

*Alimentação animal*

UNIVERSIDADE DE ÉVORA

**Influência dos taninos de frutos de *Quercus ilex* L. e  
*Quercus suber* L. sobre a fermentação retículo-ruminal  
e a digestão enzimática das proteínas**

*José Antunes Afonso de Almeida*



51930

636.084

ALN 2

ÉVORA

1986

Aos meus MESTRES

Aos meus ALUNOS

À SOCIEDADE QUE SIRVO

Este trabalho foi realizado no Departamento de Nutrição Animal da Estação Zootecnica Nacional e expressamente elaborado para ser submetido à Universidade de Évora com vista à obtenção do grau de Doutor.

*AB IMO PECTORE*

O autor manifesta a sua gratidão a todos os que abnegadamente contribuíram para a realização deste trabalho:

Professor Doutor APOLINÁRIO VAZ PORTUGAL, nosso orientador, Director da Estação Zootécnica Nacional (INIAER) e Professor na Escola Superior de Medicina Veterinária

- pelos apoios, sugestões e orientação generosamente prestados;
- pela concessão de acesso à utilização de todos os meios, materiais e humanos, da Estação Zootécnica Nacional;
- pelo encarecer das actividades desenvolvidas o qual, sabidamente imerecido, nos acalentou nas fases de maior desanimação.

Doutor JOÃO RAMALHO RIBEIRO, Chefe do Departamento de Nutrição e Alimentação Animais da Estação Zootécnica Nacional

- pela permanente orientação e apoio científicos generosamente prestados;
- pela concessão de total liberdade para a especulação científica e pela indulgência para com os erros involuntariamente cometidos no exercício daquela liberdade;
- pela amizade e ambiência com que nos rodeou no dia a dia.

Professor GEORGE EDMUNDO BRÁS PEREIRA, com saude

- pelo amparo no reinício das nossas actividades docentes e de investigação.

Professor Doutor JOSÉ dos SANTOS PIRES da COSTA, Sub-Director da Estação Zootécnica Nacional e Professor Associado Convidado na Universidade de Évora

- pelo permanente incentivo dado;
- pela amizade e compreensão com que sempre rodeou a nossa actividade científica.

Dr<sup>a</sup> MARIA ELVIRA BAPTISTA, Assistente da Escola Superior Agrária de Santarém

- pelo muito auxílio prestado no decurso de alguns ensaios;
- pelas sugestões e auxílio dados na elaboração das representações gráficas e organização da apresentação global do trabalho.

Eng<sup>o</sup> JOAQUIM MANUEL SERRANO, amigo e companheiro de trabalho

- pelo acompanhamento do trabalho e discussão das nossas permanentes dúvidas;
- pela incedível dedicação, e encorajamento, em todos os momentos.

Todos os Colegas do Departamento de Zootecnia da Universidade de Évora, particularmente Drs. ARTUR MARINHO, CANCELA de ABREU e OFÉLIA BENTO

-pelos muitos apoios prestados, nas presenças e ausências.

MANUEL PAULUS, amigo, trabalhador da Estação Zootecnica Nacional

-pelo muito do trabalho noturno voluntariamente prestado;

-pelo apoio logístico prestado durante as longas noites de trabalho.

Eng<sup>a</sup> ISABEL PORTUGAL MELO, da Estação Zootecnica Nacional

-pelas prestimosas sugestões e apoios no domínio laboratorial.

MARIA JOSÉ FIGUEIREDO, do Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade de Évora

-por todo o apoio prestado em vasto serviço analítico.

JOSÉ BATISTA, ANTÓNIO JOSÉ MADEIRA e JOÃO SILVA, da Estação Zootecnica Nacional

-pelo apoio no manejo dos animais experimentais.

Todo o PESSOAL do Laboratório do Departamento de Nutrição e Alimentação da Estação Zootecnica Nacional, particularmente TERESA FARIA, ARGENTINA MARTINHO e ALBERTINA CONFRARIA

-pelo apoio no domínio laboratorial.

TODAS AS PESSOAS que, embora não directamente citadas

-directa ou indirectamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## NOTA PRÉVIA

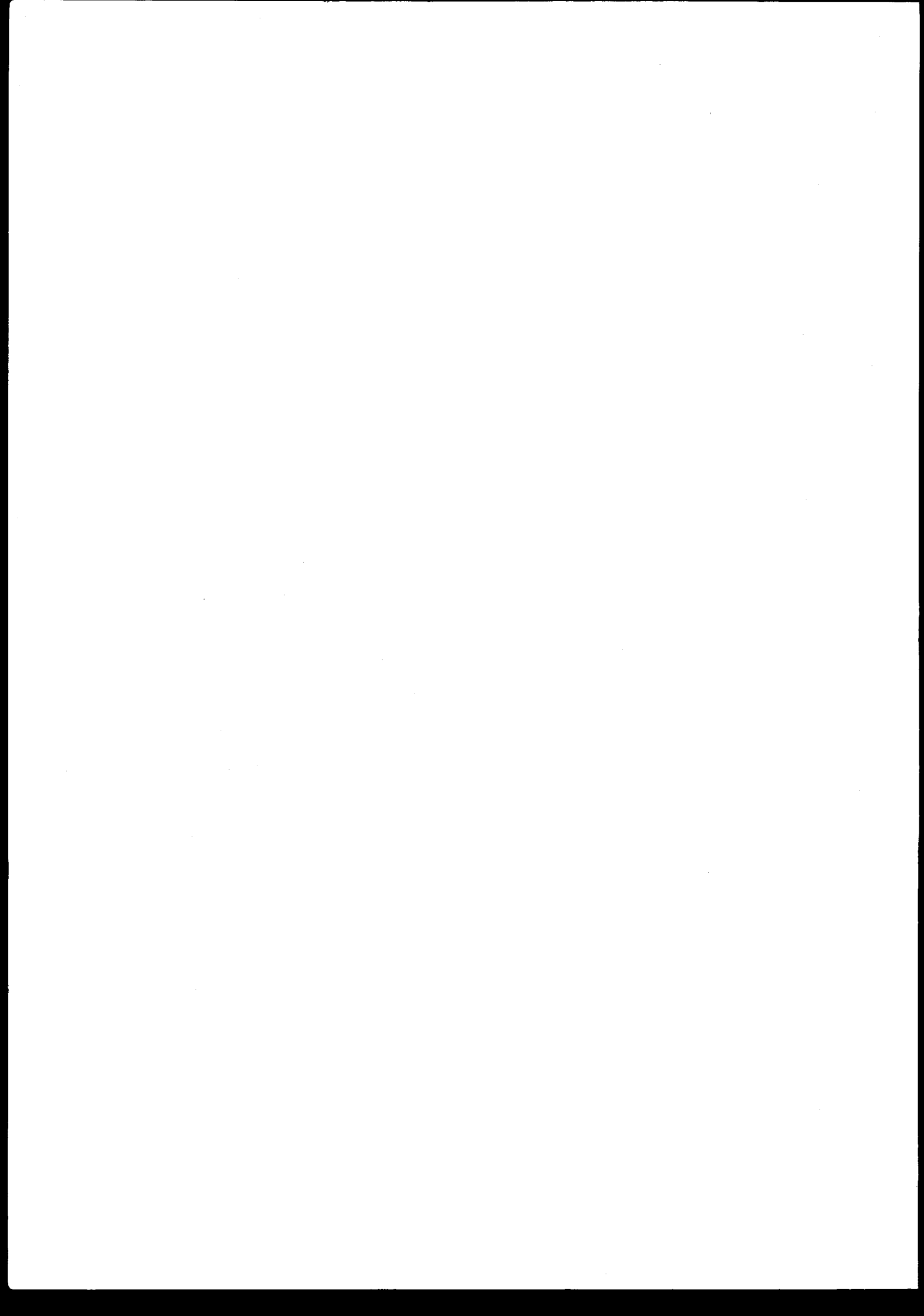
As áreas de montado do País eram em 1980, segundo dados do Instituto Nacional de Estatística, de 535 000 ha de azinheira (*Quercus ilex* L.) e 644 000 ha de sobreiro (*Quercus suber* L.).

Os frutos da azinheira (bolota) e do sobreiro (glande) constituem uma importante fonte energética para a alimentação de animais mantidos em pastoreio na época de Outono-Inverno.

É incerto o conhecimento relativo quer às densidades dos povoamentos actualmente existentes quer às produções médias de frutos: apesar de alguns autores referirem densidades de 15 a 50, e mesmo 70, árvores por hectare, parece ser mais realista considerar povoamentos médios de 15 a 30 árvores, sendo os povoamentos de *Quercus suber* L. os mais densos. No que concerne à produção de frutos (bolota e glande) a informação existente é ainda mais incerta: as variações nas condições edafo-climáticas, a variedade e tamanho dentro de cada espécie, os sistemas de poda praticados e os factores nosológicos representam, entre outras, variáveis que afectam a produtividade dos montados em frutos. Embora as últimas estatísticas publicadas refiram produções de  $160,5 \times 10^6$  litros ( $120,2 \times 10^6$  Kg), é possível que os quantitativos possam ser significativamente maiores ou menores em função dos factores de variação acima referidos. Seja como for a bolota e a glande constituem uma das principais fontes energéticas para os animais (suínos, ovinos e bovinos) mantidos em pastoreio nos cobertos de azinheiras e sobreiros durante o período de Outubro-Fevereiro.

Apesar do reconhecido valor energético da glande, e principalmente da bolota, a sua pobreza em proteína e riqueza em polifenóis taninos parecem criar, em variadas situações, problemas nutricionais. Assim, o conhecimento das influências que os taninos da glande e da bolota podem exercer sobre a utilização digestiva da dieta, particularmente da proteína, representa um objectivo de interesse fundamental e aplicado.

Por comodidade de exposição utilizar-se-á, no discurso do presente trabalho, o termo bolota para referir indistintamente os frutos de *Quercus ilex* L. e de *Quercus suber* L..



## ÍNDICE GERAL

Capítulo I - REVISÃO DA LITERATURA - TANINOS E NUTRIÇÃO	1
Introdução	5
Composição química, classificação e ocorrência	6
Interacção tanino-proteína	12
Mecanismos das interacções tanino-proteína	12
Efeitos antinutricionais dos taninos	16
Causas dos efeitos antinutricionais dos taninos	26
Métodos de remoção ou inactivação dos taninos	48
Sumário e conclusões	60
Capítulo II - INTERACÇÕES ENTRE OS TANINOS E AS PROTEÍNAS	61
Introdução	63
Materiais e métodos	66
Resultados	75
Discussão e conclusões	93
ANEXOS	105
Capítulo III - EFEITO DOS TANINOS SOBRE A DIGESTÃO <i>IN VITRO</i> DAS PROTEÍNAS	115
Introdução	117
Materiais e métodos	118
Resultados	122
Discussão e conclusões	130
ANEXOS	139



Capítulo IV - INFLUÊNCIA DOS TANINOS DA BOLOTA, E DO PEG, SOBRE A FERMENTAÇÃO NO RUMEN <i>IN VITRO</i>	145
Introdução	149
Materiais e métodos	151
Resultados e discussão	164
ANEXOS	207
Capítulo V - ESTUDOS <i>IN VIVO</i> DA DIGESTÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA E DO AZOTO, E DA SÍNTESE PROTEICA MICROBIANA EM OVINOS ALIMENTADOS COM ERVA DE OUTONO E BOLOTA	215
Introdução	217
Materiais e métodos	223
Resultados e discussão	234
ESTUDOS COMPLEMENTARES; ENSAIOS COM MARCADORES	251
CONCLUSÕES FINAIS; SUGESTÕES PARA PESQUISA FUTURA	289
BIBLIOGRAFIA	293

## ABREVIATURAS

- ABS - Absorvância da luz emitida
- ADAP - Ácido Diaminopimélico
- ADF - "Acid Detergent Fiber" (Fibra Insolúvel em Detergente Ácido - *Van Soest* -)
- ADFI - ADF Indigestível
- ADIN - "Acid Detergent Insoluble Nitrogen" (Azoto Insolúvel em Detergente Ácido - *Van Soest* -)
- AEP - Ácido Aminoetilfosfônico
- AGV - Ácidos Gordos Voláteis
- ARN - Ácido Ribonucleico
- ATP - Ácido Adenosinotri-fosfórico
- DMO - Digestibilidade da Matéria Orgânica
- DNA - Ácido Desoxiribonucleico
- EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético
- EE - Extracto Etéreo
- EM - Energia Metabolizável
- ENA - Extractivos não Azotados
- ENL - Energia Limpa de Lactação
- FAD - Flavinadeninaducleótido
- FB - Fibra Bruta
- LDH - Desidrogenase Lactica
- M - Concentração Molar
- MO - Matéria Orgânica
- MS - Matéria Sêca
- N - Azoto
- N-ADF - Azoto Ligado ao "ADF"
- NDF - "Neutral Detergent Fiber" (Fibra Insolúvel em Detergente Neutro - *Van Soest* -)
- NDFI - "NDF" Indigestível
- N-DNA - Azoto no DNA
- NNA - Azoto não Amoniacal
- NNP - Azoto não Proteico
- N-RNA - Azoto no RNA

- PB - Proteína Bruta (Nx6,25)
- PEG - Polietilenoglicol
- PG - Produção de Gás
- (P/P) - (Peso/Peso)
- (P/V) - (Peso/Volume)
- PVP - Polivinilpirrolidona
- RNA - Ácido Ribonucleico
- SES - Substâncias Solúveis em Éter
- TDN - "Total Digestible Nutrients" (Nutrientes Digestíveis Totais)
- T:P - Relação Tanino:Proteína
- (V/V) - (Volume/Volume)

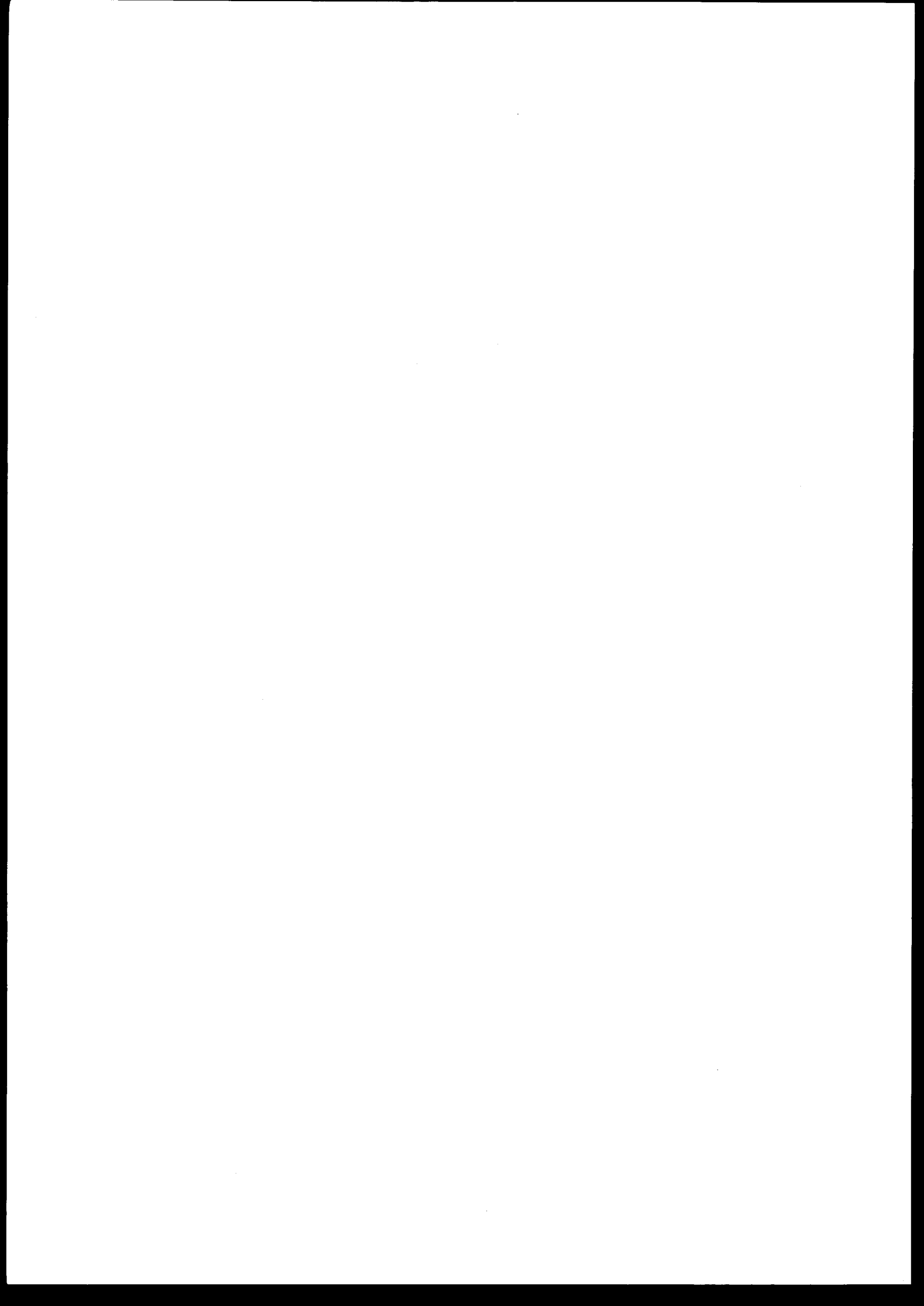
# **CAPÍTULO I**

**REVISÃO DA LITERATURA  
TANINOS E NUTRIÇÃO**

## 1. REVISÃO DA LITERATURA - TANINOS E NUTRIÇÃO

	Pág.
INTRODUÇÃO . . . . .	5
COMPOSIÇÃO QUÍMICA, CLASSIFICAÇÃO E OCORRÊNCIA . . . . .	6
INTERACÇÃO TANINO-PROTEÍNA . . . . .	12
MECANISMOS DAS INTERACÇÕES TANINO-PROTEÍNA . . . . .	12
EFEITOS NUTRICIONAIS DOS TANINOS . . . . .	16
Ratinhos . . . . .	17
Aves - crescimento . . . . .	19
Aves - produção de ovos . . . . .	21
Suínos . . . . .	22
Ruminantes . . . . .	22
CAUSAS DOS EFEITOS ANTINUTRICIONAIS DOS TANINOS . . . . .	26
1) Depressão da ingestão alimentar . . . . .	29
Monogástricos . . . . .	29
Ruminantes . . . . .	30
2) Efeito sobre a digestibilidade . . . . .	31
a. Complexos tanino proteína alimentar . . . . .	31
b. Inibição das enzimas digestivas . . . . .	32
c. Maior excreção da proteína endôgena . . . . .	34
3) Efeito sobre o tubo digestivo . . . . .	36
4) Toxicidade do tanino (ou seus metabolitos) absorvido . . . . .	37
5) Influência do tanino sobre o ecossistema retículo - -ruminal . . . . .	38

	Pág.
MÉTODOS DE REMOÇÃO E INACTIVAÇÃO DOS TANINOS . . . . .	48
1) Remoção física e química do tanino . . . . .	49
2) Adição de substâncias que se complexam com o tanino (adsorventes) . . . . .	52
3) Tratamento químico do produto alimentar . . . . .	53
4) Agentes que auxiliam a destoxificação metabólica .	57
SUMÁRIO E CONCLUSÕES . . . . .	60



## INTRODUÇÃO

O termo tanino foi utilizado originalmente para substâncias com a capacidade de tanarem o couro. Actualmente o termo aplica-se a compostos fenólicos de origem vegetal, com peso molecular suficientemente elevado (500 a 3 000), e com um número de grupos hidroxílicos suficientemente grande (100 a 200 de peso molecular), para formarem ligações eficazes com a proteína e outras moléculas (Swain, 1979). Muitos compostos polifenólicos reagem a muitos testes químicos usados para os taninos, mas não são taninos porque não precipitam a proteína, acontecendo o mesmo com os fenóis simples.

Os taninos estão presentes em muitas forragens, sub-produtos da agro-indústria e folhas de árvores, normalmente utilizados em alimentação animal. A utilização de tais alimentos pode conduzir à morte dos animais, principalmente em período de escassez de erva em que os animais são levados a consumir quantidades anormalmente grandes de alimentos ricos em tanino. Existem várias referências relatando a morte de animais, conseqüente à ingestão de glandes, na Europa (Wolter, 1974), América (Sandusky et al., 1977; Keeler et al., 1978) e África do Sul (Naser et al., 1982). A inexorável escassez de matérias primas para rações de animais nos países menos desenvolvidos tem levado à incorporação, nas rações, de quantidades mais ou menos importantes de produtos e sub-produtos ricos em taninos. Apesar do enorme esforço de pesquisa nos últimos anos para ultrapassar os problemas nutricionais surgidos com a utilização do sorgo rico em tanino (E.U.A.) e bagaço de sementes de *Shorea robusta* (Índia) na alimentação animal, principalmente de ruminantes, a informação relativa à influência dos taninos de outros produtos e sub-produtos é ainda escassa e surge a-



penas episódicamente na literatura científica (McLeod, 1974; Price e Butler, 1980; Kumar e Singh, 1984).

## COMPOSIÇÃO QUÍMICA, CLASSIFICAÇÃO E OCORRÊNCIA

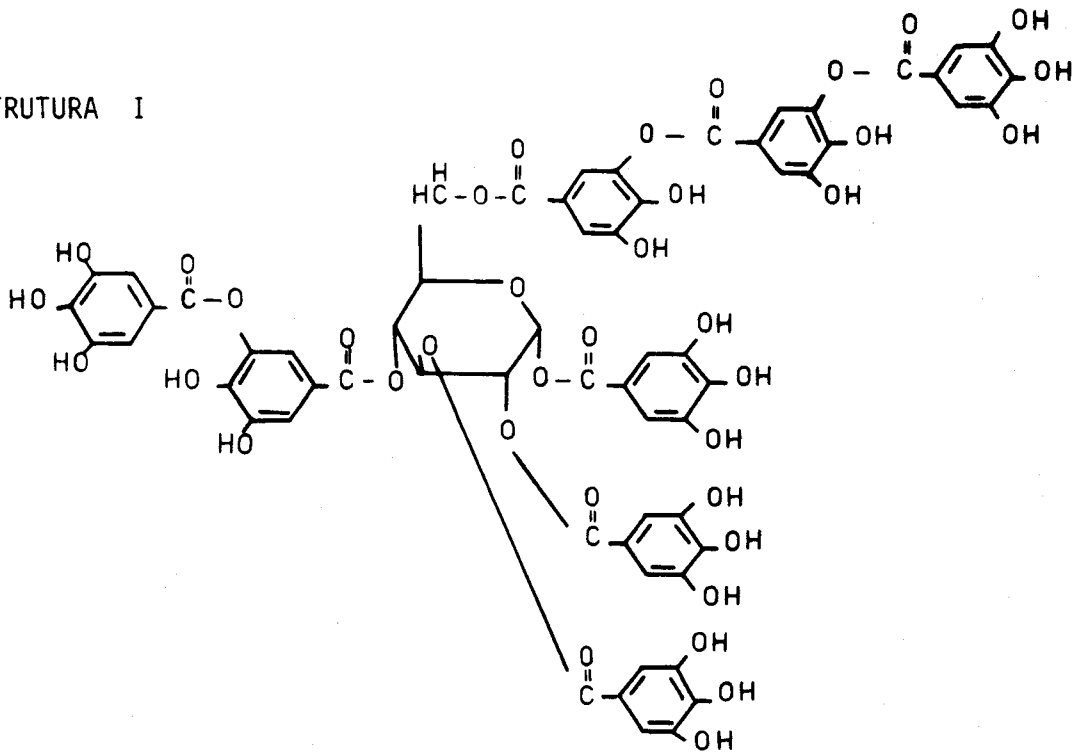
A química destes compostos foi recentemente revista por Haslam (1966), Swain (1975), Swain (1979) e Haslam (1981).

O peso molecular dos taninos condensados varia entre 5 800 - 13 200 em leguminosas (Jones et al., 1976); entre 1 700 - 2 000 para as procianidinas poliméricas do grão de sorgo (Gupta e Haslam, 1978) e 2 000 - 4 000 para os taninos das leguminosas comestíveis mais vulgares (Foo et al., 1982).

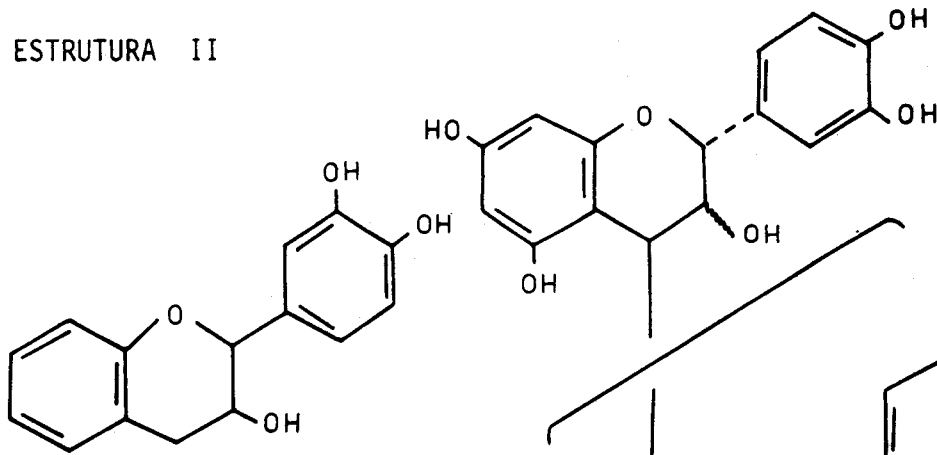
A afinidade do tanino para a proteína aumenta regularmente, nas séries polifenólicas, dos pesos moleculares mais baixos (576) para os mais elevados (1 134) (Bate-Smith, 1973). O peso molecular mínimo necessário para precipitar a proteína é de cerca de 350, o que corresponde, nas séries condensadas, aos flavonóis diméricos (Butler, 1982). Nos taninos hidrolizáveis o mínimo teórico seria duas unidades precursoras de ácido gálico ou uma de ácido elágico. Quando o peso molecular é muito grande (> 5 000) os taninos condensados tornam-se pouco solúveis em soluções fisiológicas e exibem fraca acção tanante ou adstringente.

