tanífero de Acácia Negra (*Acacia mearnsii*) em reduzir a excreção total e urinária de nitrogênio, melhorar a eficiência nutricional e o desempenho produtivo de vacas em lactação mantidas em sistema semi-intensivo de produção sob pastejo em gramínea de clima temperado ou gramínea de clima tropical e, também, avaliar o seu efeito sobre os processos de digestão, excreção de nitrogênio, bem como sobre o fluxo de metabólitos sanguíneos através do sistema portal e fígado de ovinos recebendo dietas à base de feno de gramínea de clima temperado ou gramínea de clima tropical.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se, ou em que grau, a inclusão de extrato tanífero de Acácia negra no concentrado interfere no consumo voluntário da dieta de vacas em lactação e ovinos consumindo dietas à base de gramínea de clima tropical ou clima temperado;
- Avaliar o efeito da inclusão do extrato tanífero no concentrado sobre os processos de digestão, excreção fecal, urinária e balanço de nitrogênio de ovinos confinados e vacas em lactação mantidas em sistema semi-intensivo de produção recebendo como base alimentar gramínea de clima tropical ou gramínea de clima temperado;
- Avaliar os fluxos portal, hepático e visceral de metabólitos em ovinos alimentados com gramínea de clima temperado com inclusão ou não de extrato tanífero na dieta;
- Comparar o desempenho produtivo, a eficiência de utilização do nitrogênio, a composição química do leite e a concentração plasmática de ureia em vacas consumindo ou não o extrato tanífero no concentrado em dietas à base de gramínea de clima tropical ou clima temperado;
- Estabelecer recomendações práticas sobre o uso adequado desta matéria prima na alimentação de vacas em lactação e ovinos.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 LOCAL E ÉPOCA

Foram conduzidos quatro experimentos com animais, sendo que, em dois deles foram utilizados ovinos como modelo experimental e, nos demais, foram utilizadas vacas em lactação. Os experimentos 1 e 2 foram conduzidos com ovinos e vacas em lactação, respectivamente, para avaliar o efeito da inclusão do extrato tanífero em dietas à base de gramínea tropical, e os experimentos 3 e 4 foram conduzidos com ovinos e vacas em lactação, respectivamente, para avaliar o efeito da inclusão do extrato tanífero em dietas à base de gramínea temperada. Os experimentos 1 e 3 com ovinos foram conduzidos nas instalações do Laboratório de Bromatologia e Nutrição de Ruminantes, pertencente ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria. Os experimentos 2 e 4 com vacas em lactação foram conduzidos no Instituto Regional de Desenvolvimento Rural (IRDeR), em Augusto Pestana/RS, pertencente ao Departamento de Estudos Agrários (DEAg) da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ). Os ensaios foram conduzidos de 2013 a 2015.

Os ensaios com os ovinos, em ambas as situações dietéticas, foram conduzidos com a finalidade de obter um maior número de informações relacionadas aos processos de digestão, absorção e metabolização dos nutrientes para melhor explicar os dados obtidos nos estudos realizados com as vacas em lactação.

### 5.2 EXTRATO TANÍFERO EM DIETAS À BASE DE GRAMÍNEA TROPICAL

#### 5.2.1 Experimento 1 – Ensaio de digestibilidade com ovinos

##### 5.2.1.1 Animais, dietas e delineamento experimental

O protocolo de pesquisa seguiu as diretrizes recomendadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria.

Seis ovinos machos castrados da raça Santa Inês ( $67,0 \pm 6,53$  kg de peso corporal (PC)) foram utilizados em um delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema de reversão simples (*cross-over*), em dois períodos de 21 dias, para avaliar o efeito da inclusão dietética do extrato tanífero de *Acacia mearnsii* sobre o consumo de alimentos,

digestibilidade e excreção de nitrogênio. As dietas experimentais foram constituídas de feno de Tifton 85 (*Cynodon dactylon* × *Cynodon nlemfuensis*) fornecido *ad libitum* e concentrado na quantidade de 1,2% do PC (base da matéria seca (MS)).

Os concentrados foram formulados para serem isonitrogenados, sendo compostos por milho moído, farelo de trigo e farelo de soja, sem inclusão de extrato tanífero (0) ou com 1% (base MS) de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* (Weibull Black, Tanac S. A., Montenegro, Brasil). A composição do extrato tanífero utilizado foi de 764, 750 e 181 g/kg de MS de fenóis totais, taninos totais e taninos condensados, respectivamente. O concentrado representou em média 38% do consumo total de MS. A composição química dos alimentos e a proporção dos ingredientes nos concentrados são apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 – Composição química<sup>1</sup> dos alimentos e proporção dos ingredientes nos concentrados

Item	Feno de Tifton	Concentrados <sup>2</sup>	
		Controle	Tanino
MS (%)	86,1	87,0	87,0
Composição (% da MS)			
MO	93,9	95,5	95,5
N total	0,93	3,90	3,90
FDN	79,7	20,1	20,1
FDA	40,0	6,40	6,40
CNF	9,25	46,5	46,5
EE	1,54	6,50	6,50
LDA	4,33	1,43	1,43
NIDN (% N total)	41,9	9,23	9,23
NIDA (% N total)	10,8	3,85	3,85
Ingredientes (% da MS)			
Farelo de soja	—	28,0	27,7
Farelo de trigo	—	36,0	35,6
Milho moído	—	36,0	35,6
Extrato tanífero	—	—	1,00

<sup>1</sup>MS= matéria seca; MO= matéria orgânica; N total= nitrogênio total; FDN= fibra em detergente neutro; FDA= fibra em detergente ácido; CNF= carboidratos não fibrosos; EE= extrato etéreo; LDA= lignina em detergente ácido; NIDN= nitrogênio insolúvel em detergente neutro; NIDA= nitrogênio insolúvel em detergente ácido;

<sup>2</sup>Controle= concentrado sem inclusão de tanino; Tanino= concentrado com inclusão de 1% de extrato tanífero.

Como o concentrado representou 38% da dieta consumida, a inclusão de 1% do extrato tanífero no concentrado representou uma concentração de 0,38% de extrato tanífero em relação ao total de MS ingerida pelos animais.

#### *5.2.1.2 Condução do experimento*

Os animais foram alojados em baias de metabolismo providas de cocho para volumoso e concentrado, cocho para sal mineral e bebedouro com água permanentemente disponível, onde permaneceram durante todo o experimento. Antes da fase experimental os animais passaram por um período pré-experimental de duas semanas para adaptação às instalações, sistema de alimentação, manejo e tratamento contra endo e ectoparasitas. Posteriormente, o experimento foi conduzido em dois períodos de 21 dias, sendo 14 dias de adaptação às dietas e sete dias de coleta de amostras.

O volumoso e o concentrado foram ofertados em cocho separado, três vezes ao dia, às 08 h, 12 h e 17 h. Sal mineral contendo (g/kg): Ca: 120 g, P: 87 g, Na: 147 g, Mn: 1,3 g, Zn: 3,8 g, Fe: 1,8 g, Cu: 0,59 g, Co: 0,040 g, I: 0,080 g, Se: 0,015 g, F: 0,87 g, foi oferecido em cocho separado à vontade.

#### *5.2.1.3 Coleta de amostras*

Os alimentos ofertados foram pesados e amostrados diariamente do 14º ao 20º dia de cada período experimental. O total de fezes foi coletado diariamente ao longo do período de coletas e armazenadas a -20 °C. Ao final de cada período experimental as fezes foram descongeladas, pesadas, homogeneizadas e uma amostra (5% da produção total) de cada animal foi coletada. As amostras dos alimentos e das fezes foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 55 °C durante pelo menos 72 horas, moídas através de peneira de 1mm (moinho Willey, Arthur H. Thomas, Filadélfia, PA, EUA) e armazenadas para posterior análise. A coleta total de urina foi realizada com o auxílio de frascos contendo 100 mL de uma solução de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a 20% (v/v), quantidade suficiente para reduzir o pH a valores abaixo de 2. Da excreção diária total coletou-se uma amostra de 10 mL, a qual foi diluída com água destilada em balão volumétrico de 50 mL e armazenada a -20 °C para posterior análise. Para a análise, as amostras diárias foram compostas por animal e período.

#### 5.2.1. 4 Análises químicas

O teor de matéria seca (MS) das amostras foi determinado por secagem em estufa a 105 °C durante pelo menos 12 horas. O conteúdo de cinzas foi determinado por combustão a 600 °C durante 4 horas e a matéria orgânica (MO) por diferença de massa. O nitrogênio total (N) foi determinado pelo método Kjeldahl (Método 984.13; AOAC, 1997). A análise de fibra em detergente neutro (FDN) foi baseada nos procedimentos descritos por Mertens (2002) com uso de  $\alpha$ -amilase termoestável, exceto que as amostras foram pesadas dentro de sacos filtro de poliéster (porosidade de 16  $\mu$ m) e tratadas com detergente neutro em autoclave a 110 °C por 40 minutos (SENGER et al., 2008). As concentrações de fibra em detergente ácido (FDA) e lignina em detergente ácido (LDA) foram analisadas de acordo com o Método 973.18 da AOAC (1997), exceto que as amostras foram pesadas dentro de sacos filtro de poliéster (porosidade de 16  $\mu$ m) e tratadas com detergente ácido em autoclave a 110°C por 40 minutos (SENGER et al., 2008). O nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN) e o nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) foram determinados de acordo com Licitra et al. (1996). Os teores de extrato etéreo (EE) foram obtidos por extração com éter etílico a 90°C durante 1 hora (Extrator ANKOM modelo XT15, EUA). O nitrogênio microbiano ruminal foi estimado com base na excreção urinária dos derivados das purinas (alantoína, xantina, hipoxantina e ácido úrico), os quais foram analisados colorimetricamente de acordo com a técnica de Chen e Gomes (1992). O ácido úrico foi determinado usando *kit* comercial (BIOCLIN, MG, Brasil), após xantina e hipoxantina serem convertidas a ácido úrico com xantina oxidase. Assim, os teores de ácido úrico foram calculados como a soma de ácido úrico, xantina e hipoxantina (convertidos a ácido úrico) e, os derivados de purinas como a soma do ácido úrico e alantoína. As concentrações de fenóis totais e taninos totais (método Folin-Ciocalteu), assim como a de taninos condensados (TC, método HCl-butanol) foram quantificadas no extrato tanífero após extração com acetona (70% v/v) seguindo os procedimentos descritos por Makkar (2000).

#### 5.2.1.5 Cálculos

O teor de carboidratos não fibrosos (CNF) das amostras dos alimentos foi calculado de acordo com Van Soest et al. (1991), sendo:

$$\text{CNF} = \text{MO} - ((\text{N} \times 6,25) + \text{EE} + (\text{FDN} - (\text{NIDN} \times 6,25)))$$

A digestibilidade aparente da matéria seca (DMS), assim como das demais frações, foi calculada como:

$$\text{DMS} = (\text{MS consumida (g/dia)} - \text{MS fecal (g/dia)}) / \text{MS consumida (g/dia)}$$

A digestibilidade verdadeira da matéria orgânica (DVMO) foi calculada considerando que somente a FDN excretada nas fezes é originada do alimento, onde:

$$\text{DVMO} = \text{Consumo de MO (g/dia)} - \text{FDN fecal (g/dia)} / \text{Consumo de MO (g/dia)}$$

A digestibilidade verdadeira do nitrogênio (DVN) foi calculada como:

$$\text{DVN} = \text{Consumo de N (g/dia)} - \text{NIDN fecal (g/dia)} / \text{Consumo de N (g/dia)}$$

O N endógeno fecal foi calculado assumindo-se que do N total presente nas fezes somente o NIDN é de origem alimentar, sendo a diferença correspondente à fração endógena.

A retenção de nitrogênio foi calculada descontando do consumo de nitrogênio a soma da excreção fecal e urinária de nitrogênio.

#### 5.2.1.6 Análises estatísticas

Os dados foram analisados utilizando o procedimento GLM do programa estatístico SAS (2009) de acordo com o modelo:

$$Y_{ij} = \mu + P_i + T_j + e_{ij}$$

Em que:

$Y_{ij}$  = variável dependente

$\mu$  = média das observações

$P_i$  = efeito aleatório de período ( $i = 1, 2$ )

$T_j$  = efeito fixo de tratamento ( $j = \text{tanino, controle}$ )

$e_{ij}$  = erro residual.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e o efeito de tratamento foi avaliado pelo teste F. Os resultados foram apresentados como médias ajustadas (LSMEANS) e Erro Padrão das Médias (EPM). Valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados significativos. Tendência de efeito de tratamento foi considerada quando  $0,05 < P \leq 0,10$ .

## 5.2.2 Experimento 2 – Ensaio com vacas em lactação

### 5.2.2.1 Animais, dietas e delineamento experimental

O protocolo de pesquisa seguiu as diretrizes recomendadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul. Foram utilizadas quatorze vacas da raça Holandesa em lactação ( $590 \pm 105$  kg de peso corporal (PC)) em um delineamento experimental em blocos ao acaso, no qual foram gerados sete blocos. Cada bloco foi constituído por vacas com produção individual de leite e período de lactação similares, sendo que nenhum bloco incluiu vacas com mais de 100 dias em lactação (média de  $45 \pm 37$  dias) no início do ensaio. O experimento teve duração de 49 dias, dividido em dois períodos. O primeiro período teve duração de 21 dias e todas as vacas receberam a mesma dieta para padronização. Posteriormente, foi atribuído aleatoriamente às vacas, dentro de cada bloco, um tratamento durante 28 dias. As avaliações foram realizadas nos dois períodos experimentais.

As vacas foram mantidas em pastagem de Tifton 85 (*Cynodon dactylon* × *Cynodon nlemfuensis*) em condições de pastejo rotacionado. Todas as vacas foram submetidas às mesmas condições de manejo e alimentação, exceto a formulação do suplemento, o qual constituiu os tratamentos experimentais. O suplemento foi um concentrado comercial peletizado com 20% de proteína bruta, que incluiu na sua composição básica farelo de soja, como fonte proteica, e milho moído e farelo de arroz desengordurado como fonte de alimentos energéticos. Os tratamentos foram a inclusão de 1% (base matéria seca) ou não (controle) de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* (pó de textura fina e coloração marrom, comercializado como Weibull Black, Tanac S. A., Montenegro, Brasil, contendo 764, 750 e 181 g/kg de MS de fenóis totais, taninos totais e taninos condensados, respectivamente) ao concentrado.

A quantidade de suplemento fornecida para cada animal foi estabelecida no início do experimento e não foi alterada. Seguiu-se, como critério prático, o fornecimento de 1 kg de concentrado para cada 5 litros de leite produzidos/vaca/dia. Os animais foram ordenhados mecanicamente duas vezes ao dia, às 8h e 17h, e receberam o alimento concentrado em canzis individuais logo após a ordenha da manhã e antes da ordenha da tarde. Adicionalmente, e após a oferta do concentrado, cada vaca recebeu 1% do PC (base MS) de silagem de milho. A quantidade foi estabelecida no início do experimento e não foi alterada. Durante o tempo

restante, os animais permaneceram nas áreas de pastagens, com livre acesso à água potável e acesso restrito à sombra. A composição química dos alimentos é apresentada na tabela 2.

Tabela 2 – Composição química<sup>1</sup> dos alimentos utilizados

Item	Tifton		Silagem de milho		Concentrados <sup>2</sup>	
	1º P	2º P	1º P	2º P	Controle	Tanino
MS (%)	27,56	32,18	28,49	28,33	87,67	87,94
Composição (% da MS)						
MO	92,4	92,3	94,0	93,3	87,3	87,8
N total	2,02	2,04	0,96	0,96	3,20	3,25
FDN	75,4	75,2	53,6	53,8	20,8	17,7
FDA	35,3	35,0	30,1	29,4	8,03	6,57
CNF	9,73	9,60	32,71	31,85	47,3	50,1
EE	1,73	2,05	2,90	2,94	2,47	2,43
LDA	4,26	3,89	1,92	2,2	1,15	0,26
Taninos totais	–	–	–	–	0,17	0,58
Taninos condensados	–	–	–	–	0,00	0,29
N solúvel (% N total)	20,0	18,1	52,1	53,8	5,81	6,45
NIDN (% N total)	56,3	57,9	19,5	20,8	16,4	13,3
NIDA (% N total)	14,6	18,9	13,2	10,0	15,9	26,2

<sup>1</sup>MS= matéria seca; MO= matéria orgânica; N total= nitrogênio total; FDN= fibra em detergente neutro; FDA= fibra em detergente ácido; CNF= carboidratos não fibrosos; EE= extrato etéreo; LDA= lignina em detergente ácido; NIDN= nitrogênio insolúvel em detergente neutro; NIDA= nitrogênio insolúvel em detergente ácido;

<sup>2</sup>Controle= concentrado sem inclusão de tanino; Tanino= concentrado com inclusão de 1% de extrato tanífero.

Os piquetes tinham tamanho médio de 1 ha e os animais foram manejados em um único rebanho na área experimental e em pastejo rotacionado com lotação fixa. Os períodos de ocupação médios foram de quatro dias.

#### 5.2.2.2 Variáveis relacionadas à produção de forragem

A massa de matéria seca total (MST, kg de MS/ha) foi avaliada por estimativas visuais com dupla amostragem (MANNETJE, 2000), bem como a altura do dossel em cada piquete à entrada e saída dos animais (pré e pós pastejo). Em cada piquete, foram realizadas 20 observações visuais, por, no mínimo, dois avaliadores treinados que percorreram a área experimental e, a intervalos pré-determinados de deslocamento, amostraram áreas representativas da vegetação do piquete como um todo, não sendo amostradas áreas de

exclusão do pastejo. Das 20 estimativas visuais, cinco amostras foram cortadas ao nível do solo, utilizando-se um quadro metálico de  $0,5 \times 0,5$  m ( $0,25$  m<sup>2</sup>). A forragem foi levada à estufa com circulação forçada de ar a  $55^{\circ}\text{C}$  e, após atingir peso constante, foi pesada para a determinação do teor de matéria seca (MS). A massa de matéria seca total desaparecida (kg de MS/ha) foi calculada pela diferença entre a MST pré e pós pastejo. A massa de forragem média foi de 5400 e 2400 kg de MS/há à entrada e saída dos animais, respectivamente. A altura média do dossel foi de 24 cm na entrada dos animais e 18 cm na saída.

### 5.2.2.3 *Estimativa do consumo e excreção fecal*

O consumo de alimentos (volumoso + concentrado) foi calculado a partir de estimativas da produção fecal e da digestibilidade dos alimentos utilizados. A produção fecal total foi estimada usando o indicador externo óxido de cromo III ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ). Nos últimos 14 dias de cada período experimental, 10 cápsulas de gelatina dura contendo 1000 mg de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  cada uma foram fornecidas diariamente a cada animal juntamente com o concentrado (cinco cápsulas na suplementação da manhã e outras cinco na suplementação da tarde, totalizando 10,0 g/vaca/dia de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ). Nos últimos sete dias de cada período, foram coletadas amostras de fezes (aproximadamente 500 gramas) diretamente do reto das vacas, duas vezes ao dia, após a ordenha da manhã e antes da ordenha da tarde.