Os taninos podem ser divididos em dois grupos, condensados e hidrolizáveis, que podem ser diferenciados pela estrutura e reactividade com agentes hidrolíticos (Haslam, 1966). Os taninos hidrolizáveis possuem um álcool polihídrico (glucose), como núcleo, envolvido por ácidos polifenólicos (nomeadamente ácido gálico e correlacionados), que são esterificados pelo álcool central. Como o nome sugere, e devido ao tipo

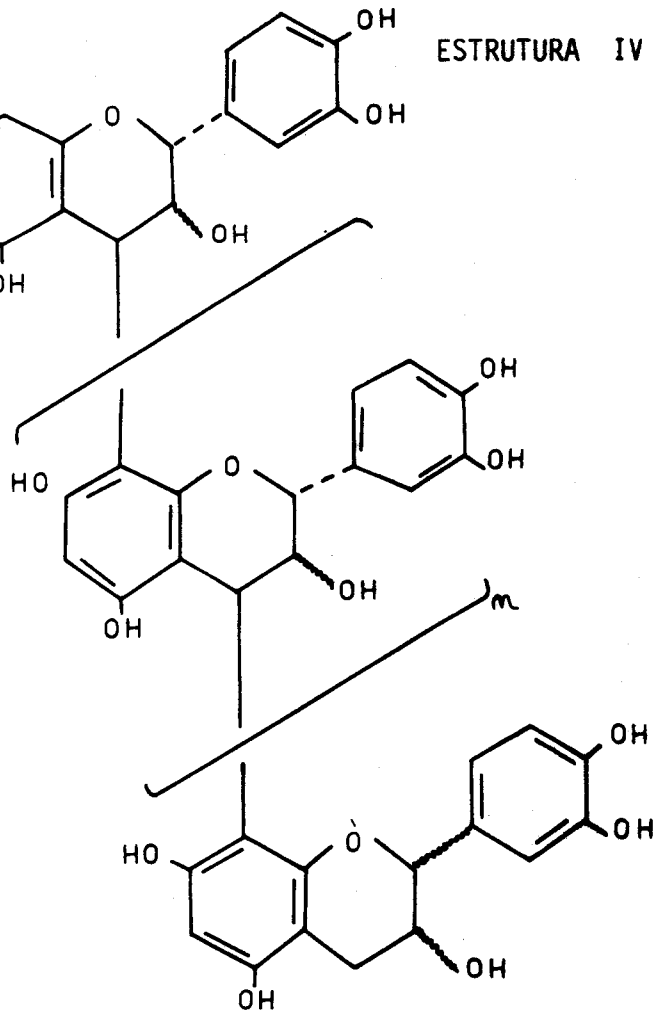
ESTRUTURA I



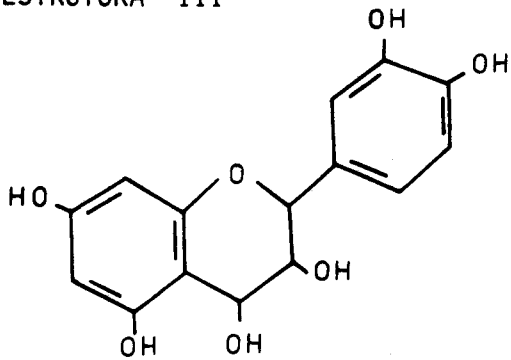
ESTRUTURA II



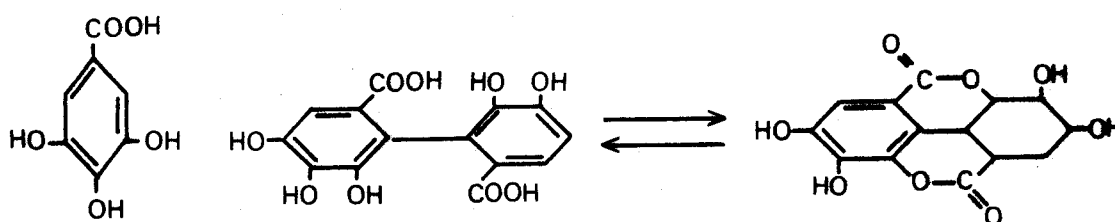
ESTRUTURA IV



ESTRUTURA III



de estrutura (poliéster) este tipo de tanino é facilmente hidrolizável por ácidos, bases, ou certas enzimas. Como exemplo típico de um tanino hidrolizável encontra-se um possível isômero do tanino obtido da sumagreira (*Rhus typhina* ou *R. coriaria*) (Estrutura I) (citado por Price e Butler, 1980). Os taninos hidrolizáveis podem ainda ser subdivididos em galhotaninos e elagitaninos consoante o ácido fenol-carboxílico componente. Por hidrólise os galhotaninos produzem ácido gálico, e os elagitaninos produzem ácido hexahidroxidifênico, o qual se isola sob a forma da sua dilactona estável, o ácido elágico.



Ácido gálico    Ác. hexahidroxifênico

Ác. elágico  
(dilactona)

Os taninos condensados, também designados procianidinas, ( antigamente designados leucoantocianidinas, porque muitos deles formam cianidinas por hidrólise ácida) são polímeros de flavan-3-óis (ex: Estrutura II) e flavan-3,4-diois (ex: Estrutura III). O tratamento com ácido promove a condensação, ou a hidrólise e formação de antocianidinas. A estrutura IV é típica dos taninos condensados do grão de sorgo e da uva (Haslam, 1977).

No Quadro nº. 1.1. representam-se alguns produtos e sub-Produtos que contêm taninos.

Quadro 1.1. Alguns alimentos que contêm taninos.

Alimento	Referências
<b>Leguminosas de pastagens</b>	
Lespedeza sp. ( <i>Lespedeza cuneata</i> G. Don)	Burns (1966); Osbourn et al., (1971); Bell et al., (1965)
Luzerna ( <i>Med. sativa</i> L.)	Milic (1972 a e b); Bate-Smith (1973)
Sanfeno ( <i>Onobrychis viciaefolia</i> Scop.)	Jones et al., (1976); Osbourn et al., (1971); Jones e Mangan (1977); Foo et al., (1982)
Erva coelheira ( <i>Lotus pedunculatus</i> Cav.)	Barry e Forss (1983); Kumar e Singh (1984)
Crownvetch ( <i>Coronilla varia</i> L.)	Bell et al., (1965); Burns e Cope (1974); Bate-Smith e Lerner (1954)
<b>Frutos de leguminosas</b>	
Feijão ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Ronnenkamp (1977); Ma e Bliss (1978)
Fava ( <i>Vicia faba</i> L.)	Martin-Tanguy et al., (1977)
Ervilha ( <i>Pisum sativum</i> L.)	Lindgren (1975)
<i>Shorea robusta</i>	Wah et al., (1977); Kumar (1980)
Alfarroba ( <i>Ceratonia siliqua</i> )	Nachtomi e Alumot (1963); Joslyn et al., (1968)
<b>Outros frutos (especialmente verdes)</b>	
Colza ( <i>Brassica campestris</i> L.)	Durkes (1971)
Cártamo ( <i>Carthamus tinctorius</i> L.)	Wah et al., (1977)
Glandes de <i>Quercus pedunculata</i>	Singleton (1981)

Glandes de <i>Quercus incana</i>	Vijjan e Katiyar (1973)
" " " <i>robur</i>	Haslam (1966)
" " " <i>ilex</i>	Lozano et al., (1983)
Banana ( <i>Musa sapientum</i> )	Goldstein e Swain (1963)
Uva ( <i>Vitis vinifera</i> )	" " "
Café ( <i>Coffea arabica</i> L.)	Hoff e Singleton (1977)
Cacao ( <i>Theobroma cocoa</i> )	Haslam (1966); Quesnell (1968)
Marmelo ( <i>Aegle marmelos</i> )	Lohan et al., (1980)
Diospiros ( <i>Diospyros Kaki</i> L.)	Goldstein e Swain (1963)
Tâmara ( <i>Phoenix dactyli- fera</i> L.)	Lloyd (1911) - cit. por Price e Butler (1980)
Maçã ( <i>Malus domestica</i> Borkh)	Price e Butler (1980)
Espinheiro ( <i>Crataegus mo- nogyna</i> )	Haslam (1977;1980) (1980)
Ameixa ( <i>Prunus domestica</i> L.)	Goldstein e Swain (1963)
<b>Grão de cereais</b>	
Cevada ( <i>Hordeum sativum</i> )	Eggum e Christensen (1975)
Milho miúdo ( <i>Eleusine co- racana</i> )	Ramachandra et al., (1977)
Sorgo ( <i>Sorghum vulgare</i> L.)	Strumeyer e Malin (1975)
( <i>Sorghum bicolor</i> (L) Moench)	Gupta e Haslam (1978); Price et al., (1979b)
<b>Folhas de árvores e arbustos</b>	
<i>Acacia catechu</i>	Lohan et al., (1980)
<i>Albizia lebbek</i>	" " " "
<i>Aegle marmelos</i>	" " " "
<i>Bauhinia variegata</i>	" " " "

<i>Eugenia jambalana</i>	Lohan et al., (1980)
<i>Ficus benghalensis</i>	" " " "
<i>Ficus glomerata</i>	" " " "
<i>Grewia optiva</i>	" " " "
<i>Morus alba</i>	" " " "
<i>Leucaena leucocephala</i>	" " " "
<i>Quercus sp.</i>	Feeney (1968); Lohan et al., (1980)
<i>Terminalia bellirica</i>	Lohan et al., (1980)
<i>Zizyphus nummularia</i>	Daniel et al., (1978) - citado por Kumar e Singh, (1984).
<i>Pteridium aquilinum</i>	Bate-Smith e Lerner (1954)

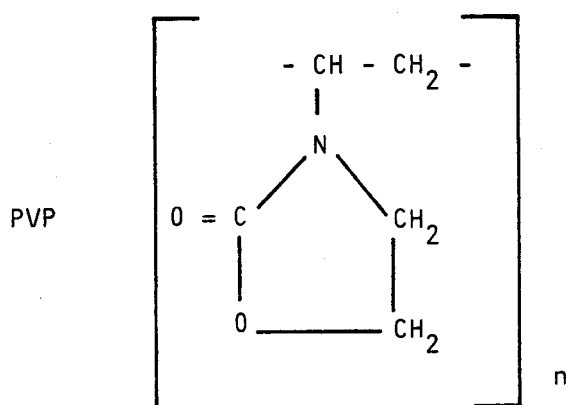
## INTERACÇÃO TANINO-PROTEÍNA

Os taninos reagem com a proteína formando complexos tanino-proteína insolúveis. Parecem participar, na formação de tais complexos, quatro tipos de ligações: ligações hidrogénio entre os grupos fenólicos do tanino e cetoimida das proteínas (Haslam, 1974); ligações iónicas entre o anião fenolato e o sítio catiónico da molécula proteica (Loomis, 1974); ligações covalentes formadas por oxidação dos polifenóis em quinonas e subsequente condensação com um grupo nucleofílico ( $-NH_2$ ,  $-SH$ ,  $-OH$ ) na proteína (Loomis, 1974; Haslam, 1979), e interacções hidrofóbicas entre a estrutura cíclica, aromática, dos compostos fenólicos e as regiões hidrofóbicas das proteínas (Loomis, 1974; Oh, 1978; Hagerman e Butler, 1980b).

## MECANISMOS DAS INTERACÇÕES TANINO-PROTEÍNA

O conhecimento actual das interacções tanino-proteína teve origem na indústria de cortumes. Inicialmente o processo tanante era considerado como sendo resultante da interacção entre os grupos hidroxilo dos taninos e os "sítios activos" da molécula de colagêneo. A natureza desses "sítios activos" tem sido objecto de muita pesquisa. Estudo com colagêneo modificado e com polímeros sintéticos indicam que as ligações peptídeo (ou amida) são envolvidas na formação de complexos entre taninos e proteínas. Os produtos de condensação da ureia com formaldeído, possuindo uma estrutura do tipo  $(-CH_2 -NH -CO -NH -CH_2 -)_n$ , que possuem a ligação peptídeo como o único grupo reactivo de alguma importância, precipitam quantitativamente os taninos. Batzer e Weissenberger (1951) observaram que poliamidas do tipo nylon,  $(-NH_4 -(CH)_n -CO -)_n$ , reagem similarmente

com taninos. Tendo em consideração a disponibilidade de grupos reagentes das proteínas, *Gustavson (1954)* sugeriu quatro sítios possíveis de ligação: (1) ligações peptídicas, (2) grupos iônicos, tais como os grupos  $\epsilon$ -amino da lisina, os grupos guanidil da arginina, e os grupos carboxilo dos ácidos aspártico e glutâmico, (3) os grupos hidroxilo da serina e hidroxiprolina, e (4) os grupos amida da glutamina e asparagina. Estudos ulteriores de *Gustavson (1956)* demonstraram que a Polivinilpirrolidona (PVP), tanto solúvel como insolúvel, formava complexos estáveis com taninos, em grau quase tão elevado como o "hide powder" e nylon hidratado.



A formação de pontes protônicas entre os radicais hidroxilo dos taninos e os radicais carboxilo dos peptídeos das proteínas foi evidenciada igualmente por *Cannon (1955)*, *Loomis e Battaile (1966)* e *Van Buren e Robinson (1969)*.

Os complexos tanino-proteína poderiam ser, pelo menos parcialmente, dissociados por certos solventes orgânicos tais como: acetona, ésteres, dimetilformamida, N-metilpirridiona e dimetilsulfoxido (*Loomis, 1969*), detergentes (*Goldstein e Swain, 1965*), álcalis e cafeína (*Mejbaum-Katzenellenbogen, 1963*) e polietilenoglicol (PEG) 4 000 (*Toyama e Kamiyama, 1972*).

Embora seja geralmente aceite que a ligação hidrogênio constitui o mecanismo predominante nas interações tanino-proteína, outras forças parecem estar envolvidas (*Oh, 1978*), inclusive ligações mais estáveis



(Loomis e Battaile, 1966). Estes autores sugeriram que se poderiam formar ligações covalentes estáveis em consequência da oxidação dos fenóis em quinonas e subsequente copolimerização das quinonas com a proteína. Uma vez que os extractos comerciais de taninos são usualmente sujeitos a condições oxidativas, durante a extracção e armazenamento, é possível que contenham grupos reactivos suficientes para formarem tais ligações estáveis (Van Sumere et al., 1975). Para além das ligações hidrogénio, Oh (1978) evidenciou que em muitas condições a ligação hidrofóbica pode constituir a principal força de ligação tanino-proteína: uma larga fracção de grupos hidrofóbicos estão localizados na superfície de várias proteínas, estando assim disponíveis para interagirem com o solvente, e com outros constituintes, no ambiente aquoso. Além disso, uma vez que as cadeias laterais de ácidos aminados são bastante compridas, comparadas com a ligação peptídica, é lógico pressupor que estas cadeias, juntamente com o volume das proteínas, poderão estar envolvidas na formação de complexos entre os taninos e as proteínas. Chibber et al., (1978) sugeriram que a fracção "Kafirina" do sorgo, fracção altamente hidrofóbica, álcool-solúvel, se associa predominante e fortemente aos taninos através de interações hidrofóbicas.

O processo da formação de complexos (resultante em parte de ligações hidrogénio e em parte de ligações hidrofóbicas) é normalmente reversível, e tanto as proteínas como os polifenóis podem em princípio ser recuperados do complexo; contudo, se as proteínas e os polifenóis interagirem sob certas condições (por exemplo: pH alcalino,  $O_2$ ) então os polifenóis podem ser oxidados em quinonas, e a forma oxidada pode então formar ligações covalentes com a proteína, tornando a associação irreversível (Van Sumere, 1975; Haslam, 1980).

Utilizando poliamida e colagêneo, Gustavson (1954; 1956) demons-

trou respostas ao pH marcadamente diferentes entre taninos hidrolizáveis e condensados. Os taninos condensados ligaram-se quase independentemente do pH, abaixo de 7-8, e a ligação diminuiu marcadamente a pH superior a 8. Em contraste, os taninos hidrolizáveis ligaram-se fortemente a pH 3-4, tendo diminuído a ligação a pH superior a 5. Estes fenômenos foram interpretados como significando que no caso dos taninos condensados, a ligação envolveria radicais hidroxilo fenólicos não ionizados, uma vez que um fenol ionizado não poderia servir como dador de prótons para a ligação hidrogênio. A valores de pH superiores a 9 os grupos fenólicos começam a ionizar-se, com formação de fenolato, passando a haver menos radicais hidroxilo disponíveis para ligação às proteínas. No caso de alguns taninos hidrolizáveis, os efeitos do pH foram atribuídos a fortes ligações hidrogênio, formadas pelos grupos carboxilo, não ionizados, dos taninos a pH abaixo de 5, e ligações hidrogênio mais fracas pelos grupos hidroxilo fenólicos não ionizados (*Loomis e Battaile, 1966*). Contudo, esta interpretação não pode ser válida para os taninos hidrolizáveis do tipo do ácido tânico que não contêm grupos carboxilo livres.

*Van Buren e Robinson (1969)* verificaram que a interacção máxima entre ácido tânico e gelatina ocorreu no ponto isoelectrico da proteína. No que diz respeito ao tipo de proteína, a gelatina, cujos ácidos aminados não polares (prolina, hidroxiprolina e glicina) constituem mais de 50% da proteína, ligou quantidades invulgarmente grandes de taninos por unidade de peso, comparada com outras proteínas (*Singleton, 1967*).

A especificidade da interacção seria, segundo *Hagerman e Butler (1981)*, uma função inversa do tamanho, conformação, e carga da molécula proteica. As proteínas ricas em prolina exibiriam elevada afinidade para os taninos devido à sua conformação aberta e às suas capacidades para formarem fortes ligações hidrogênio.

Haslam (1974) observou que a formação de complexos polifenóis-taninos resultava de interligações entre moléculas proteicas separadas e os fenóis, e que a capacidade tanante residual, embora relacionada com o tamanho molecular, dependia principalmente do número de sítios separados na molécula capazes de se associarem com a proteína. Os possíveis sítios separados nos polifenóis naturais seriam os núcleos 0-dihidroxi e trihidroxifenólicos, os quais seriam capazes de se associarem às proteínas. Os grupos fenólicos isolados não seriam importantes neste contexto.

Refira-se igualmente que os taninos condensados e hidrolizáveis apresentam muitas similaridades estruturais tais como núcleos 0-dihidroxi e trihidroxi, que se projectam para a superfície exterior da estrutura molecular.

#### EFEITOS NUTRICIONAIS DOS TANINOS

Os efeitos nutricionais mais aparentes dos taninos, quando ingeridos a níveis não superiores aos que ocorrem, por exemplo, no grão de sorgo (1-2%) (Price et al., 1979b), são depressão no crescimento e diminuição da eficiência da utilização do alimento (Price e Butler, 1980). Tais depressões têm sido observadas em ratinhos, pintos, patinhos, porcos, novilhos e borregos. Decréscimos na produção de leite de vacas foram também observados. A par daqueles efeitos, outros se têm verificado, casual ou concomitantemente, como lesões hepáticas e renais, lesões da mucosa gastro-intestinal, perturbação na excreção de certos catiões, bloqueio da absorção de certos elementos como o  $Fe^{++}$ , aumento da excreção de proteína e ácidos aminados, e anormalidades nos membros em aves e vitelos. Níveis de tanino próximos de 5% (taninos hidrolizáveis) podem provocar a morte.

Algumas dificuldades se deparam ao procurar estabelecer comparações dos diferentes ensaios realizados: (1) O teor em tanino referenciado depende da técnica utilizada. *Price e Butler (1977)* deram recentemente ênfase a algumas causas comuns de erro e má interpretação; (2) O nível proteico da dieta influencia marcadamente a expressão do efeito deletéreo dos taninos, já que grandes quantidades deste nutriente aliviam o efeito depressivo dos taninos (*Price e Butler, 1980; Kumar e Singh, 1984*), e, por último, (3) alguns autores utilizaram o ácido tânico como modelo de tanino. Os resultados observados não são extrapoláveis para situações em que se confrontam taninos condensados (*v.g. do sorgo, uva, colza...*).

Ratinhos. - A adição de tanino à dieta de ratinhos tem efeitos comparáveis aos referidos para as aves, no que respeita ao crescimento e eficiência de utilização alimentar. (*Glick e Joslyn, 1970a*) verificaram severa depressão no crescimento de ratinhos quando se adicionou ácido tânico à dieta até níveis de 4%. A 8%, 9 em cada 10 ratinhos morreram em 4-6 dias. Estes autores demonstraram que a depressão na ingestão alimentar constituiu o principal factor depressivo nos primeiros dias da experiência. Os animais adaptaram-se parcialmente às dietas ao fim de alguns dias, após os quais os controles exibiram maior ganho de peso que os alimentados com a dieta rica em tanino. Com uma dieta de elevado teor proteico (40% de caseína), o ácido tânico, mesmo ao nível de 5% nas dietas, não afectou a velocidade de crescimento nem a ingestão (*Glick e Joslyn, 1970a*); com 20% de caseína e 5% de ácido tânico observaram uma significativa depressão no crescimento. Noutro trabalho (*Glick e Joslyn, 1970b*), os mesmos autores

administraram 3 tipos de taninos condensados (de semente de uva, quebracho e mimosa) e 2 tipos de taninos hidrolizáveis (ácido tânico comercial e ácido taratânico), através do alimento, a níveis que variavam 2-10%. A depressão no crescimento foi maior com o ácido tânico que com os taninos condensados do quebracho ou da mimosa, ambos administrados ao nível de 1%. *Schaffert et al.*, (1974) observaram ganhos de peso e eficiência alimentar inferiores quando ratinhos foram alimentados com dois genótipos diferentes de grão de sorgo ricos em taninos, comparado com dois genótipos de baixo teor em tanino. As diferenças não foram contudo significativas quando se adicionou 15% de farinha de soja à dieta. *Jambunathan e Mertz* (1973) observaram maiores ganhos de peso, ao fim de 10 dias, em ratinhos alimentados com 3 dietas à base de grão de sorgo de baixo teor em tanino, que nos ratinhos alimentados com dietas baseadas em três variedades de grão mais rico em tanino (35,29 e 20 g *vs* 7,1 e 12 g, respectivamente). Os ratinhos com dietas com elevado teor em tanino, que aumentaram em média 12 g no peso vivo, consumiram mais alimento que os alimentados em dietas de baixo teor em tanino, os quais aumentaram 20 g. *Oswalt* (1973) comparou os ganhos de peso em ratinhos alimentados com sorgos de elevado e baixo teor em tanino, em dietas isoproteicas, sendo a dieta à base de sorgo de baixo teor em tanino a que permitiu maiores ganhos de peso. *Dreyer e Van Nierkerk* (1974) trabalhando com ratinhos, e utilizando vários genótipos de sorgo, verificaram que a correlação entre velocidade de crescimento e digestibilidade da proteína foi maior que a encontrada entre velocidade de crescimento e teor em taninos, o que levou aqueles autores a sugerirem a digestibilidade da proteína como o melhor índice das propriedades depressoras do crescimento, do grão de sorgo. *Ronnenkamp* (1977) refere menores velocidades de crescimento e piores eficiências de conversão alimentar em ratinhos alimentados com dietas à base de feijão (*Phaseolus*

*vulgaris*) e correlaciona-os com o conteúdo em tanino.

Aves - crescimento - Um grande número de trabalhos realizados com a finalidade de determinar os efeitos nutricionais dos taninos, utilizaram aves como unidades experimentais (Price e Butler, 1980).

Fuller et al., (1966) concluíram que era necessário um nível de tanino, na dieta, superior a 0,64%-0,84% para retardar o crescimento de pintos. Vohra et al., (1966) verificaram depressão no crescimento de pintos alimentados com uma dieta contendo 0,5% de ácido tânico, e 70% de mortalidade no efectivo experimental, entre o 7º e 11º dia de experiência, quando o teor daquele tanino atingiu os 5%. Glick e Joslyn (1970b) compararam os efeitos do ácido tânico e de extractos tanantes de casca de castanheiro, quebracho e acácia, sobre o crescimento de ratinhos. Ao nível de 1% o ácido tânico foi o mais eficaz como depressor do crescimento e da ingestão alimentar, não tendo os taninos condensados afectado significativamente o peso médio das unidades experimentais. Aqueles autores observaram ainda maior mortalidade em pintos que em ratinhos alimentados com dietas contendo 3%-7% de ácido tânico. Em contraste, Kratzer et al., (1975) referiram que os taninos (hidrolizáveis e condensados) inibiam o crescimento de pintos em grau similar, numa base de igual conteúdo fenólico total. Segundo Potter e Fuller (1968) e Rayudu et al., (1970a) o pirocatecol e o pirogalhol, metabolitos do ácido tânico, exerceriam um efeito depressivo mais severo sobre o crescimento de pintos que o próprio tanino. Chang e Fuller (1964) observaram que o tanino, ao nível de 0,1%, não provocava qualquer efeito negativo, mas que deprimia o crescimento a níveis de 0,5% e 2%. Também Rostagno et al., (1973) observaram diminuições na velocidade

de crescimento e do índice de conversão alimentar com níveis de 1%-2% de tanino na dieta. O tanino estava contido no sorgo, tal como nas experiências de *Armstrong et al.*, (1973) que observaram os mesmos efeitos. Nestas experiências o controle foi sorgo pobre em tanino.

Embora quantidades maiores de proteína possam atenuar a depressão no crescimento de ratinhos, provocada pelo tanino alimentar, (*Glick e Joslyn, 1970a; Schaffert et al.*, 1974) e suínos (*Combs e Wallace, 1976* - citado por *Price e Butler, 1980*), *Armstrong et al.*, (1973) registaram um ritmo de crescimento 15% inferior em pintos alimentados com sorgo rico em tanino, mesmo com níveis de 20% de proteína na dieta. *Martin-Tanguy et al.*, (1977) encontraram uma correlação negativa significativa entre ganho de peso de patinhos e teor em tanino de dietas à base de diferentes variedades de fava com diferentes teores em tanino. *Marquardt et al.*, (1977) verificaram perda de peso em pintos a cuja dieta foi adicionado tanino purificado de fava (3,9%). Outros efeitos, nomeadamente anormalidade dos membros (*Swain, 1965*) têm sido observados em pintos alimentados com sorgo rico em tanino.

Em contraste com as observadas depressões no crescimento de animais que ingeriram tanino, outros autores não confirmaram tais observações quando utilizaram sorgo, rico e pobre em tanino, na dieta de pintos, ao nível de 55% (*Halloran e Maunder, 1971*) e 60% (*Stephenson et al.*, 1967; 1968). *Ringrose e Morgan (1970)*, citados por *Price e Butler (1980)*, não observaram diferenças na eficiência de utilização alimentar, em pintos alimentados com dietas contendo 2% de ácido tânico, embora tenha havido depressão no crescimento. A substituição de 50% do milho por sorgo (*Damrom et al.*, 1968), ou a substituição do sorgo pobre pelo rico em tanino (*Stephenson et al.*, 1968), não provocaram efeitos depressivos no crescimento e na eficácia de utilização alimentar, em pintos. No entanto estes autores

utilizaram rações com elevado teor proteico, o qual poderá ter mascarado os efeitos dos taninos (Schaffert et al., 1974; Combs e Wallace, 1976 - citados por Price e Butler, 1980).

Apesar dos problemas referentes à falta de uniformidade das condições experimentais, parece-nos indiscutível poder concluir que os taninos, tanto condensados (grão de sorgo) como hidrolizáveis (ácido tânico) exercem efeitos depressivos, a níveis superiores a 0,5-1%, sobre o crescimento e eficiência de utilização alimentar de aves.

Aves - produção de ovos. Potter et al., (1967) referiram uma ligeira diminuição na produção de ovos quando galinhas foram alimentadas com uma dieta contendo 1% de ácido tânico, e uma diminuição um pouco maior com 2%. A este nível de ácido tânico também verificaram um aumento no número de ovos com coloração verde da gema e com gema matizada. Lindgren (1975) encontrou uma correlação de -0,82 entre os coeficientes de digestão da proteína bruta e o teor em taninos, quando galinhas poedeiras foram alimentadas com dietas à base de diferentes variedades de fava ou ervilha contendo várias quantidades de tanino, mas não observou nenhum efeito sobre a produção de ovos. Martin-Tanguy et al., (1977) verificaram que favas ricas em tanino deprimiam o peso dos ovos e reduziam o ritmo de postura, embora não tenham apresentado dados estatísticos. Guillaume e Bellec (1977) verificaram uma relação inversa entre peso dos ovos postos diariamente e teor em taninos da ração. Sell et al., (1983) observaram baixa produção de ovos e reduzida eficiência alimentar em aves alimentadas com dietas à base de sorgo e com 11,5% ou 14,5% de PB. Com 14,5% de PB na dieta a perda de peso das aves foi menor. O peso dos ovos não foi afectado pelo tanino.



Suínos - As referências na bibliografia não estão de acordo no que se refere aos efeitos dos taninos nas dietas para suínos. Duas referências (Hillier et al., 1959; Thrasher et al., 1975) indicam diminuição na velocidade de crescimento e piores conversões alimentares em suínos alimentados com dietas à base de grão de sorgo rico em tanino, quando comparadas com dietas contendo grão de sorgo pobre em tanino. Três outras referências (Campabadal et al., 1976; Combs e Wallace, 1976; Hammel e Johnson, 1976) indicam não ter havido diferenças significativas na velocidade de crescimento, ou na eficiência da conversão alimentar, quando se compararam dietas à base de sorgo rico e pobre em tanino. É possível que a quantidade de proteína utilizada nestas dietas (14-16%) tenha sido suficientemente elevada para diminuir os efeitos deletéreos do tanino, tal como foi observado por Schaffert et al., (1974) com ratinhos, quando adicionaram 15% de farinha de soja às dietas. As digestibilidades da Matéria Seca (MS) e Proteína Bruta (PB), em porcos alimentados com sorgo rico em taninos foram significativamente inferiores às observadas para o sorgo pobre em taninos (Thrasher et al., 1975; Campabadal et al., 1976). Ferreira (1984), referindo trabalhos de autores espanhóis, conclui que o tanino da bolota exerce efeitos depressivos no crescimento de suínos quando aquela é incorporada nas rações a níveis superiores a 30%. Segundo Kondos e Foale (1983) o sorgo pobre em tanino é nutricionalmente superior ao rico em tanino, para suínos.

Ruminantes - O problema dos efeitos dos taninos sobre ruminantes é bem mais complexo devido ao ecossistema retículo-ruminal. Muito embora se tivessem observado efeitos depressivos, principalmente sobre a ingestão, em ruminantes pastoreando leguminosas ricas em tanino (McLeod, 1974), algumas esperanças foram colocadas na utilização dos taninos na protecção da proteí-

na contra a desaminação no rumen (Zelter et al., 1970), e na prevenção do timpanismo devido à sua acção anti-espumante no rumen (Jones et al., 1970).

As proteínas podem tornar-se mais resistentes à degradação no rumen, sem perda de digestibilidade no intestino, mediante tratamento térmico moderado (Church, 1979), cobertura da proteína com compostos inertes e lípidos (Chalupa, 1975), ou através de tratamentos químicos, nomeadamente com aldeídos (Ferguson et al., 1967) e tanino (Zelter et al., 1970; Driedger e Hatfield, 1972).

A estabilidade do complexo tanino condensado-proteína está ligada ao pH (Jones e Mangan, 1977), sendo insolúvel e estável na gama de pH compreendida entre 3,5-7,0, mas dissociando-se e libertando a proteína a pH < 3.0 e pH > 8.5. A presença de taninos condensados em forragens verdes deveria assim, teoricamente, reduzir a taxa de degradação ruminal da proteína no rumen (pH 5,8-6,8) permitindo no entanto a sua solubilização e libertação no abomaso (pH 2,5-3,5) e intestino delgado (pH 7,5-8,5). John e Lancashire (1981), confirmaram isto com cultivares de *Lotus corniculatus* contendo 2,5 e 14,5 g de tanino condensado/Kg de MS, e Barry e Manley (1984) com *Lotus pedunculatus* contendo 46 e 106g de tanino condensado/Kg de MS. Sabe-se, contudo, que nem todos os complexos tanino-proteína têm o mesmo pH óptimo para máxima ligação (Hagerman e Butler, 1978). Várias experiências sugerem que o tanino pode proteger parcialmente a proteína da desaminação ruminal. Leroy et al., (1964) mostraram que a adição de uma solução aquosa de tanino (preparada a partir de um pó, extraído de madeira de castanheiro, que continha 70% de tanino puro) a bagaços de amendoim e de soja, aquando da incubação *in vitro* com suco de rumen, provocava uma diminuição na libertação de amoníaco sem afectar o poder celulolítico da microflora do rumen. As doses mínimas de extracto tanante a utilizar foram definidas, para diferentes proteínas, por Zelter et al., (1970) (Quadro 1.2). Estes autores propuseram doses de 6 a 15% de ta-

nino de castanheiro visando a reduçãõ, a menos de 10%, da desaminaçãõ do azoto proteico no meio ruminal *in vitro*. As quantidades variaram com a natureza do tanino utilizado, o tipo de produto e a natureza da proteína, mas parecem independentes do teor em azoto.

Quadro 1.2 Doses mÍnimas de extracto tanante necessÁrias para impedir a desaminaçãõ de diferentes proteÍnas pelas bactÉrias do rumen ( Zelter et al., 1970).

	N, % M.S.	Tanino, % do produto seco
P de leite	6,08	16
Torta de colza	6,67	12
Torta de girassol	7,58	15
Torta de linho	6,46	6
Torta de amendoim	9,01	15
Torta de soja	8,42	8

Para Driedger e Hatfield (1972) o tratamento com 10% de Ácido tÁnico, (1g de Ácido tÁnico, 10g de bagaço de soja) protege perfeitamente durante 8 horas de incubaçãõ em rumen artificial e após 12 horas a protecçãõ É ainda de 90% (em relaçaõ ao tempo t=0).

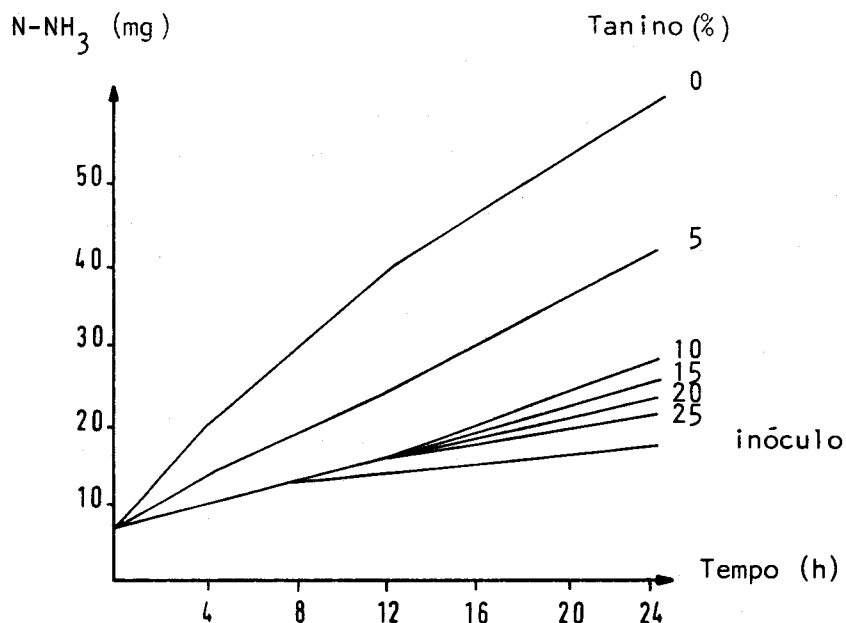


Fig. 1.1. Influência do tempo de incubação e da intensidade do tratamento de um bagaço de soja tanado sobre a produção de amoníaco no rumen *in vitro* (Driedger e Hatfield, 1972).

Contudo, nem todos os autores são unânimes em reconhecer que o emprego dos taninos melhora a utilização do azoto nos ruminantes. *Nishimuta et al.*, (1973) observaram que, apesar da diminuição da amoniogênese ao nível do rumen e da excreção do azoto urinário, a excreção do azoto fecal aumentou, e a retenção azotada não melhorou, nos borregos alimentados com bagaço de soja tratado com 9% de ácido tânico. No decurso de um estudo ulterior, estes mesmos autores (1974) não verificaram, em novilhos, nenhum efeito da tanagem do bagaço sobre a quantidade de proteínas alimentares que chegaram ao intestino delgado. Alguns destes resultados poder-se-iam explicar pelo facto de os complexos tanino-proteína serem capazes de se dissociar em pH ácido, e de se reformarem quando o pH se eleva ao nível do intestino delgado (Driedger e Hatfield, 1972). É igualmente possível que os taninos possam inibir directamente as enzimas proteolíticas (Feeney, 1969), tornando assim as proteínas menos digestíveis. Pelo contrário, *Zelter e Leroy* (1966) e *Delort-Laval e Viroben* (1969) não

observaram senão uma pequena inibição da actividade pepsina-tripsina *in vitro* (-5% relativamente à testemunha não tratada) com as doses mínimas de tanino de castanheiro, o que lhes permitiu pensar que, naquelas condições, a digestão das proteínas tanadas não era afectada no intestino. *Driedger e Hatfield (1972)* verificaram que borregos alimentados com bagaço de soja, ou bagaço de soja tratado com ácido tânico, ganharam 177g/dia e 217g/dia de peso vivo, respectivamente, tendo a retenção azotada sido igualmente superior para o alimento tratado (10,6g) relativamente ao não tratado (7,5g). Contudo, os autores notaram que os *pellets* não tratados se desintegravam rapidamente em água, enquanto que os tratados retinham a sua forma durante 6 horas, observação que está de acordo com as propriedades adesivas que são características dos taninos. Assim, é possível que alguns, ou todos, dos efeitos verificados tenham sido motivados pela estabilidade dos *pellets*.

Estudos de balanço azotado em ovinos, alimentados com pó de leite desnatado tratado com tanino de castanheiro, mostraram uma ligeira diminuição na digestibilidade do azoto (0,68% vs 0,72%) mas um significativo aumento na retenção azotada (23,6% vs 16,1%) (*Delort-Laval et al., 1972*).

*McGinty (1969)* -(citado por *Price e Butler, 1980*) observou reduzida digestibilidade da MS quando administrou a novilhas sorgo rico em tanino. A digestibilidade da proteína foi de metade da observada com sorgo pobre em tanino. *Maxson et al., (1973b)* observaram que novilhas alimentadas com milho, e sorgo rico e pobre em taninos, tiveram aumentos de peso de 32,25 e 27 libras, respectivamente, durante 3 períodos de 19 dias. *Maxson et al., (1973b)* verificaram uma menor produção de leite e um menor ganho de peso em vacas alimentadas com silagem de sorgo rico em tanino, do que em vacas alimentadas com silagem de sorgo pobre em tanino.

Reed et al., (1982) referiram que o tanino condensado na "ADF" da mandioca limitava a sua utilização como forragem.

A presença de taninos nos alimentos para ruminantes parece também ser responsável pela baixa produção de leite, redução na disponibilidade do enxofre, modificações degenerativas tóxicas no intestino, fígado, baço e rim, e constipação fatal ( Jagdale et al., 1976; Garner e Hurwood, 1976; Gupta et al., 1977; Lohan et al., 1979 - citados por Kumar e Singh, 1984 ). Em ensaios de pastoreio com *Lotus pedunculatus*, Barry e Manley (1984) verificaram que o PEG 4 000 melhorava o crescimento de borregos de 125g/dia para 166g/dia, não tendo o PEG exercido qualquer acção nos borregos em pastagem de trevos, branco e encarnado. Apesar dos argumentos em favor da possível acção benéfica dos taninos nos alimentos para ruminantes, parece-nos ainda válida, face ao acumular de informações, a conclusão de Broster et al., (1978): " Thus the instances of benefits from treatment of protein are very few against the weight of evidence of no effect or a detrimental effect in studies of growth in cattle, and they are restricted to low levels of N intake: No benefits have been recorded in the studies of lactation in cows in papers cited by Goering and Waldo, (1974)".

A eficácia dos taninos na prevenção do timpanismo em bovinos parece ser mais clara. A principal causa do timpanismo parece ser a formação de uma espuma estável no retículo-rumen (Reid, 1960 - citado por Reid et al., 1974). A proteína vegetal solúvel é a principal responsável pela formação de espuma, embora hajam outros factores envolvidos (Clark e Reid, 1974). Kendall (1966) sugeriu que a presença de tanino seria responsável pela ausência de timpanismo em bovinos quando alimentados com certas leguminosas, baseando-se em estudos *in vitro* com extractos de folhas. Este autor observou que a adição de Polivinilpirrolidona (PVP) so-

lúvel, ao rumen *in vitro* contendo folhas de tais leguminosas, provocava a formação de espuma. A PVP é bem conhecida na sua capacidade de se complexar com taninos. Jones *et al.*, (1976) observaram uma completa ausência de proteína solúvel no rumen de bovinos que pastavam espécies que contêm taninos condensados. Verificaram igualmente que o complexo tanino-proteína foliar era dissociado numa percentagem de 9,5 ao pH do abomaso (2,5). Reid *et al.*, (1974) compararam sanfeno (contendo 1,5% de tanino condensado) e trevo encarnado (sem taninos) e verificaram frequente ocorrência de timpanismo com o trevo encarnado e ausência total de timpanismo com o sanfeno. Atribuíram ao tanino uma acção anti-timpanizante.

#### CAUSAS DOS EFEITOS ANTI-NUTRICIONAIS DOS TANINOS

As explicações sugeridas para os efeitos anti-nutricionais dos taninos enquadram-se em cinco linhas principais (Price e Butler, 1980):

O tanino

- 1) Deprime a ingestão alimentar
- 2) Afecta a digestibilidade:
  - a. Complexa-se com a proteína ou outros componentes alimentares.
  - b. Complexa-se com enzimas digestivas, interferindo com a digestão.
  - c. Complexa-se com suficiente quantidade de proteína endógena de alta qualidade.
- 3) Complexa-se com, ou danifica, partes do próprio tubo digestivo, interferindo com as suas funções.
- 4) Os seus produtos de hidrólise são absorvidos e têm efeito tóxico em qualquer ponto do organismo.

5) Interfere no ecossistema retículo-ruminal.

1) Depressão da ingestão alimentar

Monogástricos - Do ponto de vista biológico a importância dos taninos reside na sua eficácia como repelentes para os predadores, quer animais quer microbianos. Em ambos os casos a propriedade relevante é a "adstringência" (Bate-Smith, 1973; 1981) tornando os tecidos não palatáveis, por precipitação da muco-proteína salivar, ou por imobilização de enzimas, impedindo a invasão dos tecidos do hospedeiro pelos parasitas (Harborne, 1976).

A diminuição nos ganhos de peso observados em aves, em algumas experiências com tanino, sem diminuição da eficiência alimentar, pode ser explicada por depressão na ingestibilidade (Ringrose e Morgan, 1970). O mesmo efeito foi observado em ratinhos por Glick e Joslyn (1970a) e em pintos por Vohra et al., (1966). Por outro lado, a palatabilidade dos alimentos que contêm naturalmente taninos não parece constituir problema importante, como foi observado para o grão de sorgo administrado a pintos (Featherston e Rogler, 1975) e ratinhos (Jambunathan e Mertz, 1973; Schaffert et al., 1974) em que os animais que consumiram o sorgo rico em tanino demonstraram velocidades de crescimento mais baixas que os controles alimentados com sorgo pobre em tanino, mas consumiram mais que os testemunhas. Tamir e Alumot (1970) verificaram que a depressão no crescimento, provocada pelas vagens verdes de alfarroba ricas em tanino, mas não pelas vagens maduras, foi consequência da baixa ingestão alimentar. Tal poderá dever-se à presença de tanino hidrolizável que se encontra conjuntamente com tanino condensado nas vagens verdes, enquanto que as maduras apenas contêm taninos condensados (Joslyn et al., 1968). Bornstein et al., (1963 - citados por Price e Butler, 1980) observaram que o consumo alimentar aumentou, e o ganho de peso diminuiu, quando se adicionou alfarroba a die-



tas para pintos. No entanto os autores apresentaram evidência para a presença de uma substância depressora do apetite que era solúvel em água.

Ruminantes - A baixa palatabilidade, devido aos taninos adstringentes, conduz à redução da ingestão voluntária. Ensaio conduzido em pastoreio de *Sericea lespedeza*, com ovinos (Wilkins et al., 1953) e novilhas (Donnelly, 1954), evidenciaram que os animais consumiram maior quantidade de plantas com baixo teor que com elevado teor em taninos. Donnelly e Anthony (1969) referiram que o nível de tanino requerido para rejeição do alimento, pelos animais em pastoreio, era de 20 mg/g de MS. Jokl e Carlson (1982) referiram que as folhas de *Eucalyptus saligna* e *Lecytis pisonis* não eram aceitáveis para animais em pastoreio devido ao elevado conteúdo fenólico. O bagaço de sementes de *Shorea robusta* seria não palatável em si, mas poderia ser aceite quando misturado com algum concentrado palatável (Patel et al., 1972). Jones et al., (1976) isolaram taninos condensados de leguminosas pratenses e estudaram a distribuição do seu tamanho molecular e composição (relação delfinidina/cianidina), relacionando-os com a palatabilidade. Concluíram que a palatabilidade estava relacionada com o conteúdo em prodelfinidina, sendo os *Trifolium arvense* e *Trifolium affine* menos palatáveis que a *Coronilla varia*. Os taninos também diminuem a permeabilidade da parede do tubo digestivo, reagindo com a camada celular externa do intestino (Mitjavila et al., 1977), afectando o processo digestivo e de absorção. Todos estes factores podem afectar adversamente a ingestão voluntária do alimento pelos ruminantes. Recentemente, Barry e Duncan (1984) e Barry e Manley (1984) observaram, em estudos que compararam *Lotus pedunculatus* com baixo e elevado teor em tanino, que os taninos deprimem a ingestão de Energia Metabolizável (EM), tanto por depressão da ingestão voluntária como por depressão da digestão da matéria orgânica (MO). A adição de PEG estimulou a digestão da hemicelulose e ce-

lulose, indicativo de que os taninos deprimiram a digestão ruminal.

## 2) Efeito sobre a digestibilidade

A reduzida digestibilidade dos alimentos ricos em tanino, particularmente a da sua fracção azotada, pode dever-se a vários factores:

a. Complexos tanino-proteína alimentar - *Tamir e Alumot (1970)* sugeriram que a menor retenção de N pelos ratinhos alimentados com vagens de alfarroba era provocada por ligação não específica da proteína com o tanino e, pelo menos em parte, por inferior digestibilidade da proteína. Dada a capacidade de pequenas quantidades de suplementos de farinha de soja para eliminarem diferenças no ganho de peso causadas pelo tanino, no grão de sorgo, *Schaffert et al., (1974)* concluíram que o efeito do tanino não era tóxico mas antes afectava a disponibilidade da proteína alimentar. *Feeney (1969)* verificou que a caseína era quase completamente protegida da hidrólise pela tripsina (a pH 7,6) quando foi complexada com tanino. Houve um substancial aumento na digestibilidade do complexo a pH 9,2, o pH prevalecte na "traça" que se alimenta de folhas de carvalho que contêm taninos. A susceptibilidade da albumina sérica bovina e da proteína G-1 do feijão *Phaseolus vulgaris*, à hidrólise triptica foi substancialmente diminuída após exposição a taninos da glândula de carvalho (*Romero e Ryan, 1978*). Os problemas nutricionais provocados pelos taninos estão muito provavelmente relacionados, em parte, com uma menor retenção azotada. Aumento da excreção azotada e redução da digestibilidade proteica foram referidos para ratinhos alimentados com vagens de alfarroba contendo taninos (*Tamir e Alumot, 1970*), sorgo (*Featherston e Rogler, 1975; Martin-Tanguy et al., 1976*), ou tanino adicionado a dietas de base (*Glick e Joslyn, 1970a; Mitjavila et al., 1977*); para pintos alimentados com sorgo contendo

tanino (Stephenson et al., 1971; Nelson et al., 1975), cevada (Eggum e Christensen, 1975), favas (Martin-Tanguy et al., 1977), ou tanino adicionado a dietas de base (Vohra et al., 1966; Rostagno et al., 1973) e para porcos alimentados com sorgo rico em tanino (Trasher et al., 1975). Baixas digestibilidades *in vitro* da proteína foram observadas no sorgo rico em tanino (Armstrong et al., 1974; Price et al., 1979a). Dreyer e Van Niekerk (1974) sugeriram que a digestibilidade da proteína era um índice melhor das propriedades depressoras do crescimento, do sorgo rico em tanino, que o próprio tanino. A proteína não é provavelmente o único componente alimentar adversamente afectado a nível da digestão e absorção.

b. Inibição das enzimas digestivas - Os taninos são potentes inibidores das enzimas digestivas devido à sua capacidade de se complexarem tanto com as proteínas dos substractos como com as enzimáticas (Hagerman e Butler, 1978; Bressani e Elias, 1979). Existem muitos trabalhos realizados e que demonstram a inibição de um grande número de enzimas por diversos tipos de taninos, dos quais apenas alguns são aqui salientados.

O elevado conteúdo em tanino de alguns sorgos híbridos inibe a actividade amilásica (Daiber, 1975) e a fermentação microbiana (Watson, 1975) em tal grau que tornam estes grãos inúteis para a confecção de cerveja *Bantu*. Muitos outros exemplos podem ser encontrados na revisão feita por Van Sumere et al., (1975). A maioria dos casos de inibição pelo tanino são provocados por, ou são acompanhados de, precipitação da enzima. A tripsina é inibida por taninos da folha de carvalho (Feeney, 1969), da vagem de alfarrobeira (Tamir e Alumot, 1969), da luzerna (Milic et al., 1972) e da fava (Griffiths, 1979; Griffiths e Mosley, 1980). O grau de inibição das enzimas digestivas pelos taninos dependerá provavelmente de vários factores, nomeadamente da quantidade de proteína alimentar (a qual se poderia ligar no lugar de alguma proteína enzimática), oportunidade

para que se forme o complexo tanino-proteína alimentar antes da ingestão, quantidades relativas das várias enzimas e a ordem em que são confrontadas com o tanino, afinidades diferentes entre componentes do tanino e as várias enzimas, e pH. Alguns dos factores variariam com a espécie e idade dos animais, e entre indivíduos.

*Glick e Joslyn (1970b)* verificaram um aumento de 3 a 4 vezes nos níveis de actividade das enzimas proteolíticas no conteúdo intestinal de ratinhos alimentados com dietas contendo 5% de tanino, comparado com as testemunhas. Os autores sugeriram que este aumento não seria devido à ligação a uma enzima específica, porque as relações da tripsina com outras enzimas proteolíticas nos controlos e nos ratinhos alimentados com 5% de ácido tânico foram as mesmas. Não observaram hipertrofia pancreática ou exaustão das enzimas pancreáticas. *Tamir e Alumot (1970)* observaram aumentos consideráveis na actividade enzimática da tripsina e amilase no conteúdo cecal de ratinhos alimentados com alfarroba contendo tanino (esp. alfarroba verde) ou taninos extraídos da alfarroba. Os mesmos autores (1969) verificaram que as enzimas digestivas, tripsina,  $\alpha$ -amilase e lipase, eram fortemente inibidas pelos taninos condensados da alfarroba. A comparação destes resultados com a inibição enzimática pelos taninos hidrolizáveis e condensados, demonstrou as diferenças que se podem esperar como resultado das características diferentes das várias enzimas e taninos. O tanino condensado inibiu a actividade da tripsina em maior grau que o tanino hidrolizável, enquanto que se observou o oposto com a lipase. A  $\alpha$ -amilase foi inibida em igual grau por ambos.

Os compostos fenólicos poderiam afectar as enzimas quer (a) por reduzirem a solubilidade da proteína enzimática, através da formação de complexos proteína-tanino insolúveis (*Williams, 1963*), quer (b) por inibirem a actividade enzimática através da formação de complexos solúveis mas

inactivos (Loomis e Battaile, 1966; Zanobini et al., 1967). Por isso, podem-se visualizar, para a inibição das enzimas pelos taninos, cinéticas de reacção competitiva e não competitiva. Hall (1966) observou que o grau de inibição de pectina-esterase era proporcional à concentração de ácido tânico, e com o aumento na concentração do substrato a inibição diminuía. A inibição era reversível. Cinéticas de reacção não competitiva foram referidas para a galactosidase (Goldstein e Swain, 1965), tripsina (Tamir e Alumot, 1969), amilase (Tamir e Alumot, 1969; Davis e Hosoney, 1979) e lipase (Griffiths, 1979). No entanto, em estudo da cinética da actividade inibidora do concentrado padrão de proteína foliar, preparado a partir de azevém italiano, festuca e quinoa, Humphries (1980) verificou que, em cada caso, havia inibição mista. A resistência do substrato complexado com tanino, ao ataque enzimático, foi ilustrado por Feeney (1969).

c. Maior excreção de proteína endógena - A menor retenção azotada na presença de tanino alimentar, como discutido anteriormente, pode ser consequência, ou da diminuição da digestibilidade da proteína alimentar, ou do aumento da excreção de proteína endógena. Mitjavila et al., (1977) pretendem que " the hypothesis of a lower digestibility of the tannin-dietary protein complexes or proteolytic enzyme inhibition by tannins should be eliminated, at least as far as hydrolyzable tannins are concerned". Os autores tinham previamente demonstrado que a digestibilidade aparente do azoto total, numa dieta semi-purificada contendo um hidrolizado enzimático de caseína, era diminuída na presença de tanino (Mitjavila et al., 1971). Elkin et al., (1978) verificaram que o grão de sorgo rico em tanino deprimia a velocidade de crescimento em pintos, comparado com sorgo pobre em tanino, numa dieta à base de sorgo-farinha de soja, e que a substituição da farinha de soja pelo seu equivalente em amino-ácidos livres não provocava um idêntico

incremento (de facto a eficiência alimentar foi significativamente mais pobre). Se os complexos tanino-proteína alimentar indigestíveis e a inibição das enzimas proteolíticas fossem as únicas causas da depressão do crescimento, induzida pelo tanino, a substituição de uma porção significativa da proteína por ácidos aminados livres deveria ter resultado em alguma melhoria.

*Glick e Joslyn (1970b)* observaram boa utilização da proteína alimentar em ratinhos alimentados com rações contendo 5% de ácido tânico e  $^{14}\text{C}$ -caseína. Embora só tivessem usado dois ratinhos por tratamento, a excreção proteica pelos ratinhos alimentados com tanino foi 33 e 18% do ingerido comparado com 6 e 4% para as testemunhas. Durante um período de coleta de 84 horas foi excretado, por cada um dos ratinhos, menos de 5% de  $^{14}\text{C}$ . Esta observação, conjuntamente com as do aumento de 3 a 4 vezes nos níveis da actividade proteolítica intestinal, levou-os a concluir que as proteínas de origem endógena (incluindo as enzimáticas) representaram a maior parte dos compostos azotados excretados. *Mitjavila et al., (1977)* citam os seus resultados, utilizando uma dieta isenta de proteína (*Mitjavila et al., 1974*), como suporte desta hipótese. Se for excretada proteína endógena adicional sob a forma de um complexo com o tanino, a disponibilidade de um ou mais ácidos aminados pode ser reduzida, mais do que seria de esperar se fosse excretado um complexo tanino-proteína alimentar, dependendo da composição em ácidos aminados das proteínas endógena e alimentar. Isto seria provocado por uma permuta proteica, sendo digerida parte da proteína alimentar, e excretada, em maiores quantidades que o normal, proteína endógena de provável superior qualidade nutricional. O potencial de remoção selectiva das proteínas endógenas, ricas em ácidos aminados essenciais, foi demonstrado em ratinhos alimentados com inibidor da tripsina da soja (*Khayambashi e Lyman, 1966*). As proteínas no intestino delgado

contiveram sete vezes o nível de ácidos aminados essenciais, e dezassete vezes a quantidade de cisteína, encontrados nas testemunhas. *Silano (1977)* afirma que " the possible natural occurrence of tannins in cereals in the form of tannin-protein complexes could be considered a condition which limits the adverse nutritional effects of cereal tannins; actually, tannin-protein complexes may represent partially detoxified tannins."