As amostras de fezes foram armazenadas congeladas ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), posteriormente, secas em estufa com circulação forçada de ar a  $55^{\circ}\text{C}$  durante sete a dez dias, moídas (peneira de 1mm) e armazenadas para posterior análise. Para determinação da concentração de cromo, as amostras de fezes foram compostas por animal e período. O teor de cromo das fezes foi determinado por espectrofotometria de absorção atômica após queima em mufla e solubilização ácido-perclórica (CZARNOCKI, et al., 1961). Para este processo de queima e digestão das amostras, assumiu-se uma perda de 12% de cromo das fezes. Concomitantemente às amostras de fezes, também foram coletadas amostras do concentrado e silagem fornecidos aos animais e diariamente amostras da forragem de cada potreiro por simulação de pastejo. O material foi seco em estufa com circulação forçada de ar ( $55^{\circ}\text{C}$ ) durante pelo menos três dias, moído (peneira de 1 mm) e armazenado para posterior análise. A recuperação fecal do cromo não foi medida e adotou-se o valor de 80% para todos os animais experimentais, conforme descrito na literatura por Ribeiro Filho et al. (2008).

Os teores de matéria seca (MS) das amostras de alimentos e fezes foram determinados por secagem em estufa a  $105^{\circ}\text{C}$  durante pelo menos 12 horas. O conteúdo de cinzas foi

determinado por combustão a 600°C durante 4 horas e a matéria orgânica (MO) por diferença de massa. O nitrogênio total (N) das amostras de alimentos e fezes foi determinado pelo método Kjeldahl (Método 984.13; AOAC, 1997). A análise de fibra em detergente neutro (FDN) foi baseada nos procedimentos descritos por Mertens (2002) com uso de  $\alpha$ -amilase termoestável, exceto que as amostras foram pesadas dentro de sacos filtro de poliéster (porosidade de 16  $\mu$ m) e tratadas com detergente neutro em autoclave a 110°C por 40 minutos (SENGER et al., 2008). As concentrações de fibra em detergente ácido (FDA) e lignina em detergente ácido (LDA) foram analisadas de acordo com o Método 973.18 da AOAC (1997), exceto que as amostras foram pesadas dentro de sacos filtro de poliéster (porosidade de 16  $\mu$ m) e tratadas com detergente ácido em autoclave a 110°C por 40 minutos (SENGER et al., 2008). O nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN), nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA), e o nitrogênio solúvel foram determinados de acordo com Licitra et al. (1996). Os teores de extrato etéreo (EE) foram obtidos por extração com éter etílico a 90°C durante 1 hora (Extrator ANKOM modelo XT15, EUA). O teor de carboidratos não fibrosos (CNF) das amostras dos alimentos foi calculado de acordo com Van Soest et al. (1991), sendo:  $CNF = MO - ((N \times 6,25) + EE + (FDN - (NIDN \times 6,25)))$ . As concentrações de fenóis totais e taninos totais (método Folin-Ciocalteu), assim como a de taninos condensados (TC, método HCl-butanol) foram quantificadas no extrato tanífero e nos concentrados após extração com acetona (70% v/v) seguindo os procedimentos descritos por Makkar (2000).

A digestibilidade *in situ* da matéria seca (DISMS) e da matéria orgânica (DISMO) foi determinada utilizando-se um bovino fistulado no rúmen, sendo as amostras pesadas e incubadas em sacos filtro de poliéster (porosidade de 41  $\mu$ m) durante 48 horas e o resíduo queimado em mufla para descontar o teor de matéria mineral.

O consumo de suplemento e silagem foi obtido através de controles individuais do fornecimento destes alimentos e eventuais sobras. O consumo de pasto foi obtido pelas equações:

$$CPasto = \{PFTotal - (PFSilagem + PFConcentrado)\} / \{1 - (DISMSPasto/100)\}, \text{ onde:}$$

CPasto = Consumo de pasto (kg de MS/vaca/dia);

PFTotal = Produção fecal total (kg de MS/vaca/dia);

PFSilagem = Produção fecal estimada para a silagem (kg de MS/vaca/dia);

PFConcentrado = Produção fecal estimada para o concentrado (kg de MS/vaca/dia); e

DISMSPasto = Digestibilidade das amostras de simulação de pastejo (%).

A produção fecal estimada para a silagem e para o concentrado foi calculada pelas equações:

$$PF_{\text{Concentrado}} = C_{\text{Concentrado}} * \{1 - (DISMS_{\text{Concentrado}}/100)\}, \text{ onde:}$$

$PF_{\text{Concentrado}}$  = Produção fecal estimada para o concentrado (kg de MS/vaca/dia);

$C_{\text{Concentrado}}$  = Consumo de concentrado (kg de MS/vaca/dia); e

$DISMS_{\text{Concentrado}}$  = Digestibilidade do concentrado (%).

$$PFS_{\text{Silagem}} = CS_{\text{Silagem}} * \{1 - (DISMS_{\text{Silagem}}/100)\}, \text{ onde:}$$

$PFS_{\text{Silagem}}$  = Produção fecal estimada para a silagem (kg de MS/vaca/dia);

$CS_{\text{Silagem}}$  = Consumo de silagem (kg de MS/vaca/dia); e

$DISMS_{\text{Silagem}}$  = Digestibilidade da silagem (%).

#### 5.2.2.4 Avaliações e coletas de fluidos corporais

O peso corporal das vacas foi avaliado no início do primeiro período, término do primeiro período e final do segundo período, logo após a ordenha da manhã, antes da suplementação. O escore de condição corporal (ECC) foi avaliado semanalmente. A metodologia para avaliação do ECC foi aquela proposta por Wildman et al. (1982), com escala de 1 a 5 e intervalos de 0,25, estabelecendo-se 1 para a vaca extremamente magra e 5 para a vaca obesa. Essa avaliação foi feita sempre pelo mesmo avaliador devido à subjetividade da medida.

A produção de leite (litros/dia) foi registrada três vezes por semana através da mensuração da produção das ordenhas da manhã e tarde. Amostras de 50 mL de leite (compostas pela ordenha da manhã e tarde) de cada vaca foram coletadas semanalmente e acondicionadas em frascos contendo o conservante bronopol (2-bromo-2-nitropropano-1-3-diol), e enviadas para análise. Foi realizada a contagem de células somáticas (CCS) por método de fluorescência óptica através do analisador de células somáticas Fossomatic (modelo Fossomatic<sup>TM</sup> FC, marca Foss), e a análise dos teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais, extrato seco desengordurado, caseína e nitrogênio uréico por método infravermelho através do analisador de composição química Milkoscan (modelo Milkoscan<sup>TM</sup> FT+, marca Foss) no Laboratório do Leite da Universidade Integrada do Vale do Taquari de Ensino Superior (UNIVATES).

Amostras de sangue foram coletadas de todos os animais uma vez por semana, 5 horas após o fornecimento do suplemento da manhã, em duas alíquotas através da punção da veia coccígea em tubos com vácuo de 10 mL com ativador de coágulo e de 4 mL com heparina e fluoreto de sódio (NaF). Posteriormente, o sangue foi centrifugado a  $3000 \times g$  por 20 minutos para a separação do soro ou plasma. Este material foi coletado e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  em tubos do tipo *ependorf* com capacidade de 2 mL até a análise de metabólitos. A concentração plasmática de nitrogênio uréico foi determinada colorimetricamente utilizando *kit* comercial (BIOCLIN, MG, Brasil).

Durante os últimos sete dias de cada período experimental, foram coletados por meio de massagem perineal 50 mL de urina de cada vaca após a ordenha da manhã e antes da ordenha da tarde. Após, as amostras foram centrifugadas e uma alíquota de 10 mL de urina foi retirada, adicionado 1 mL de ácido sulfúrico 20% (v/v), a fim de manter o pH abaixo de 3,0, diluída com água destilada para o volume de 50 mL e armazenadas congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, nas amostras de urina foram analisadas as concentrações de nitrogênio total pelo método Kjeldahl (Método 984.13; AOAC, 1997) e as concentrações de creatinina e ureia por colorimetria utilizando *kits* comerciais (BIOCLIN, MG, Brasil). O nitrogênio microbiano ruminal foi estimado com base na excreção urinária dos derivados das purinas (alantoína e ácido úrico), os quais foram analisados colorimetricamente conforme Chen e Gomes (1992). A produção diária de urina foi medida em seis vacas com diferentes ECC ao final do experimento a fim de conhecer a excreção diária média de creatinina por unidade de peso corporal. A concentração de creatinina nas amostras de coletas pontuais foi utilizada para estimar o volume de urina produzido diariamente, assumindo-se que a excreção diária de creatinina é função constante do peso do animal (CHIZZOTTI et al., 2008). A partir da concentração de nitrogênio das amostras de coletas pontuais, da produção total de fezes, estimada pela concentração de óxido de cromo, e do volume total de urina, estimado pela concentração de creatinina, foram estimadas as excreções diárias (g) de nitrogênio na urina e nas fezes. Através da estimativa da produção diária de urina também foi calculada a excreção de ureia e derivados de purinas e a síntese de compostos nitrogenados microbianos ruminais.

### 5.2.2.5 Cálculos

A produção de leite corrigida para 4% de gordura foi calculada conforme a fórmula de Gaines descrita no NRC (2001), sendo:

$$\text{Produção de leite corrigida (L/d)} = (0,4 \times \text{produção de leite}) + 15 \times ((\% \text{ de gordura}/100) \times \text{produção de leite}).$$

A eficiência de utilização do N (EUN) para a síntese proteica do leite foi calculada da seguinte forma:

$$\text{EUN} = ((\text{proteína do leite (kg/d)} / 6,38) \times 100) / \text{consumo de N (kg/d)}.$$

### 5.2.2.6 Análises estatísticas

Foi calculada para todas as variáveis a diferença entre os valores obtidos no segundo período experimental menos aqueles obtidos no primeiro período experimental. Esse conjunto de valores diferenciais e os dados de cada período experimental foram analisados de forma independente. Os dados foram analisados utilizando o procedimento GLM do programa estatístico SAS (2009) de acordo com o modelo:

$$Y_{ij} = \mu + B_i + T_j + e_{ij}$$

Em que:

$Y_{ij}$  = variável dependente

$\mu$  = média das observações

$B_i$  = efeito aleatório de bloco (i = 1 a 7)

$T_j$  = efeito fixo de tratamento (j = tanino, controle)

$e_{ij}$  = erro residual.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e o efeito de tratamento foi avaliado pelo teste F. Os resultados foram apresentados como médias ajustadas (LSMEANS) e Erro Padrão das Médias (EPM). Valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados significativos. Tendência de efeito de tratamento foi considerada quando  $0,05 < P \leq 0,10$ .

## 5.3 EXTRATO TANÍFERO EM DIETAS À BASE DE GRAMÍNEA TEMPERADA

### 5.3.1 Experimento 3 – Ensaio de metabolismo visceral com ovinos

#### 5.3.1.1 Animais, dietas e delineamento experimental

Cinco ovinos machos castrados da raça Texel ( $48,3 \pm 3,2$  kg de peso corporal (PC)) foram utilizados em um delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema de reversão simples (*cross-over*), em dois períodos de 21 dias, para avaliar o efeito da inclusão dietética do extrato tanífero de *Acacia mearnsii* sobre o consumo de alimentos, digestibilidade, excreção de nitrogênio e concentração e fluxo de metabólitos sanguíneos através do sistema portal e fígado.

As dietas experimentais foram constituídas de um feno misto de aveia (*Avena sativa*) e azevém (*Lolium multiflorum* Lam) (proveniente das mesmas áreas de pastagem das vacas do experimento 4) fornecido *ad libitum* e suplemento na quantidade de 1,4% do PC (base da matéria seca (MS)). O suplemento foi um concentrado comercial peletizado com 18% de proteína bruta, que incluiu na sua composição básica farelo de soja, como fonte proteica, milho moído e farelo de arroz desengordurado como fonte de alimentos energéticos, e a inclusão de 2% (base matéria seca) ou não (controle) de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* (pó de textura fina e coloração marrom, comercializado como Weibull Black, Tanac S. A., Montenegro, Brasil, contendo 764, 750 e 181 g/kg de MS de fenóis totais, taninos totais e taninos condensados, respectivamente).

O concentrado representou em média 39% do consumo total de MS. Como o concentrado representou 39% da dieta consumida, a inclusão de 2% do extrato tanífero no concentrado representou uma concentração de 0,78% de extrato tanífero em relação ao total de MS ingerida pelos animais.

A composição química dos alimentos é apresentada na tabela 3.

Tabela 3 – Composição química<sup>1</sup> dos alimentos utilizados

Item	Feno de Aveia/Azevém	Concentrados <sup>2</sup>	
		Controle	Tanino
MS (%)	87,4	87,7	87,1
Composição (% da MS)			
MO	92,1	85,4	86,4
N total	1,40	3,02	2,93
FDN	70,8	21,8	19,8
FDA	42,4	9,39	7,79
CNF	14,2	44,4	45,7
EE	1,12	2,96	4,59
LDA	5,82	0,58	0,50
Taninos totais	–	0,14	1,05
Taninos condensados	–	0,00	0,63
N solúvel (% N total)	27,1	5,51	14,1
NIDN (% N total)	31,0	10,7	10,7
NIDA (% N total)	10,8	12,3	12,9

<sup>1</sup>MS= matéria seca; MO= matéria orgânica; N total= nitrogênio total; FDN= fibra em detergente neutro; FDA= fibra em detergente ácido; CNF= carboidratos não fibrosos; EE= extrato etéreo; LDA= lignina em detergente ácido; NIDN= nitrogênio insolúvel em detergente neutro; NIDA= nitrogênio insolúvel em detergente ácido;

<sup>2</sup>Controle= concentrado sem inclusão de tanino; Tanino= concentrado com inclusão de 2% de extrato tanífero.

### 5.3.1.2 Condução do experimento

Em torno de 60 dias antes de iniciar a fase experimental os animais passaram por uma implantação cirúrgica de cateteres permanentes nos ramos da veia mesentérica cranial, veia porta e veias hepáticas, assim como, dissecação e elevação da artéria carótida para o espaço subcutâneo e fixada através da musculatura. O protocolo de pesquisa seguiu as diretrizes recomendadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria, contemplando medicações anestésicas, analgésicas, anti-inflamatórios e antibióticos, contando com a participação de profissionais especializados em tais procedimentos. Após a intervenção cirúrgica, os animais passaram por um período de recuperação mínimo de seis semanas, período o qual foram monitorados através de exame clínico, além da avaliação e controle da dor e análise de cortisol sanguíneo e hemogasometria.

Os animais foram alojados em baias de metabolismo providas de cocho para volumoso e concentrado, cocho para sal mineral e bebedouro com água permanentemente disponível, onde permaneceram durante todo o experimento. Antes da fase experimental, e após o período de recuperação, os animais passaram por um período pré-experimental de duas semanas para

adaptação às instalações, sistema de alimentação, manejo e tratamento contra endo e ectoparasitas. Posteriormente, o experimento foi conduzido em dois períodos de 21 dias, sendo 14 dias de adaptação às dietas e sete dias de coleta de amostras.

O volumoso e o concentrado foram ofertados em cocho separado, três vezes ao dia, às 08 h, 12 h e 17 h. Sal mineral contendo (g/kg): Ca: 120 g, P: 87 g, Na: 147 g, Mn: 1,3 g, Zn: 3,8 g, Fe: 1,8 g, Cu: 0,59 g, Co: 0,040 g, I: 0,080 g, Se: 0,015 g, F: 0,87 g, foi oferecido em cocho separado à vontade.

### 5.3.1.3 Coleta de amostras

Os alimentos ofertados foram pesados e amostrados diariamente do 14º ao 20º dia de cada período experimental. O total de fezes foi coletado diariamente ao longo do período de coletas e armazenadas a -20 °C. Ao final de cada período experimental as fezes foram descongeladas, pesadas, homogeneizadas e uma amostra (5% da produção total) de cada animal foi coletada. As amostras dos alimentos e das fezes foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 55 °C durante pelo menos 72 horas, moídas através de peneira de 1mm (moinho Willey, Arthur H. Thomas, Filadélfia, PA, EUA) e armazenadas para posterior análise.

A coleta total de urina foi realizada com o auxílio de frascos contendo 100 mL de uma solução de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a 20% (v/v), quantidade suficiente para reduzir o pH a valores abaixo de 2. Da excreção diária total coletou-se uma amostra de 10 mL, a qual foi diluída com água destilada em balão volumétrico de 50 mL e armazenada a -20 °C para posterior análise. Para a análise, as amostras diárias foram compostas por animal e período.

Entre o 15º ao 21º dia de cada período experimental foram realizadas as coletas de sangue dos animais. Foi realizado um único dia de coleta para cada animal por período, sendo que a maior parte das coletas se concentraram nos últimos 3 dias de cada período. No dia da coleta, foi implantado no animal um catéter (22 gauges, 0,9 mm d.e. e 25 mm comprimento, Descarpack, SP, Brasil) na artéria carótida, acoplado a uma extensão com uma torneira de três vias, possibilitando a coleta de amostras de sangue arterial.

Para a obtenção dos valores de fluxo de sangue através dos tecidos drenados pela veia porta (TDVP) e fígado dos animais, foi realizada a infusão no ramo cateterizado da veia mesentérica cranial de 15 mL (*primed*), seguido de infusão contínua (2,0 mL/minuto) de uma solução de paraminohipurato (PAH) a 1,5 % (p/v), pH 7,4, com auxílio de uma bomba de infusão (Cole Palmer Instrument, modelo 200-CE, EUA). O PAH (Sigma-AldrichCo., St.

Louis, MO, USA) foi preparado utilizando-se água deionizada de acordo com Huntington et al. (1989), filtrado em filtro de celulose (papel filtro quantitativo, porosidade 7,5 micras, diâmetro 12,5, Nalgon, Alemanha), o pH ajustado para 7,4 com hidróxido de sódio (NaOH) ou ácido clorídrico (HCl), autoclavado a 110 °C por 20 minutos e armazenado a 4 °C em frascos de vidro até as infusões. O PAH foi infundido nos animais a temperatura ambiente, utilizando-se equipos esterelizados (Cale Parmer), equipados com um filtro (0,45 µm) acoplado na extremidade do equipo.

Cinco horas após a alimentação da manhã (08 h), iniciou-se a infusão de PAH (*primed* + infusão contínua). Esta infusão permaneceu constante até o último horário de coleta. A primeira coleta foi realizada 40 minutos após o início da infusão. Foram quatro horários de coletas com intervalo de 60 minutos entre elas, sendo realizadas amostragens de sangue portal, hepático e arterial, simultaneamente, utilizando seringas heparinizadas de 10 mL. Estas amostras foram transferidas para tubos cônicos de centrifuga contendo fluoreto de sódio 35% (NaF), centrifugadas (Eppendorf, modelo 5416, Alemanha) a 2200 × g por 20 minutos, e o plasma coletado e armazenado a -20°C. O controle do hematócrito foi realizado em todos os horários de coleta através da confecção de capilares e processados em centrifuga específica para micro-hematócrito.

A patência dos catéteres durante as coletas de sangue foi mantida por *flushing* com solução fisiológica contendo 20 UI de heparina/mL (0,5 mL de heparina em 125 mL de solução) e entre os períodos de coleta por *flushing* com solução fisiológica contendo 200 IU de heparina, 0,01 mL de penicilina/ampicilina e 0,01 mL de álcool benzílico/mL de solução (HUNTINGTON et al., 1989). Assim, a cada 125 mL de solução fisiológica foi adicionado 1,25 mL de álcool benzílico P.A. (Synth, Diadema, SP, Brasil), 5 mL de heparina contendo 25000 UI, totalizando 200 UI para cada mL, e benzilpenicilina potássica 5000000 UI contabilizando 40000 UI para cada 1 mL ou 1 grama de ampicilina sódica totalizando 8 mg para cada 1 mL.

#### 5.3.1.4 Análises químicas

O teor de matéria seca (MS) das amostras foi determinado por secagem em estufa a 105 °C durante pelo menos 12 horas. O conteúdo de cinzas foi determinado por combustão a 600 °C durante 4 horas e a matéria orgânica (MO) por diferença de massa. O nitrogênio total (N) foi determinado pelo método Kjeldahl (Método 984.13; AOAC, 1997). A análise de fibra em detergente neutro (FDN) foi baseada nos procedimentos descritos por Mertens (2002) com

uso de  $\alpha$ -amilase termoestável, exceto que as amostras foram pesadas dentro de sacos filtro de poliéster (porosidade de 16  $\mu\text{m}$ ) e tratadas com detergente neutro em autoclave a 110 °C por 40 minutos (SENGER et al., 2008). As concentrações de fibra em detergente ácido (FDA) e lignina em detergente ácido (LDA) foram analisadas de acordo com o Método 973.18 da AOAC (1997), exceto que as amostras foram pesadas dentro de sacos filtro de poliéster (porosidade de 16  $\mu\text{m}$ ) e tratadas com detergente ácido em autoclave a 110°C por 40 minutos (SENGER et al., 2008). O nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN), o nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) e o nitrogênio solúvel foram determinados de acordo com Licitra et al. (1996). Os teores de extrato etéreo (EE) foram obtidos por extração com éter etílico a 90°C durante 1 hora (Extrator ANKOM modelo XT15, EUA).

O nitrogênio microbiano ruminal foi estimado com base na excreção urinária dos derivados das purinas (alantoína, xantina, hipoxantina e ácido úrico), os quais foram analisados colorimetricamente de acordo com a técnica de Chen e Gomes (1992). O ácido úrico foi determinado usando *kit* comercial (BIOCLIN, MG, Brasil), após xantina e hipoxantina serem convertidas a ácido úrico com xantina oxidase. Assim, os teores de ácido úrico foram calculados como a soma de ácido úrico, xantina e hipoxantina (convertidos a ácido úrico) e, os derivados de purinas como a soma do ácido úrico e alantoína.

As concentrações de fenóis totais e taninos totais (método Folin-Ciocalteu), assim como a de taninos condensados (TC, método HCl-butanol) foram quantificadas no extrato tanífero e nos concentrados após extração com acetona (70% v/v) seguindo os procedimentos descritos por Makkar (2000).

O volume de células vermelhas das amostras de sangue total foi determinado com uso de tubos capilares em microcentrífuga (Centimicro Quimis, Mod. Q 222H/HM, São Paulo, Brasil). Imediatamente após a coleta, as amostras foram tratadas para análise do PAH. O método de escolha foi o sulfonato-naftileno. Através dos valores obtidos nessa análise, foi possível calcular o fluxo de plasma dos animais. As amostras de plasma foram tratadas inicialmente com ácido tricloroacético 5% (TCA), sendo uma alíquota de 1000  $\mu\text{L}$  de plasma desproteinizada com 9000  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético 5%. Após a precipitação da amostra, a mesma passou por uma filtração rápida (papel filtro quantitativo, porosidade 7,5 micras, diâmetro 12,5, Nalgon, Alemanha). Depois de filtrada, a amostra permaneceu por duas horas em banho-maria a 90 °C e, posteriormente foi analisada para a concentração de PAH utilizando método colorimétrico descrito por Huntington et al. (1982).

A concentração plasmática de glicose (Bioclin K082, MG, Brasil) e as concentrações de ureia no plasma e na urina (Bioclin K047, MG, Brasil) foram determinadas através de *kits*

comerciais, sendo os dois testes enzimático-colorimétricos. A concentração plasmática de amônia foi analisada pelo método fenol-hipoclorito conforme descrito por Weatherburn (1967).

#### 5.3.1.5 Cálculos

O teor de carboidratos não fibrosos (CNF) das amostras dos alimentos foi calculado de acordo com Van Soest et al. (1991), sendo:

$$\text{CNF} = \text{MO} - ((\text{N} \times 6,25) + \text{EE} + (\text{FDN} - (\text{NIDN} \times 6,25)))$$

A digestibilidade aparente da matéria seca (DMS), assim como das demais frações, foi calculada como:

$$\text{DMS} = (\text{MS consumida (g/dia)} - \text{MS fecal (g/dia)}) / \text{MS consumida (g/dia)}$$

A digestibilidade verdadeira da matéria orgânica (DVMO) foi calculada considerando que somente a FDN excretada nas fezes era originada do alimento, onde:

$$\text{DVMO} = \text{Consumo de MO (g/dia)} - \text{FDN fecal (g/dia)} / \text{Consumo de MO (g/dia)}$$

A digestibilidade verdadeira do nitrogênio (DVN) foi calculada como:

$$\text{DVN} = \text{Consumo de N (g/dia)} - \text{NIDN fecal (g/dia)} / \text{Consumo de N (g/dia)}$$

O N endógeno fecal foi calculado assumindo-se que do N total presente nas fezes somente o NIDN é de origem alimentar, sendo a diferença correspondente à fração endógena.

O estudo da produção ou utilização de um metabólito em um órgão específico requer conhecimento da taxa de entrada e saída do metabólito no órgão. Assim, o fluxo de sangue ou plasma juntamente com a diferença na concentração do metabólito em um determinado órgão origina esta informação. O fluxo de plasma (FP) através dos tecidos drenados pela veia porta (TDVP), fígado e tecidos viscerais (TV) foi calculado de acordo com Katz e Bergman (1969) como:

$$\text{FP (L/h)} = \text{IRPAH} / (\text{VPAH} - \text{APAH})$$

onde, IRPAH é a taxa de infusão do PAH (mg/h), VPAH e APAH são a concentração de PAH (mg/L) nos plasmas venosos (portal ou hepático) e arterial, respectivamente.

O fluxo portal ou visceral líquido dos metabólitos foi estimado como a diferença entre a concentração portal ou hepática menos a concentração arterial do nutriente, multiplicado pelo fluxo de plasma portal ou hepático, respectivamente. Considerando o metabolismo visceral total o resultado da soma do metabolismo portal e hepático, então o metabolismo hepático foi calculado como a diferença entre o fluxo visceral menos o fluxo portal líquido dos metabólitos.

### 5.3.1.6 Análises estatísticas

Os dados de consumo, digestibilidade, excreção fecal e urinária e, síntese de compostos nitrogenados microbianos ruminais foram analisados utilizando o procedimento GLM do programa estatístico SAS (2009) de acordo com o modelo:

$$Y_{ij} = \mu + P_i + T_j + e_{ij}$$

Em que:

$Y_{ij}$  = variável dependente

$\mu$  = média das observações

$P_i$  = efeito aleatório de período ( $i = 1, 2$ )

$T_j$  = efeito fixo de tratamento ( $j = \text{tanino, controle}$ )

$e_{ij}$  = erro residual.

Os dados derivados das amostras de sangue coletadas em cada intervalo de amostragem foram analisados como medidas repetidas no tempo utilizando o procedimento MIXED do programa estatístico SAS (2009) de acordo com o modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + P_i + T_j + Tp_k + (T \times Tp)_{jk} + e_{ijk}$$

Em que:

$Y_{ij}$  = variável dependente

$\mu$  = média das observações

$P_i$  = efeito aleatório de período ( $i = 1, 2$ )

$T_j$  = efeito fixo de tratamento ( $j = \text{tanino, controle}$ )

$Tp_k$  = efeito de tempo de coleta

$(T \times Tp)_{jk}$  = efeito da interação entre tratamento e tempo de coleta

$e_{ij}$  = erro residual.

Todos os resultados foram submetidos à análise de variância e o efeito de tratamento foi avaliado pelo teste F. Os resultados foram apresentados como médias ajustadas (LSMEANS) e Erro Padrão das Médias (EPM). Valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados significativos. Tendência de efeito de tratamento foi considerada quando  $0,05 < P \leq 0,10$ .

### 5.3.2 Experimento 4 – Ensaio com vacas em lactação

O protocolo de pesquisa seguiu as diretrizes recomendadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul. Foram utilizadas quatorze vacas da raça Holandesa em lactação ( $538 \pm 69$  kg de peso corporal (PC)) em um delineamento experimental em blocos ao acaso, no qual foram gerados sete blocos. Cada bloco foi constituído por vacas com produção individual de leite e período de lactação similares, sendo que nenhum bloco incluiu vacas com mais de 100 dias em lactação (média de  $68 \pm 31$  dias) no início do ensaio. O experimento teve duração de 49 dias, dividido em dois períodos. O primeiro período teve duração de 21 dias e todas as vacas receberam a mesma dieta para padronização. Posteriormente, foi atribuído aleatoriamente às vacas, dentro de cada bloco, um tratamento durante 28 dias. As avaliações foram realizadas nos dois períodos experimentais.

No período 1 as vacas foram mantidas em uma pastagem mista de aveia branca (*Avena sativa*) e azevém (*Lolium multiflorum* Lam), com estimativa visual de 20 a 30% de participação de aveia e no período 2 exclusivamente azevém, em condições de pastejo rotacionado em ambos os períodos. As vacas de cada bloco foram submetidas às mesmas condições de manejo e alimentação, exceto a formulação do suplemento, o qual constituiu os tratamentos experimentais. O suplemento foi um concentrado comercial peletizado com 18% de proteína bruta, que incluiu na sua composição básica farelo de soja, como fonte proteica, e milho moído e farelo de arroz desengordurado como fonte de alimentos energéticos. Os tratamentos foram a inclusão de 2% (base matéria seca) ou não (controle) de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* (pó de textura fina e coloração marrom, comercializado como Weibull Black, Tanac S. A., Montenegro, Brasil, contendo 764, 750 e 181 g/kg de MS de fenóis totais, taninos totais e taninos condensados, respectivamente) ao concentrado.

A quantidade de suplemento fornecida para cada animal foi estabelecida no início do experimento e não foi alterada. Seguiu-se, como critério prático, o fornecimento de 1 kg de concentrado para cada 5 litros de leite produzidos/vaca/dia. Os animais foram ordenhados mecanicamente duas vezes ao dia, às 8h e 17h, e receberam o alimento concentrado em canzís

individuais logo após a ordenha da manhã e antes da ordenha da tarde. Durante o tempo restante, os animais permaneceram nas áreas de pastagens, com livre acesso à água potável e acesso restrito à sombra. A composição química dos alimentos é apresentada na tabela 4.

Tabela 4 – Composição química<sup>1</sup> dos alimentos utilizados

Item	Aveia/Azevém		Concentrados <sup>2</sup>	
	1° P	2° P	Controle	Tanino
MS (%)	16,4	15,9	87,7	87,1
Composição (% da MS)				
MO	89,2	88,1	85,4	86,4
N total	2,86	3,90	3,02	2,93
FDN	50,0	54,1	21,8	19,8
FDA	24,8	26,0	9,39	7,79
CNF	23,9	15,7	44,4	45,7
EE	3,67	3,42	2,96	4,59
LDA	0,70	0,97	0,58	0,50
Taninos totais	–	–	0,14	1,05
Taninos condensados	–	–	0,00	0,63
N solúvel (% N total)	33,4	29,1	5,51	14,07
NIDN (% N total)	35,2	39,0	10,7	10,7
NIDA (% N total)	6,92	6,11	12,3	12,9

<sup>1</sup>MS= matéria seca; MO= matéria orgânica; N total= nitrogênio total; FDN= fibra em detergente neutro; FDA= fibra em detergente ácido; CNF= carboidratos não fibrosos; EE= extrato etéreo; LDA= lignina em detergente ácido; NIDN= nitrogênio insolúvel em detergente neutro; NIDA= nitrogênio insolúvel em detergente ácido;

<sup>2</sup>Controle= concentrado sem inclusão de tanino; Tanino= concentrado com inclusão de 2% de extrato tanífero.

Os piquetes tinham tamanho médio de 1 ha e os animais foram manejados em um único rebanho na área experimental e em pastejo rotacionado com lotação fixa. Os períodos de ocupação médios foram de três dias. A massa de forragem média foi de 2500 e 1200 kg de MS/há à entrada e saída dos animais, respectivamente. A altura média do dossel foi de 19 cm na entrada dos animais e 12 cm na saída.

A estimativa da produção fecal e do consumo de pasto seguiu a mesma metodologia descrita para o experimento 2, e conforme a equação a seguir:

$$CPasto = \{PFTotal - PFConcentrado\} / \{1 - (DISMSPasto/100)\}, \text{ onde:}$$

CPasto = Consumo de pasto (kg de MS/vaca/dia);

PFTotal = Produção fecal total (kg de MS/vaca/dia);

PFConcentrado = Produção fecal estimada para o concentrado (kg de MS/vaca/dia); e

DISMSPasto = Digestibilidade das amostras de simulação de pastejo (%).

Todas as demais avaliações e coletas de fluidos corporais, cálculos e as análises estatísticas foram realizadas exatamente da mesma forma como descrito para o experimento 2.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 EXPERIMENTO 1

O consumo de MS, MO e FDN, bem como a digestibilidade destas frações da dieta, foram similares ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos (Tabela 5).

No entanto, a digestibilidade verdadeira do N e a excreção fecal de N endógeno reduziram ( $P\leq 0,05$ ) pela inclusão do extrato tanífero na dieta (Tabela 6). O consumo de N, a digestibilidade aparente, a excreção total de N através das fezes e urina, assim como a retenção de N pelos animais e a síntese de compostos nitrogenados microbianos ruminais não foram alterados com a inclusão do tanino na dieta ( $P>0,05$ ).

Tabela 5 – Consumo e digestibilidade total da matéria seca (MS), matéria orgânica (MO) e fibra em detergente neutro (FDN) em ovinos alimentados com feno de tifton (0,62) mais concentrado (0,38) com ou sem inclusão de extrato tanífero

Item	Tratamentos <sup>1</sup>		EPM <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>
	Controle	Tanino		
Consumo total (g/d)				
MS	1814	1828	57,5	0,866
MO	1714	1727	54,3	0,869
FDN	1032	1045	32,2	0,780
Consumo de MS (% do PC)	2,72	2,73	0,045	0,799
Consumo de MO (g/kg PM)	73,2	74,1	1,01	0,573
Digestibilidade aparente				
MO	0,77	0,77	0,013	0,717
FDN	0,72	0,72	0,016	0,815
Digestibilidade verdadeira				
MO	0,83	0,83	0,010	0,860
Consumo de MO digestível (g/d)	1315	1337	48,4	0,763

<sup>1</sup>Controle=concentrado sem inclusão de tanino; Tanino=concentrado com inclusão de 1% de extrato tanífero;

<sup>2</sup>Erro padrão das médias, onde n=6 por tratamento;

<sup>3</sup>Probabilidade do erro tipo I da análise de variância.

Tabela 6 – Digestibilidade total, excreção fecal e urinária, nitrogênio microbiano e balanço de nitrogênio em ovinos alimentados com feno de tifton (0,62) mais concentrado (0,38) com ou sem inclusão de extrato tanífero

Item	Tratamentos <sup>1</sup>		EPM <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>
	Controle	Tanino		
Consumo (g/d)	38,20	38,25	1,343	0,980
Digestibilidade				
Aparente	0,82	0,82	0,008	0,760
Verdadeira	0,97	0,96	0,002	0,009
Excreção (g/d)				
N fecal total	6,87	6,73	0,433	0,832
N urina	21,8	21,0	0,95	0,549
N endógeno (% do N fecal)	81,1	76,1	0,68	0,004
N microbiano (g/d)	22,2	22,0	1,44	0,726
Retenção de N (g/d)	9,50	10,52	0,640	0,302

<sup>1</sup>Controle=concentrado sem inclusão de tanino; Tanino=concentrado com inclusão de 1% de extrato tanífero;

<sup>2</sup>Erro padrão das médias, onde n=6 por tratamento;

<sup>3</sup>Probabilidade do erro tipo I da análise de variância.

## 6.2 EXPERIMENTO 2

A inclusão de extrato tanífero na dieta não promoveu alteração ( $P>0,05$ ) no peso e escore de condição corporal dos animais (Tabela 7). Da mesma forma, todos os parâmetros de consumo avaliados como, consumo total de MS, consumo de MO, FDN, N, bem como o consumo de MS do pasto, foram similares ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos (Tabela 8).

Tabela 7 – Peso e escore de condição corporal de vacas mantidas em pastagem de tifton e suplementadas com concentrado com ou sem inclusão de 1,0% de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* no concentrado (0,21% da dieta)

TRAT <sup>1</sup>	1º Período			2º Período			Diferença <sup>2</sup>		
	Média	EPM <sup>3</sup>	P <sup>4</sup>	Média	EPM	P	Média	EPM	P
Peso Corporal (kg)									
CON	580,8			572,1			-8,67		
TAN	582,9	32,70	0,964	581,1	30,9	0,842	-1,83	5,609	0,408
Escore de Condição Corporal <sup>5</sup>									
CON	2,77			2,69			-0,08		
TAN	2,65	0,133	0,536	2,75	0,103	0,703	0,10	0,073	0,115

<sup>1</sup>TRAT= tratamentos; CON= concentrado sem inclusão de tanino; TAN= concentrado com inclusão de 1% de extrato tanífero;

<sup>2</sup>Média do 2º período – média do 1º período;

<sup>3</sup>Erro padrão das médias, onde n=7 por tratamento;

<sup>4</sup>Probabilidade do erro tipo I da análise de variância;

<sup>5</sup>Escala de 1 a 5, sendo 1 muito magra e 5 muito gorda.

Na tabela 9 são apresentados os resultados de produção diária de leite e produção corrigida para 4% de gordura, contagem de células somáticas e composição do leite. Nenhum destes parâmetros avaliados foi influenciado ( $P > 0,05$ ) pela inclusão do tanino na dieta das vacas. A eficiência alimentar (litros de leite/kg de MS ingerida), a eficiência de utilização do N para a síntese das proteínas do leite, e a concentração plasmática de N-ureia também foram similares entre os tratamentos (Tabela 10).