3) Efeito sobre o tubo digestivo - Poucos estudos foram feitos acerca do efeito do tanino sobre o tubo digestivo. *Mitjavila et al., (1977)* verificaram que parte do aumento no azoto excretado por ratinhos, alimentados com 1% de ácido tânico, correspondeu a glicoproteínas das secreções mucosas, como evidenciado por um aumento paralelo do ácido siálico e glucosamina. A percentagem de lípidos nas fezes também aumentou. Estudos histológicos revelaram uma hipersecreção de muco gástrico e duodenal. Este aumento na secreção foi insuficiente para proteger o epitélio do tubo digestivo, dada a observação de um efeito necrótico na mucosa. Enterócitos isolados de ratinhos, alimentados com dietas contendo 1% de ácido tânico, manifestaram reduzido metabolismo do oxigênio (0,58 vs 0,81  $\mu$  M  $O_2$ /mg de proteína/hr) mas não exibiram diferenças no nível do metabolismo da glucose ou do ácido lactico. A análise mineral das cinzas das fezes indicou perturbações na absorção mineral. O ácido tânico provocou aumento no Cálcio (6,8 vs 4,9 Meq/ratinho) e Sódio (1,8 vs 1,3 Meq/ratinho) excretados. Observaram-se diminuições estatisticamente significativas na excreção do Cobre, Magnésio, Manganês e Ferro.

*Vohra et al., (1966)* administraram, a pintos, dietas contendo 5% de ácido tânico e observaram que a sua morte ocorreu entre os 70 e 110 dias. Através da necrópsia, verificaram que as aves exibiam descamação

da mucosa esofágica, edema subcutâneo e espessamento do papo. A bolsa de Fabricius era ligeiramente mais pequena que o normal.

Concentrações maiores de tanino provocaram gastroenterite e congestão da parede intestinal de ratinhos (Boyd *et al.*, 1965 - citados por Price e Butler, 1980) e gastroenterite hemorrágica em coelhos (Dollahite *et al.*, 1962, citados por Price e Butler, 1980). O ácido tânico foi durante muito tempo usado rectalmente em enemas de Bário para retirar o muco e definir as paredes do colon com fins radiológicos (Singleton e Kratzer, 1969), tendo o processo sido abandonado quando se verificou que podia provocar a morte (Price e Butler, 1980).

4) Toxicidade do tanino (ou seus metabolitos) absorvido - Singleton e Kratzer (1969), numa excelente revisão acerca da toxicidade dos fenóis vegetais, partem do pressuposto de que a absorção directa de uma macromolécula, com ligações protónicas, não dializável, precipitante de proteínas, como o tanino será pouco usual no animal em condições fisiológicas normais. Glick e Joslyn (1970b) demonstraram que o ácido galhotânico não era absorvido pelo intestino do ratinho. Contudo, na medida em que um dos sintomas do consumo prolongado de tanino é a gastroenterite (com inflamação, edema e lesões celulares do intestino), é provável que o tanino possa ser absorvido em tais circunstâncias (Singleton e Kratzer, 1969). Após o tanino ter atravessado a mucosa intestinal, poderá surgir uma miríade de possíveis interacções deletéreas. Uma outra situação que possivelmente ocorrerá é a hidrólise dos taninos hidrolizáveis (presumivelmente no intestino). Quando se incluiu ácido tânico na dieta de diversos animais, recuperaram-se produtos metabólicos de degradação do tanino: Nas excreta de galinhas isolou-se ácido gálico, ácido 4-O-metil-gálico e pirogalhol (Potter e Fuller, 1968), e nas de ratinhos e coelhos ácido 4-O-metil-galli-



co (Booth *et al.*, 1959). Quanto aos taninos condensados é impróvel que sejam hidrolizados no intestino. De facto, as condições ácidas levam geralmente à polimerização da catequina, componente de muitos taninos condensados.

O ácido tânico provocou elevado teor lipídico no fígado de ratinhos (Booth, 1961) e pintos (Vohra *et al.*, 1966; Rayudu *et al.*, 1970a). Contudo, não se verificaram alterações nos lípidos hepáticos em pintos (Vohra *et al.*, 1966) ou ratinhos (Glick e Joslyn, 1970b) quando alimentados com dietas com 5% de ácido tânico. Vohra *et al.*, (1966), também referem o aparecimento de fígado gordo em pintos alimentados com sorgo rico em tanino. Rayudu *et al.*, (1970a) observaram que a infiltração gorda do fígado não representa o efeito mais deletéreo do tanino, porque os componentes que a provocam são destoxificados por O-metilação. Outros produtos de hidrólise dos taninos hidrolizáveis, tais como o pirogalhol e pirocatecol, não foram destoxificados e foram muito mais deletéreos em termos de redução do ganho de peso e mortalidade, em pintos.

As evidências mais directas do efeito do tanino sobre tecidos corporais são fornecidas por experiências em que aquele não foi administrado oralmente. Toxicidade hepática e renal, e mortalidade humana, resultaram da aplicação de soluções de ácido tânico, a 3-5%, a tecidos queimados, sendo os taninos condensados menos tóxicos (Singleton e Kratzer, 1973). Todos os taninos são tóxicos quando injectados.

5) Influências dos taninos sobre o ecossistema retículo - ruminal - Apesar da inércia bioquímica manifestada pelos compostos aromáticos em geral (Dagley, 1971 - citado por Marinho, 1984), os taninos, pela sua complexa organização estrutural, são extremamente reactivos, produzindo efeitos inibidores sobre a maioria dos sistemas biológicos, em maior ou menor

grau e podem originar desequilíbrios nos ecossistemas onde são introduzidos (Marinho, 1984).

Se alguns microorganismos são altamente susceptíveis à presença de taninos, outros existem capazes de suportarem elevadas concentrações do mesmo e inclusive degradá-lo (Basaraba, 1966; Grant, 1976; Mahadevan e Muthukumar, 1980).

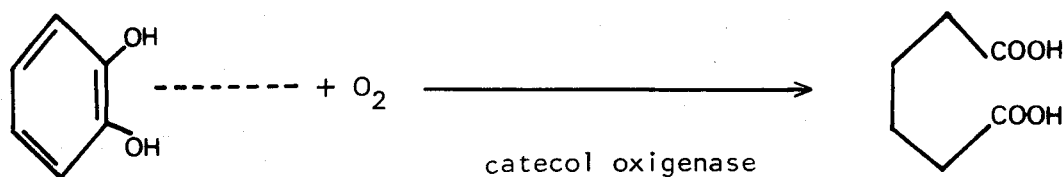
Uma das formas sob a qual se manifesta a acção deletérea dos taninos sobre os sistemas biológicos é a inibição da actividade enzimática (vidê pág.32). Benoit e Starkey (1968b) referem que uma parte importante do efeito inibidor dos taninos na decomposição microbiana dos resíduos vegetais se deve à inactivação, pelos taninos, de exoenzimas microbianas relacionadas com a degradação de polímeros de elevado peso molecular, como o são celulosas, hemicelulosas e pectinas. A fracção tanino pode-se complexar com a celulose, tornando o produto resistente à decomposição. As actividades degradativas sobre outros compostos, tais como amido, quitina, celulose e saponinas, também parecem ser inibidas pela acção dos taninos (Basaraba e Starkey, 1966; Benoit e Starkey, 1968a; Lewis e Starkey, 1969).

Segundo alguns autores, a parede celular constitui alvo principal dos taninos, nos microorganismos susceptíveis à sua presença. Henis et al., (1964) verificaram que o ácido tânico e a fracção tanino da vagem da alfarrobeira afectavam drasticamente a morfologia de alguns microorganismos. As bactérias Gram (-) seriam menos susceptíveis que as Gram (+) em relação à acção dos taninos (Smith, 1974). Os taninos hidrolizáveis teriam igualmente propriedades quelantes em relação aos cationes Cálcio (Shrager et al., 1969 - citado por Marinho, 1984) e alguns cationes, especialmente o Cálcio, parecem ser essenciais para a estabilidade das membranas da parede celular das bactérias Gram (-) (Hague et al., 1974 - citado por Marinho, 1984).

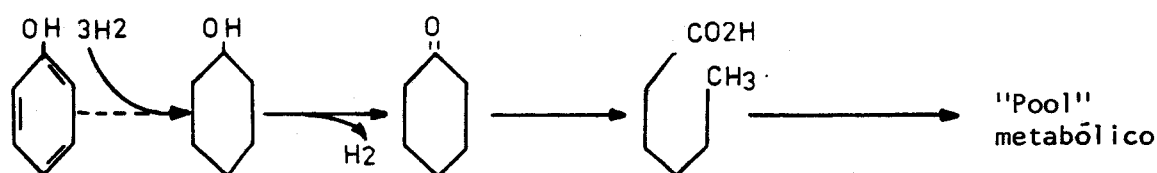
Um número limitado de microorganismos tem sido apontado como responsável pela degradação dos taninos. Ensaio feitos para testar a acção dos taninos sobre a taxa de oxidação da glucose, em alguns microorganismos, evidenciaram não só a inexistência de qualquer acção inibitória sobre a *Pseudomonas fluorescens* como também este organismo utilizou mais oxigênio quando incubado com tanino de acácia, do que quando incubado apenas com glucose (Basaraba, 1966). Fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, provenientes de solos florestais, decompuseram taninos hidrolizáveis e condensados (Lewis e Starkey, 1969). Os mesmos autores (1969) demonstraram a utilização de galhotaninos pelas *Achromobacterium sp.*, como única fonte de energia para o crescimento.

Microorganismos taninolíticos têm sido isolados de ecossistemas aquáticos. Para além de fungos *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.*, os *Deuteromycetes* desempenham papel importante na taninolise (Ingold, 1976 - citado por Marinho, 1984). As leveduras aparecem fortemente envolvidas na degradação de taninos, particularmente *Pichia pseudopolymer*, *P. adeyeyhi*, *P. monospora*, *Debaryomyces hansenii* e *Candida sp.* (Jacob e Marie, 1975 - citados por Marinho, 1984).

Até há bem poucos anos não era concebível a degradação de compostos aromáticos na ausência de oxigênio molecular. A grande inércia química dos núcleos fenólicos apenas seria vencida pela acção desmolítica de oxigenases, enzimas que incorporam  $O_2$  na estrutura benzênica, primeiro passo para a sua clivagem (Stanier et al., 1977):



Algumas bactérias, porém, também estão habituadas a degradar estes substratos na ausência de  $O_2$ , por fotometabolismo (*Athiorhodaceae* sp.), respiração nitrato (*Pseudomonas* sp. e *Moraxela* sp.), respiração sulfato e fermentação metanogênea (um consórcio bacteriano) (Taylor et al., 1970; Evans, 1977), em que o núcleo benzênico é primeiro reduzido e então clivado por hidrólise, produzindo ácidos alifáticos para o crescimento celular (Evans, 1977):



Apesar destes factos, a degradação de taninos em anaerobiose nunca foi evidenciada. Apenas compostos fenólicos mais simples (flavonóis) foram até hoje referidos como passíveis de degradação em anaerobiose, no solo, em digestores e no retículo-rumen (Simpson et al., 1969; Cheng et al., 1969; 1971; Krishnamoorthy et al., 1970; Tsai e Jones, 1975; Evans, 1977). Flavonóis isolados de folhas (rutina e quercitina) foram degradados em AGV através da formação de compostos intermediários como ácido p-hidroxifenilacético, sendo esta actividade atribuída principalmente à fracção bacteriana ruminal (Sharma et al., 1981). Hobson (1969; 1970) referiu que a lenhina era o único componente da dieta que não era atacado pelos microorganismos do rumen, porque a sua degradação constitui uma reacção oxidativa. Van Soest (1982) afirmou que o desaparecimento da lenhina, a que alguns autores se referem (Hartley et al., 1973; 1976; Fahey, G.C.; Jung, H.G., 1983) se ficou a dever única e exclusivamente a erros puramente analíticos. Na opinião do mesmo autor, a degradação biológica da lenhina constitui um processo demasiado lento (demorando sema-

nas e até meses) para ser concebível no tracto digestivo do ruminante, não sendo compatível com o tempo de permanência do alimento no tubo digestivo.

Embora se tenha já evidenciado a presença de actividade tanásica na mucosa do rumen de bovinos (*Begović e Durzić, 1977*) e da cabra (*Begović et al., 1979*), a degradação intraruminal de taninos nunca foi inequívocamente demonstrada. Teoricamente, no quadro marcadamente Gram (-) da micropopulação bacteriana do rumen, aliado à presença de leveduras (*Hungate, 1966*) e fungos *Phycomycetes* (*Orpín, 1977 a,b; Bauchop, 1979 a,b*), o ecossistema ruminal estaria em condições de poder albergar uma micropopulação adaptada à presença de taninos ou habilitada a processar a sua destoxificação. No entanto convem ser retida a ideia básica de que o tempo médio de geração dos microorganismos, a sua eficiência relativa de crescimento e a taxa de renovação da digesta ruminal, podem impossibilitar o estabelecimento de muitas populações microbianas num ecossistema tão dinâmico e tão competitivo.

Os taninos no alimento diminuem a digestibilidade da matéria seca (*Burns e Cope, 1974*) e do azoto (*Van Soest, 1982*) nos ruminantes. No entanto a natureza química e bioquímica dos taninos parece exercer efeito sobre a digestibilidade da proteína, já que existem referências contraditórias acerca da digestibilidade das proteínas das folhas de árvores relativamente ao seu teor total em tanino. (Quadro 1.3 de *Kumar e Singh, 1984*).

Quadro 1.3 Conteúdo em taninos e digestibilidade da proteína bruta de folhas de várias espécies de árvores (Kumar e Singh, 1984).

Espécies	Taninos (%)	Digestibilidade da proteína bruta (%)	Referências (vidē Kumar e Singh, 1984)
<i>Grewia optiva</i>	0.00	72.0	Lohan et al. (1980)
<i>Ailanthus excelsa</i>	0.25(a)	16.2(b)	(a)Seghal (1981); (b)Singh and Patnayak (1977)
<i>Albizia lebbeck</i>	0.73	67.0	Lohan et al. (1980)
<i>Ficus glomerata</i>	0.76	60.0	Lohan et al. (1980)
<i>Moras alba</i>	0.80	71.0	Lohan et al. (1980)
<i>Ficus benghalensis</i>	0.98	21.0	Lohan et al. (1980)
<i>Bauhinia variegata</i>	1.21(a)	10.7(b)	(a)Lohan et al. (1980); (b)Kehar et al. (1955)
<i>Aegle marmelos</i>	2.21	71.0	Lohan et al. (1980)
<i>Leucaena leucocephala</i>	1.53(a)	16.7(b)	(a)Lohan et al. (1980); (b)Upadhaya et al. (1974)
<i>Acacia catechu</i>	1.54	24.0	Lohan et al. (1980)
<i>Gymnosporia soirosa</i>	2.01(a)	2.6(b)	(a)Sehgal (1981); (b)Mohan et al. (1977)
<i>Quercus incana</i>	2.56	57.0	Lohan et al. (1980)
<i>Prosopis cineraria</i>	2.92(a)	4.4(b)	(a)Sehgal (1981); (b)Bhandari et al. (1979)
<i>Zizyphus nummularia</i>	4.30(a)	5.5(b)	(a)Daniel et al. (1978); (b)Nath et al. (1969)
<i>Terminalia bellirica</i>	6.42	10.0	Lohan et al. (1980)
<i>Eugenia Jambalana</i>	7.57	1.0	Lohan et al. (1980)

Os taninos parecem influenciar o metabolismo do rumen em geral. Alguns estudos detalhados têm sido realizados sobre a influência dos taninos sobre várias reacções enzimáticas do rumen. *Smart et al.*, (1961) e *Cope et al.*, (1971) referiram que uma substância hidrossolúvel presente nas folhas de *S. lespedeza* inibiu a hidrólise enzimática da celulose e que a redução na actividade celulásica era proporcional à concentração do inibidor presente. *Lyford et al.*, (1967) observaram que esta substância inibidora constituía uma parte da fracção tanino. *Henis et al.*, (1964) estudaram o efeito de extractos aquosos de vagens de alfarrobeira sobre o crescimento e morfologia de microorganismos e verificaram que as suas fracções tanínicas exerceram efeitos bacteriostáticos sobre o *Cellvibrio fulvus* - uma bactéria celulolítica - e sugeriram que o local de acção dos taninos, sobre microorganismos, seria o envólucro celular. *Tagari et al.*, (1965) demonstraram que a inibição da proteólise e síntese microbiana no rumen artificial era devida à presença de taninos nos extractos de alfarroba, enquanto que a produção de amónia não era afectada. Contudo, *Leroy et al.*, (1964) referiram que a adição de solução aquosa de tanino a bagaços de amendoim e soja, quando incubados no rumen *in vitro* reduziu significativamente a produção de amónia sem afectar a digestibilidade da celulose. Deve-se salientar que no primeiro caso (*Tagari et al.*, 1965) os taninos foram adicionados directamente ao conteúdo do rumen *in vitro*, enquanto que na segunda experiência (*Leroy et al.*, 1964) os taninos foram incubados previamente com a proteína antes de serem incubados. *Tripathi* (1975) observou que a degradação da proteína do amendoim era inibida, no rumen da cabra, pela adição de ácido tânico, ou ácido tânico e tanino de *Shorea robusta*. O tanino foliar de *Ziziphus nummularia* também inibiu a proteólise da caseína no rumen *in vitro* (*Kumar e Singh*, 1984). *Jayasuria et al.*, (1982) observaram uma baixa taxa de desaparecimento da

proteína das folhas de chã, no rumen *in vitro*, devido à presença de polifenóis. Ben Ghedalia e Tagari (1977) verificaram menor actividade desidrogenásica, e menor concentração de amônia, no rumen de animais alimentados com silagem de sorgo (contendo tanino), quando comparados com animais alimentados com silagem de milho.

Benoit e Starkey (1968b) observaram que a urease era inibida pelos taninos da acácia. Lohan et al., (1981) referiram a inibição da actividade ureásica do fluido ruminal por extractos de *Quercus incana*, tendo a inibição sido proporcional ao conteúdo em inibidor na mistura reagente. Contudo, Singh e Arora (1980) demonstraram que os taninos das sementes de *Shorea robusta* não afectaram a actividade ureásica, tendo pelo contrário encontrado valores de amônia superiores na presença de elevada concentração de taninos. Estas observações contraditórias podem ser explicadas na base dos métodos de estudo utilizados: Benoit e Starkey (1968b) e Lohan et al., (1981) expuseram os taninos à presença da enzima antes de adicionarem o substracto, enquanto que Singh e Arora (1980) adicionaram os taninos após a adição de substractos. Robb (1976) atribui a digestibilidade negativa da proteína no bagaço de sementes de *Shorea robusta* à presença de elevadas quantidades de taninos. Os taninos presentes neste alimento formaram complexos, não só com a proteína do bagaço, mas também com as outras proteínas veiculadas na dieta (Negi, 1982). A baixa digestibilidade da PB da *Acacia albida* e *Adansonia digitata* foi igualmente atribuída à presença de elevadas quantidades de tanino (Diagayete, 1981).

Os taninos inibem igualmente as produções de gás, de AGV e a síntese microbiana no rumen. Ensaio *in situ* evidenciaram uma forte correlação negativa entre a produção de gás, digestibilidade da MS e PB, e a presença de taninos (Donnelly e Anthony, 1969; McGinty, 1969; Saba et al., 1972; Pal et al., 1972; Burns e Cope, 1974; Schaffert et al., 1974; Green,



1974; Ramachandra et al., 1977; Waterman et al., 1980). Os taninos de *Shorea robusta* inibiram a produção de AGV no rumen (Singh, 1977; 1978), mas apenas a elevadas concentrações de tanino. Singh (1977) verificou que, *in vitro*, os taninos de folhas de *Ficus religiosa*, à concentração de 1,2%, e o ácido tânico a níveis dez vezes superiores, não tinham qualquer efeito sobre a produção de AGV. Taninos extraídos de *Shorea robusta*, à concentração em que ocorrem naturalmente (13,3% - 2,66 mg/ml) e ácido tânico na mesma concentração, não inibiram a produção de AGV. No entanto, em concentrações dez vezes superiores àquela, o ácido tânico inibiu a produção de AGV (Singh, 1978). Sadanandan e Arora, (1976) observaram uma diminuição na utilização de P<sup>13</sup> fosfato pela microbiota do rumen com o incremento nos níveis de ácido tânico de 1,25% até 7,5%. Sadanandan e Arora, (1979) em trabalho efectuado com búfalos-de-água (*Bos bubalus*) alimentados com farinha de "sal seed", com vários níveis de incorporação de ácido tânico (0,5%), referem um decréscimo nos níveis de N-RNA, N-DNA e AGV, bem como do N proteico microbiano total, à medida que se incrementou a quantidade de ácido tânico, e um aumento simultâneo nos níveis de N proteico no líquido ruminal filtrado.

A actividade ureásica do conteúdo ruminal foi inibida por extractos aquosos de folhas de carvalho (*Quercus incana*), tendo a inibição sido proporcional ao teor em taninos presente (Lohan et al., 1981). Sadanandan e Arora (1979) verificaram que os AGV, DNA microbiano e RNA no rumen diminuíam com o aumento da concentração de ácido tânico na dieta. A utilização do fosfato pelos microorganismos do rumen também diminuiu com o aumento na concentração de tanino (Sadanandan e Arora, 1975). Este tipo de inibição microbiana pode ter efeitos negativos ou positivos sobre o animal, dependendo da situação.

Ben-Ghedalia e Tagari (1977) observaram que ovinos alimentados

com silagem de sorgo, contendo 18,7g de tanino/Kg de MS, apresentaram menor ingestão e digestibilidade da fibra bruta, e menor actividade microbiana no rumen, comparado com ovinos alimentados com silagem de milho contendo 6,6g de tanino/Kg de MS. O limiar de toxicidade do ácido tânico, adicionado directamente ao conteúdo ruminal, em animais fistulados, foi de 3% - 5% em bovinos, mas de 8% - 10% em cabras, aparentemente porque a cabra produziu uma tanase activa na mucosa ruminal (Begovic et al., 1979). A presença dos taninos no *Lotus pedunculatus* aumentou marcadamente a absorção pós ruminal de NNA, mas deprimiu a digestão ruminal dos glúcidos facilmente fermentescíveis e da hemicelulose (Barry e Duncan, 1984). Em estudos quantitativos, Barry e Manley (1984) observaram que o ganho total de N entre a boca e o duodeno foi de 10,5g/dia para o *Lotus pedunculatus* rico em tanino e apenas 1,9g/dia para o de baixo teor, tendo sido o coeficiente de digestão pós ruminal idêntico em ambos os casos (0,67 vs 0,71). Estas observações reforçaram as conclusões de Barry e Forss (1983) de que são necessárias concentrações elevadas de tanino para evitar a desaminação no rumen. Concluem aqueles autores que, às concentrações óptimas de tanino para proteger a proteína da desaminação ruminal existe depressão na ingestão de EM. No entanto estas conclusões, se aplicáveis ao *Lotus pedunculatus*, podem não ser verdadeiras para outras forragens, nomeadamente sanfeno, cujos taninos têm um peso molecular muito superior (28 000 - Jones e Mangan, 1981) ao do *Lotus* (7 700 - Barry e Forss, 1983).

A digestibilidade *in vitro* da *lespedeza* foi de 59% e 65%, respectivamente, em plantas de elevado (5,2% - 7,3%) e baixo (2,5% - 2,9%) teor em tanino (Donnelly e Anthony, 1970). As digestibilidades *in vitro* da *C. varia* (Burns e Cope, 1974), *S. lespedeza* (Cope e Burns, 1971), sorgo forragem (Arora et al., 1975), grão de sorgo (Harris et al., 1970; Martin-Tanguy et al., 1976; Hibberd et al., 1982), milho miúdo (Ramachan-

*dra et al.*, 1977) e fava (Bond, 1976; Buckley *et al.*, 1983) apresentaram correlações negativas com o teor em tanino. A principal acção do tanino na redução da digestibilidade *in vitro* da MS da casca da fava seria devida à inibição da celulase (Griffiths e Jones, 1977). Estudos de digestibilidade *in situ* da MS de dez forragens ricas, e outras dez pobres, em tanino conduziram a valores de 65% e 72% respectivamente (Donnelly e Anthony, 1969). Van Hoven (1984) observou, em quarenta espécies de arbustos, elevada correlação entre teor em polifenóis e digestibilidade *in vitro* da MS, e que os taninos condensados exerceram uma influência negativa mais pronunciada que o ácido tânico (tanino hidrolizável).

#### MÉTODOS DE REMOÇÃO OU INACTIVAÇÃO DOS TANINOS

Dado que os taninos vegetais prejudicam a utilização dos alimentos pelos animais, será desejável reduzir o nível de taninos ou a sua acção.

Na maioria dos vegetais, o teor em taninos é simplesmente governado por um ou dois genes e não é difícil eliminar o factor tanino (Ma e Bliss, 1978; Marshall *et al.*, 1979). Um dos problemas que se levanta é o de saber se a selecção para baixo teor em tanino pode conduzir à perda de importantes vantagens agronômicas. O sorgo rico em tanino, com uma estrutura panicular aberta, parece evitar a predação pelas aves (Harris, 1969). Os taninos contribuem para a resistência vegetal a agentes patogênicos e insectos (Feeney, 1976; Schultz e Baldwin, 1982). Outra característica desejável dos taninos é a resistência a más condições atmosféricas, particularmente retardando a germinação das sementes antes da colheita, e a aquisição de fungos (Harris e Burns, 1970). Assim, a selecção para baixos ní-

veis de tanino conduz à obtenção de plantas mais susceptíveis às agressões por predadores (animais ou microbianos). Por isso, têm sido experimentados vários métodos para ultrapassar o problema nutricional associado aos alimentos ricos em tanino.

Os esforços conduzidos para dominar os efeitos antinutricionais, ou tóxicos, dos taninos dos alimentos, centram-se em várias linhas, nomeadamente (Price e Butler, 1980):

- (1) Remoção física ou química do tanino.
- (2) Adição à dieta de substâncias que se complexam com o tanino.
- (3) Tratamento químico do produto alimentar, para alterar o tanino *in situ*.
- (4) Adição à dieta de substâncias que auxiliam a sua destoxificação metabólica.
- (5) Tratamento dos frutos com hormonas.
- (6) Selecção de variedades de plantas com conteúdo mais baixo em tanino.

(1) Remoção física e química do tanino - Uma vez que o tanino se encontra na "testa" de algumas sementes, p.ex. feijão e sorgo, deveria ser possível remover o tanino, sem provocar perda de nutrientes, por remoção física daquela parte da semente. A remoção manual das "testa", de variedades de feijões ricas em tanino, (*Phaseolus vulgaris*), resultou num alimento que deu melhores performances de crescimento em ratinhos (Ronnenkamp, 1977). A remoção das "testa" de favas não resultou em melhoria nutricional (Martin-Tanguy et al., 1977). Camadas externas do grão de sorgo foram removidas por embebição em álcali a 60° e lavagem em água a 60° C, tendo-se removido a maior parte do tanino. Quando incorporado em dietas de ratinhos (Featherston e Rogler, 1975) ou pintos (Armstrong et al.,

1974a), o grão descascado deu performances marcadamente melhores, tanto em ganho de peso, como em eficiência alimentar. O grão isento de tanino conteve essencialmente a mesma quantidade de proteína, em percentagem da MS do grão inteiro, mas provavelmente perdeu-se, conjuntamente com a fibra, uma quantidade desconhecida de proteína, e possivelmente outros nutrientes. O descasque mecânico do sorgo removeu eficazmente a maior parte do tanino, mas à custa de uma considerável perda de proteína (Chibber *et al.*, 1978a). O descasque de 12,24 e 37% do grão foi acompanhada de perdas de 20,34 e 45% de proteína e 23,74 e 98% de tanino, respectivamente. Estas perdas de proteína podem ser consideravelmente maiores que as perdas por extração com bases, devido à tendência do embrião do grão de sorgo se perder quando é utilizada a moagem (Price e Butler, 1980).