Tabela 8 – Consumo por vacas mantidas em pastagem de tifton e suplementadas com concentrado com ou sem inclusão de 1,0% de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* no concentrado (0,21% da dieta)

(continua)

TRAT <sup>1</sup>	1º Período			2º Período			Diferença <sup>2</sup>		
	Média	EPM <sup>3</sup>	P <sup>4</sup>	Média	EPM	P	Média	EPM	P
Consumo de MS (kg/d)									
CON	22,80	1,133	0,923	22,94	0,924	0,961	0,14	0,698	0,824
TAN	22,96			22,87			-0,09		
Consumo de MS (% do PC)									
CON	4,05	0,251	0,920	4,04	0,173	0,750	-0,003	0,1247	0,810
TAN	4,01			3,96			-0,047		
Consumo de MO (kg/d)									
CON	20,91	1,046	0,912	20,99	0,849	0,977	0,07	0,645	0,827
TAN	21,08			20,95			-0,13		
Consumo de N (kg/d)									
CON	0,483	0,0305	0,875	0,474	0,0217	0,905	-0,009	0,0172	0,899
TAN	0,490			0,477			-0,013		
Consumo de FDN (kg/d)									
CON	13,47	0,746	0,908	13,70	0,574	0,749	0,24	0,534	0,855
TAN	13,34			13,44			0,09		
Consumo de Concentrado (kg de MS/d)									
CON	4,62	0,341	0,756	4,62	0,341	0,756	0,00	0,000	0,000
TAN	4,78			4,78			0,00		
Consumo de Concentrado (% do CMS)									
CON	20,38	1,522	0,808	20,19	1,201	0,734	-0,20	0,621	0,950
TAN	20,92			20,78			-0,14		

Tabela 8 – Consumo por vacas mantidas em pastagem de tifton e suplementadas com concentrado com ou sem inclusão de 1,0% de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* no concentrado (0,21% da dieta)

(conclusão)

TRAT <sup>1</sup>	1º Período			2º Período			Diferença <sup>2</sup>		
	Média	EPM <sup>3</sup>	P <sup>4</sup>	Média	EPM <sup>3</sup>	P <sup>4</sup>	Média	EPM <sup>3</sup>	P <sup>4</sup>
Consumo de Silagem (kg de MS/d)									
CON	4,77			4,78			0,01		
TAN	4,79	0,304	0,972	4,74	0,291	0,922	-0,04	0,082	0,634
Consumo de Silagem (% do CMS)									
CON	21,04			20,88			-0,16		
TAN	20,96	1,314	0,964	20,71	1,046	0,911	-0,24	0,727	0,937
Consumo de Pasto (kg de MS/d)									
CON	13,41			13,53			0,13		
TAN	13,39	1,051	0,993	13,35	0,714	0,861	-0,04	0,694	0,868
Consumo de Pasto (% do CMS)									
CON	58,57			58,93			0,36		
TAN	58,12	2,474	0,901	58,50	1,865	0,874	0,38	1,300	0,992

<sup>1</sup>TRAT= tratamentos; CON= concentrado sem inclusão de tanino; TAN= concentrado com inclusão de 1% de extrato tanífero;

<sup>2</sup>Média do 2º período – média do 1º período;

<sup>3</sup>Erro padrão das médias, onde n=7 por tratamento;

<sup>4</sup>Probabilidade do erro tipo I da análise de variância.

Tabela 9 – Produção e composição do leite de vacas mantidas em pastagem de tifton e suplementadas com concentrado com ou sem inclusão de 1,0% de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* no concentrado (0,21% da dieta)

(continua)

TRAT <sup>1</sup>	1º Período			2º Período			Diferença <sup>2</sup>		
	Média	EPM <sup>3</sup>	P <sup>4</sup>	Média	EPM	P	Média	EPM	P
Produção de Leite (L/d)									
CON	27,74			24,94			-2,80		
TAN	27,94	2,092	0,946	24,69	1,694	0,919	-3,25	1,002	0,755
Produção de Leite Corrigida (L/d) <sup>5</sup>									
CON	23,50			19,29			-4,22		
TAN	23,76	1,676	0,915	20,00	1,210	0,686	-3,76	1,018	0,761
Contagem de Células Somáticas (x 1000 células/mL)									
CON	161,6			183,1			21,5		
TAN	154,1	51,13	0,920	116,9	45,87	0,346	-37,2	21,75	0,101

Tabela 9 – Produção e composição do leite de vacas mantidas em pastagem de tifton e suplementadas com concentrado com ou sem inclusão de 1,0% de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* no concentrado (0,21% da dieta)

(conclusão)

TRAT <sup>1</sup>	1º Período			2º Período			Diferença <sup>2</sup>		
	Média	EPM <sup>3</sup>	P <sup>4</sup>	Média	EPM	P	Média	EPM	P
Gordura (%)									
CON	3,00			2,73			-0,27		
TAN	3,12	0,088	0,379	2,86	0,183	0,616	-0,25	0,156	0,925
Gordura (kg/d)									
CON	0,828			0,637			-0,189		
TAN	0,846	0,0516	0,812	0,681	0,0425	0,490	-0,164	0,0494	0,730
Proteína (%)									
CON	2,82			2,88			0,06		
TAN	2,78	0,093	0,786	2,86	0,076	0,882	0,08	0,038	0,751
Proteína (kg/d)									
CON	0,768			0,703			-0,064		
TAN	0,769	0,0456	0,982	0,693	0,0377	0,845	-0,079	0,0251	0,694
Lactose (%)									
CON	4,53			4,44			-0,09		
TAN	4,46	0,071	0,546	4,43	0,074	0,987	-0,03	0,029	0,169
Lactose (kg/d)									
CON	1,254			1,108			-0,146		
TAN	1,251	0,0996	0,982	1,100	0,0816	0,947	-0,149	0,045	0,967
Sólidos Totais (%)									
CON	11,34			11,07			-0,27		
TAN	11,43	0,274	0,821	11,21	0,230	0,667	-0,21	0,174	0,831
Extrato Seco Desengordurado (%)									
CON	8,20			8,28			0,07		
TAN	8,15	0,109	0,743	8,26	0,092	0,882	0,1	0,048	0,650
Caseína (%)									
CON	2,10			1,90			-0,20		
TAN	2,10	0,100	0,957	1,89	0,058	0,880	-0,21	0,062	0,968
Caseína (kg/d)									
CON	0,568			0,463			-0,105		
TAN	0,577	0,0421	0,891	0,456	0,0246	0,845	-0,121	0,0325	0,743
N-ureia (mg/dL)									
CON	10,51			8,97			-1,55		
TAN	11,51	1,319	0,605	11,90	1,279	0,134	0,39	1,204	0,279

<sup>1</sup>TRAT= tratamentos; CON= concentrado sem inclusão de tanino; TAN= concentrado com inclusão de 1% de extrato tanífero;

<sup>2</sup>Média do 2º período – média do 1º período;

<sup>3</sup>Erro padrão das médias, onde n=7 por tratamento;

<sup>4</sup>Probabilidade do erro tipo I da análise de variância;

<sup>5</sup>Produção de leite corrigida para 4% de gordura.

Tabela 10 – Eficiência alimentar, eficiência de utilização do N e concentração de N-ureia no plasma de vacas mantidas em pastagem de tifton e suplementadas com concentrado com ou sem inclusão de 1,0% de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* no concentrado (0,21% da dieta)

TRAT <sup>1</sup>	1º Período			2º Período			Diferença <sup>2</sup>		
	Média	EPM <sup>3</sup>	P <sup>4</sup>	Média	EPM	P	Média	EPM	P
Eficiência alimentar (Litros de leite/kg MS)									
CON	1,21	0,083	0,954	1,09	0,067	0,853	-0,13	0,053	0,731
TAN	1,22			1,07			-0,15		
Eficiência alimentar corrigida (Litros de leite/kg MS) <sup>5</sup>									
CON	1,06	0,071	0,909	0,88	0,05	0,889	-0,17	0,046	0,944
TAN	1,07			0,89			-0,18		
Eficiência de utilização do N para síntese proteica do leite (%)									
CON	25,2	1,48	0,888	23,6	1,39	0,684	-1,60	0,735	0,626
TAN	24,9			22,8			-2,12		
N-ureia no plasma (mg/dL)									
CON	11,66	0,716	0,424	11,17	1,003	0,296	-0,49	0,426	0,248
TAN	12,50			12,73			0,25		

<sup>1</sup>TRAT= tratamentos; CON= concentrado sem inclusão de tanino; TAN= concentrado com inclusão de 1% de extrato tanífero;

<sup>2</sup>Média do 2º período – média do 1º período;

<sup>3</sup>Erro padrão das médias, onde n=7 por tratamento;

<sup>4</sup>Probabilidade do erro tipo I da análise de variância;

<sup>5</sup>Calculada a partir da produção de leite corrigida para 4% de gordura.

Na tabela 11 são apresentados os resultados de consumo, excreção fecal e urinária de N, e as relações entre produção de leite e excreção total de N, e entre excreção de ureia e excreção de creatinina na urina. O consumo e a excreção fecal de N não foram afetados pela inclusão do extrato tanífero no concentrado ( $P > 0,05$ ). No entanto, a excreção de N total através da urina (em g/d e em % do consumo de N), a excreção de N-ureia (em g/d, % do consumo de N e % do N total da urina), assim como a relação ureia:creatinina aumentaram pela inclusão do tanino na dieta ( $P \leq 0,05$ ), tanto no 2º período experimental como entre os períodos de avaliação. A excreção total de N (urina + fezes) tendeu a aumentar, tanto em g/d ( $P = 0,065$ ) como em % do consumo de N ( $P = 0,070$ ), e também houve aumento ( $P \leq 0,05$ ) entre

os períodos experimentais devido à presença do tanino na dieta. Contrariamente, a relação entre litros de leite:kg de N excretado apresentou uma redução mais acentuada entre os períodos experimentais quando os animais ingeriram extrato tanífero ( $P \leq 0,05$ ).

Tabela 11 – Consumo e excreção de N por vacas mantidas em pastagem de tifton e suplementadas com concentrado com ou sem inclusão de 1,0% de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* no concentrado (0,21% da dieta)

(continua)

TRAT <sup>1</sup>	1º Período			2º Período			Diferença <sup>2</sup>		
	Média	EPM <sup>3</sup>	P <sup>4</sup>	Média	EPM	P	Média	EPM	P
Consumo de N (g/d)									
CON	483,0			473,5			-9,48		
TAN	490,0	30,50	0,875	477,3	21,74	0,905	-12,66	17,222	0,899
N urina (g/d)									
CON	149,7			125,4			-24,24		
TAN	141,4	7,59	0,459	149,4	5,26	0,008	7,94	5,868	0,003
N urina (% CN) <sup>5</sup>									
CON	31,43			26,75			-4,68		
TAN	29,26	1,944	0,448	31,62	1,263	0,020	2,35	1,808	0,019
N-ureia urina (g/d)									
CON	97,63			77,33			-20,28		
TAN	87,17	5,905	0,237	99,93	3,414	0,0007	12,76	4,704	0,0004
N-ureia urina (% CN)									
CON	20,44			16,61			-3,83		
TAN	18,03	1,389	0,248	21,22	1,049	0,010	3,19	1,306	0,003
N-ureia urina (% N total urina)									
CON	64,88			61,71			-3,16		
TAN	61,56	1,758	0,210	67,02	1,370	0,020	5,45	1,605	0,003
N fecal (g/d)									
CON	144,9			145,6			0,71		
TAN	145,1	7,43	0,988	148,4	4,99	0,698	3,37	5,594	0,744
N fecal (% CN)									
CON	30,23			30,82			0,59		
TAN	29,73	0,844	0,681	31,12	0,677	0,761	1,39	0,431	0,214
Excreção total de N (g/d) <sup>6</sup>									
CON	294,6			271,0			-23,53		
TAN	286,5	11,99	0,643	297,8	9,22	0,065	11,32	6,436	0,003
Excreção total de N (% CN)									
CON	61,67			57,57			-4,09		
TAN	58,99	2,331	0,435	62,74	1,818	0,070	3,75	1,757	0,009

Tabela 11 – Consumo e excreção de N por vacas mantidas em pastagem de tifton e suplementadas com concentrado com ou sem inclusão de 1,0% de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* no concentrado (0,21% da dieta)

(conclusão)

TRAT <sup>1</sup>	1º Período			2º Período			Diferença <sup>2</sup>		
	Média	EPM <sup>3</sup>	P <sup>4</sup>	Média	EPM	P	Média	EPM	P
Relação litros de leite:kg de N excretado									
CON	94,61			92,09			-2,52		
TAN	97,25	6,415	0,777	82,26	5,969	0,270	-14,99	2,367	0,003
Relação ureia:creatinina									
CON	7,07			5,64			-1,44		
TAN	6,21	0,461	0,211	7,13	0,397	0,022	0,93	0,375	0,001

<sup>1</sup>TRAT= tratamentos; CON= concentrado sem inclusão de tanino; TAN= concentrado com inclusão de 1% de extrato tanífero;

<sup>2</sup>Média do 2º período – média do 1º período;

<sup>3</sup>Erro padrão das médias, onde n=7 por tratamento;

<sup>4</sup>Probabilidade do erro tipo I da análise de variância;

<sup>5</sup>% CN = porcentagem em relação ao consumo de N;

<sup>6</sup>Excreção total de N (g/d) = N fecal + N urinário.

As excreções diárias de alantoína, ácido úrico e do total de derivados de purinas através da urina, bem como a síntese de compostos nitrogenados microbianos ruminais foram semelhantes ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos (Tabela 12).

Tabela 12 – Excreção de derivados de purinas e síntese de N microbiano por vacas mantidas em pastagem de tifton e suplementadas com concentrado com ou sem inclusão de 1,0% de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* no concentrado (0,21% da dieta)

TRAT <sup>1</sup>	1º Período			2º Período			Diferença <sup>2</sup>		
	Média	EPM <sup>3</sup>	P <sup>4</sup>	Média	EPM	P	Média	EPM	P
Alantoína (mmol/d)									
CON	251,2			257,6			6,40		
TAN	248,4	16,66	0,907	238,5	13,24	0,329	-9,93	18,280	0,541
Ácido úrico (mmol/d)									
CON	27,84			27,43			-0,40		
TAN	23,73	2,857	0,332	24,28	2,453	0,383	0,55	2,147	0,761
Derivados de purinas (mmol/d)									
CON	279,1			285,1			6,02		
TAN	272,2	18,74	0,799	262,8	13,26	0,259	-9,42	19,887	0,595
N microbiano (g/d)									
CON	169,9			174,6			4,72		
TAN	164,7	12,82	0,783	158,0	8,80	0,210	-6,78	14,420	0,585

<sup>1</sup>TRAT= tratamentos; CON= concentrado sem inclusão de tanino; TAN= concentrado com inclusão de 1% de extrato tanífero;

<sup>2</sup>Média do 2º período – média do 1º período;

<sup>3</sup>Erro padrão das médias, onde n=7 por tratamento;

<sup>4</sup>Probabilidade do erro tipo I da análise de variância.

### 6.3 EXPERIMENTO 3

Nenhum dos parâmetros de consumo avaliados, nem mesmo a digestibilidade da MS, MO e FDN sofreram modificações pela inclusão de extrato tanífero na dieta dos animais ( $P>0,05$ ) (Tabela 13). No entanto, houve redução ( $P\leq 0,05$ ) das digestibilidades aparente e verdadeira do N e da excreção de ureia através da urina (Tabela 14). O consumo, a excreção fecal total e endógena de N, bem como a síntese de compostos nitrogenados microbianos ruminais foram similares entre os tratamentos.

Tabela 13 – Consumo e digestibilidade total da matéria seca (MS), matéria orgânica (MO) e fibra em detergente neutro (FDN) em ovinos alimentados com feno de aveia e azevém (0,61) mais concentrado (0,39) com ou sem inclusão de extrato tanífero

Item	Tratamentos <sup>1</sup>		EPM <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>
	Controle	Tanino		
Consumo total (g/d)				
MS	1567	1555	38,3	0,822
MO	1401	1398	35,4	0,947
FDN	805	773	36,0	0,547
Consumo de MS (% do PC)	3,08	3,20	0,147	0,597
Consumo de MO (g/kg PM)	73,56	75,94	3,029	0,594
Digestibilidade aparente				
MO	0,60	0,60	0,010	0,953
FDN	0,47	0,45	0,014	0,359
Digestibilidade verdadeira				
MO	0,70	0,70	0,010	0,980
Consumo de MO digestível (g/d)	834	832	17,5	0,925

<sup>1</sup>Controle=concentrado sem inclusão de tanino; Tanino=concentrado com inclusão de 2% de extrato tanífero;

<sup>2</sup>Erro padrão das médias, onde n=5 por tratamento;

<sup>3</sup>Probabilidade do erro tipo I da análise de variância.

Tabela 14 – Digestibilidade total, excreção fecal e urinária e síntese de nitrogênio microbiano em ovinos alimentados com feno de aveia e azevém (0,61) mais concentrado (0,39) com ou sem inclusão de extrato tanífero

Item	Tratamentos <sup>1</sup>		EPM <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>
	Controle	Tanino		
Consumo (g/d)	32,5	31,1	0,72	0,204
Digestibilidade				
Aparente	0,67	0,63	0,014	0,044
Verdadeira	0,91	0,89	0,003	0,020
Excreção (g/d)				
N fecal total	10,6	11,6	0,52	0,209
N-ureia	17,1	13,7	1,03	0,050
N endógeno (% do N fecal)	71,4	71,3	1,137	0,962
N microbiano (g/d)	15,8	14,2	0,73	0,161

<sup>1</sup>Controle=concentrado sem inclusão de tanino; Tanino=concentrado com inclusão de 2% de extrato tanífero;

<sup>2</sup>Erro padrão das médias, onde n=5 por tratamento;

<sup>3</sup>Probabilidade do erro tipo I da análise de variância.

As concentrações plasmáticas, arterial, portal e hepática de N-amônia, e as concentrações arterial e portal de glicose foram similares ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos (Tabela 15). Entretanto, as concentrações de N-ureia no sangue arterial, portal e hepático reduziram ( $P\leq 0,05$ ) quando incluído tanino na dieta. De forma semelhante, as concentrações hepáticas de glicose tenderam a reduzir ( $P=0,065$ ) quando os animais ingeriram tanino.

Tabela 15 – Concentração plasmática arterial, portal e hepática de glicose, N-amônia (N-NH<sub>3</sub>) e N-ureia em ovinos alimentados com feno de aveia e azevém (0,61) mais concentrado (0,39) com ou sem inclusão de extrato tanífero

Item	Tratamentos <sup>1</sup>		EPM <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>
	Controle	Tanino		
Arterial (mg/L plasma)				
Glicose	735,2	700,6	34,20	0,192
N-NH <sub>3</sub>	1,15	1,15	0,812	0,952
N-ureia	207,3	190,7	8,73	0,011
Portal (mg/L plasma)				
Glicose	715,0	686,7	32,42	0,327
N-NH <sub>3</sub>	3,66	3,79	2,147	0,149
N-ureia	201,7	185,9	9,07	0,023
Hepática (mg/L plasma)				
Glicose	781,6	728,3	32,87	0,065
N-NH <sub>3</sub>	1,01	1,02	0,745	0,922
N-ureia	201,9	188,4	6,12	0,030

<sup>1</sup>Controle=concentrado sem inclusão de tanino; Tanino=concentrado com inclusão de 2% de extrato tanífero;  
<sup>2</sup>Erro padrão das médias, onde n=5 por tratamento;  
<sup>3</sup>Probabilidade do erro tipo I da análise de variância.

O fluxo de plasma através dos sistemas portal e visceral, bem como o fluxo líquido de glicose e N-amônia através dos tecidos drenados pela veia porta, fígado e tecidos viscerais totais não foram alterados ( $P>0,05$ ) devido à inclusão de tanino na dieta dos animais (Tabela 16). Para o N-ureia, houve modificação somente no fluxo através dos tecidos viscerais totais, havendo uma redução no fluxo deste metabólito ( $P=0,053$ ) quando ofertado extrato tanífero.

Tabela 16 – Fluxo de plasma e fluxo líquido de glicose, N-amônia (N-NH<sub>3</sub>) e N-ureia através dos tecidos drenados pela veia porta, fígado e tecidos viscerais totais em ovinos alimentados com feno de aveia e azevém (0,61) mais concentrado (0,39) com ou sem inclusão de extrato tanífero

Item	Tratamentos <sup>1</sup>		EPM <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>
	Controle	Tanino		
Fluxo de plasma (L/h)				
Portal	152,1	144,1	8,10	0,181
Visceral	167,2	159,7	11,64	0,449
Tecidos drenados pela veia porta (mg/h)				
Glicose	-2942	-2066	433,3	0,160
N-NH <sub>3</sub>	383,6	370,3	195,93	0,686
N-ureia	-885,4	-620,6	253,06	0,101
Fígado (mg/h)				
Glicose	8627	7959	778,5	0,461
N-NH <sub>3</sub>	-402,9	-377,8	203,66	0,490
N-ureia	1462	1166	333,1	0,113
Tecidos viscerais totais (mg/h)				
Glicose	6102	6032	775,7	0,804
N-NH <sub>3</sub>	-29,06	-27,23	13,936	0,868
N-ureia	591,4	458,9	95,24	0,053

<sup>1</sup>Controle=concentrado sem inclusão de tanino; Tanino=concentrado com inclusão de 2% de extrato tanífero;  
<sup>2</sup>Erro padrão das médias, onde n=5 por tratamento;  
<sup>3</sup>Probabilidade do erro tipo I da análise de variância.

#### 6.4 EXPERIMENTO 4

A inclusão de extrato tanífero na dieta não promoveu nenhuma alteração ( $P>0,05$ ) no peso e escore de condição corporal dos animais (Tabela 17). Da mesma forma, o consumo de MS do pasto (em % do consumo de MS total) foi similar entre os tratamentos (Tabela 18). No

entanto, a inclusão de tanino no concentrado elevou ( $P \leq 0,05$ ) o consumo total de MS, MO, FDN e MS do pasto (kg/d) no segundo período experimental e tendeu a aumentar a diferença entre os períodos experimentais ( $P \leq 0,10$ ). Similarmente, o consumo de N pelos animais foi superior ( $P \leq 0,05$ ) quando incluído extrato tanífero na dieta, tanto no 2º período experimental quanto na diferença entre os períodos de avaliação.

Tabela 17 – Peso e escore de condição corporal de vacas mantidas em pastagem mista de aveia e azevém e suplementadas com concentrado com ou sem inclusão de 2,0% de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* no concentrado (0,49% da dieta)

TRAT <sup>1</sup>	1º Período			2º Período			Diferença <sup>2</sup>		
	Média	EPM <sup>3</sup>	P <sup>4</sup>	Média	EPM	P	Média	EPM	P
Peso Corporal (kg)									
CON	573,5	13,90	0,591	586,9	14,56	0,581	13,49	2,129	0,780
TAN	584,4			598,7			14,36		
Escore de Condição Corporal <sup>5</sup>									
CON	2,35	0,074	0,224	2,60	0,065	0,315	0,25	0,026	0,361
TAN	2,21			2,50			0,29		

<sup>1</sup>TRAT= tratamentos; CON= concentrado sem inclusão de tanino; TAN= concentrado com inclusão de 2% de extrato tanífero;

<sup>2</sup>Média do 2º período – média do 1º período;

<sup>3</sup>Erro padrão das médias, onde n=7 por tratamento;

<sup>4</sup>Probabilidade do erro tipo I da análise de variância;

<sup>5</sup>Escala de 1 a 5, sendo 1 muito magra e 5 muito gorda.

Na tabela 19 são apresentados os resultados de produção diária de leite e produção corrigida para 4% de gordura, contagem de células somáticas e composição do leite. Nenhum destes parâmetros avaliados foi influenciado ( $P > 0,05$ ) pela inclusão do tanino na dieta das vacas.

A eficiência alimentar (litros de leite/kg de MS ingerida), a eficiência de utilização do N para a síntese das proteínas do leite, e a concentração plasmática de N-ureia também foram similares ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos (Tabela 20).

Tabela 18 – Consumo por vacas mantidas em pastagem mista de aveia e azevém e suplementadas com concentrado com ou sem inclusão de 2,0% de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* no concentrado (0,49% da dieta)

TRAT <sup>1</sup>	1º Período			2º Período			Diferença <sup>2</sup>		
	Média	EPM <sup>3</sup>	P <sup>4</sup>	Média	EPM	P	Média	EPM	P
Consumo de MS (kg/d)									
CON	22,98			23,84			0,86		
TAN	23,84	0,736	0,424	26,35	0,769	0,042	2,50	0,603	0,081
Consumo de MS (% do PC)									
CON	4,19			4,23			0,04		
TAN	4,29	0,136	0,612	4,63	0,175	0,137	0,34	0,102	0,064
Consumo de MO (kg/d)									
CON	20,24			20,82			0,57		
TAN	21,08	0,647	0,381	23,10	0,671	0,036	2,02	0,534	0,083
Consumo de N (kg/d)									
CON	0,667			0,873			0,206		
TAN	0,686	0,0214	0,538	0,965	0,0276	0,039	0,279	0,0214	0,036
Consumo de FDN (kg/d)									
CON	9,69			10,82			1,13		
TAN	9,98	0,287	0,482	12,04	0,334	0,026	2,05	0,317	0,065
Consumo de Concentrado (kg de MS/d)									
CON	6,40			6,40			0,00		
TAN	6,43	0,349	0,949	6,43	0,349	0,949	0,00	0,000	0,000
Consumo de Concentrado (% do CMS)									
CON	27,76			26,85			-0,92		
TAN	26,88	0,937	0,518	24,35	0,998	0,105	-2,53	0,683	0,124
Consumo de Pasto (kg de MS/d)									
CON	16,58			17,46			0,88		
TAN	17,42	0,474	0,239	19,91	0,548	0,009	2,49	0,601	0,086
Consumo de Pasto (% do CMS)									
CON	72,23			73,15			0,92		
TAN	73,12	0,937	0,518	75,65	0,998	0,105	2,53	0,683	0,124

<sup>1</sup>TRAT= tratamentos; CON= concentrado sem inclusão de tanino; TAN= concentrado com inclusão de 2% de extrato tanífero;

<sup>2</sup>Média do 2º período – média do 1º período;

<sup>3</sup>Erro padrão das médias, onde n=7 por tratamento;

<sup>4</sup>Probabilidade do erro tipo I da análise de variância.

Tabela 19 – Produção e composição do leite de vacas mantidas em pastagem mista de aveia e azevém e suplementadas com concentrado com ou sem inclusão de 2,0% de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* no concentrado (0,49% da dieta)

(continua)

TRAT <sup>1</sup>	1º Período			2º Período			Diferença <sup>2</sup>		
	Média	EPM <sup>3</sup>	P <sup>4</sup>	Média	EPM	P	Média	EPM	P
Produção de Leite (L/d)									
CON	35,66			34,73			-0,93		
TAN	36,67	2,205	0,751	36,21	1,969	0,606	-0,46	0,618	0,606
Produção de Leite Corrigida (L/d) <sup>5</sup>									
CON	26,76			27,55			0,8		
TAN	27,24	1,571	0,833	28,12	1,306	0,765	0,88	0,973	0,948
Contagem de Células Somáticas (x 1000 células/mL)									
CON	81,5			95,6			14,1		
TAN	69,6	23,66	0,735	77,8	22,65	0,598	8,2	11,36	0,726
Gordura (%)									
CON	2,34			2,66			0,31		
TAN	2,30	0,09	0,714	2,53	0,176	0,630	0,24	0,152	0,732
Gordura (kg/dia)									
CON	0,833			0,911			0,077		
TAN	0,838	0,0515	0,948	0,909	0,0578	0,985	0,071	0,0578	0,939
Proteína (%)									
CON	2,91			3,01			0,1		
TAN	2,99	0,054	0,364	3,07	0,058	0,526	0,08	0,025	0,595
Proteína (kg/d)									
CON	1,039			1,045			0,006		
TAN	1,096	0,0661	0,556	1,111	0,0590	0,444	0,015	0,0184	0,713
Lactose (%)									
CON	4,44			4,44			0,002		
TAN	4,52	0,096	0,578	4,49	0,087	0,695	-0,026	0,0236	0,413
Lactose (kg/d)									
CON	1,578			1,541			-0,038		
TAN	1,660	0,1037	0,589	1,632	0,0957	0,517	-0,029	0,0280	0,826
Sólidos Totais (%)									
CON	10,78			11,13			0,36		
TAN	10,91	0,14	0,526	11,08	0,240	0,878	0,17	0,131	0,344
Extrato Seco Desengordurado (%)									
CON	8,38			8,48			0,09		
TAN	8,50	0,092	0,377	8,57	0,091	0,485	0,07	0,018	0,339

Tabela 19 – Produção e composição do leite de vacas mantidas em pastagem mista de aveia e azevém e suplementadas com concentrado com ou sem inclusão de 2,0% de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* no concentrado (0,49% da dieta)  
(conclusão)

TRAT <sup>1</sup>	1º Período			2º Período			Diferença <sup>2</sup>		
	Média	EPM <sup>3</sup>	P <sup>4</sup>	Média	EPM	P	Média	EPM	P
Caseína (%)									
CON	1,97			2,05			0,08		
TAN	2,04	0,049	0,330	2,10	0,048	0,506	0,05	0,019	0,400
Caseína (kg/d)									
CON	0,703			0,710			0,007		
TAN	0,751	0,0465	0,481	0,761	0,0425	0,416	0,01	0,0126	0,878
N-ureia (mg/dL)									
CON	11,49			19,81			8,32		
TAN	11,67	0,612	0,834	20,23	0,670	0,671	8,55	0,697	0,822

<sup>1</sup>TRAT= tratamentos; CON= concentrado sem inclusão de tanino; TAN= concentrado com inclusão de 2% de extrato tanífero;

<sup>2</sup>Média do 2º período – média do 1º período;

<sup>3</sup>Erro padrão das médias, onde n=7 por tratamento;

<sup>4</sup>Probabilidade do erro tipo I da análise de variância;

<sup>5</sup>Produção de leite corrigida para 4% de gordura.

Na tabela 21 são apresentados os resultados de consumo, excreção fecal e urinária de N, e as relações entre produção de leite e excreção total de N, e entre excreção de ureia e excreção de creatinina na urina. O consumo de N (g/d), a excreção fecal (tanto em g/d como em % do consumo de N) e a excreção total de N (urina + fezes, em g/d) aumentaram ( $P \leq 0,05$ ) devido à inclusão do extrato tanífero na dieta dos animais. A excreção de N através da urina (em g/d), a excreção de N-ureia (em g/d e como uma % do N total da urina), a excreção total de N (como uma % do consumo de N) e a relação ureia:creatinina não foram afetadas ( $P > 0,05$ ) pelo tanino. No entanto, a inclusão de extrato tanífero ao suplemento promoveu um menor aumento ( $P \leq 0,05$ ) na excreção de N-ureia da urina (como uma % do consumo de N) e também apresentou uma redução ( $P \leq 0,05$ ) mais acentuada na relação litros de leite:kg de N excretado entre os períodos experimentais, quando comparados através da análise da diferença os períodos 1 (período de padronização) e 2 (período de inclusão do tanino à dieta). Da mesma forma, a excreção de N total através da urina (como uma % do consumo de N) tendeu a ser menor ( $P = 0,092$ ) quando realizada a análise da diferença entre os períodos experimentais.

Tabela 20 – Eficiência alimentar, eficiência de utilização do N e concentração de N-ureia no plasma de vacas mantidas em pastagem mista de aveia e azevém e suplementadas com concentrado com ou sem inclusão de 2,0% de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* no concentrado (0,49% da dieta)

TRAT <sup>1</sup>	1º Período			2º Período			Diferença <sup>2</sup>		
	Média	EPM <sup>3</sup>	P <sup>4</sup>	Média	EPM	P	Média	EPM	P
Eficiência alimentar (Litros de leite/kg MS)									
CON	1,55	0,069	0,902	1,45	0,040	0,176	-0,10	0,035	0,187
TAN	1,54			1,37			-0,17		
Eficiência alimentar corrigida (Litros de leite/kg MS) <sup>5</sup>									
CON	1,17	0,041	0,914	1,16	0,039	0,112	-0,02	0,046	0,212
TAN	1,17			1,06			-0,10		
Eficiência de utilização do N para síntese proteica do leite (%)									
CON	24,35	1,142	0,696	18,71	0,652	0,446	-5,63	0,725	0,208
TAN	25,00			17,98			-7,01		
N-ureia no plasma (mg/dL)									
CON	11,97	0,527	0,327	20,55	0,792	0,995	8,58	0,878	0,538
TAN	12,74			20,55			7,79		

<sup>1</sup>TRAT= tratamentos; CON= concentrado sem inclusão de tanino; TAN= concentrado com inclusão de 2% de extrato tanífero;

<sup>2</sup>Média do 2º período – média do 1º período;

<sup>3</sup>Erro padrão das médias, onde n=7 por tratamento;

<sup>4</sup>Probabilidade do erro tipo I da análise de variância;

<sup>5</sup>Calculada a partir da produção de leite corrigida para 4% de gordura.

Tabela 21 – Consumo e excreção de N por vacas mantidas em pastagem mista de aveia e azevém e suplementadas com concentrado com ou sem inclusão de 2,0% de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* no concentrado (0,49% da dieta)

(continua)

TRAT <sup>1</sup>	1º Período			2º Período			Diferença <sup>2</sup>		
	Média	EPM <sup>3</sup>	P <sup>4</sup>	Média	EPM	P	Média	EPM	P
Consumo de N (g/d)									
CON	667,2	21,35	0,538	873,5	27,58	0,039	206,2	21,41	0,036
TAN	686,5			965,3			278,8		
N urina (g/d)									
CON	237,6	11,40	0,230	317,1	14,53	0,232	79,57	7,946	0,632
TAN	258,1			343,2			85,12		

Tabela 21 – Consumo e excreção de N por vacas mantidas em pastagem mista de aveia e azevém e suplementadas com concentrado com ou sem inclusão de 2,0% de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* no concentrado (0,49% da dieta) (conclusão)

TRAT <sup>1</sup>	1º Período			2º Período			Diferença <sup>2</sup>		
	Média	EPM <sup>3</sup>	P <sup>4</sup>	Média	EPM	P	Média	EPM	P
N urina (% CN) <sup>5</sup>									
CON	35,53			36,35			0,83		
TAN	37,42	1,046	0,228	35,69	1,460	0,756	-1,72	0,974	0,092
N-ureia urina (g/d)									
CON	144,9			250,7			105,8		
TAN	168,5	7,93	0,060	276,1	10,10	0,104	107,5	5,82	0,834
N-ureia urina (% CN)									
CON	21,63			28,80			7,17		
TAN	24,41	0,820	0,036	28,71	1,112	0,954	4,30	0,805	0,029
N-ureia urina (% N total urina)									
CON	60,75			79,28			18,53		
TAN	64,88	0,972	0,012	80,41	1,000	0,440	15,53	1,445	0,171
N fecal (g/d)									
CON	165,7			175,2			9,54		
TAN	175,6	4,66	0,164	210,6	6,7	0,003	34,99	5,647	0,009
N fecal (% CN)									
CON	24,88			20,07			-4,81		
TAN	25,63	0,442	0,259	21,80	0,293	0,002	-3,81	0,378	0,095
Excreção total de N (g/d) <sup>6</sup>									
CON	403,3			492,4			89,11		
TAN	433,6	15,18	0,186	553,8	18,62	0,040	120,11	10,615	0,064
Excreção total de N (% CN)									
CON	60,41			56,43			-3,98		
TAN	63,05	1,136	0,129	57,49	1,511	0,630	-5,55	0,989	0,284
Relação litros de leite:kg de N excretado									
CON	83,86			68,46			-15,40		
TAN	88,35	1,283	0,039	68,22	1,420	0,910	-20,13	1,120	0,017
Relação ureia:creatinina									
CON	20,2			34,3			14,0		
TAN	22,9	0,44	0,001	36,9	0,74	0,029	13,9	0,83	0,949

<sup>1</sup>TRAT= tratamentos; CON= concentrado sem inclusão de tanino; TAN= concentrado com inclusão de 2% de extrato tanífero;

<sup>2</sup>Média do 2º período – média do 1º período;

<sup>3</sup>Erro padrão das médias, onde n=7 por tratamento;

<sup>4</sup>Probabilidade do erro tipo I da análise de variância;

<sup>5</sup>% CN = porcentagem em relação ao consumo de N;

<sup>6</sup>Excreção total de N (g/d) = N fecal + N urinário.

A excreção diária de alantoína, derivados de purinas através da urina, bem como a síntese de compostos nitrogenados microbianos ruminais foi semelhante ( $P>0,05$ ), independentemente se houve inclusão ou não de tanino na dieta dos animais (Tabela 22). No entanto, a excreção diária de ácido úrico tendeu a aumentar ( $P=0,088$ ) nos animais que ingeriram o extrato tanífero.

Tabela 22 – Excreção de derivados de purinas e síntese de N microbiano por vacas mantidas em pastagem mista de aveia e azevém e suplementadas com concentrado com ou sem inclusão de 2,0% de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* no concentrado (0,49% da dieta)

TRAT <sup>1</sup>	1º Período			2º Período			Diferença <sup>2</sup>		
	Média	EPM <sup>3</sup>	P <sup>4</sup>	Média	EPM	P	Média	EPM	P
Alantoína (mmol/d)									
CON	443,2	23,46	0,527	342,8	22,18	0,433	-100,42	20,480	0,133
TAN	421,3			368,5			-52,80		
Ácido úrico (mmol/d)									
CON	48,01	2,660	0,255	32,93	4,426	0,088	-15,07	4,213	0,250
TAN	52,61			44,92			-7,69		
Derivados de purinas (mmol/d)									
CON	469,3	27,72	0,898	364,8	27,61	0,237	-104,59	22,225	0,191
TAN	474,5			413,8			-60,71		
N microbiano (g/d)									
CON	309,4	19,29	0,908	232,7	19,40	0,227	-76,72	16,114	0,190
TAN	312,7			267,9			-44,80		

<sup>1</sup>TRAT= tratamentos; CON= concentrado sem inclusão de tanino; TAN= concentrado com inclusão de 2% de extrato tanífero;

<sup>2</sup>Média do 2º período – média do 1º período;

<sup>3</sup>Erro padrão das médias, onde n=7 por tratamento;

<sup>4</sup>Probabilidade do erro tipo I da análise de variância.

## 7 DISCUSSÃO

### 7.1 EXTRATO TANÍFERO EM DIETAS À BASE DE GRAMÍNEA TROPICAL

Embora o consumo de matéria seca, o desempenho produtivo e a composição do leite, bem como a concentração sanguínea de ureia não tenham sido alterados pela inclusão de extrato tanífero na dieta dos animais, os resultados obtidos neste estudo foram contrários à hipótese testada. Este efeito dos taninos, oposto àquele descrito na literatura, sobre a excreção e eficiência total de utilização do N ocorreu devido ao aumento da excreção total deste nutriente como consequência do aumento da excreção de N-ureia através da urina.

No ensaio com ovinos, em que foi fornecido feno de tifton como base alimentar e inclusão ou não de 1% de extrato tanífero no concentrado (correspondendo em média a 0,38% da MS da dieta), os parâmetros de consumo, excreção fecal e urinária, síntese de compostos nitrogenados microbianos ruminais, digestibilidade dos compostos não nitrogenados e digestibilidade aparente do N, além da retenção de nitrogênio não foram alterados pela inclusão do tanino na dieta. Ao suplementar vacas em lactação com 0,45% da MS da dieta com taninos condensados, Benchaar et al. (2008) também não observaram diferenças sobre a digestibilidade total aparente dos nutrientes em relação ao grupo controle.