É sempre possível a extração aquosa do tanino de semente de sorgo moída, mas as perdas em nutrientes tornam este processo indesejável. Reichert *et al.*, (1980) observaram que a embebição do grão de sorgo inteiro com 25% de água (P/P), durante nove dias, reduziu o teor em taninos de 3,63% para 0,3%. Contudo, Price *et al.*, (1980) demonstraram que a fervura do grão de sorgo rico em tanino, em água, não aumentava o seu valor nutricional, o que poderia ser devido à inextraibilidade dos taninos condensados. Bate-Smith (1975) verificou que taninos condensados, tais como a procianidina A, não eram extraíveis com água, devido à sua insolubilidade. Como notou McLeod (1974), a maioria dos taninos nas foragens são do tipo condensado. A embebição de farinha de sementes de *Shorea robusta* em água fria removeu 60% do tanino, mas as perdas em nutrientes foram consideráveis (Panda *et al.*, 1969). A embebição do grão de sorgo em hidróxido de sódio a 1% resultou numa remoção similar de tanino, mas as perdas de MS foram de 50-70% (Weber, 1969).

A simples lavagem e fervura com água remove 80% dos taninos da

farinha de sementes de *Shorea robusta* (Singh e Arora, 1978 ). Contudo as perdas de MS são elevadas (18-23%). A água fria não removeu as substâncias depressoras (taninos) das vagens de alfarrobeira, mas a água quente teve alguns efeitos benéficos (Bornstein et al., 1963 - citados por Kumar e Singh, 1974).

Dreyer e Van Niekerk (1974) ,trabalhando com ratinhos e sorgo, obtiveram aumento na performance de crescimento e na digestibilidade da proteína do grão de sorgo rico em tanino, por extracção com álcool etílico a 60%, mas o grau de melhoria não foi suficiente para aumentar o valor nutritivo até ao nível do melhor sorgo pobre em tanino. Durante as extracções com álcool é de esperar a perda da fracção prolamina das proteínas, a qual é mais pobre em ácidos aminados essenciais que a maioria das outras fracções.

Existem algumas evidências de que o processo de laminagem pelo vapor pode inibir parcialmente os efeitos nutricionalmente deletéreos do tanino, no grão de sorgo. O gás produzido no rumen *in vitro* foi menor com um grão rico que com outro pobre (28 vs 48 ml/g de MS) em tanino; o desaparecimento da MS foi de 7 e 15% respectivamente (Saba et al.,1972). Após processamento pelo vapor, e laminagem (flocos), os valores foram de 71 e 75 ml e 15 e 14% respectivamente. Weber (1969 - citado por Price e Butler, 1980) referiu que o processamento pelo vapor reduziu em 25% o conteúdo em tanino do sorgo, aumentou a produção de ovos e melhorou ligeiramente a conversão alimentar, quando administrado a galinhas poedeiras. Não referem análises estatísticas. Tendências similares foram referidas no ano seguinte, embora não estatisticamente significativas (Weber, 1970 - citado por Price e Butler, 1980). A autoclavagem da farinha, em camadas finas, durante 12 minutos a 12 psi, resultou em piores ganhos de peso e eficiência alimentar,num ensaio,e não exerceu nenhum efeito noutro.

O tratamento com água quente contendo quer 2% de cloreto de cálcio quer 10% de gelatina reduziu o tanino analisável, mas não resultou num significativo melhoramento dos ganhos em peso dos pintos (*Bornstein et al.*, 1963- citado por *Kumar e Singh*, 1984).

(2) Adição de substâncias que se complexam com o tanino (adsorventes) -

Os taninos podem ser removidos pela adição de certos adsorventes, tais como a polivinilpirrolidona (PVP) e o polietilenoglicol (PEG), aos quais os taninos se ligam mais fortemente que às proteínas (*Loomis*, 1974). *Rayudu et al.*, (1970b) verificaram que esta propriedade era operativa *in vivo*, porque a PVP reduziu marcadamente o efeito depressor do ácido tânico sobre o crescimento de frangos.

*Goldstein e Swain* (1965) estudaram muitas substâncias como re-activadoras do complexo  $\beta$ -glucosidase-ácido tânico: A cafeína à concentração de 0,1 M restaurou 50% da actividade; detergentes não iónicos e catiónicos, mas não os aniónicos, foram igualmente eficazes. O detergente não iónico TWEEN 80, a concentrações inferiores a 1mg/ml deu completa re-activação. A PVP e o PEG foram quase igualmente eficazes. Em estudos similares com outras enzimas, a PVP provou ser o agente mais eficaz. Verificaram que o tanino condensado formou complexos mais estáveis que o ácido tânico.

*Mc Ginty* (1968) e *Ford e Hewitt* (1979) utilizaram PEG para atenuar a diminuição na digestibilidade das proteínas provocada pelos taninos do sorgo. *Ford e Hewitt* (1979) observaram, em ratinhos e pintos alimentados com sorgo, uma melhoria substancial na digestibilidade da proteína quando incluíram 0,1g de PEG 4 000/g de proteína, embora acompanhada de uma aparente diminuição no valor biológico. Tais efeitos foram similares aos observados por tratamento com  $\text{NH}_3$ . Os mesmos autores observaram efeitos semelhantes sobre fava rica em taninos administrada a pintos e

ratinhos, não tendo no entanto o PEG exercido acção significativa nestes últimos. 1,5% de PVP inibiu parcialmente a depressão no crescimento provocada pela adição de um extracto de *Vicia faba* contendo tanino a dietas de pintos (Marquardt et al., 1977). Similarmente, Armstrong et al., (1973) verificaram que a adição de 1,0% de PVP a dietas para frangos, tanto de sorgo pobre em tanino ao qual se adicionou ácido tânico, como de sorgo rico em tanino, evitava a depressão no crescimento. Jokl e Carlson (1982) observaram que concentrados proteicos de folhas de árvores tinham baixo valor nutritivo, devido aos fenóis associados, e que esse valor melhorava com adição de PVP.

Jung e Fahey (1981) estudaram a digestibilidade *in vitro* de forragens, utilizando PVP para remover os fenóis vegetais, tendo observado melhoria na digestibilidade da celulose e proteína da luzerna (*Medicago sativa*) mas não da *Coronilla varia*. Jones e Mangan (1977) demonstraram, em experiências *in vivo* com ovinos, e em estudos *in vitro*, que o PEG dissociava os complexos proteína-tanino condensado. Em trabalhos recentes, Barry e Duncan (1984) e Barry e Manley (1984) demonstraram inequivocamente que o PEG 4 000 é operativo *in vivo*, tendo removido o efeito depressivo dos taninos do *Lotus pedunculatus* sobre a ingestão e digestão ruminal da MO. O efeito mais drástico verificou-se no entanto sobre a digestão da PB, que aumentou 50%.

(3) Tratamento químico do produto alimentar - A gama de condições e de produtos químicos que podem ser usados no tratamento do alimento, antes de ser ingerido, e o tempo concedido para a efectivação de quaisquer reacções com o tanino, conferem a este tipo de tratamento muitas vantagens sobre os aditivos alimentares, que devem actuar *in vivo* (Price e Butler, 1980). Rayudu et al., (1970 b) verificaram que o  $\text{Ca(OH)}_2$  e  $\text{CaCO}_3$  a 0,9 %



e 2%, respectivamente, do peso da dieta, não diminuíam o efeito deletéreo do ácido tânico adicionado à dieta. *Price et al.*, (1978b) referem melhorias na qualidade nutricional do grão de sorgo rico em tanino através da sua embebição com  $\text{NH}_4\text{OH}$ , tendo observado a eliminação da depressão do crescimento de ratinhos e pintos, e uma melhoria da eficiência alimentar, embora não atingindo o nível observado para um sorgo testemunha, pobre em tanino. Numa publicação subsequente (1979a) os mesmos autores referem que a destoxificação é causada por condições de humidade e alcalinidade em geral. A "performance" de crescimento de pintos, com dietas de sorgo rico em tanino, foi igual à das testemunhas com sorgo pobre em tanino quando o primeiro foi tratado (grão integral) durante trinta dias com amônia diluída, e à temperatura ambiente, ou durante 42 horas com carbonato de potássio 0,5M (3,5 l para 18 Kg de grão moído), a 50° C. O tratamento com óxido de cálcio (0,36 Kg de  $\text{CaO}/3,1$  litros de  $\text{H}_2\text{O}$  para 18 Kg de grão moído) a 24° C, durante uma semana, deu uma melhoria de menor magnitude. Todos os tratamentos referidos resultaram em reduções de 80 a 90% dos taninos mensuráveis por análises químicas. *Ford e Hewitt* (1979) observaram um aumento de 17,2% no teor em N do grão de sorgo tratado com amoníaco, mesmo depois do grão ter sido moído e exposto ao ar até desaparecimento do cheiro a amoníaco. Tal poderia ser vantajoso para ruminantes, capazes que são de utilizarem NNP. Contudo, uma grande parte deste NNP pode ser indisponível (*Van Soest*, comunicação pessoal) por ligação à fibra. O álcali obtido por imersão de cinzas de madeira em água também pode, aparentemente, ser usado para destoxificar o grão de sorgo (*Price et al.*, 1979a). O tratamento do grão de sorgo rico em tanino com soda "mogadi" ( $\text{Na}_2\text{CO}_3, \text{NaHCO}_3, \text{H}_2\text{O}$ ), aumentou a digestibilidade da MS, amido e PB (*Muindi et al.*, 1981; *Muindi e Thomke*, 1981). *Armstrong et al.*, (1974c) observaram que a digestibilidade da proteína do grão de sorgo resistente às aves era de 4,35% e

que quando o tanino era extraído com álcali o valor subia para 17,8%. Outros autores referem igualmente melhorias na digestibilidade da proteína (Chavan et al., 1979) e da matéria seca (Reichert et al., 1980) do grão de sorgo rico em tanino, após tratamento alcalino. Singh e Arora (1978) observaram uma melhor utilização do bagaço de sementes de *Shorea robusta* extraído com álcali, num estudo preliminar com novilhos alimentados com palha de trigo. Num estudo posterior, Singh e Arora (1980) observaram que a incorporação de 45% do mesmo bagaço extraído com álcali na mistura de concentrado promoveu uma melhor taxa de crescimento de vitelos, comparado com a incorporação de bagaço não extraído, embora a relação alimento/ganho de peso tenha diminuído. Negi (1982) referiu que os taninos residuais no bagaço de sementes de *Shorea robusta*, após tratamento alcalino, eram do tipo condensado e que poderiam estar irreversivelmente ligados à proteína, exercendo dessa maneira um efeito negativo. Outra explicação poderia ser a de que o hidróxido de sódio pode oxidar o tanino. A oxidação converte os hidroxilos doadores de ligações hidrogênio em carbonilos quinônicos aceitadores de tais ligações. Tal fenômeno diminui a capacidade de ligação à proteína pelo mecanismo normal, mas pode dar origem a reações de substituição com grupos ε-amino da lisina e sulfidril da cisteína, fazendo com que os taninos se liguem irreversivelmente à proteína:

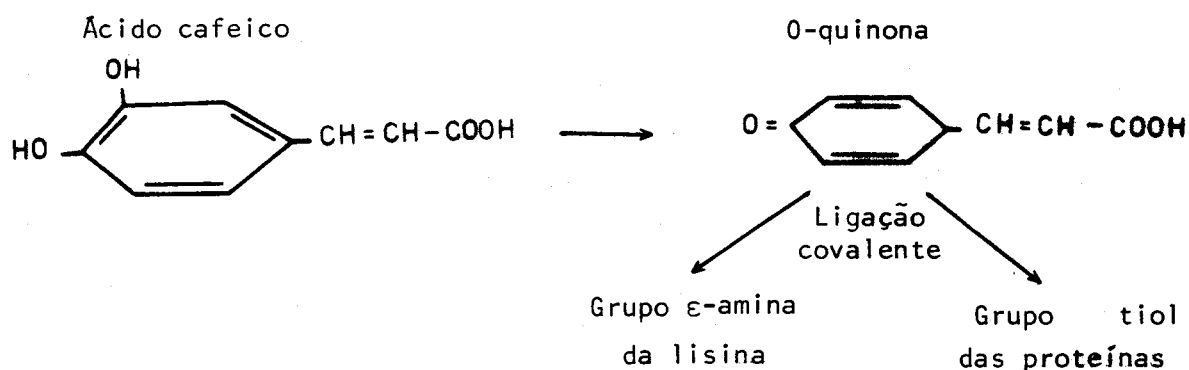


Fig.1.2. Oxidação do ácido cafeico em cafeo-quinona, seguida de ligação autocatalítica a agrupamentos amino e tiol nas proteínas (Sosulski, 1979).

É possível que o tanino, após tratamento alcalino, não influencie as actividades enzimática e microbiana; contudo, a proteína alimentar irreversivelmente ligada ao tanino será totalmente indisponível para o animal. O tratamento com hidróxido de cálcio também seria ineficaz. Em ensaios de alimentação com cabras alimentadas com bagaço de sementes de *Shorea robusta* tratado com hidróxido de cálcio, *Sharma et al.*, (1977) verificaram os usuais efeitos deletéreos (baixa digestibilidade da MS, energia e proteína). Existem referências de perdas de MS da ordem dos 20-70% após tratamento alcalino para remoção dos taninos (*Wah et al.*, 1977; *Singh e Arora*, 1978). Tais perdas repercutem-se sobre a proteína do alimento. No bagaço de sementes de *Shorea robusta* as perdas de MS devidas ao tratamento com  $\text{NaHCO}_3$  e  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  variaram de 19% a 26% (*Singh e Arora*, 1978). As lenhinas presentes na parede celular são solubilizadas pelo tratamento alcalino e podem exercer efeitos depressivos adicionais sobre a fermentação ruminal (*Van Soest*, 1982; *Jung e Fahey*, 1983). Por isso, o tratamento alcalino deverá ser estudado com particulares cautelas. *Gandhi et al.*, (1975) trataram bagaço de sementes de *Shorea robusta* com  $\text{NH}_3$  para despolimerizar o tanino e observaram que o bagaço tratado não era tóxico e era mais palatável, não tendo havido neste caso perda de MS.

*Kemm et al.*, (1981) - citados por *Kumar e Singh* (1984), verificaram que o tratamento do grão de sorgo com aldeído fórmico transformava os taninos em resinas não reactivas. (O aldeído fórmico é um reagente específico do núcleo floroglucinol, e os polímeros de aldeídos com polifenóis são bem conhecidos na indústria de resinas altamente polimerizadas, tipo baquelite). *Reichert et al.*, (1980) observaram que 0,3% de formalina reduzia o tanino em 88-98% no grão de sorgo, o que poderia aumentar o seu valor nutritivo. Mas, numa experiência com ovinos, o grão de sorgo tratado com formalina não afectou a ingestão de MS e MO digestíveis, a digestibi-

lidade da MS e MO no rumen, nem a concentração de amônia no rumen, comparado com a dieta de sorgo não tratado (Pienaar e Renton, 1980). Daiber (1977 - citado por Price e Butler, 1980) preconiza a utilização do aldeído fórmico à escala industrial através da sua vaporização, e circulação dos vapores dentro do silo.

(4) Agentes que auxiliam a destoxificação metabólica - Alguns dos produtos fenólicos de hidrólise do ácido tânico são excretados como monometil-éteres, os quais poderiam provocar uma depleção de dadores de grupos metilo, como a metionina ou colina. Chang e Fuller (1964) e Fuller et al., (1967), referiram que a suplementação da dieta à base de sorgo rico em tanino com um nível de colina e metionina duplo do normal tinha eliminado a depressão no crescimento de pintos observada sem o suplemento. Contudo, tal suplementação aliviou apenas parcialmente o efeito depressivo induzido pelas dietas com ácido tânico. Os grupos metilo necessários ao processo de destoxificação poderiam ser fornecidos pela colina e metionina, induzindo uma deficiência naqueles ácidos aminados (fígado gordo) nos pintos alimentados com sorgo rico em tanino. Em contraste, Vohra et al., (1966) e Armstrong et al., (1973) não confirmaram os resultados anteriores. Connor et al., (1969) verificaram o referido efeito positivo da colina e metionina, embora sem recuperação total do efeito depressivo do ácido tânico ou tanino do sorgo. Rayudu et al., (1970b) observaram que uma mistura de arginina, ornitina e dadores de grupos metilo (metionina e colina) aliviou parcialmente a depressão no crescimento provocada pelo ácido tânico. Feathers-ton e Rogler (1975) referiram ter havido inibição completa da depressão no crescimento, em pintos alimentados com sorgo rico em tanino, por adição de metionina suplementar à dieta, tal como o observado por Armstrong et al., (1973). Estes autores, contudo, não observaram qualquer efeito da

colina suplementar. *Glick e Joslyn (1970b)* e *Featherston e Rogler (1975)* não observaram qualquer melhoria no crescimento de ratinhos quando foi adicionada metionina a dietas contendo quer ácido tânico quer sorgo rico em taninos. Pelo contrário *Sell e Rogler (1984)* observaram que a metionina aleviava o efeito depressivo do tanino do sorgo sobre galinhas poedeiras, sendo que este (ou os seus produtos de degradação) são absorvidos e activam a UDP-glucuroniltransferase hepática, enzima envolvida nos processos de destoxificação dos compostos fenólicos.

Não parece verosímil que o efeito benéfico de elevados teores proteicos em dietas contendo taninos (*Schaffert et al., 1974*; *Sell et al., 1983*; *Combs e Wallace, 1976* -citados por *Price e Butler, 1980*) se deva ao aumento em ácidos aminados doadores de metilo, ou directamente ao valor nutritivo da proteína. É mais provável que o referido efeito benéfico seja, pelo menos em parte, devido a uma remoção mais completa dos taninos solúveis ao nível do tubo digestivo, permitindo que parte da proteína não complexada seja digerida e absorvida. Além disso, como salientaram *Hagerman e Butler (1978)*, o tanino pode precipitar um peso duplo do seu de proteína, e uma baixa reacção tanino-proteína poderia tornar os complexos tanino-proteína mais acessíveis (maior solubilidade?) às enzimas digestivas. Seria interessante saber se um suplemento proteico de qualidade nutricional muito baixa provoca uma melhoria similar das rações que contêm tanino.

A ureia, conhecido agente dissociante das ligações hidrogénio (supostamente existentes nos complexos tanino-proteína), foi testada igualmente por vários autores para a sua capacidade de aliviar os efeitos deletéreos dos taninos. A sua utilização satisfaria simultaneamente parte das necessidades azotadas da microbiota do rumen. O bagaço extraído, de sementes de *Shorea robusta*, apresenta valores negativos de digestibi-

lidade da proteína bruta (Robb,1976). Rai e Sukla (1977) observaram que a adição de 10% de ureia a um concentrado proteico contendo 20% daquele bagaço não afectava a digestibilidade da fracção azotada. Sinha e Nath (1982) Observaram ,pelo contrário, que a suplementação do bagaço de sementes de *Shorea robusta* com ureia melhorava a sua palatibilidade e a digestibilidade dos nutrientes, especialmente da FB e da PB. Buckley et al., (1983) não observaram diferenças na digestibilidade da MS no rumen entre a fava rica em taninos (Diana) e a sem taninos, quando suplementadas com um excesso de ureia. No entanto a mesma quantidade de ureia não anulou o efeito deletéreo do nível mais elevado de taninos na fava Hertz. Savon et al., (1973) num ensaio para testagem da protecção da proteína com ácido tânico, numa dieta contendo elevado teor em melação e ureia, não observaram qualquer diferença significativa entre os valores de pH,  $\text{NH}_3$  e AGV no rumen dos animais alimentados com amostras tratadas e não tratadas. A suplementação com ureia, de dietas ricas em taninos, poderia melhorar a qualidade alimentar através, quer de um suprimento extra de N, quer pela sua actividade química. A ureia desestabiliza as ligações hidrogénio e as interacções hidrofóbicas (Oh,1978) que participam na formação do complexo tanino-proteína. Por isso, a utilização da ureia poderia libertar ,pelo menos em parte, a proteína do complexo, tornando-a disponível para o animal.

## SUMÁRIO E CONCLUSÕES

A elevada quantidade de taninos presente em muitas espécies vegetais limita a sua utilização como alimento tanto de monogástricos como de ruminantes. Os taninos combinam-se com as proteínas da dieta e endógenas, bem como com as enzimas e microorganismos, afectando negativamente as digestões no retículo-rumen e intestino. A complexação dos taninos com as mucoproteínas salivares, a par com os fenómenos de diarreia ou obstipação, determina uma baixa ingestão dos produtos vegetais ricos em taninos. Se os taninos hidrolizáveis parecem ser mais eficazes na depressão da ingestão, já os do tipo condensado parecem ser mais deletéreos sobre os fenómenos da digestão química.

Apesar da riqueza de informação relativa à influência dos taninos de alguns produtos e sub-produtos sobre a nutrição de aves, é ainda escassa a informação relativa aos efeitos sobre suínos e ruminantes.

O risco sofrido pelos animais que têm vários alimentos à escolha parece ser muito pequeno. Contudo, quando o alimento rico em taninos constitui a única fonte disponível, as interacções tanino-proteína criam problemas nutricionais de natureza aplicada, principalmente em situações de carência proteica na dieta.

Apesar dos progressos conseguidos nos domínios da remoção ou inactivação dos taninos das dietas, continuam por elucidar os aspectos da economia da sua aplicação prática.

A determinação do conteúdo em taninos, condensados e hidrolizáveis dos vários alimentos, tradicionais e não tradicionais, para animais; o grau em que afectam a palatabilidade e a digestão; o efeito dos níveis e qualidade da proteína alimentar sobre os efeitos deletéreos dos taninos; o estudo das interacções específicas entre as proteínas e os taninos, representam áreas que exigem maior esforço de pesquisa.

As implicações nutricionais dos monómeros fenólicos e da lenhina deveriam ser consideradas na mesma área do problema dos taninos.

## CAPÍTULO II

INTERACÇÕES ENTRE OS TANINOS E AS PROTEÍNAS



	Pág.
2. INTERACÇÕES ENTRE OS TANINOS E AS PROTEÍNAS	
2.1. Introdução . . . . .	63
2.2. Materiais e métodos . . . . .	66
2.2.1. Materiais . . . . .	66
2.2.2. Obtenção dos taninos . . . . .	66
2.2.3. Obtenção da hemoglobina . . . . .	68
2.2.4. Diazotação da gelatina . . . . .	68
2.2.5. Análise dos taninos . . . . .	70
2.2.6. Estudos turbimétricos . . . . .	72
2.2.7. Estudos colorimétricos . . . . .	73
2.2.8. Análise estatística . . . . .	74
2.3. Resultados . . . . .	75
2.3.1. Análise dos taninos . . . . .	75
2.3.2. Influência do pH sobre a formação de complexos tanino- -proteína e taninos-PEG . . . . .	80
2.3.3. Influência do pH sobre as quantidades de proteína e ta- ninos precipitados, a vários níveis iniciais de tanino. . . . .	85
2.3.4. Influência da quantidade inicial de proteína sobre a precipitação da proteína e do tanino em presença . . . . .	89
2.3.5. Inibição da formação, e dissociação dos complexos tani- no-hemoglobina pelo PEG <sub>20.000</sub> . . . . .	92
2.4. Discussão e conclusões. . . . .	93
ANEXOS . . . . .	105

## 2. INTERACÇÕES ENTRE OS TANINOS E AS PROTEÍNAS

### 2.1. Introdução

Uma das características essenciais dos taninos é a sua capacidade para formarem complexos insolúveis com as proteínas (Swain, 1965). Embora muitos autores tenham dedicado muito do seu esforço à elucidação do modo específico da interacção tanino-proteína (Gustavson, 1956; Goldstein e Swain, 1963; Loomis e Battaile, 1966; Van Sumere et al., 1975; Oh, 1978), o mesmo continua a ser objecto de controvérsia. Van Sumere et al., (1975) e Oh (1978) fizeram excelentes revisões acerca dos possíveis mecanismos da interacção tanino-proteína.

Crê-se geralmente que os taninos se ligam às proteínas através da formação de múltiplas pontes protónicas entre os agrupamentos hidroxilo fenólicos dos taninos e os agrupamentos carbonilo das proteínas (Gustavson, 1954; Goldstein e Swain, 1963). Contudo, considerando a diversidade de estruturas moleculares entre os taninos e os vários agrupamentos funcionais presentes nas proteínas, qualquer das seguintes interacções pode, em princípio, ocorrer (Loomis, 1974): ligação hidrogénio, ligação iónica, ligação hidrofóbica e ligação covalente. Este último tipo de ligação representa uma alteração irreversível que requiere oxigénio molecular e é favorecida por elevado pH ou pela presença de polifenol oxidases. Em condições de neutralidade, ou acídicas, não se verificam normalmente ligações covalentes entre os taninos e as proteínas (Oh et al., 1979), e os complexos formados em tais condições são geralmente dissociáveis por agentes ou solventes adequados (Oh et al., 1980). A presença de dadores de prótons na forma de agrupamentos hidroxílicos fenólicos nos taninos e de

aceitadores de prótons na forma de funções carbonilo das ligações peptídicas das proteínas faz supor a possibilidade de formação de pontes protônicas (ligações hidrogênio). Do mesmo modo, uma vez que ambos os grupos contêm regiões hidrofóbicas (os núcleos aromáticos dos taninos e as cadeias laterais alifáticas e aromáticas dos ácidos aminados nas proteínas), parece ser igualmente possível que estes participem nos fenômenos de interação. Embora não existam agrupamentos ionizados nos taninos condensados (*Gustavson, 1956; Haslam, 1966*), não se pode excluir a possibilidade de existência de interações iônicas nos complexos taninos hidrolizáveis-proteínas. Nos taninos hidrolizáveis os agrupamentos ionizados poderiam originar-se, particularmente nos elagitaninos, através de hidrólise parcial das ligações mais interiores na molécula (*Haslam, 1966*). No caso dos taninos condensados, este tipo de ligação não está presente em condições de pH ácido ou neutro (*Haslam, 1977*). As proantocianidinas apenas se ionizam a elevado pH, por dissociação dos agrupamentos hidroxílicos fenólicos, com formação de íons fenoxidos.