Embora a inclusão de 0,38% de extrato tanífero não afetou significativamente a digestibilidade aparente do N, assim como não afetou a excreção fecal, a digestibilidade verdadeira do N reduziu. Este efeito da adição do extrato tanífero no concentrado sobre a digestibilidade verdadeira do N se deve, principalmente, à redução da excreção de nitrogênio endógeno. A excreção de N endógeno foi estimada descontando do nitrogênio fecal total a fração insolúvel em detergente neutro (NIDN). Portanto, é necessário ter cautela na análise deste resultado uma vez que o complexo formado pelo tanino com a proteína não é solúvel em detergente neutro (MAKKAR et al., 1995a). Este resultado pode indicar que os possíveis complexos formados entre tanino e proteína não foram totalmente desfeitos após o rúmen, uma vez que a excreção de nitrogênio insolúvel em detergente neutro é altamente correlacionada com o consumo de tanino condensado, o que indica que os taninos são capazes de formar complexos insolúveis no trato digestivo, tanto com compostos nitrogenados de origem dietética como de origem endógena (REED, 1995).

Para síntese de proteína microbiana, os micro-organismos ruminais dependem da disponibilidade de nitrogênio e de carboidratos (CLARK et al., 1992). O fato da síntese de compostos nitrogenados microbianos ruminais não ter diferido significativamente, tanto no

ensaio com ovinos como no ensaio com as vacas, indica que não houve limitação na concentração de açúcares redutores, aminoácidos e/ou amônia no fluido ruminal através da ingestão do extrato tanífero pelos animais. Este resultado está de acordo com aquele encontrado por Mezzomo et al. (2011) ao incluírem 0,4% de taninos condensados na MS de uma dieta com alta proporção de concentrado para novilhos.

Do mesmo modo que no ensaio com ovinos, a inclusão de 0,21% de extrato tanífero na dieta das vacas não alterou a ingestão de MS pelos animais. Este resultado é similar àqueles encontrados em vários estudos (AGUERRE et al., 2010; BAAH et al., 2007; BEAUCHEMIN et al., 2007; BENCHAAAR et al., 2008; DSCHAAK et al., 2011) com proporções de volumoso e concentrado variáveis e porcentagens de taninos condensados de quebracho na MS da dieta variando entre 0,42 a 3,0%. No entanto, as dosagens de extrato tanífero utilizadas no presente estudo foram inferiores, principalmente nos ensaios com gramínea de clima tropical, àquelas da maior parte dos trabalhos referenciados na literatura em que foi utilizado extrato tanífero de acácia negra (*Acacia mearnsii*) ou extrato tanífero de quebracho (*Schinopsis balansae*). Quando estimado o consumo total de MS, verificou-se que a proporção de concentrado na dieta foi inferior à esperada (40 a 45%), reduzindo o nível de 1% de extrato tanífero no concentrado para 0,38 e 0,21% da MS da dieta no ensaio com ovinos e vacas, respectivamente. Os valores de consumo de pasto estimados pelo uso do óxido de cromo foram superestimados em comparação aos preditos pelo NRC (2001) e pelo CNCPS versão 5.0 (*Cornell Net Carbohydrate and Protein System*) para as condições do presente estudo com vacas em lactação. Além disso, o elevado teor de FDN do pasto (75,3%) é um importante fator de limitação do consumo pelos animais e, também, é um indicativo de que o nível de consumo observado seja elevado. Através do CNCPS verificou-se que a dieta promoveu um leve balanço positivo entre a exigência e a oferta de energia metabolizável, e um balanço negativo para a proteína metabolizável. A provável superestimativa no consumo de pasto, teoricamente, não deve prejudicar a comparação entre tratamentos, uma vez que todos foram submetidos à mesma forma de avaliação.

A maior parte dos trabalhos discute seus dados com base em doses de taninos condensados. No entanto, o conteúdo de tanino das plantas é frequentemente difícil de comparar entre laboratórios devido aos diferentes métodos ou padrões utilizados para quantificação. De acordo com Schofield et al. (2001) um método adequado para a determinação da concentração de taninos condensados é o ensaio butanol-HCl, mas o padrão deve ser extraído e purificado da mesma parte da planta em estudo (WAGHORN, 2008).

A análise química indicou que as concentrações de fenóis totais, taninos totais e taninos condensados no extrato tanífero de *Acacia mearnsii* foram de 764, 750 e 181 g/kg de MS, respectivamente. As concentrações de fenóis totais e taninos condensados neste extrato foram similares às aquelas reportadas por Ahmed et al. (2005) e Minho et al. (2010). No entanto, Carulla et al. (2005) e Grainger et al. (2009) relataram concentrações de taninos condensados muito mais altas (i.e., 615 e 603 g/kg de MS, respectivamente) em um extrato tanífero da mesma espécie de planta. Esta discrepância dos valores de taninos condensados é, provavelmente, devido a diferenças no método de análise. Embora a técnica butanol-HCl tenha sido utilizada em todos os estudos, no presente estudo e no estudo de Minho et al. (2010) os taninos condensados foram calculados como equivalente leucocianidina através de uma equação publicada por Makkar (2000). No entanto, Carulla et al. (2005) e Grainger et al. (2009) usaram um extrato tanífero de *Acacia mearnsii* purificado como padrão, o qual foi purificado por cromatografia em gel usando Sephadex LH-20. Nestes estudos assumiu-se que o extrato tanífero de *Acacia mearnsii* contém essencialmente taninos condensados. Entretanto, ambos, taninos hidrolisáveis e taninos condensados podem ser retidos em Sephadex LH-20 (MAKKAR e BECKER, 1994) e poderiam estar presentes no padrão purificado. Dessa forma, apesar de uma mais detalhada caracterização química deste extrato ser necessária, os resultados do presente estudo indicam que a maior parte dos taninos do extrato tanífero de *Acacia mearnsii* são taninos hidrolisáveis.

O impacto dos taninos condensados sobre o consumo e digestão de ruminantes é bem documentado na literatura. Por outro lado, os taninos hidrolisáveis estão sujeitos à ação enzimática bacteriana e o efeito deles sobre a fermentação ruminal é usualmente considerado negligenciável ou nem mesmo mencionado (O'DONOVAN e BROOKER, 2001). No entanto, neste trabalho foi assumido que os taninos hidrolisáveis exerceram o maior impacto sobre os parâmetros metabólicos e nutricionais. Além disso, o consumo médio de taninos hidrolisáveis foi equivalente a 0,05 g/kg de PC, valor abaixo daquele relatado por induzir sinais de toxicidade em animais (KUMAR e VAITHIYANATHAN, 1990).

A produção e a composição do leite não foram alteradas pela inclusão do extrato tanífero na dieta. A ausência de efeitos sobre a concentração e produção de proteínas do leite sugere que não houve um efeito negativo sobre a oferta de aminoácidos na glândula mamária para a síntese das proteínas do leite. De forma similar, Benchaar et al. (2008) observaram que a adição de taninos de quebracho (0,45% de taninos condensados na MS da dieta) não influenciou na produção e composição do leite de vacas no terço inicial da lactação. Os resultados do presente estudo também estão de acordo com aqueles observados por Dschaak

et al. (2011), que relataram que a adição de taninos de quebracho (3% da MS da dieta) não afetou a produção de leite ou concentrações de gordura, proteína e lactose. No entanto, Aguerre et al. (2010) verificaram que a adição de taninos a uma taxa de 0,45% da MS da dieta aumentou a concentração de proteína verdadeira, mas reduziu as concentrações de proteína quando adicionado 1,8% da MS da dieta. Noro et al. (2013) ao fornecerem 0,25 ou 0,40% de extrato tanífero de quebracho na MS da dieta para vacas em lactação não verificaram alteração na produção de leite e na concentração de N-ureia do leite. No entanto, a porcentagem de gordura do leite reduziu quando fornecido 0,40% de extrato e a porcentagem de proteína reduziu independentemente do nível de inclusão de tanino na dieta. Por isso, não é claro como menores doses de tanino, como aquelas testadas por Aguerre et al. (2010) e Noro et al. (2013) reduziram a concentração de proteína do leite. Provavelmente, os efeitos dos taninos sobre o metabolismo animal estão mais relacionados à concentração e qualidade da proteína bruta (PB) da dieta que ao consumo total deste nutriente, além do teor de energia metabolizável, a qual tem grande influência sobre o destino metabólico dos aminoácidos absorvidos.

A contagem de células somáticas também não diferiu entre os tratamentos do presente estudo. No entanto, entre os dados mais interessantes do estudo de Liu et al. (2013) estão a redução na contagem de células somáticas e na concentração do radical livre malondialdeído no leite, além do aumento da atividade das enzimas antioxidantes no fígado e plasma em resposta à suplementação com um extrato tanífero de castanheira rico em taninos hidrolisáveis. Este resultado indica que a suplementação com taninos hidrolisáveis poderia reduzir o estresse oxidativo e a inflamação da glândula mamária em vacas em lactação, possibilitando uma melhor condição geral de saúde aos animais ao longo da lactação.

A caseína, as proteínas totais e o N-ureia eram os componentes do leite mais prováveis de sofrer alterações pela inclusão de tanino na dieta. No entanto, isto não ocorreu. No estudo de Aguerre et al. (2010) a concentração de N-ureia no leite reduziu em 7,2% quando as vacas foram suplementadas com 1,8% do extrato tanífero, mas não reduziu com mais baixas concentrações (i.e., 0,45 e 0,90% da MS da dieta). Do mesmo modo, Benchaar et al. (2008) não observaram efeito da suplementação com 0,45% de taninos condensados na MS da dieta sobre o N-ureia do leite. Neste contexto, Nelson (1996) sugere que quando a proteína total do leite for de 3,0 a 3,2% e a concentração de N-ureia for de 12 a 16 mg/dL, as degradabilidades das frações proteína e energia estão, provavelmente, balanceadas. Portanto, é provável que a concentração de N-ureia do leite não tenha sofrido alterações com a inclusão de tanino na dieta, pois este metabólito já estava sendo secretado no leite em níveis abaixo ou no limite

inferior dos valores de referência (12 a 16 mg/dL), mesmo no período de padronização. Desse modo, suporta-se a possibilidade de inadequado suprimento proteico-energético aos animais nesta condição dietética.

Considerando que foram observados valores de contagem de células somáticas abaixo de 200 mil células/mL e os valores de lactose abaixo de 4,8%, assume-se que as vacas estavam recebendo um aporte de energia insuficiente, limitando a disponibilidade de glicose para a glândula mamária. Além disso, os baixos valores de proteína total do leite (valores abaixo de 3,0 - 3,2%) e a baixa porcentagem de caseína na proteína total (valores entre 66 a 75%) confirmam os resultados obtidos na simulação realizada pelo CNCPS indicando um déficit de proteína na dieta para ambos os tratamentos e períodos experimentais.

Ao estudar o metabolismo do N em vacas lactantes, Huhtanen e Hristov (2009) encontraram um valor médio de eficiência de utilização do N para a síntese das proteínas do leite de 27,7% através de uma meta-análise de 998 dietas de experimentos realizados no norte da Europa com vacas produzindo em média 25,4 kg/dia de leite (4,28% de gordura e 3,2% de proteína) e com consumo médio de 17,9 kg/dia de MS de dietas com 16,5% de PB. No entanto, a eficiência no presente trabalho foi inferior. E, embora a eficiência de uso do N para a síntese das proteínas do leite não tenha sido afetada pelos tratamentos, houve um aumento na excreção total de N pelos animais, consequência do aumento da excreção de N-ureia através da urina, o que contribuiu para o aumento da ineficiência do uso geral deste nutriente.

É conhecido que a eficiência de utilização do N é consequência de muitos processos, incluindo exigências por aminoácidos, balanço de energia, quantidade e perfil de aminoácidos absorvidos e absorção de amônia, entre outros, o que torna difícil o entendimento deste resultado sem o conhecimento dos parâmetros de fermentação ruminal e fluxo intestinal nos animais, uma vez que, nem a ureia plasmática, nem a ureia do leite sofreram alterações. Além disso, à medida que a produção de leite aumenta, a excreção de nitrogênio nas fezes e urina por unidade de leite produzido pode diminuir. Isto não ocorreu neste trabalho devido ao aumento na excreção urinária de N e estabilização na produção de leite pela inclusão de tanino na dieta dos animais. Um dado interessante demonstrado por Jonker et al. (2002) é que uma melhoria em 50% na eficiência de utilização do nitrogênio por um rebanho leiteiro pode reduzir a perda de nitrogênio para o ambiente em 40%.

Orlandi et al. (2015) ao adicionarem de 0,9 a 1,8% de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* na dieta de novilhos e Ávila et al. (2015) ao fornecerem o mesmo extrato tanífero a novilhos na quantidade de 1,5% da matéria seca da dieta, verificaram uma mudança no sítio de excreção do N da urina para as fezes, sendo este um efeito consistentemente reportado na

literatura (AUFRÈRE et al., 2008; THEODORIDOU et al., 2010). Isto é positivo sob o ponto de vista ambiental, uma vez que, contribui para a redução na emissão de óxido nitroso através da urina (MISSELBROOK et al., 2005). No entanto, estes resultados são contrários ao obtido no presente estudo conduzido com vacas em lactação, em que a inclusão de 0,21% deste extrato tanífero na dieta promoveu um aumento na excreção de N através da urina, bem como um aumento na excreção total de N e redução na eficiência de uso geral deste nutriente.

Existem três hipóteses para este aumento na excreção de N-ureia através da urina. A primeira é que, independentemente dos tratamentos, as dietas podem não ter suprido adequadamente a demanda energética das vacas e, o provável aumento no aporte de aminoácidos da proteína metabolizável promovido pela inclusão de tanino na dieta, pode ter sido utilizado como fonte de energia após a desaminação e oxidação hepática, conduzindo a um aumento na síntese de ureia pelo fígado, sem impactar negativamente na produção de proteínas do leite. Além disso, a redução do peso corporal das vacas entre os períodos experimentais pode ser um indicativo que os animais estavam em balanço energético negativo. A segunda hipótese, é que a proteína metabolizável nos animais que ingeriram extrato tanífero teve um perfil biológico para a síntese das proteínas do leite inferior ao ideal, levando à desaminação dos aminoácidos desbalanceados e à síntese de ureia. Porém, para que isso tivesse ocorrido seria necessário que o fluxo e absorção de aminoácidos no intestino delgado tivessem aumentado, ou então, aminoácidos do tecido muscular terem sido mobilizados e direcionados à glândula mamária para compensar o perfil deficiente da proteína metabolizável, uma vez que, a produção de proteínas do leite entre os tratamentos foi semelhante. E, como terceira hipótese para o aumento da excreção urinária de N-ureia, pode ter ocorrido uma alteração na concentração e/ou perfil de ácidos graxos voláteis no rúmen devido à inclusão do extrato tanífero na dieta, acarretando em uma redução na oferta de energia metabolizável para as vacas. Como forma de garantir a homeostase dos processos metabólicos relacionados à manutenção e produção, o provável maior aporte de aminoácidos absorvidos como consequência da inclusão de taninos na dieta ou mesmo aminoácidos provenientes do tecido muscular, foram captados e desaminados pelo fígado, contribuindo para o aumento da excreção de N-ureia na urina, sem prejuízos para os demais parâmetros avaliados. No entanto, esta complexidade de fatores torna difícil identificar a real causa desta maior excreção de N, sendo que nem a concentração e perfil de ácidos graxos voláteis, nem o fluxo e perfil de aminoácidos da digesta foram avaliados neste estudo.

A urina é a principal rota de excreção do N. Conforme Mulligan et al. (2004) a excreção de N é muito provavelmente aumentada em resposta a um aumento no consumo de

N. No entanto, o consumo de N foi similar entre os tratamentos, caracterizando um desequilíbrio energético-proteico pela ingestão de tanino nesta situação dietética. A excreção de N tem um importante impacto ambiental, dado que o N urinário está predominantemente na forma de ureia, a qual é rapidamente ( $< 24$  h) hidrolisada à amônia (POWELL et al., 2011) ou nitrificada à nitrato e lixiviada ou perdida através da emissão de óxido nitroso ( $N_2O$ ), e a contaminação pelo N ameaça a qualidade do solo e da água (MONAGHAN et al., 2007). Por outro lado, o N presente nas fezes está predominantemente na forma orgânica e é relativamente estável (ROTZ, 2004). Ele decompõe mais lentamente que o N urinário, e por isso é menos prontamente disponível para desnitrificação.

O impacto do N urinário na pastagem inclui a transferência e concentração de N em uma área, na qual resulta em rápido crescimento da vegetação, embora estas áreas sejam excluídas do pastejo pelos animais. Uma consequência é um acúmulo de material morto e proliferação de fungos, levando a uma menor área pastejada (GRAINGER et al., 2009). O aumento na excreção de N urinário no presente estudo foi em média de 19 e 29% para o N total e para o N-ureia, respectivamente. Estes elevados valores podem acarretar em um importante impacto ambiental, principalmente em sistemas de pastejo rotacionado com alta lotação animal, além do impacto econômico, uma vez que uma parcela significativa do N ingerido pelo animal deixa de ser convertido em tecido animal ou secretado como proteínas do leite.

A falta de efeito para a maior parte das variáveis e o aumento da excreção de N através da urina pelas vacas ao ingerirem o extrato tanífero, provavelmente, se deve ao desbalanceado e insuficiente fornecimento de energia e proteína metabolizável em ambos os tratamentos, consequência do avançado estágio vegetativo do pasto (alto percentual de FDN e N insolúvel) e baixa qualidade da silagem. Desse modo, a indicação ou não de uso deste extrato tanífero na alimentação de vacas em lactação recebendo dietas adequadamente balanceadas à base de gramíneas de clima tropical torna-se impraticável, uma vez que, as dietas do presente estudo não refletem uma condição nutricional satisfatória.

## 7.2 EXTRATO TANÍFERO EM DIETAS À BASE DE GRAMÍNEA TEMPERADA

Ao incluir 0,49% de extrato tanífero na dieta de vacas em lactação consumindo dieta à base de gramínea de clima temperado, a hipótese deste trabalho foi parcialmente comprovada. Isto porque, embora o desempenho produtivo e composição do leite, concentração plasmática de ureia e a eficiência de utilização do N para a síntese das proteínas do leite não foram

alterados pela ingestão de taninos, houve aumento na excreção fecal (g/d) e excreção total de N (g/d) promovido pelo aumento do consumo de MS pelos animais. No entanto, esta maior excreção de N foi modulada pelo uso do extrato tanífero. Houve uma tendência de redução na excreção urinária e aumento na excreção fecal como proporção do N consumido (% CN), contribuindo para uma mudança na rota de excreção do N da urina para as fezes, sem interferir na eficiência de uso geral deste nutriente. Aliado a isto, o maior consumo de extrato tanífero (i.e., 0,78% da MS da dieta) pelos ovinos no ensaio de metabolismo visceral indicou que esta quantidade de taninos foi capaz de promover uma redução nas concentrações plasmáticas e na excreção de N-ureia através da urina sem alterar a excreção fecal dos animais.

Embora não tenha sido intencional, houve uma discrepância entre os ensaios com ovinos e vacas quanto à porcentagem de taninos e proteína bruta (PB) da dieta. No ensaio com vacas a quantidade de taninos na dieta foi de 0,49% da MS e 18,0% de PB no primeiro período e 22,8% de PB no segundo período experimental, devido ao aumento da participação de azevém na dieta. No entanto, no experimento com ovinos a quantidade de taninos foi de 0,78% da MS da dieta e 12,7% de PB. Isto ocorreu devido ao uso de feno em estágio vegetativo/reprodutivo avançado com menor participação de azevém e pela oferta de concentrado ter sido calculada como equivalente do peso corporal em relação ao consumido pelas vacas. Conforme Olmos Colmenero e Broderick (2006), o conteúdo de 16,5% de PB na dieta é ideal para vacas produzindo de 35 a 40 kg/d de leite. No entanto, para vacas com este nível de produção o NRC (2001) recomenda 23% e Ipharraguerre e Clark (2005) 22,8% de PB na dieta. Isso indica que a PB pode não ter sido limitante neste estudo.

No ensaio com ovinos, em que foi fornecido feno de aveia/azevém como base alimentar e inclusão ou não de 2% de extrato tanífero no concentrado (correspondendo em média a 0,78% da MS da dieta), os parâmetros de consumo e digestibilidade da MO e da FDN não foram alterados pela inclusão do tanino na dieta. Embora esta quantidade de extrato tanífero não tenha afetado significativamente a digestibilidade da MO, assim como não afetou a excreção de N fecal total e N endógeno, as digestibilidades aparente e verdadeira do N reduziram 6% e 2,2%, respectivamente. Carulla et al. (2005) relataram uma redução média de 11% na digestibilidade aparente do N quando tanino condensado de *Acacia mearnsii* foi adicionado (2,5% da MS da dieta) à dieta de ovinos consumindo tanto azevém, trevo vermelho ou alfafa, mas com uma redução na digestibilidade da MO de 2%.

Um aspecto interessante observado no presente estudo, e frequentemente mencionado na literatura, foi a relação entre as menores concentrações de N-ureia no sangue e a menor

excreção urinária deste metabólito pelos ovinos quando ingeriram tanino. Por outro lado, o efeito da inclusão de 0,49% de extrato tanífero na dieta das vacas foi menos evidente, uma vez que, esta quantidade de taninos não foi suficiente para reduzir a concentração de N-ureia do plasma e do leite e somente tendeu a reduzir a participação do N urinário da excreção total como uma porcentagem do N consumido pelos animais. No entanto, embora as concentrações portal, hepática e visceral e o fluxo visceral de ureia reduziram pela inclusão de taninos na dieta, nem as concentrações nem os fluxos de N-NH<sub>3</sub> foram alterados. Esta falta de efeito para o N-NH<sub>3</sub> pode ter ocorrido devido ao uso de parte deste metabólito para a síntese hepática de glutamina, levando a uma menor síntese de N-ureia. Entretanto, a hipótese mais provável para este resultado é que não houve diferença estatística para o N-NH<sub>3</sub> devido aos elevados Erros Padrão da Média (EPM) obtidos. Conforme Jolazadeh et al. (2015) existe uma correlação positiva entre as concentrações de N-ureia no sangue e amônia no fluido ruminal. Entretanto, os dados disponíveis na literatura (AGUERRE et al., 2010; BEAUCHEMIN et al., 2007; BENCHAAAR et al., 2008; CARULLA et al., 2005; DSCHAAK et al., 2011) são variáveis quanto ao efeito dos taninos sobre a concentração de amônia no rúmen, indicando que os efeitos dos taninos sobre o metabolismo da proteína variam com a concentração de taninos, fonte de planta utilizada e composição da dieta.

Assim como nos ensaios utilizando gramínea de clima tropical, a inclusão de tanino em dieta à base de gramínea de clima temperado não promoveu alterações na síntese de compostos nitrogenados microbianos ruminais. Isto indica que, provavelmente, não houve limitação na concentração de açúcares redutores, N  $\alpha$ -amino e/ou amônia no fluido ruminal através da ingestão do extrato tanífero pelos animais.

No entanto, diferente do resultado obtido nos demais ensaios, a inclusão de 0,49% de extrato tanífero na dieta das vacas promoveu um aumento de 14% no consumo de MS de pasto. Em outros estudos também foram observados aumentos no consumo por ovelhas (CARULLA et al., 2005) alimentadas com uma dieta contendo 2,5% de taninos condensados de *Acacia mearnsii* e em vacas leiteiras (WOODWARD et al., 2001) alimentadas com *Lotus corniculatus* contendo 2,6% de taninos. A ingestão de MS é um dos mais importantes parâmetros a ser observado em um sistema de produção visto que, está diretamente relacionada à quantidade de nutrientes disponíveis para os processos de digestão e metabolização pelo animal, com possíveis reflexos no desempenho produtivo. Entretanto, os valores de consumo de pasto estimados pelo uso do óxido de cromo foram superestimados em comparação aos preditos pelo NRC (2001) e pelo CNCPS versão 5.0 (*Cornell Net Carbohydrate and Protein System*) para as condições do presente estudo. Através do CNCPS

verificou-se que a dieta e o nível de consumo observado promoveram um balanço positivo, tanto entre a exigência e a oferta de energia metabolizável como, entre a exigência e a oferta de proteína metabolizável. Além disso, houve uma limitação na oferta de FDN fisicamente efetiva, sendo mais acentuada no segundo período experimental quando aumentou a disponibilidade de azevém em estágio inicial de desenvolvimento. A provável superestimativa no consumo de pasto, teoricamente, não deve prejudicar a comparação entre tratamentos, uma vez que todos foram submetidos à mesma forma de avaliação.

O consumo de taninos totais foi em média de 5,85 e 3,68 g/kg de MS nos ensaios com ovinos e vacas, respectivamente. E, assim como nos ensaios utilizando gramínea tropical, estes valores estão abaixo daqueles relatados por Grainger et al. (2009) em que houve impacto negativo do extrato tanífero de *Acacia mearnsii* sobre o consumo e digestibilidade de vacas leiteiras sob pastejo em azevém e suplementadas com grão de triticale ao fornecerem 8,6 g/kg de MS consumida. Além do mais, o consumo médio de taninos hidrolisáveis nos ensaios do presente estudo foi equivalente a 0,13 g/kg de PC, valor abaixo daquele relatado por induzir sinais de toxicidade em animais (KUMAR e VAITHIYANATHAN, 1990).

Da mesma forma como no ensaio utilizando gramínea tropical, neste ensaio a produção e a composição do leite não foram alteradas. No entanto, no estudo conduzido por Grainger et al. (2009) o fornecimento de 0,9% de taninos condensados de *Acacia mearnsii* na MS da dieta de vacas reduziu a produção de leite em 3,6% como consequência da redução do consumo de alimentos. Ao avaliarem uma dose mais baixa, Griffiths et al. (2013) observaram que o fornecimento de 0,6% de taninos condensados de *Acacia mearnsii* na MS consumida por vacas, não alterou o consumo, mas reduziu a proteólise ruminal. Além disso, o conteúdo de 23,9% de PB na dieta excedeu as exigências para produção de leite e 0,6% de taninos foi improvável de limitar a disponibilidade de aminoácidos para produção de leite. Neste contexto, a ausência de efeitos dos taninos sobre a concentração e produção de proteínas do leite no presente estudo, sugere que não houve um efeito negativo sobre a oferta de aminoácidos na glândula mamária para a síntese das proteínas do leite. No entanto, independentemente se houve inclusão de extrato tanífero na dieta ou não, a porcentagem de caseína na proteína total do leite apresentou valores abaixo do convencional (em torno de 80%), em média 68%.

Independentemente dos tratamentos, as concentrações de N-ureia no leite aumentaram acentuadamente no segundo período experimental, ultrapassando a faixa de referência (12 a 16 mg/dL) e sinalizadora de adequado balanço energético-proteico da dieta, consequência da maior ingestão de N pelos animais. Conforme Broderick e Clayton (1997), maiores valores de

N-ureia no leite são um indicativo de maior excreção de N através da urina devido à alta correlação entre o conteúdo destes metabólitos. De fato isto foi constatado no presente estudo, assim como uma estreita relação entre as concentrações de N-ureia no leite e plasma. Além disso, Powell et al. (2011) mostraram que a redução do N-ureia do leite pela adição de tanino na dieta foi associada com a redução na excreção urinária.

Segundo o NRC (2001) mesmo vacas recebendo dietas com 19% a 21% de PB poderiam ter valores de N-ureia no sangue ou N-ureia no leite aceitáveis, se o nitrogênio fosse eficientemente utilizado por intermédio de um bom balanço de aminoácidos ou uma boa disponibilidade de energia no rúmen. Maamouri et al. (2011) ao suplementarem ovelhas em lactação mantidas em pastagem de azevém com concentrado, concentrado mais folhas secas de *Acacia cyanophylla* contendo 3,15% de taninos na MS, ou somente com as folhas de *Acacia cyanophylla*, verificaram que as excreções de N-ureia no leite e de N através da urina pelos animais que ingeriram o concentrado juntamente com a fonte de taninos foram inferiores aos demais tratamentos, bem como, houve uma aumento na retenção de N neste grupo de animais. Segundo os autores, estes resultados sugerem que os taninos interagem com as proteínas do concentrado e reduzem a degradação ruminal, porém não interagem eficientemente com o N solúvel das gramíneas.

Outro resultado, independente do efeito de tratamento e, em ambos os períodos experimentais, foi a inversão nos teores de gordura e proteína do leite. Esta inversão de valores é, frequentemente, mencionada na literatura como consequência de acidose ruminal subclínica. De acordo com Bauman e Griinari (2003), os possíveis efeitos da acidose ruminal que levam à síndrome da baixa gordura do leite são o aumento do ácido propiônico, efeito insulínico que favorece a lipogênese, diminuição do ácido acético, diminuição da biohidrogenação dos ácidos graxos insaturados no rúmen, produzindo ácidos graxos intermediários, principalmente ácidos graxos 18:1 trans, os quais teriam uma potente ação inibidora da síntese de gordura no leite. A provável redução no pH do fluido ruminal pode ter sido consequência da ingestão de forragem com baixo teor de MS, baixo percentual de FDN fisicamente efetiva e alta quantidade de carboidratos rapidamente fermentáveis no rúmen, típico de forrageiras hibernais em estágio inicial de crescimento. No entanto, não é possível inferir se esta possível redução do pH no rúmen pode ter afetado negativamente em algum grau a capacidade de ligação dos taninos às proteínas.

A suplementação com 0,49% de extrato tanífero não foi capaz de alterar a eficiência alimentar. Este resultado está de acordo com aquele descrito por Aguerre et al. (2010) ao fornecerem até 1,8% de extrato tanífero na MS da dieta. Entretanto, Dschaak et al. (2011)

observaram aumento na eficiência alimentar pela suplementação com 3,0% de extrato tanífero em dieta com alta proporção de forragem, mas não em dieta com baixa proporção. Para a eficiência de uso do N para a síntese das proteínas do leite, embora também não tenha sido observado efeito pela inclusão de tanino na dieta, a elevada ingestão de N pelas vacas no segundo período experimental não acompanhado de aumento na produção de proteínas do leite, levou a uma redução média de 25% na eficiência quando o conteúdo de PB da dieta passou de 18,0% para 22,8%. Isso sugere que houve uma limitação na quantidade e/ou disponibilidade de energia para uma adequada eficiência de uso do N ingerido.

A disponibilidade de energia para a glândula mamária é um dos fatores que mais influencia no volume de leite produzido. Embora não avaliado no ensaio de produção, a inclusão de 0,78% de extrato tanífero na dieta dos ovinos tendeu a reduzir a concentração de glicose plasmática liberada pelo fígado. O possível efeito dos taninos sobre o balanço energético está relacionado com o incremento na absorção de aminoácidos e no incremento da proporção molar de propionato ruminal, que é o principal precursor gliconeogênico em ruminantes (NORO et al., 2013). Alguns estudos (BEAUCHEMIN et al., 2007; CARULLA et al., 2005; MEZZOMO et al., 2011) têm relatado aumento na proporção molar de propionato quando tanino está presente na dieta. No entanto, em nenhum destes estudos foram analisadas as concentrações plasmáticas de glicose.

Em um estudo avaliando a inclusão de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* na dieta de peixes, Martinelli (2013) observou que nas dietas com adição de taninos os níveis de glicose plasmática foram maiores quando comparados aos tratamentos sem inclusão de tanino, decrescendo antecipadamente entre 7 e 8 horas após alimentação. Em estudos com animais ruminantes as informações referentes às concentrações sanguíneas de glicose são inconsistentes. Jolazadeh et al. (2015) ao fornecerem extrato de *Fandoghi variety* para bovinos não verificaram diferenças entre os níveis glicêmicos. No entanto, Makkar et al. (1995b) sugerem que a presença de taninos condensados na dieta pode ser capaz de promover um aumento na glicemia dos animais. Os autores atribuíram esta hipótese ao aumento na proporção de propionato, através de um estudo *in vitro*.

Segundo Anhê et al. (2012), através de estudos com seres humanos e animais de laboratório, foi verificado que os polifenóis dietéticos podem influenciar no metabolismo da glicose estimulando a absorção periférica de glicose por tecidos sensíveis e não sensíveis à insulina. Além disso, a supressão da gliconeogênese hepática tem sido descrita como um possível mecanismo para o efeito antidiabético de muitos polifenóis (JUNG et al., 2008). Hanhineva et al. (2010) relataram que os polifenóis podem exercer um importante efeito na

redução dos níveis de glicose sanguínea pelo aumento da absorção de glicose pelo músculo e adipócitos. Os mesmos autores mencionam que os polifenóis podem, também, aumentar a atividade das glicoquinases hepáticas, as quais aumentam a utilização de glicose para a síntese de glicogênio, reduzindo a liberação de glicose hepática (gliconeogênese). No entanto, como não foram analisadas as concentrações de glicose plasmática das vacas não é possível inferir se 0,49% de extrato tanífero foi capaz de promover uma redução na disponibilidade de glicose para os tecidos periféricos. Independentemente disso, a produção e a composição do leite não foram afetadas pelos taninos. Porém, independente do efeito dos tratamentos e períodos experimentais, é provável que a glândula mamária não tenha recebido um aporte adequado de glicose para a síntese de lactose, uma vez que os valores observados estiveram abaixo de 4,8% e a contagem de células somáticas foi menor que 200 mil células/mL.

Embora uma menor porcentagem do N ingerido tendeu a ser excretado através da urina e uma maior porcentagem foi excretada através das fezes, a inclusão de tanino na dieta das vacas não afetou a eficiência de uso geral deste nutriente. É conhecido que a eficiência de utilização do N é consequência de muitos processos, incluindo digestão, exigências por aminoácidos, balanço de energia, quantidade e perfil de aminoácidos absorvidos e absorção de amônia, entre outros. Independente do mecanismo metabólico houve um equilíbrio entre redução e aumento nas rotas de excreção do N, mantendo a eficiência de uso do N similar àquela dos animais do tratamento controle. Estes resultados estão de acordo com aqueles observados por Orlandi et al. (2015) ao adicionarem de 0,9 a 1,8% de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* na dieta de novilhos e Ávila et al. (2015) ao fornecerem o mesmo extrato tanífero a novilhos na quantidade de 1,5% da matéria seca da dieta, nos quais verificaram uma mudança no sítio de excreção do N da urina para as fezes, sem afetar negativamente o uso do N pelos animais.

No entanto, a maior excreção de N (g/d), consequência do maior consumo de MS, promoveu uma redução mais acentuada na relação entre litros de leite produzidos e kg de N excretado. Como observado neste estudo e conforme relato de Mulligan et al. (2004), a excreção de N é aumentada em resposta a um aumento do consumo de N. No entanto, além da inclusão do tanino na dieta ser o agente promotor do aumento do consumo e excreção de N (g/d) pelos animais, também foi um importante modulador da porcentagem de excreção de N por cada uma das vias (i.e., fezes ou urina). Oposto ao estudo de Grainger et al. (2009), o nível de inclusão de 0,49% não foi suficiente para reduzir os valores de excreção urinária de N (g/d) abaixo daqueles de excreção fecal em relação ao tratamento controle. Porém, foi suficiente para modificar a proporção do N excretado por cada uma das vias.

A redução da excreção de N através da urina e aumento da excreção através das fezes tem uma importante implicação para os sistemas pastoris. O N fecal está principalmente na forma orgânica e assim é menos volátil, enquanto a maior parte do N urinário está na forma de ureia e, por isso, sujeito a nitrificação e subsequente perdas por lixiviação, podendo contabilizar para cerca de 60% das emissões de óxido nitroso nas áreas de pastagens (DE KLEIN e LEDGARD, 2005). Além disso, a retenção líquida de N do solo pelas plantas é aumentada pelos taninos condensados (FOX et al., 1990; PALM e SANCHEZ, 1991) devido à mineralização dos complexos tanino-proteína ser inibida e as fezes contendo taninos decompõem mais lentamente do que as fezes que não contêm taninos (NIEZEN et al., 2002).

Noro et al. (2013) explicam que a ausência de efeito para algumas variáveis estudadas quando incluíram 0,25 ou 0,40% de extrato tanífero de quebracho na MS da dieta de vacas em lactação sob pastejo em azevém perene e recebendo 3 kg/dia de concentrado, sugere que a quantidade de proteína verdadeira da dieta pode ter sido insuficiente para os taninos exercerem seus efeitos, ou melhor, os taninos não apresentaram efeito sobre a porção solúvel da proteína. Além disso, a taxa de degradação de forrageiras temperadas de alta qualidade é elevada, apresentando uma taxa de passagem cerca de 30%/hora (GIBBS e SALDIAS, 2010), o que poderia prejudicar a complexação dos taninos com as proteínas no rúmen. Esta observação é importante para o presente estudo, pois, embora não avaliada, provavelmente, a taxa de passagem da digesta das vacas foi alta devido ao alto conteúdo de água da forragem.

Embora a inclusão de 0,49% de extrato tanífero na dieta tenha provocado um aumento no consumo de MS pelos animais e provocado uma mudança nas rotas de excreção do N, não foram identificados outros benefícios diretos sobre a produção, composição do leite e eficiência de uso do N. No entanto, é provável que o consumo adicional de alimentos tenha um importante reflexo sobre o balanço energético das vacas ao longo da lactação. Com base nestes resultados, fica claro que esta dose de extrato tanífero testada se destaca quanto ao seu benefício ambiental nos sistemas de produção de leite em condições de pastejo em gramíneas de clima temperado de forma mais expressiva que os benefícios produtivos diretos no curto prazo. Além disso, os resultados obtidos no ensaio de metabolismo visceral com ovinos indicam que, provavelmente, a maior proporção de concentrado (i.e., fonte de proteína verdadeira e energia) na dieta e, conseqüentemente, a maior ingestão de extrato tanífero poderia promover outros benefícios para vacas em lactação no curto prazo, como redução dos teores de N-ureia do leite e uma redução mais expressiva na excreção de N urinário, podendo apresentar efeitos positivos sobre a eficiência de uso do nitrogênio.