Tanto as ligações hidrogênio como as hidrofóbicas são ambos fenômenos solvente-dependentes. Assim, a ocorrência de ligações hidrogênio entre solutos é favorecida em solventes hidrofóbicos (e.g. tetracloreto de carbono) enquanto que as ligações hidrofóbicas entre solutos ocorrem primariamente em solventes polares ou hidrofílicos (e.g. água). *Oh (1978)* demonstrou inequivocamente a existência de ligações hidrofóbicas nos complexos formados entre o tanino de uva e várias proteínas, polímeros sintéticos de ácidos aminados, PVP e PEG. Recentemente, *Chibber et al., (1978)* sugeriram que os taninos no grão de sorgo se associavam predominantemente e fortemente às kafirinas, proteínas álcool-solúveis fortemente hidrofóbicas, postulando assim a interação hidrofóbica. Em condições alcalinas e aeróbicas os fenóis podem oxidar-se em quinonas, as quais reagem covalen-

temente com as proteínas e determinados ácidos aminados (lisina e metionina) (Sosulski, 1979). Os dois primeiros tipos de ligações são reversíveis e pH-dependentes (Hagerman e Butler, 1978; Oh, 1978). Em condições naturais os taninos apresentam-se livres na célula (Haslam, 1966) ou reversivelmente ligados às proteínas (Chibber et al., 1978). Contudo, se submetidos a determinados tratamentos tecnológicos os produtos ricos em fenóis, (e.g. bagaço de girassol, de cârtamo, resíduo de uva...) sofrem escurecimento não enzimático, resultante da oxidação dos fenóis, os quais se podem ligar de forma irreversível às proteínas e a determinados ácidos aminados (Haslam, 1966; Sosulski, 1979).

A complexação dos taninos com as proteínas parece ser afectada pelos tipos de proteína e tanino em presença (Hagerman e Butler, 1978; Oh, 1978), pelas concentrações relativas dos reagentes (Calderon et al., 1968; Van Buren e Robison, 1969), e pelo pH (Hagerman e Butler, 1978; Oh, 1978), entre outros factores (McLeod, 1974; Price e Butler, 1980). No tubo digestivo dos vertebrados as diferentes condições de pH, as quantidades relativas e tipos de taninos e proteínas em presença, entre outros factores, podem influenciar a formação de complexos taninos-proteínas, o destino de tais componentes no tubo digestivo, e consequentemente os efeitos mais ou menos deletéreos que os taninos podem exercer sobre o animal.

Tanto a acção ambiental (Swain, 1979) como os efeitos nutricionais (Price e Butler, 1980) dos taninos poderão ser melhor compreendidos se se conhecer a natureza das interacções taninos-proteínas e os factores que mais influenciam essas interacções (Hagerman e Butler, 1980a). No presente estudo utilizaram-se taninos de bolota e de alfarroba, representando os dois tipos de tanino existentes (hidrolizáveis e condensados, respectivamente), proteínas e enzimas digestivas, e PEG e PVP (como agentes potencialmente dissociantes dos complexos tanino-proteína) num estu-

do das interações entre os taninos e as proteínas. Os factores estudados, susceptíveis de influenciarem a complexação dos taninos com as proteínas, foram as quantidades relativas de taninos e proteínas, a natureza das proteínas, o pH e a presença de PEG.

## 2.2. Materiais e métodos

2.2.1. Materiais - A bolota utilizada foi apanhada na Herdade Experimental da Mitra, da Universidade de Évora, em percentagens de, aproximadamente, 70% de azinheira (*Quercus ilex L.*) e 30% de sobreiro (*Quercus suber L.*). A alfarroba utilizada foi alfarroba comercial, da região Algarvia, seca ao sol, tal como geralmente é comercializada. O ácido 7-amino-1,3, naftaleno dissulfónico foi adquirido à Eastman Kodak Company; o ácido tânico à Carlo Erba e os restantes produtos à BDH.

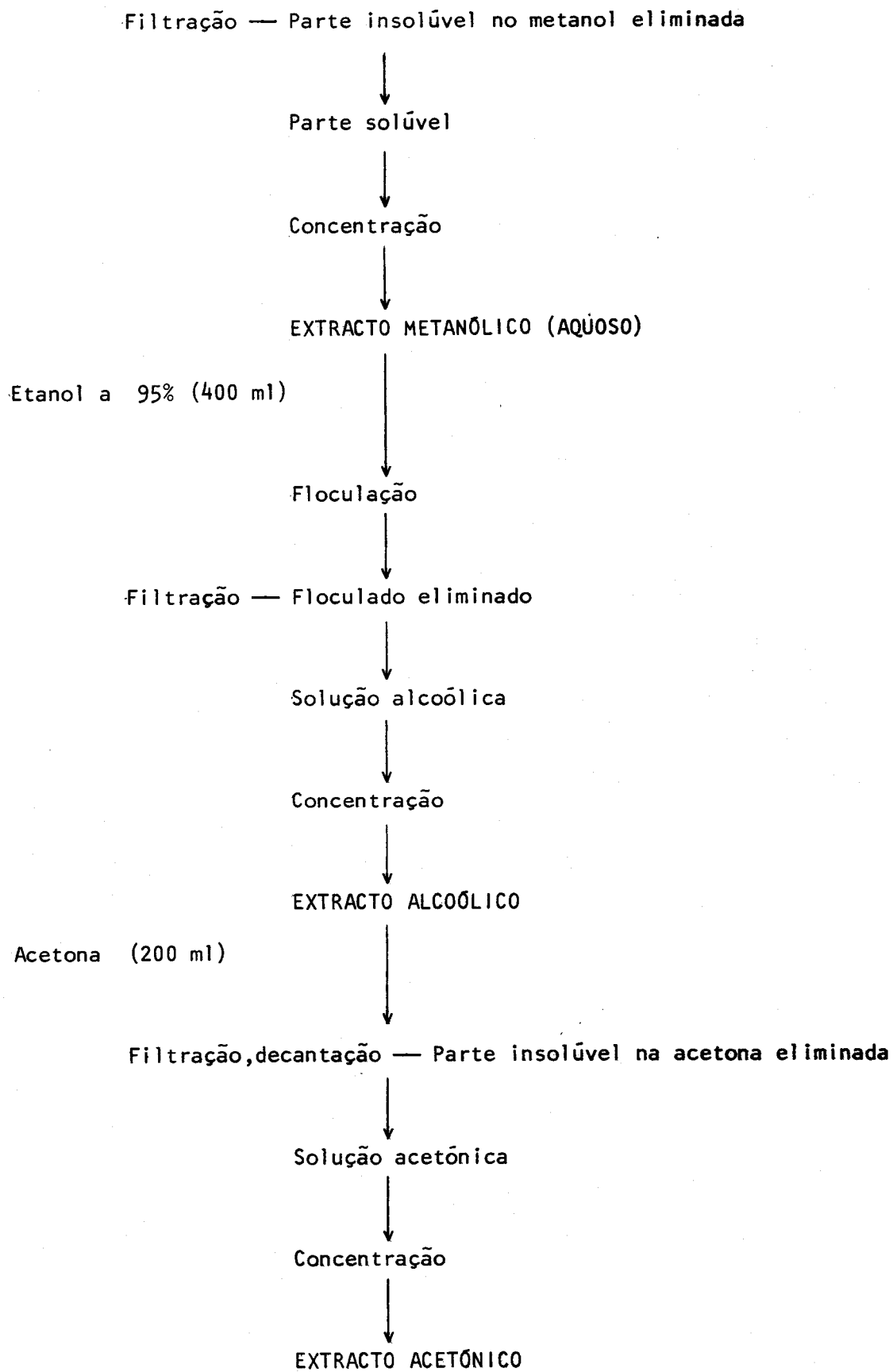
2.2.2. Obtenção dos taninos. - Para a determinação quantitativa dos taninos na bolota e alfarroba a relação material vegetal: solvente utilizada foi sempre de 1:50 (P/V) (usualmente, 200 mg de material extraídos com 10 ml de solventes, durante a noite). Antes da extração dos taninos com os solventes apropriados o material vegetal foi sujeito a extração com a mesma quantidade de éter etílico a fim de extrair o máximo de cromógenos. Os taninos semi-purificados de bolota e alfarroba foram obtidos conforme o esquema abaixo:

50 g material vegetal finamente ralado

1 litro de metanol

1 litro de água quente (90°C)





Numa fase preparatória procedeu-se a uma tentativa de levar mais além o processo de purificação: Ao extracto acetónico adicionou-se uma solução de 10% de acetato básico de chumbo. Forma-se um precipitado de tanato de chumbo. Eliminou-se o sobrenadante e adicionou-se ao precipitado 200 ml de acetona. Borbulhou-se hidrogénio sulfurado o qual precipitou sob a forma de sulfureto de chumbo negro, libertando os taninos em solução acetónica. Após filtração a solução pode ser concentrada. Estes últimos processos foram contudo eliminados já que o "Índice de taninos" observado no final não se revelou superior ao do extracto acetónico antes da adição do acetato básico de chumbo. O Índice de taninos foi medido utilizando o método turbidimétrico (ver em 2.2.5.).

2.2.3. Obtenção da hemoglobina - Para a hemanálise dos taninos utilizou-se hemoglobina bovina: Após colheita do sangue procedeu-se à sua imediata centrifugação, a 1.500xg, para separação dos glóbulos do plasma. Após eliminação do plasma sobrenadante e da camada de leucócitos, os eritrócitos foram lavados duas vezes com uma solução de NaCl a 9% em água destilada e finalmente lisados por adição de água destilada a 4°C. Após recentrifugação, para separar as membranas celulares, a solução de hemoglobina sobrenadante foi diluída com água destilada fria (4°C) até se obter a absorção desejada a 578nm (ver Hemanálise de taninos), e conservada à temperatura indicada. A solução de hemoglobina deve ser utilizada dentro de um período de 48 horas.

2.2.4. Diazotação da gelatina - O método utilizado foi basicamente o de *Riordan e Vallee (1972)* modificado por *Mahadevan et al., (1979)*. Para a diazotização da proteína utilizou-se o ácido 7-amino-1,3, naftaleno dissulfónico: A amina (200 mmoles) foi dissolvida em 1,5 litros

de HCl 0,15N e arrefecida em banho de gelo com agitação permanente. Adicionou-se seguidamente 200 ml de uma solução de nitrito de sódio a 100mg. ml<sup>-1</sup> previamente arrefecida em banho de gelo. A adição do nitrito de sódio fez-se gota a gota, durante um período de aproximadamente 45 minutos, mantendo o sistema em banho de gelo e com agitação permanente. Dado que o reagente diazo é instável em meio ácido, o pH da solução foi imediatamente acertado a 5,40 (5,0 - 5,5) com NaOH 3N. O volume final foi ajustado a 2,5 litros com água gelada. A solução de sal diazonio foi imediatamente utilizada para a marcação de 50 g de gelatina. A proteína foi dissolvida em 800 ml de tampão bicarbonato de sódio 0,5 M, pH 8,8. A solução de proteína foi previamente refrigerada em banho de gelo antes da adição, em pequenas quantidades, sob agitação constante, da solução do sal diazonio. A adição processou-se lentamente de forma a estar completa ao fim de 45 minutos. A mistura foi conservada durante mais 30 minutos, sempre sob agitação e em banho de gelo, ao fim dos quais se adicionou 200 mmoles de solução de fenol em água, à concentração de 0,1M, a fim de remover o excesso de composto diazonio que não tenha reagido com a proteína. Para reacção completa, 1g de proteína necessita 3g de composto diazonio. Seguidamente a solução foi acidificada com ácido clorídrico 1N até se dar a precipitação da proteína conjugada, a qual foi então recuperada por filtração através de papel de filtro Whatman nº1, com auxílio de um funil de Buchner. Depois de redissolvida em tampão bicarbonato de sódio (0,5M), a proteína foi reprecipitada por adição de etanol, até à concentração de 80% (V/V), e ácido clorídrico até se atingir um grau de acidez suficiente para precipitar a proteína (pH 3,5 - 4,0). Este processo foi repetido 3 vezes. Finalmente a proteína conjugada foi lavada duas vezes com água bidestilada e seguidamente com éter. O produto, de cor vermelho-alaranjada, foi seguidamente desidratado sob baixa pressão (14 mm Hg) a



40°C, após se ter evaporado o éter. A proteína assim modificada apresentou 12,7% de N (método de Kjeldahl, AOAC 1970), e um coeficiente de extinção ( $E_{460}^{1\%}$  em OHNa 0,1N) de 12. As soluções de azoproteínas obedecem à lei de Beer.

2.2.5. Análise dos taninos. - Dado que os resultados das análises de taninos são susceptíveis de variar consoante a técnica utilizada (Price e Butler, 1977; Bullard et al., 1981) os taninos foram analisados por 5 diferentes técnicas. O material vegetal, moído através do crivo de 0,8 mm, foi extraído como indicado em 2.2.2.

Método da vanilina. O reagente vanilina foi preparado diariamente misturando volumes iguais de vanilina a 1% em metanol e HCl concentrado diluído a 8% em metanol. A 1 ml de extracto vegetal adicionou-se 5 ml de reagente vanilina. O ensaio a branco foi constituído por 1 ml de extracto vegetal e 5 ml de HCl concentrado, diluído a 4% de metanol. Após a adição do reagente vanilina (ou do HCl a 4%) os tubos foram conservados em banho de água a 30°C, protegidos da luz com um pano negro. Ao fim de 20 minutos após a adição do reagente a ABS a 578nm foi lida em espectrofotómetro Beckman, modelo 35. A leitura do branco é subtraída da amostra com vanilina. Diariamente foi preparada uma curva padrão utilizando concentrações de catequina até 0,3 mg.ml<sup>-1</sup> (Price et al., 1978a).

Método do Azul da Prússia. O método utilizado foi o de Price e Butler (1977), tal como modificado por Budini et al., (1980): A 3 ml de extracto diluído, em tubo de ensaio, adicionou-se 200 µl de K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 0,008M, seguidos imediatamente de 200 µl de FeCl<sub>3</sub>, 0,1M. Ambos os solutos foram dissolvidos em HCl 0,1M. Após exactamente 5 minutos à temperatura ambiente a densidade óptica foi lida a 700 nm, num espectrofotómetro, Beckman, mod. 35. Em todas as leituras foram utilizados ensaios em

branco de idêntica composição em que se omitiram os extractos.

Técnica da precipitação da hemoglobina (hemanálise). As soluções de hemoglobina foram preparadas conforme o descrito em 2.2.3. Em cada determinação utilizaram-se extractos acetônicos dos materiais vegetais, e o ácido tânico utilizado como padrão foi dissolvido no mesmo solvente. O processo analítico baseou-se no método de *Bate-Smith* (1973; 1977) para caracterizar a adstringência relativa dos taninos, o qual foi modificado para se adaptar a uma determinação quantitativa: A 3 ml de solução de hemoglobina (diluída com água destilada para dar uma absorvância de  $\pm 1,000$  a 578 nm), em tubo de centrífuga, adicionou-se 1 ml de cada um dos padrões ou de extracto a ser analisado. Durante a adição da solução de tanino manteve-se o conteúdo do tubo em forte agitação (agitador vortex) a fim de evitar a formação precoce de precipitados volumosos, susceptíveis de dificultarem a ulterior formação de complexos (*Bate-Smith*, 1973). Após repouso durante 15 minutos, em banho de água a 39°C, os tubos foram centrifugados a 3 500xg durante 30 minutos. O sobrenadante foi recolhido e a sua absorvância determinada a 578 nm num espectrofotômetro Beckman, modelo 35. Os resultados são expressos em equivalentes de ácido tânico.

Técnica da precipitação da proteína. Utilizámos uma modificação do método descrito por *Hagerman e Butler* (1978). Alíquotas dos extractos (geralmente 0,1 a 0,5 ml) foram adicionadas a 2,0 ml de solução de gelatina, a 1,0 mg.ml<sup>-1</sup> em tampão acetato 0,18 M, pH 4,8 (contendo 0,17 M NaCl), contidos em tubos de centrífuga de 15 ml de capacidade. Após agitação (agitador vortex), as soluções ficaram em repouso durante 15 minutos em banho de água a 39°C. Após centrifugação durante 30 minutos (3.500xg) os sobrenadantes foram eliminados. Os precipitados foram seguidamente resuspensores em 4 ml de metanol absoluto, com auxílio de um agitador vortex, reprecipitados, e os sobrenadantes eliminados. Os precipi-

tados foram dissolvidos em 4 ml de solução de dodecil-sulfato de sódio (1%, em água destilada). Após diluição adequada os taninos precipitados com as proteínas foram medidos pelo método do Azul da Prússia. Os resultados foram expressos como equivalentes de ácido tânico através da utilização de curvas padrão preparadas diariamente para as condições usadas nas análises.

Método turbidimétrico. Em ensaios preliminares verificou-se que ao adicionar tanino a uma solução de albumina ovo se produzia uma turvação, a qual era proporcional à quantidade de tanino adicionada: A 3 ml de solução da proteína em tampão acetato 0,20M, pH 4,8 contendo 0,17M de NaCl adicionou-se 1 ml de extracto vegetal diluído, ou de cada um dos padrões de ácido tânico utilizado para traçado de uma curva de calibração. Ao fim de 5 minutos, a 39°C, a mistura foi vigorosamente agitada em agitador vortex e o grau de turvação lido a 450 nm. Utilizaram-se extractos acetônicos (70% acetona, 30% água) de bolota, alfarroba e resíduo de uva e o ácido tânico utilizado como padrão foi diluído igualmente em acetona a 70% (V/V). Em cada determinação fizeram-se leituras de brancos em que a solução de proteína foi substituída por tampão acetato 0,20M (pH 4,8), contendo 0,17M de NaCl. A acetona, nas concentrações utilizadas, não interfere no desenvolvimento da formação de complexos tanino-proteína. Os extractos vegetais foram usualmente diluídos a 1 → 5 (bolota) e 1 → 2,5 (alfarroba), tendo o extracto de resíduo de uva sido utilizado sem qualquer diluição.

2.2.6. Estudos turbidimétricos. - As influências do pH, dos níveis de taninos, da natureza das proteínas, e do PEG sobre a formação de complexos tanino-proteína foram estudadas medindo o aumento na turvação produzida, num espectrofotômetro Beckman (modelo 35), a 450 nm. As determina-

ções turbidimétricas foram executadas segundo o método de *Armstrong* (1976) modificado: a 3 ml de solução de proteína ou PEG, (a  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) adicionou-se 1 ml de solução de tanino (a  $1,0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  para as proteínas e a  $2,0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  para o PEG). Ambos os substratos foram dissolvidos em soluções tampão com pH adequado (ver adiante), contendo  $0,17 \text{ M NaCl}$ . Durante a adição da solução de tanino o tubo contendo a solução de proteína, ou PEG, foi mantido sob agitação vigorosa (com o auxílio de um agitador de vortex) a fim de evitar a formação precoce de grumos de grande dimensão, de difícil desagregação e dispersão, susceptíveis de dificultarem as leituras. Ao fim de 5 minutos em banho de água a  $39^{\circ}\text{C}$  o conteúdo foi novamente agitado durante 15 s, transferido para célula de espectrofotômetro com 1 cm de percurso óptico e o grau de turvação desenvolvida medido a 450 nm. Após a adição do tanino desenvolve-se a turvação do meio, a qual aumenta rapidamente até aos 5 minutos, estabilizando até aos 7-8 minutos. A partir desse lapso de tempo a agregação dos complexos tende a formar flocos de grandes dimensões de difícil desagregação mesmo com forte agitação.

As concentrações e relações de concentrações (P/P) foram escolhidas por forma a assegurar uma gama conveniente de leituras de turvação.

Os diferentes valores de pH foram obtidos através da utilização de soluções tampão contendo acetato de sódio ( $0,2 \text{ M}$ ) ajustadas aos diferentes valores com hidróxido de sódio ou ácido clorídrico.

**2.2.7. Estudos colorimétricos.** - A fim de quantificar a quantidade de proteína precipitada, em função do valor de pH e da quantidade de tanino em presença, utilizou-se uma proteína diazotada (tornada corada artificialmente) a fim de facilitar a sua quantificação.

Básicamente, a 5 ml de solução de proteína diazotada, a

0,5 mg.ml<sup>-1</sup>, adicionou-se 5 ml de solução de tanino à concentração desejada. Ao fim de 15 minutos, em banho de água a 39°C, a mistura foi centrifugada e a proteína não precipitada foi determinada no sobrenadante. A quantidade de proteína precipitada foi calculada como sendo a diferença entre a quantidade de proteína inicialmente presente (5 ml de solução de proteína a 0,5 mg.ml<sup>-1</sup>) e a que permaneceu em solução após incubação com o tanino. As quantificações foram realizadas com auxílio de uma curva padrão de caseína diazotada.

2.2.8. Análise estatística. - Para a testagem estatística dos dados da influência dos factores pH e níveis de tanino, tanto nos estudos turbidimétricos como nos colorimétricos, dada a não monotonia das respostas observadas, efectuaram-se comparações parciais após teste de conjunto significativo (quer dizer, consideraram-se aqueles factores como qualitativos e não quantitativos). Assim, a análise foi efectuada para vários critérios de classificação. Os dados observados para as acções do ácido tânico sobre a gelatina ou PEG foram sujeitos a análise de regressão, linear e curvilínea, com e sem transformação logarítmica dos resultados. Para as respostas dicotômicas observadas não se tentou nenhum tipo de transformação dos valores das variáveis dependentes (Hicks, 1982).

## 2.3. Resultados

2.3.1. Análise dos taninos. - A fim de seleccionar o solvente mais adequado à extracção dos taninos, procedeu-se à extracção (durante 3 horas) de 200 mg de material vegetal com éter etílico, seguida de extracção, durante a noite, com vários solventes, nomeadamente água quente, metanol e acetona a 70% (V/V) em água. Dado que ao nível do tubo digestivo dos ruminantes as condições de pH podem influenciar a solubilização dos taninos e a sua reactividade em relação às proteínas, procedeu-se, igualmente à extracção com solução tampão ruminal (ver composição no Cap.IV, pág. 164 ), e com HCl diluído (pH 1,8), contendo 0,17M de NaCl.

No quadro 2.1. são apresentados os resultados da análise dos taninos extraíveis, em 12 horas, com diferentes solventes.

Quadro 2.1. Níveis de taninos extraíveis da bolota e alfarroba com diferentes solventes, e analisados por três métodos diferentes. (B=bolota; A=Alfarroba)

SOLVENTES	Pro- duto	Taninos (% MS) <sup>b)</sup>		
		Método de análise		
		Azul da Prússia	Hemanálise	Turbidimétrico
Água a 90°C	B	3,10 ± 0,11	1,60 ± 0,43	1,25 ± 0,34
	A	1,60 ± 0,08	2,04 ± 0,47	1,20 ± 0,40
Metanol	B	2,76 ± 0,19	2,44 ± 0,33	2,70 ± 0,39
	A	1,40 ± 0,10	2,76 ± 0,26	1,80 ± 0,35
Acetona 70% (V/V)	B	4,06 ± 0,20	4,14 ± 0,19	3,30 ± 0,20
	A	4,33 ± 0,14	3,78 ± 0,26	2,80 ± 0,23
Solução tampão ruminal	B	1,43 ± 0,09	a)	a)
	A	0,47 ± 0,10		
HCl (pH 1,8)	B	3,10 ± 0,16	2,90 ± 0,25	2,70 ± 0,19
	A	1,60 ± 0,12	1,00 ± 0,31	1,10 ± 0,24

a)- A intensa coloração desenvolvida pelos taninos na saliva sintética impediram estas determinações.

b)- Determinações em 3 amostras diferentes e resultados expressos sob a forma dos valores médios  $\pm t.s./\sqrt{n}$ , em que t=t estudantizado ( $\alpha=0,05$ ), s=desvio padrão e n=número de determinações.

A acetona a 70% extraiu mais material oxidável (Azul da Prússia) que quaisquer dos outros solventes, tanto da bolota como da alfarroba, bem como mais material complexável com as proteínas (Hemanálise; Turbidimetria). A quantidade de material oxidável, extraída pela saliva sintética foi pequena, para ambos os materiais. Tanto o metanol como a água quente, a saliva sintética e o ácido clorídrico diluído, extraíram mais material analisável (por quaisquer dos métodos utilizados) da bolota que da alfarroba.

No quadro 2.2. são apresentados os resultados das análises dos taninos de bolota e alfarroba.

Quadro 2.2. Níveis de taninos de bolota e alfarroba, extraíveis com acetona a 70% (V/V), analisados por 5 diferentes técnicas.

Produto	Taninos (% MS) <sup>b)</sup>				
	Método de análise				
	Vanilina <sup>c)</sup>	Azul da Prússia <sup>d)</sup>	Hemanálise <sup>d)</sup>	Precipitação da proteína <sup>d)</sup>	Turbidimétrico <sup>d)</sup>
Bolota a)	0,54±0,09	4,48±0,22	4,14±0,37	4,03±0,27	3,3±0,31
Alfarroba a)	3,7 ±0,10	4,33±0,18	3,27±0,31	4,14±0,23	2,8±0,27

a)- Material ralado com ralador de cozinha (fruto inteiro)

b)- Determinações em 5 amostras diferentes e resultados expressos sob a forma dos valores médios  $\pm t.s./\sqrt{n}$ , em que  $t=t$  estudantizado ( $\alpha=0,05$ ),  $s$ =desvio padrão e  $n$ =número de determinações.

c)- Valores expressos em equivalentes catequina.

d)- Valores expressos em equivalentes ácido tânico.

Os valores observados foram diferentes consoante os métodos utilizados. Os valores mais elevados foram obtidos com o método de oxidação

- redução (Azul da Prússia) e os mais baixos com o método turbidimétrico. Exceptuando o método da vanilina os restantes concordam qualitativamente. Todos eles forneceram valores superiores para a bolota. No entanto, uma comparação quantitativa revela diferenças entre os vários métodos, para a bolota e alfarroba. O método do Azul da Prússia, por exemplo, forneceu valores 1,08 e 1,32 vezes superiores aos da Hemanálise para a bolota e alfarroba, respectivamente. No entanto a Hemanálise forneceu valores 1,25 vezes superiores ao método turbidimétrico para a bolota, e apenas 1,18 vezes superiores para a alfarroba. O método da precipitação da proteína deu valores apenas ligeiramente inferiores aos do Azul da Prússia.

Nas figuras A 2.1. e A 2.2. Representam-se curvas padrão determinadas no decurso das análises, e utilizadas para a quantificação dos taninos nos extractos acetónicos.

Quadro 2.3. Equações de regressão possíveis para as curvas representadas na figura 2.1.

Quantidade de gelatina (mg)	Equações de regressão (Y=ABS, 450nm; X=mg de ácido tânico)	Gama de concentrações utilizada (mg ác.tânico)	r	Sy.x	Valor de F da regressão
15	$Y = -0,457 + 2,819X$	0,3-0,8	0,999	0,089	277
	$Y = -0,506 + 3,025X - 0,186X^2$	0,3-0,8	0,999	0,029	803
	$Y = 2,027 - 1,431(-1LN X)$	0,3-0,8	0,990	0,081	207
9	$Y = 0,142 + 2,248X$	0,3-1,0	0,993	0,077	510
	$Y = -0,609 + 4,830X - 2,062X^2$	0,2-1,0	0,994	0,085	236
	$Y = 2,179 - 1,232(-1LN X)$	0,2-1,0	0,998	0,042	1 964
6	$Y = 0,343 + 1,691X$	0,3-0,8	0,990		
	$Y = 0,0138 + 3,000X - 1,174X^2$	0,3-1,0	0,999	0,017	1 654
	$Y = 1,856 - 0,906(-1LN X)$	0,2-1,0	0,999	0,018	5 341
	$Y = 1,846 - 0,879(-1LN X)$	0,3-1,0	0,999	0,008	14 675
3	$Y = 0,295 + 1,055X$	0,2-0,8	0,979	0,053	113
	$Y = 0,073 + 2,105X - 1,045X^2$	0,2-1,0	0,996	0,027	282
	$Y = 1,199 - 0,479(-1LN X)$	0,1-0,8	0,999	0,015	3 532
	$Y = 1,180 - 0,460(-1LN X)$	0,1-1,0	0,998	0,025	1 547
1,5	$Y = 0,097 + 0,991X$	0,1-0,8	0,989	0,030	192
	$Y = 0,008 + 1,669X - 0,977X^2$	0,1-0,8	0,998	0,014	602
	$Y = 0,773 - 0,275(-1LN X)$	0,1-0,8	0,994	0,022	531



Para avaliação das concentrações óptimas de proteína, no método turbidimétrico, para a análise quantitativa dos taninos, estudaram-se as relações entre a turvação desenvolvida pelo meio reagente pela adição de várias quantidades de tanino a quantidades variáveis de proteína. O volume total da mistura foi sempre de 4 ml (3 ml de solução de proteína + 1 ml de solução de tanino, ambos dissolvidos em tampão acetato 0,2 M contendo 0,17 M NaCl). Na figura 2.1. representam-se as diversas curvas de resposta (Quadro A 2.1.) e no quadro 2.3. as possíveis equações das mesmas.

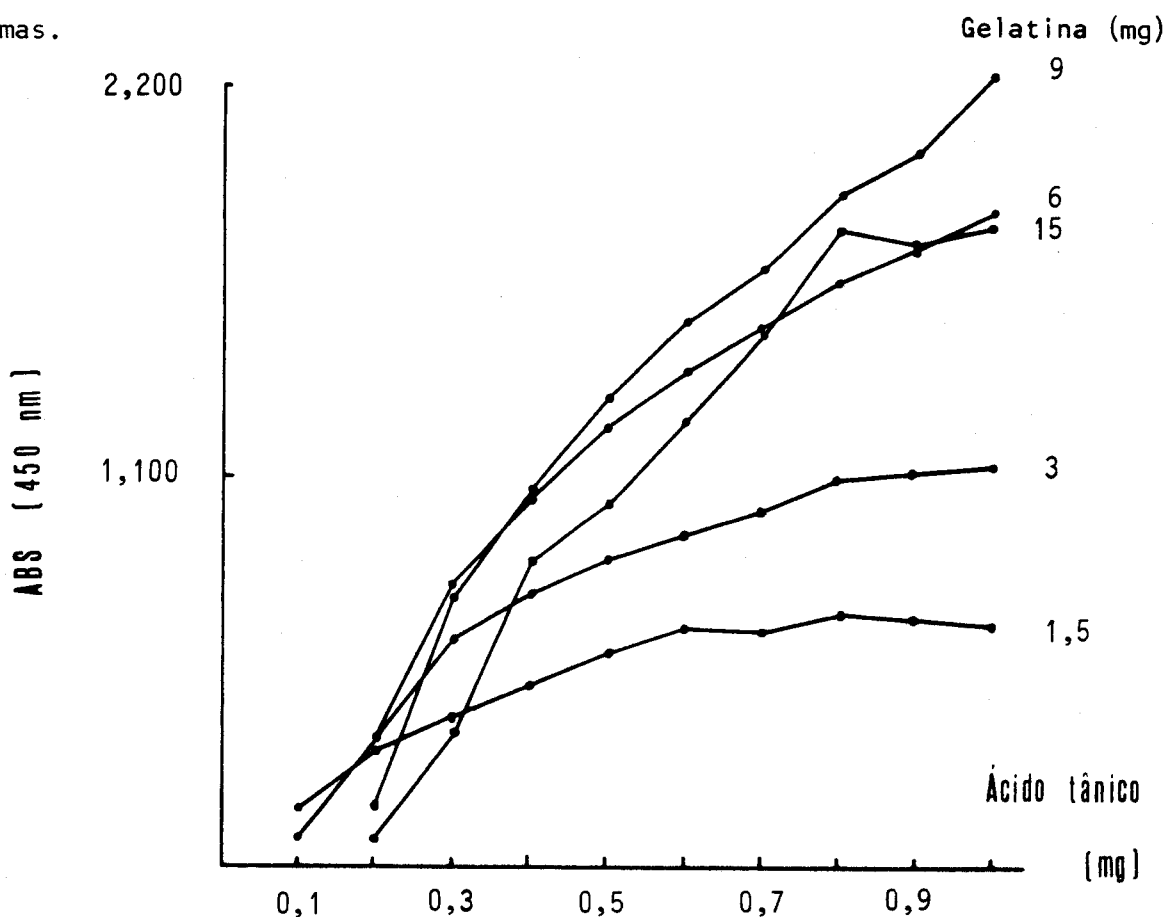


Fig.2.1. Formação de complexos entre a gelatina e o ácido tânico (leitura, a 450 nm, da turvação desenvolvida) (Quadro A 2.1.).

Com concentrações iniciais elevadas de proteína a resolução é menor, sendo apenas possível detectar concentrações de taninos acima de  $300 \mu\text{g. ml}^{-1}$ . Com concentrações iniciais de proteína mais baixas o método permite

detectar concentrações de taninos a partir de  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ , embora os intervalos de concentrações mensuráveis sejam mais estreitos. Com um excesso de proteína (15 mg) verificou-se uma relação linear entre a turvação desenvolvida e a quantidade de tanino adicionada. No entanto, com quantidades inferiores de proteína uma componente quadrática foi sempre aparente. Observou-se sempre um rápido aumento na turvação, a baixas concentrações de tanino e acima de um determinado limiar, a partir do qual os incrementos no grau de turvação foram decrescendo.

Num esforço para melhorar a técnica turbidimétrica, por forma a encontrar uma curva padrão linear, as concentrações de taninos foram expressas em base logarítmica, omitindo a concentração zero. Não se observaram efeitos quadráticos significativos para as várias combinações de concentração de proteína e valores absolutos dos logaritmos das concentrações de taninos. A transformação logarítmica permite medições de maior confiança quando se utilizam valores baixos e altos de concentração de taninos, na medida em que os coeficientes de regressão das curvas padrão construídas com valores não transformados decrescem continuamente, deteriorando-se logicamente a resolução à medida que aumenta a turvação. Por transformação logarítmica a resposta é linear e a natureza quadrática da curva padrão não transformada é acomodada. Com 3mg de proteína conseguiu-se uma boa resolução, e intervalos de leitura adequados às concentrações de taninos nos extractos acetónicos de bolota e alfarroba (Fig. A 2.2.).

A adição de quantidades crescentes de proteína, à mesma quantidade de tanino, permite o traçado de uma curva de titulação do tanino pela proteína (Fig. 2.2.). Também neste caso a curva obtida é convenientemente descrita por uma equação de grau 2, para valores de proteína compreendidos entre 0,6 e 9 mg e para 1 mg de tanino. A derivada da equação  $Y=0,039+0,425X-0,020X^2$  fornece um valor de 10,6, quantidade máxima de proteína que aparentemente se complexa com 1 g de tanino.

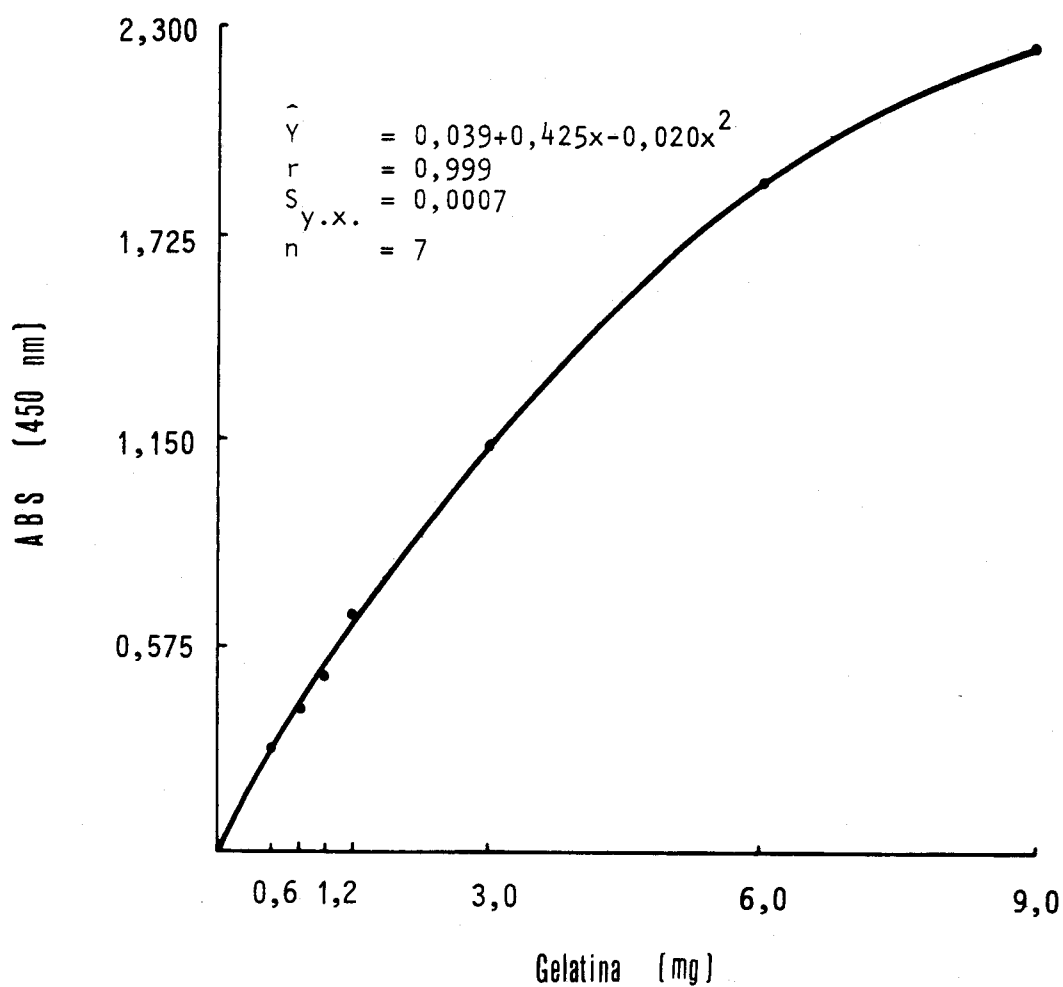


Fig.2.2. Titulação do ácido tânico (1mg) pela gelatina (Quadro A 2.1.).

Este valor é muito semelhante aos 11 g de proteína que *Hagerman e Butler (1980a)* verificaram complexar-se com 1 g de ácido tânico. Devido à pouca quantidade de taninos de bolota e alfarroba disponíveis para os ensaios não se procedeu à sua titulação com a gelatina.

2.3.2. Influência do pH sobre a formação de complexos tanino-proteínas e tanino-PEG. - A adição de tanino a uma solução de proteína resultou sempre na rápida formação de complexos insolúveis, com o conseqüente aumento na turvação mensurável. O grau de turvação foi proporcional, dentro de certos limites, à quantidade de tanino adicionada (Quadro A 2.2.), e foi

considerado como sendo igualmente proporcional à extensão da formação de complexos tanino-proteína (Fig. 2.3., a e b) (Quadro A 2.2.).

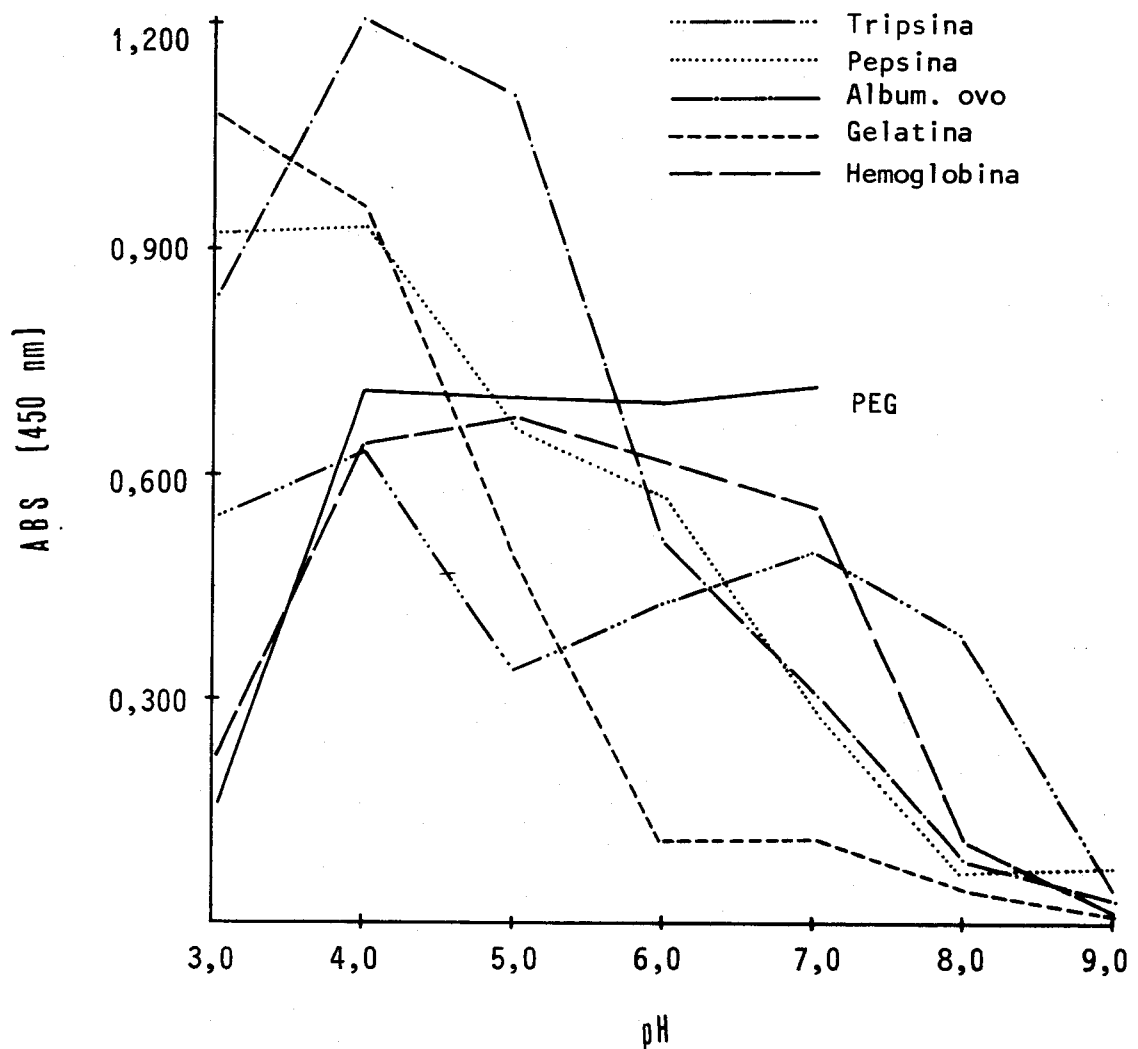


Fig. 2.3.(a) Influência do pH sobre a formação de complexos insolúveis entre os taninos de bolor e várias proteínas e PEG. (Quadro A2.2)

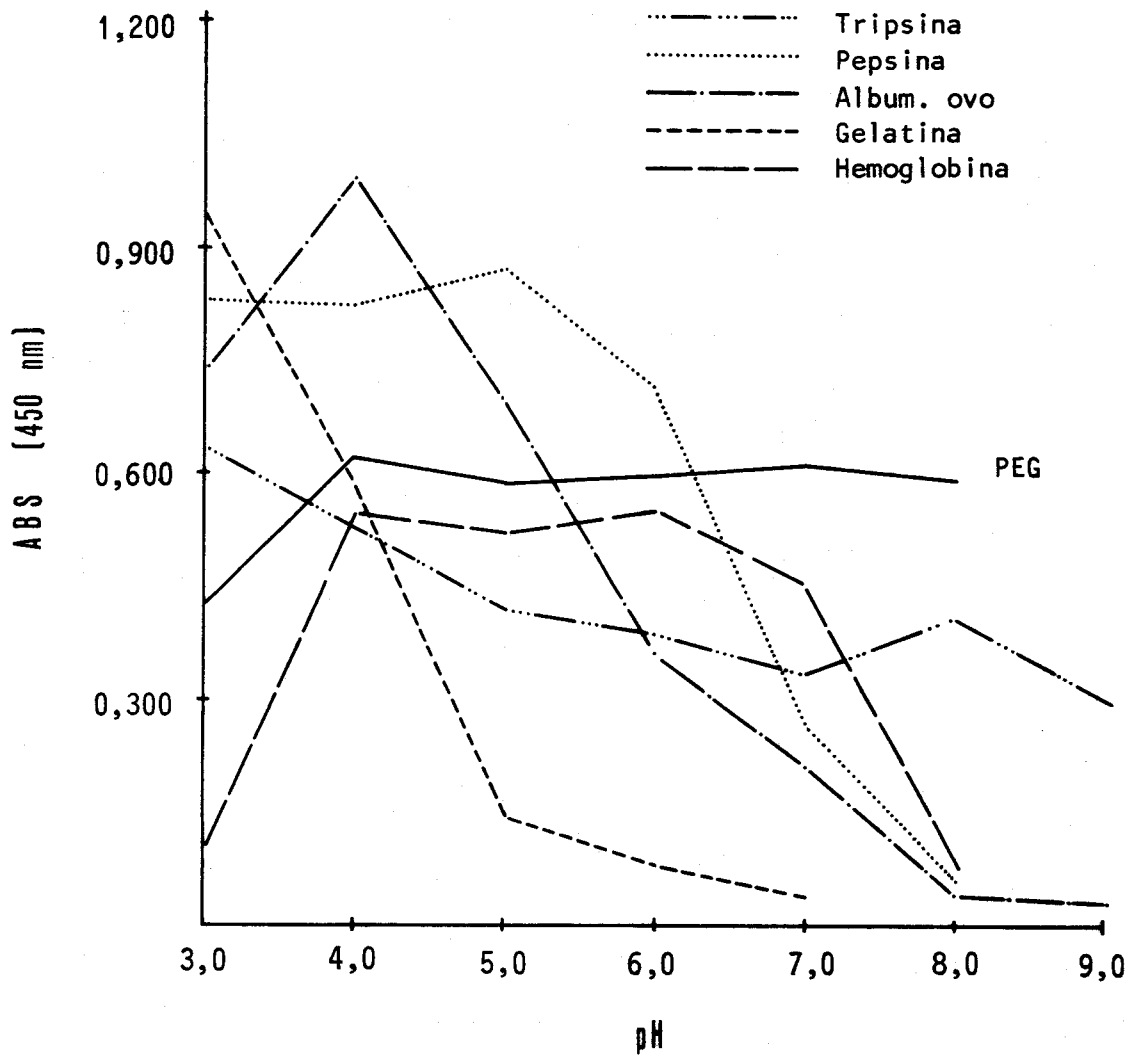


Fig. 2.3.(b) Influência do pH sobre a formação de complexos insolúveis entre os taninos de alfarroba e várias proteínas e PEG (Quadro A 2.2.).

Quadro 2.4. Valores de pH a partir dos quais se observou uma diminuição acentuada na formação de complexos (ABS 450 nm).

Proteína	pI <sup>a)</sup>	TIPO DE TANINO	
		Bolota	Alfarroba
α-Amilase		-	7,00
Albumina ovo	4,6	5,00	4,00
Gelatina	4,9	4,00	3,00
Hemoglobina	6,8	7,00	7,00
Pepsina	1,0	4,00	5,00
Tripsina	10,1	8,00	-

a) - PI = Ponto Isoelectrico da Proteína

Globalmente, observou-se uma turvação acentuada a pH 4 - 6, e fraca turvação a níveis mais elevados de pH. Acima de pH 7,0 a turvação aumentou, mas devida apenas à oxidação dos taninos com formação de pigmentos avermelhados e acastanhados, observados nos testemunhas que continham apenas tanino. O valor dos brancos foi subtraído da turvação medida. De um modo global verificou-se que o grau de turvação diminuiu abruptamente acima de certos valores de pH (Quadro 2.4.), variáveis para cada tipo de proteína, embora pouca variação tenha sido observada entre os taninos de bolota e de alfarroba.

Os valores de pH acima dos quais se observou uma acentuada diminuição da turvação foram próximos dos pontos isoelectricos das proteínas (Quadro 2.4.). Com a tripsina e tanino de alfarroba observou-se uma diminuição pouco acentuada, mas constante, no grau de turvação desenvolvido. Mesmo a pH 8,0 a turvação era ainda acentuada (Quadro A 2.2.).

Aparentemente, a formação de complexos tanino-proteína insolúveis decresceu a partir de valores mais ácidos para o tanino de bolota e albumina ovo e gelatina, e de valores menos ácidos ou mais alcalinos para o tanino de alfarroba e pepsina e tripsina. Não se observaram diferenças para ambos os tipos de taninos e a hemoglobina.

Com o PEG a formação de complexos insolúveis foi quase independente do pH, tanto com o tanino de bolota como com o de alfarroba, para valores de pH compreendidos entre 4 e 7 (bolota) e 4 e 8 (alfarroba). No entanto houve um acréscimo acentuado na turvação entre valores de pH 3,0 e 4,0, tendo tal incremento sido mais acentuado com tanino de bolota. Tal como o verificado com a proteína, (Fig. 2.1.), também o grau de turvação desenvolvido (Formação de complexos insolúveis) pelo PEG na presença do tanino dependeu da quantidade de tanino presente (Fig. 2.4.). A tur-

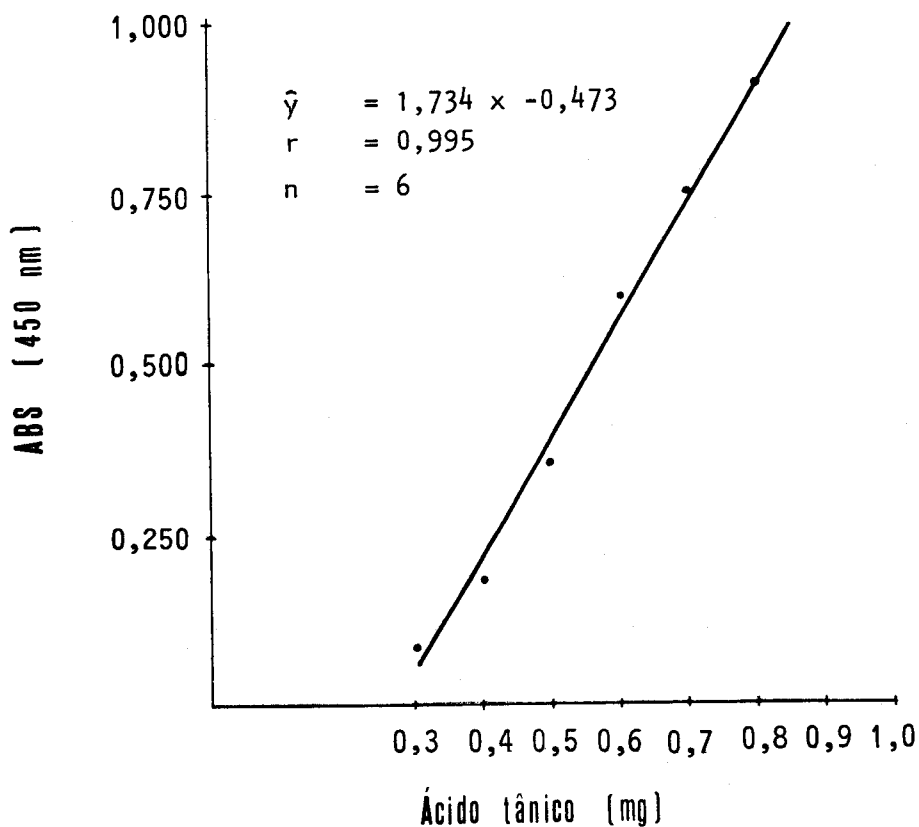


Fig. 2.4. Formação de complexos insolúveis entre o PEG<sub>20.000</sub> e o ácido tânico (Quadro A 2.3.).

vação mais elevada foi observada com uma relação PEG: ácido tânico de aproximadamente 2,5 (Quadro A 2.3.). No entanto, fazendo reagir várias quantidades de PEG com várias quantidades de tanino de bolota, observou-se um máximo de turvação com relações PEG: tanino de aproximadamente 1 (Fig. 2.5.; Quadro A 2.4.).

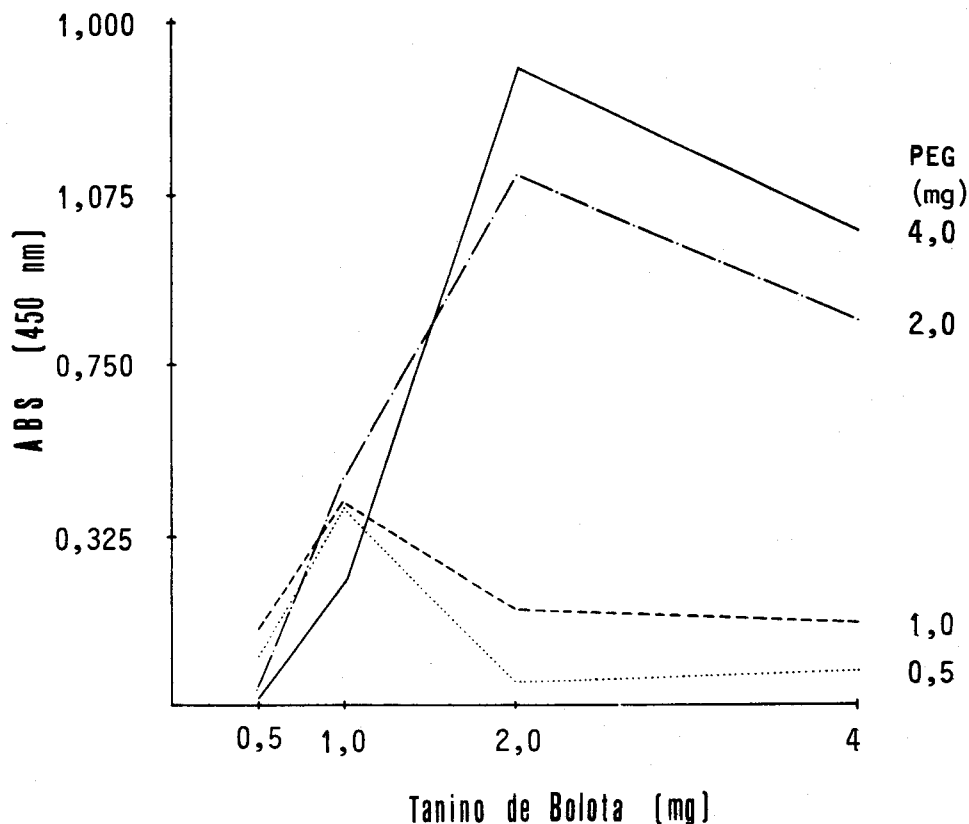
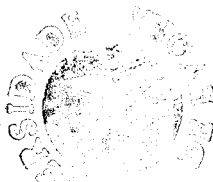


Fig. 2.5. Formação de complexos insolúveis entre o tanino de bolota e o PEG<sub>20.000</sub> (Quadro A 2.4.).