## 8 CONCLUSÕES

A inclusão de 2% de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* no concentrado fornecido a vacas em lactação na proporção de aproximadamente 25% da MS e associado a dietas à base de gramíneas de clima temperado, promove aumento do consumo de MS pelos animais e tem o potencial de reduzir o impacto ambiental pela menor proporção de N excretado através da urina, sem interferir na produção e composição do leite em curto prazo. Além disso, com base no estudo de metabolismo visceral em ovinos, o fornecimento de até aproximadamente 40% deste concentrado promove uma redução mais acentuada na excreção de N urinário e pode apresentar reflexos positivos sobre as concentrações de ureia no leite e no plasma. No entanto, a inclusão de 1% deste extrato tanífero ao concentrado associado a dietas à base de gramínea de clima tropical com baixo conteúdo de proteína bruta não apresenta respostas produtivas e metabólicas favoráveis que justificam o uso deste aditivo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUERRE, M. J. et al. Effect of quebracho-chestnut tannin extracts at two dietary crude protein levels on performance and rumen fermentation of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93 (Suppl. 1), p. 445 (Abstr.), 2010.
- AHMED, M.; KHIRSTOVA, P.; ICHO, G. Comparative study of tannins of *Acacia nilotica* an indigenous tanning material in Sudan with *Acacia mearnsii*. **Suranaree J. Sci. Technol.**, v. 12, p. 259-265, 2005.
- ANDRABI, S. M. et al. In vivo assessment of the ability of condensed tannins to interfere with the digestibility of plant protein in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v. 122, p. 13-27, 2005.
- ANHÊ, G. F. et al. Quercetin decreases inflammatory response and increases insulin action in skeletal muscle of ob/ob mice and in L6 myotubes. **European Journal of Pharmacology**, v. 689, n. 1-3, p. 285-293, 2012.
- ANHÊ, F. F. et al. Polyphenols and type 2 diabetes: A prospective review. **Pharma Nutrition**, v. 1, p. 105-114, 2013.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**, 16<sup>th</sup>, 3. ed. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD. 1997.
- AUFÈRE, J.; DUDILIEU, M.; PONCET, C. *In vivo* and *in situ* measurements of the digestive characteristics of sainfoin in comparison with lucerne fed to sheep as fresh forages at two growth stages and as hay. **Animal**, v. 2, p. 1331-1339, 2008.
- 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.
- BAAH, J. et al. Effects of potential dietary antiprotozoal supplements on rumen fermentation and digestibility in heifers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 126-137, 2007.
- BARTON M. D, Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. **Nutrition Research Reviews**, v. 13, p. 1-22, 2000.
- BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. K. Nutritional regulation of milk fat synthesis. **Annual Review of Nutrition**, v. 23, p. 203-227, 2003.
- BEAUCHEMIN, K. A. et al. Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 1990-1996, 2007.
- BENCHAAR, C.; MCALLISTER, T. A.; CHOUINARD, P. Y. Digestion, ruminal fermentation, ciliate protozoal populations, and milk production from dairy cows fed cinnamaldehyde, quebracho condensed tannin, or *Yucca schidigera* saponin extracts. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 4765-4777, 2008.

BERCHIELLI, T. T.; MESSANA, J. D.; CANESIN, R. C. Produção de metano entérico em pastagens tropicais. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.13, n. 4, p. 954-968, out./dez. 2012.

BERGMAYER, H. U. **Methods of enzymatic analysis**. New York, Academic Press, 1064 p. 1965.

BRASIL. Ministério da Ciência e Tecnologia. **Comunicação Nacional Inicial do Brasil à Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre Mudança do Clima**. Coordenação-Geral de Mudanças Globais de Clima (Comunicação Nacional). Brasília, 74p. 2004.

BRODERICK, G. A.; CLAYTON, M. K. A statistical evaluation of animal and nutritional factors influencing concentrations of milk urea nitrogen. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 2964-2971, 1997.

BRODERICK, G. A. Effects of varying dietary protein and energy levels on the production of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1370-1381, 2003.

BRODERICK, G.; HUHTANEN, P. Application of milk urea nitrogen values. In: Cornell Nutrition Conference for feed manufacturers. Syracuse **Proceedings...**, p. 185-193, 2007.

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

CHEN, X. B.; GOMES, M. J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives – An overview of the technical details. **International Feed Resources Unit Rowett Research Institute**, Bucksburn Aberdeen, UK, Ocasional publication, p. 22, 1992.

CHIZZOTTI, M. L. et al. Determination of creatinine excretion and evaluation of spot urine sampling in Holstein cattle. **Livestock Science**, v. 113, p. 218-225, 2008.

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

CLARK, J. K.; KLUSMEYER, T. H.; CAMERON, M. R. Symposium: nitrogen metabolism and amino acid nutrition in dairy cattle. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to duodenum of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 8, p. 2304-2323, 1992.

CLIFFORD, M. N. Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. **Planta Medica**, v. 70 (12), p. 1103-1114, 2004.

CORNELL NET CARBOHYDRATE AND PROTEIN SYSTEM – CNCPS. **The net carbohydrate and protein system for evaluating herd nutrition and nutrient excretion**. Model documentation, version 5.0. Department of Animal Science, Cornell University, 292 p. 2003.

- CRESPY, V. et al. Comparison of the intestinal absorption of quercetin, phloretin and their glucosides in rats. **Journal of Nutrition**, v. 131, n. 8, p. 2109-2114, 2001.
- CZARNOCKI, J. et al. The determination of chromium oxide in samples of feed and excreta by acid digestion and spectrophotometry. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 4, p. 167-179, 1961.
- DE KLEIN, C. A. M.; LEDGARD, S. F. Nitrous oxide emissions from New Zealand agriculture key sources and mitigation strategies. **Nutr. Cycl. Agroecosys.**, v. 72, p. 77-85, 2005.
- DSCHAAK, C. M. et al. Effects of supplementing condensed tannin extract on intake, digestion, ruminal fermentation, and milk production of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 2508-2519, 2011.
- EL-WAZIRY, A. M. et al. Processing methods of soybean meal - 2. Effect of autoclaving and quebracho tannin treated-soybean meal on gas production and rumen fermentation *in vitro*. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 3, suppl. (1), p. 17-24, 2007.
- FOX, R. H.; MYERS, R. J. K.; VALLIS, I. The nitrogen mineralization rate of legume residues as influenced by their polyphenol, lignin and nitrogen contents. **Plant Soil**, v. 129, p. 251-259, 1990.
- FOX, D. G. et al. The Cornell Net Carbohydrate and Protein System model for evaluating herd nutrition and nutrient excretion. **Animal Feed Science and Technology**, v. 112, p. 29-78, 2004.
- GIBBS, J.; SALDIAS, B. Rumen function in high production pasture based cows of the South Island of new Zealand. **XXVI World Buiatrics Congress**. Santiago - Chile. v. 11, p. 14-18, 2010, 58 p.
- GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. **Forage fiber analysis: apparatus, reagents, procedures, and some applications**. Agricultural Handbook, n. 379, 1970, 20 p.
- GONÇALVES, R.; MATEUS, N.; FREITAS, V. Inhibition of a-amylase activity by condensed tannins. **Food Chemistry**, v. 125, p. 665-672, 2011.
- GRAINGER, C. et al. Potential use of *Acacia mearnsii* condensed tannins to reduce methane emissions and nitrogen excretion from grazing dairy cows. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 89, p. 241-251, 2009.
- GRIFFITHS, W. M. et al. Supplementing lactating dairy cows fed high-quality pasture with black wattle (*Acacia mearnsii*) tannin. **Animal**, v. 7:11, p. 1789-1795, 2013.
- GUSTAFSSON, A. H.; PALMQUIST D. L. Diurnal variation of rumen ammonia, serum urea, and milk urea in dairy cows at high and low yields. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 475-484, 1993.
- HANHINEVA, K. et al. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 1365, 2010.

HOF, G. et al. Milk urea nitrogen as a tool to monitor the protein nutrition of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 3333-3340, 1997.

HUHTANEN, P.; HRISTOV A. N. A meta-analysis of the effects of dietary protein concentration and degradability on milk protein yield and milk N efficiency in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 3222-3232, 2009.

HUNTINGTON, G. B. Portal blood flow and net absorption of ammonia-nitrogen, urea-nitrogen, and glucose in Nonlactating Holstein Cows. **Journal of Dairy Science**, vol 65, pg. 1155-1162, 1982.

HUNTINGTON, G. B.; REYNOLDS, C. K.; STROUD, B. H. Techniques for measuring blood flow in splanchnic tissues of cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p. 1583-1595, 1989.

IMAIZUMI, H. et al. Diet crude protein content and sources for lactating dairy cattle. **Scientia Agricola**, v. 67, n. 1, p. 16-22, 2010.

IPHARRAGUERRE, I. R.; CLARK, J. H. Impacts of the source and amount of crude protein on the intestinal supply of nitrogen fractions and performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 22-37, Supplement. 2005.

JOLAZADEH, A. R.; DEHGHAN-BANADAKY, M.; REZAYAZDI, K. Effects of soybean meal treated with tannins extracted from pistachio hulls on performance, ruminal fermentation, blood metabolites and nutrient digestion of Holstein bulls. **Animal Feed Science and Technology**, v. 203, p. 33-40, 2015.

JONKER, J. S.; KOHN, R. A.; ERDMAN, R. A. Using milk urea nitrogen to predict nitrogen excretion and utilization efficiency in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2681-2692, 1998.

JONKER, J. S. et al. Dairy herd management practices that impact nitrogen utilization efficiency. **Journal of Dairy Science**, Champaign, Ill, US, v. 85, n. 5, p. 1218-1226, 2002.

JUNG K. H. et al. Epigallocatechin gallate stimulates glucose uptake through the phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathway in L6 rat skeletal muscle cells. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, p. 429-434, 2008.

KATZ, M. L.; BERGMAN, E. N. A method for simultaneous cannulation of the major splanchnic blood vessels of the sheep. **American Journal of Veterinary Research**, v. 30, p. 655-661, 1969.

KOHN, R. A.; KALSCHEUR, K. F.; RUSSEK-COHEN, E. Evaluation of models to estimate urinary nitrogen and expected milk urea nitrogen. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 227-233, 2002.

KOZLOSKI, G. V.; HENTZ, F. Nutritional potential of tannin extracts for ruminants. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v. 19, n. 1-2, p. 11-12, 2011.

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.

KUMAR, R.; VAITHIYANATHAN, S. Occurrence, nutritional significance and effect on animal productivity of tannins in tree leaves. **Animal Feed Science and Technology**, v. 30, p. 21-38, 1990.

LICITRA, G.; HERNANDEZ, T. M.; VAN SOEST, P. J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 57, p. 347-358, 1996.

LIU, H. W.; ZHOU, D. W.; LI, K. Effects of chestnut tannins on performance and antioxidative status of transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 5901-5907, 2013.

MAAMOURI, O. et al. Effects of concentrate and *Acacia cyanophylla* foliage supplementation on nitrogen balance and milk production of grazing ewes. **Livestock Science**, v. 139, p. 264-270, 2011.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Isolation of tannins from leaves of some trees and shrubs and their properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 731-734, 1994.

MAKKAR, H. P. S. et al. Some problems in fiber determination of a tannin-rich forage (*Acacia saligna* leaves) and their implications in *in vivo* studies. **Animal Feed Science and Technology**, v. 55, p. 67-76, 1995a.

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

MAKKAR, H. P. S. **Quantification of tannins in tree foliage**. FAO/IAEA Working Document IAEA, Vienna, Austria, 2000, 26 p.

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

MANNETJE, L. 't. Measuring biomass of grassland vegetation. In: MANNETJE, L. 't; JONES, R. M. (Eds.) **Field and laboratory methods for grassland and animal production research**. Wallingford: CABI, p. 151-177, 2000.

MANZANO, S; WILLIAMSON, G. Polyphenols and phenolic acids from strawberry and apple decrease glucose uptake and transport by human intestinal Caco-2 cells. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54 (12), p. 1773-1780, 2010.

MARTIN, K. R; APPE, L C. L. Polyphenols as dietary supplements: A double-edged sword. **Nutrition and Dietary Supplements**, v. 2, p. 1-12, 2010.

MARTINELLI, S. G. **Dinâmica digestiva proteica e resposta de desempenho em jundiá (*Rhamdia quelen*)**. 2013. 63 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Santa Maria, 2013.

MARTINEZ, D. T. **Seleção genética de *Acacia mearnsii* De Wild. (Acácia-negra) visando o aumento da qualidade e produtividade de madeira e tanino no Rio Grande do Sul**. 2006. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Paraná, 2006.

MCSWEENEY, C. S. et al. Microbial interactions with tannins nutritional consequences for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, p. 83-93, 2001.

MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: a collaborative study. **J. AOAC**, v. 85, p. 1217-1240, 2002.

MEZZOMO, R., et al., Influence of condensed tannin on intake, digestibility, and efficiency of protein utilization in beef steers fed high concentrate diet, **Livestock Science**, 2011. doi:10.1016/j.livsci.2011.04.004

MINHO, A. P. et al. Efficacy of condensed tannin presents in acácia extract on the control of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. **Ciência Rural**, v. 40, p. 1360-1365, 2010.

MISSELBROOK, T. H. et al. Dietary manipulation in dairy cattle: laboratory experiments to assess the influence on ammonia emissions. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 1765-1777, 2005.

MONAGHAN, R. M. et al. Nutrient management in New Zealand pastures – recent developments and future issues. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 50, p. 181-201, 2007.

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

MULLIGAN, F. J. et al. Supplementary concentrates type affects nitrogen excretion of grazing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 3451-3460, 2004.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7.ed. Washington, DC: National Academy Press, 381p. 2001.

NELSON, A. Practical applications of MUN analyses. **Bovine Pract.**, v. 29, p. 85-95, 1996.

NIEZEN, J. H. et al. The effect of diet fed to lambs on subsequent development of *Trichostrongylus colubriformis* larvae *in vitro* and on pasture. **Vet. Parasitol.**, v. 105, p. 269-283, 2002.

NORO, M. et al. Respuesta metabólica y productiva de vacas lecheras en pastoreo suplementadas con taninos de quebracho (*Schinopsis balansae*). **Revista Científica**, FCV-LUZ, v. 23, n. 5, p. 417-425, 2013.

O'DONOVAN, L.; BROOKER, J. D. Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of *Streptococcus gallolyticus* (*S. caprinus*) and *Streptococcus bovis*. **Microbiology**, v. 147, p. 1025-1033, 2001.

OLMOS COLMENERO, J. J.; BRODERICK, G. A. Effect of dietary crude protein concentration on milk production and nitrogen utilization in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 1704-1712, 2006.

OLTNER, R.; WIKTORSSON, H. Urea concentrations in milk and blood as influenced by feeding varying amounts of protein and energy to dairy cows. **Livestock Production Science**, v. 10, p. 457-467, 1983.

O'MARA, F. P. The significance of livestock as a contributor to global greenhouse gas emissions today and in the near future. **Animal Feed Science and Technology**, v. 166-167, p. 7-15, 2011.

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.

PALM, C. A.; SANCHEZ, P. A. Nitrogen release from the leaves of some tropical legumes as affected by their lignin and polyphenolic contents. **Soil. Biol. Biochem.**, v. 23, p. 83-88, 1991.

PATRA, A. K.; SAXENA, J. A review of the effect and mode of action of saponins on microbial population and fermentation in the rumen and ruminant production. **Nutrition Research Reviews**, v. 22, p. 204-219, 2009.

PATRA, A. K.; SAXENA, J. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. **Journal of Science Food and Agricultural**, v. 91, p. 24-37, 2010.

PLACE, S. E.; MITLOEHNER, F. M. Invited review: Contemporary environmental issues: A review of the dairy industry's role in climate change and air quality and the potential of mitigation through improved production efficiency. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 3407-3416, 2010.

POWELL, J. M. et al. Technical note: Effects of forage protein-binding polyphenols on chemistry of dairy excreta. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 1765-1769, 2009.

POWELL, J. M.; WATTIAUX, M. A.; BRODERICK, G. A. Short communication: evaluation of milk urea nitrogen as a management tool to reduce ammonia emissions from dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 4690-4694, 2011.

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

RIBEIRO FILHO, H. M. N.; ZIMERMANN, F. C.; KOZLOSKI, G. V. Baixa dosagem de óxido de cromo para estimativa da produção fecal em bovinos. **Ciência Rural**, v. 38, n. 9, p. 2567-2573, 2008.

- ROTZ, C. A. Management to reduce nitrogen losses in animal production. **Journal of Animal Science**, v. 82, E119-E137, 2004.
- RUBANZA, C. D. K. Polyphenolics and tannins effect on in vitro digestibility of selected Acacia species leaves. **Animal Feed Science and Technology**, v. 119, p. 129-142, 2005.
- SANTOS, F. A. P. et al. Utilização da suplementação com concentrados para vacas em lactação mantidas em pastagens tropicais. In: SIMPÓSIO SOBRE BOVINOCULTURA LEITEIRA, 5. 2005, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, p. 219-294, 2005.
- SAS . Institute Inc. SAS Language Reference. Version 9.2. Cary, NC: SAS institute. 2009.
- SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, p. 21-40, 2001.
- SCHULZE, C. **From molecule to men: Inhibition of intestinal glucose absorption by polyphenols and plant extracts for reducing the glycemic response**. 2014. 131 p. Dissertation (Doktors der Naturwissenschaften) – Technische Universität München, 2014.
- SENGER, C. C. D. et al. Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 146, p. 169-174, 2008.
- SILVA, S. M. et al. Inhibition of salivary and pancreatic  $\alpha$ -amylases by a pinhão coat (*Araucaria angustifolia*) extract rich in condensed tannin. **Food Research International**, v. 56, p. 1-8, 2014.
- STONE, J. B. et al. Forage intake and efficiency of feed utilization in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 43, p. 1275-1281, 1960.
- THEODORIDOU, K. et al. Effects of condensed tannins in fresh sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on *in vivo* and *in situ* digestion in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v. 160, p. 23-38, 2010.
- TORAL, P. G. et al. Tannins as feed additives to modulate ruminal biohydrogenation: Effects on animal performance, milk fatty acid composition and ruminal fermentation in dairy ewes fed a diet containing sunflower oil. **Animal Feed Science and Technology**, v. 164, p. 199-206, 2011.
- TURNER, S. A. et al. Condensed tannins in birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) affect the detailed composition of milk from dairy cows. **Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.**, v. 65, p. 283-289, 2005.
- VAN DER GRINTEN, P. et al. Utilisation of kikuyu grass pastures and dairy production in a high altitude region of Costa Rica. **Tropical Grasslands**, v. 26, p. 255-262, 1992.
- VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3583-3597, 1991.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**, 2nd ed. Cornell University Press, New York, NY, USA, 476 p. 1994.

WAGHORN, G. C. et al. The effect of condensed tannins on the site of digestion of amino acids and other nutrients in sheep fed on *Lotus corniculatus* L. **British Journal of Nutrition**, v. 57, p. 115-126, 1987.

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

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

WALLACE, R. J. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 63, p. 621-629, 2004.

WANG, Y. et al. Effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* upon lactation performance in ewes. **J. Agric. Sci. Camb.**, v. 126, p. 353-362, 1996.

WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 39, n. 38, p. 971-974, 1967.

WILDMAN, E. E. et al. A dairy condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. **Journal of Dairy Science**, v. 65, p. 495-501, 1982.

WOODWARD, S. L. et al. Early indications that feeding *Lotus* will reduce methane emission from ruminants. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v. 61, p. 23-26, 2001.

WOODWARD, S. L.; WAGHORN, G. C.; LABOYRIE, P. Condensed tannins in birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) reduced methane emissions from dairy cows. **Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.**, v. 64, p. 160-164, 2004.

ZHANG, L.; ZUO, Z.; LIN, G. Intestinal and hepatic glucuronidation of flavonoids. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4 (6), p. 833-845, 2007.