2.3.3. Influência do pH sobre as quantidades de proteína e taninos precipitados, a vários níveis iniciais de tanino.- Nas figuras 2.6. representam-se as quantidades de gelatina (a) e taninos (b) precipitados a vários níveis iniciais de tanino, em função do pH (Quadro A 2.5.). A pH 6,0 foi removida quase toda a gelatina da solução quando o tanino de bolota atingiu 5 mg (relação T:P=2) enquanto que a pH 3,0 somente 33% da gelatina foi precipitada. Mesmo com 20 mg de tanino (relação T:P=8) apenas 52% da proteína foi precipitada àquele valor de pH. A percentagem de





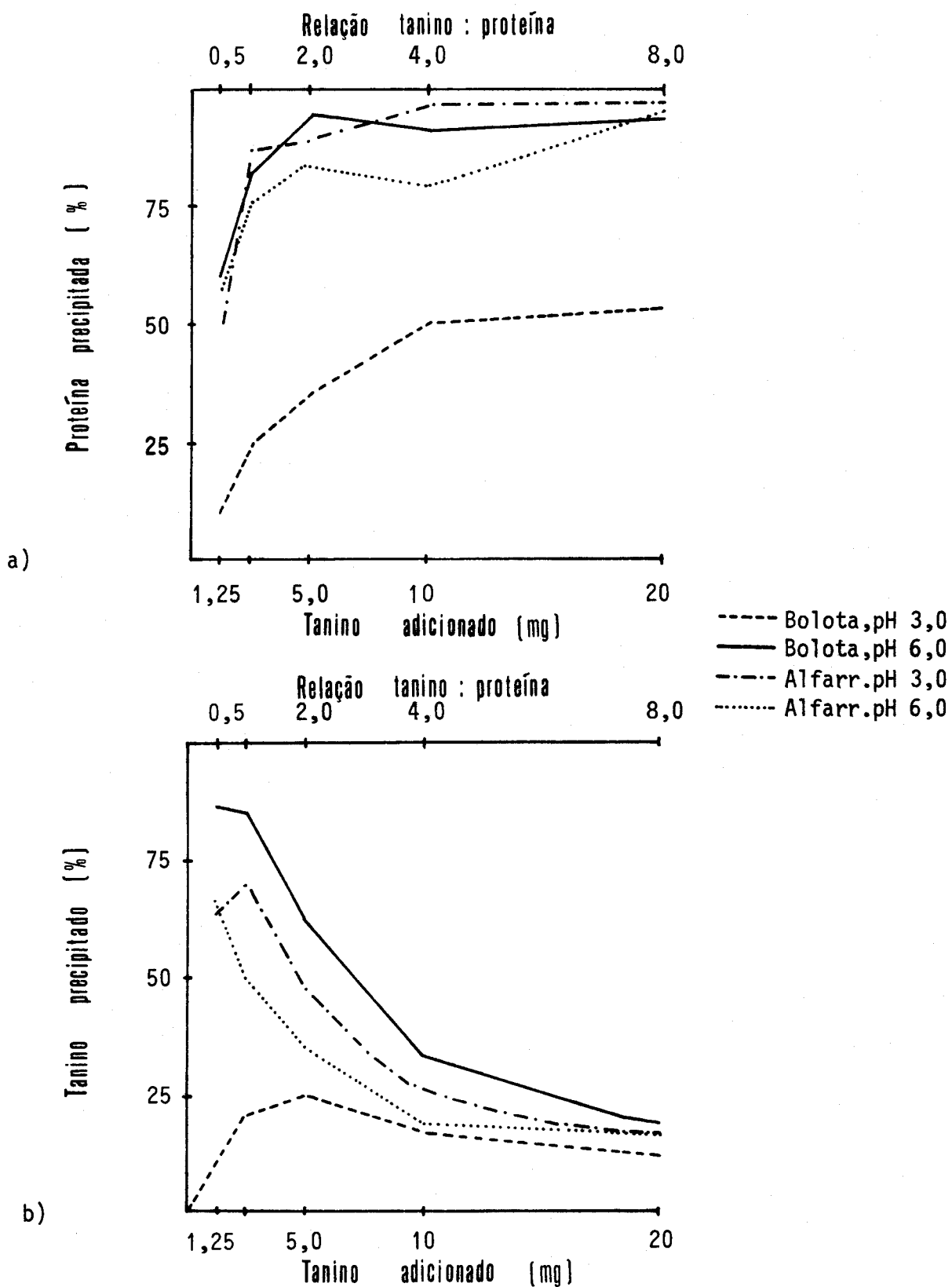


Fig. 2.6. Gelatina (a) e taninos (b) precipitados a vários níveis iniciais de taninos de bolota ou alfarroba. (Quadro A 2.5.)

proteína precipitada pelo tanino de alfarroba foi menos afectada pelo pH, embora para as relações tanino-proteína mais elevadas se tenha precipitado mais gelatina, a pH 3,0.

A percentagem de tanino de bolota precipitado a pH 6,0 diminuiu à medida que se aumentou a quantidade adicionada. Contudo, a pH 3,0 a quantidade precipitada aumentou até uma relação tanino:proteína 2, tendo diminuído para valores superiores.

A pH 6,0 à medida que se aumentou o nível de tanino, diminuiu a percentagem de tanino precipitado, tanto da bolota como da alfarroba. A pH 3,0 essa percentagem aumentou até certo ponto (T:P= 1,0 e 2,0 para o de alfarroba e de bolota, respectivamente).

A pH 6,0 precipitou a maior parte da gelatina quando a relação T:P atingiu o valor 2,0. Quando essa relação foi de 8,0 a precipitação foi completa.

Quando se baixou o pH precipitou mais tanino de alfarroba que de bolota. Quando se elevou o pH precipitou mais tanino de bolota. Para níveis comparáveis de taninos verificou-se maior quantidade de tanino de bolota precipitado a pH 6,0 e maior quantidade de tanino de alfarroba precipitado a pH 3,0.

O tanino de bolota precipitou mais gelatina a pH 6,0 que a pH 3,0, mas o tanino de alfarroba precipitou quantidades comparáveis, aos dois níveis de pH estudados.

Numa base ponderal, ambos os tipos de taninos precipitaram quantidades comparáveis de proteína a pH 6,0. Contudo, a pH 3,0 o tanino de alfarroba precipitou 3,4; 4,4; 2,60; 1,92 e 1,84 vezes mais gelatina que o tanino de bolota, para relações de tanino:proteína 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 respectivamente.

A principal diferença nos comportamentos dos taninos de bolota e alfarroba residiu na influência do pH sobre as suas interações com a gelatina. A diminuição do pH de 6,0 para 3,0 provocou uma marcada diminuição na força de ligação do tanino de bolota e pouca ou nenhuma alteração na ligação do tanino de alfarroba. Este efeito foi melhor observado a baixos níveis de taninos. Além disso verificou-se menor efeito do pH sobre a agregação, até tamanho sedimentável, com os complexos tanino de alfarroba-gelatina.

Na fig. 2.7. representaram-se as quantidades de gelatina precipitadas pelos taninos de bolota e alfarroba a vários valores de pH compreendidos entre 3,0 e 6,0. Com ambos os tipos de taninos observou-se um máximo de precipitação da proteína a pH 4,5. Acima e abaixo deste valor a mesma diminuiu.

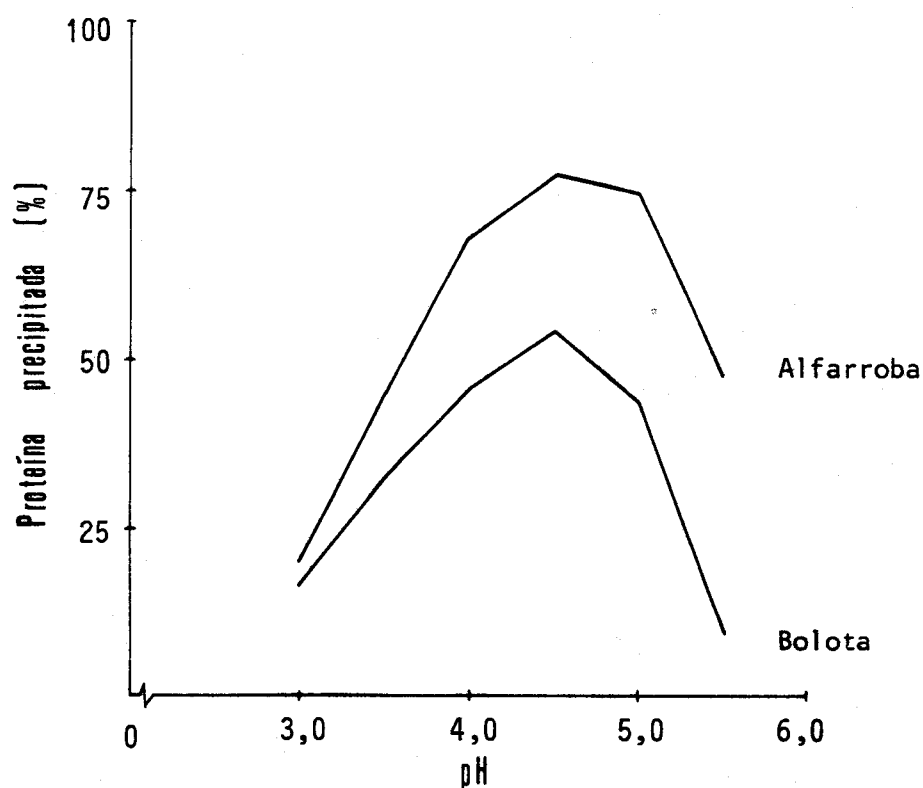


Fig. 2.7. Influência do pH sobre a formação de complexos "taninos-gelatina". (Quadro A 2.6.).

O tanino de alfarroba precipitou sempre mais gelatina que o tanino de bo-

lota. Com a relação tanino:proteína utilizada (0,25) o tanino de bolota precipitou 54,5% e o de alfarroba 78,5% da proteína presente. O pH a que se verificou um máximo de precipitação da proteína está próximo do ponto isoelectrico da mesma (4,9).

2.3.4. Influência da quantidade inicial de proteína sobre a precipitação da proteína e do tanino em presença. - Na fig. 2.8. representam-se as quantidades de gelatina e de tanino de bolota precipitados, com quantidades fixas de tanino e variáveis de proteína (Quadro A 2.6.). A percentagem de proteína precipitada foi decrescendo à medida que diminuiu a relação tanino:proteína.

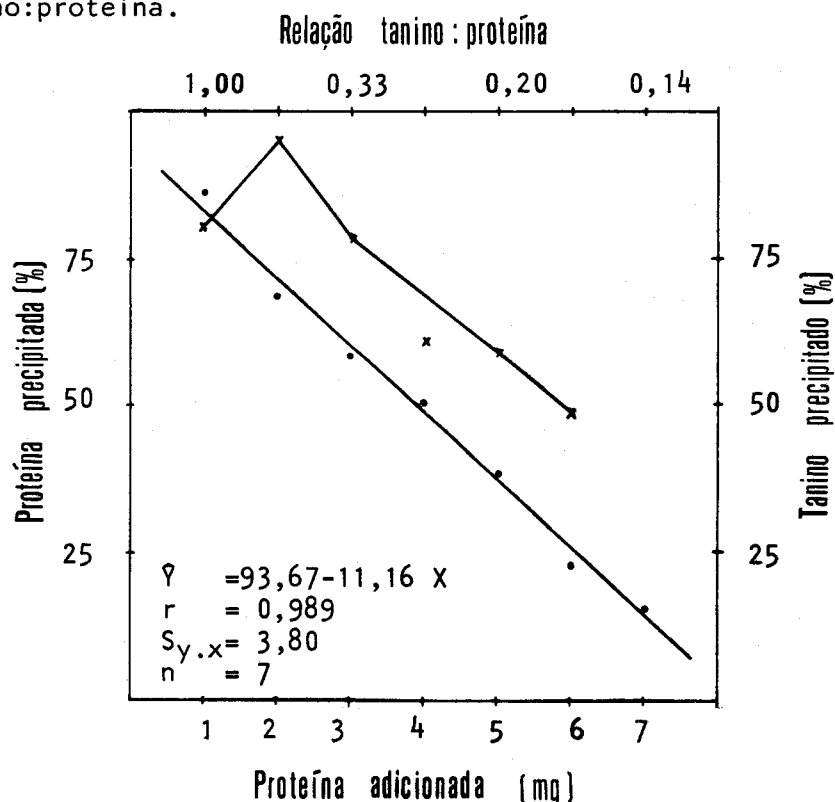


Fig.2.8. Proteína (.) e tanino de bolota (x) precipitados com quantidades crescentes de gelatina (Quadro A 2.7.)

Por outro lado, a percentagem de tanino precipitado aumentou entre 1 e 2 mg de gelatina, tendo a precipitação sido praticamente completa para uma relação tanino-proteína de 0,5. A partir deste valor observou-se um de-

crêscimo na percentagem de tanino precipitado. A percentagem máxima de tanino precipitado observou-se para uma relação proteína:tanino de 2 e a de gelatina precipitada para uma relação de 1. Aparentemente, um excesso de proteína inibiu a formação de complexos entre o tanino de bolota e a gelatina.

A fim de avaliar quantitativamente o observado nos estudos turbidimétricos entre os taninos e algumas proteínas e o PEG, a vários níveis de pH, determinaram-se as quantidades relativas de taninos precipitados com 3 tipos de proteínas e com PEG (Fig. 2.9.).

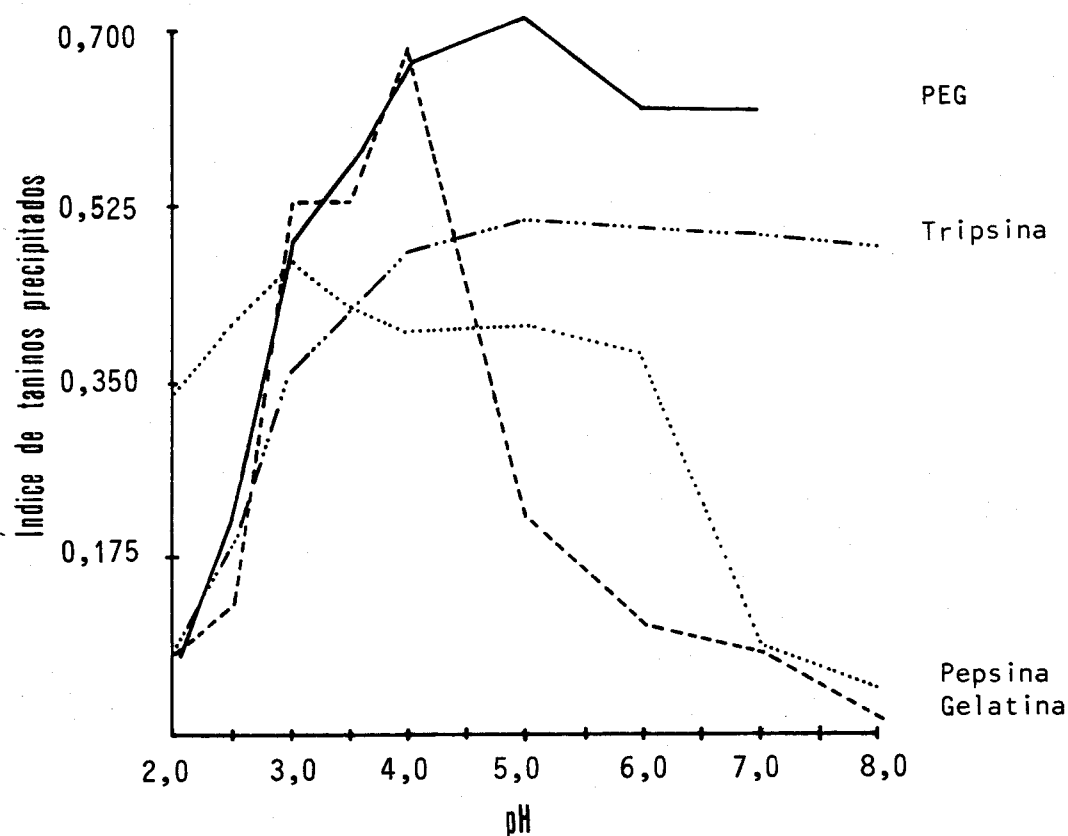


Fig. 2.9. Influência do pH sobre a afinidade do ácido tânico para várias proteínas e PEG. (Quadro A 2.8.)

Com a gelatina precipitaram quantidades significativas de taninos apenas entre 3,0 e 5,0. Abaixo ou acima daqueles valores a quantidade precipitada foi muito inferior. Entre pH 2,0 e 6,0 a pepsina precipitou quantidades significativas de tanino, embora em menor quantidade que as outras

proteínas e PEG para valores de pH compreendidos entre 3,0 e 4,5. A tripsina, PEG e gelatina precipitaram pouco tanino até pH 2,5. Acima deste valor aumentou a quantidade de tanino precipitado, a qual não foi muito diferente entre valores de pH de 4,0 a 7,0-8,0 para o PEG e tripsina, embora aquele tenha precipitado mais tanino que esta. Para a gama de valores de pH estudados o PEG precipitou mais taninos que as proteínas utilizadas.

### 2.3.5. Inibição da formação, e dissociação dos complexos tanino-hemoglobina pelo PEG<sub>20.000</sub>

- Dada a forte afinidade do PEG para os taninos, estudou-se a capacidade deste reagente para dissociar os complexos tanino-proteína. Utilizou-se a hemoglobina como substrato proteico dado que, por se tratar de uma cromoproteína, é de fácil doseamento. Os resultados estão expressos no quadro seguinte:

Quadro 2.5. Influência do PEG sobre os complexos tanino-hemoglobina <sup>a)</sup>.

Quantidade de PEG <sup>b)</sup> (mg)	ABS (578 nm) do sobrenadante, após centrifugação. (Média de 3 observações)	
	Tanino de bolota	Tanino de alfarroba
0,0	0,134	0,089
0,6	1,113	1,329
0,8	1,617	1,416
1,0	1,934	1,595
1,2	2,016	2,006
1,4	2,100	2,105
1,6	2,008	2,110
2,0	2,177	2,124

a) - 5 ml de solução de hemoglobina (ABS 578 nm=2,216) + 4 ml de solução de tanino a 0,25 mg.ml<sup>-1</sup>

b) - 1 ml de solução de PEG <sub>20.000</sub>, à concentração adequada, adicionado 15 minutos após a adição do tanino à solução de hemoglobina.

À medida que aumentou a quantidade de PEG adicionado, aumentou a quantidade de hemoglobina libertada dos complexos, até a relação tanino: PEG ter atingido 0,8-0,7. No entanto, mesmo para uma relação tanino: PEG 0,5 a hemoglobina libertada, aparentemente, nunca foi completa.

O PEG não só foi capaz de dissociar os complexos tanino: hemoglobina como evitar a sua formação (Quadro 2.6.):

Quadro 2.6. Inibição da formação, e dissociação, dos complexos tanino-hemoglobina. (Média de 3 observações)

Tratamento da proteína	ABS a 578 nm
1. Nenhum (A+5 ml H <sub>2</sub> O)	2,546
2. 1,0 mg de tanino (A+B+1 ml H <sub>2</sub> O)	
a) de bolota . . . . .	0,380
b) de alfarroba . . . . .	0,187
3. 1,25 mg de PEG antes da adição do tanino (A+C+B)	
a) de bolota . . . . .	2,483
b) de alfarroba . . . . .	2,289
4. 1,25 mg de PEG após a adição do tanino (A+B+C)	
a) de bolota . . . . .	2,466
b) de alfarroba . . . . .	2,214

(A) 5 ml de solução de hemoglobina

(B) 4 ml de solução de tanino a 0,25 mg.ml<sup>-1</sup> em H<sub>2</sub>O

(C) 1 ml de solução de PEG<sub>20.000</sub> a 1,12 mg.ml<sup>-1</sup> em H<sub>2</sub>O.

O tanino de alfarroba exerceu uma acção precipitante, sobre a hemoglobina, maior que o tanino de bolota. A inibição da formação de complexos tanino-hemoglobina, e a sua reversão pelo PEG, foi mais acentuada com o tanino de bolota que com o de alfarroba. No entanto, e para ambos os casos, tanto a inibição da formação de complexos, como a sua dissociação, pelo PEG não foram completas.

#### 2.4. Discussão e conclusões

Obtenção dos taninos. A enorme diversidade estrutural deste tipo de compostos e a sua grande propensão para alterações, nomeadamente polimerização, oxidação e ligação a outros constituintes (*v.g.* proteínas) faz com que sejam de difícil isolamento no estado purificado não alterado. Contudo, dado que os resultados analíticos obtidos com o Azul da Prússia não foram substancialmente mais elevados que os obtidos com métodos de precipitação das proteínas, leva-nos a concluir que o grau de contaminação com fenóis simples ou outros materiais redutores não terá, aparentemente, sido significativo. Contudo, as várias manipulações realizadas deverão ter introduzido um certo grau de oxidação dos taninos isolados, muito embora se tenha procurado evitar ao máximo o seu contacto com o oxigénio atmosférico.

Numa primeira fase pretendeu-se realizar a purificação dos taninos, extraídos com metanol, através da sua imobilização em coluna de Sephadex LH-20, lavagem com etanol, e ablução com acetona aquosa. O tratamento do abluído acetónico com fenol permitiria a dissociação dos complexos tanino-proteína e remoção dos resíduos proteicos dos extractos (*Hagerman e Butler, 1980b*) de taninos não oxidados. No entanto, os elevados custos actuais das resinas de intercâmbio iónico impuseram-nos uma metodologia que, embora menos elegante, satisfiz o objectivo.

Extracção dos taninos. O facto de o máximo de taninos terem sido extraídos com acetona aquosa está de acordo com as conclusões de outros autores. Com efeito, *Haslam (1966)* e *Broadhurst e Jones (1978)* verificaram que tanto os taninos hidrolizáveis como os condensados eram melhor extraídos com acetona aquosa. No entanto, e como refere *Haslam (1966)*, é sempre possível extrair mais algum tanino fazendo actuar vários solventes



sequencialmente. A labilidade dos taninos hidrolizáveis relativamente a muitos agentes hidrolíticos, nomeadamente enzimas, água quente, ácidos ou álcalis, e a grande facilidade com que, tanto taninos hidrolizáveis como condensados, são oxidados na presença de luz e oxigênio, recomenda-nos, contudo, que todo o processo de extracção seja realizado sem recurso a grandes manipulações. O material a ser extraído deve ser macerado ou moído imediatamente antes da extracção e não deve nunca ser submetido a aquecimento em estufa (Broadhurst e Jones, 1978). Os extractos utilizados foram usualmente utilizados imediatamente após a sua obtenção a fim de minimizar os processos oxidativos.

Análise dos taninos. Embora sejam inúmeros os métodos de análise, qualitativa e quantitativa, referidos na bibliografia (King e White, 1956; Swain e Hillis, 1959; Swain e Goldstein, 1964; Haslam, 1966; Schanderl, 1970; Burns, 1971; Maxson e Rooney, 1972; Hoff e Singleton, 1977; Price e Butler, 1977; Eskin et al., 1978; Hagerman e Butler, 1978, 1980 a; Davis e Hosney, 1979; Walter e Purcell, 1979; Bullard et al., 1981), a técnica descrita por Löwenthal e modificada por Procter (1884 - citada por Kapel e Karunanithy, 1974) permaneceu em uso até à actualidade, embora a sua utilização seja de interesse duvidoso em estudos nutricionais (Hagerman e Butler, 1978).

De entre os vários métodos redox usualmente utilizados (Swain e Hillis, 1959; Burns, 1963; Singleton e Rossi, 1965; Price e Butler, 1977; Broadhurst e Jones, 1978; Eskin et al., 1978; Walter e Purcell, 1979) o do Azul da Prússia (Price e Butler, 1977; Budini et al., 1980) é o mais facilmente aplicável a produtos agrícolas, razão da sua escolha, dado que todos eles são extremamente inespecíficos. Misturas de fenóis são oxidadas em diferentes graus pelo  $Fe^{3+}$  e torna-se necessária muita cautela na interpretação dos resultados. Com efeito, a grande variação no

grau de oxidação de cada molécula ( *v.g.* uma diferença de 7 vezes entre a quercetina e a hidroquinona) serve para dar ênfase aos cuidados a ter na interpretação dos resultados quando misturas de polifenóis são analisadas por qualquer método redox (*Price e Butler, 1977*). Por outro lado, inúmeras substâncias com actividade redutora podem interferir com o método. Com extractos de vegetais verdes ou de frutos o ácido ascórbico constitui um interferente importante (*Budini et al., 1980*). Estes métodos não distinguem os fenóis simples dos fenóis taninos, nem os taninos hidrolizáveis dos condensados. Alguns autores (*Price e Butler, 1977*) pretendem que a extracção selectiva dos fenóis não taninos permite tornar qualquer método redox mais específico. No entanto, as soluções aquosas de clorêto de sódio, ou o acetato de etilo, geralmente utilizadas para esse efeito também extraem algum tanino (*Glories, 1974*). Por outro lado, os taninos podem estar relativamente oxidados, dando fraca reacção com os reagentes utilizados, e serem contudo altamente reactivos com as proteínas. Assim, estes métodos têm sido abandonados em favor de outros, mais específicos, e de maior significado nutricional, os quais se baseiam na determinação da afinidade dos extractos vegetais para as proteínas (*Bate-Smith, 1973, 1977; Chan et al., 1978; Hagerman e Butler, 1978, 1980a; Walter e Purcell, 1978; Budini et al., 1980; Schultz et al., 1981*), ou enzimas (*Goldstein e Swain, 1965; Maxson et al., 1973a; Strumeyer e Malin, 1975; Daiber, 1975; Davis e Hosney, 1979*). Tanto a função ambiental (*Swain, 1979*) como os efeitos nutricionais (*Price e Butler, 1980*) dos taninos poderão ser melhor compreendidos se se dispuser de técnicas analíticas adequadas ao estudo quantitativo das interacções tanino-proteína, já que taninos são, por definição, compostos polifenólicos que formam complexos estáveis com proteínas (*Swain, 1979*). As propriedades bioquímicas dos taninos (adstringência, inibição enzimática, efeitos nutricional-

nais deletéreos, acção anti-fúngica, etc.) estão relacionadas com a capacidade de se ligarem às proteínas (Bullard e Elias, 1980). De entre os métodos baseados na precipitação da proteína, duas versões básicas têm sido utilizadas. Numa, (Hagerman e Butler, 1978) as preparações de extractos vegetais ou de taninos purificados são adicionadas a uma solução de proteína, o complexo tanino-proteína resultante é isolado por centrifugação, dissolvido, e o tanino medido na solução alcalina, a 510 nm, após adição de clorêto férrico. A quantidade de tanino precipitada pode ser expressa em função de uma curva padrão de tanino purificado do material em estudo ou relativamente ao ácido tânico. Noutra, (Hagerman e Butler, 1980a), é medida a quantidade de proteína precipitada por uma determinada quantidade de extracto vegetal. A medida que uma quantidade constante de tanino é adicionada a quantidades crescentes de proteína, a quantidade de proteína precipitada aumenta até um ponto de estabilização para além do qual a adição de um excesso de proteína não afecta a quantidade precipitada. Para cada tanino, a razão entre a quantidade de proteína à qual se observa uma estabilização da quantidade precipitada, e a quantidade de tanino presente, é relativamente constante (Hagerman e Butler, 1980a). Esta razão, definida como a actividade específica dos taninos, traduz a quantidade de proteína precipitada por cada mg de tanino adicionado:

$$\text{Actividade específica do tanino} = \frac{\text{mg de proteína adicionada}}{\Delta A_{PB}}$$

em que  $\Delta A_{PB}$  representa a quantidade de material oxidável no meio reagente, medida pela redução do clorêto férrico. Se se dispuser de tanino purificado da espécie em estudo pode-se relacionar, através de uma curva padrão, as unidades de absorção encontradas com o Clorêto férrico, com o peso de tanino, e comparar-se então directamente as actividades específicas dos taninos em termos de mg de proteína precipitada/mg de tanino.

Segundo aqueles autores, cada mg de tanino do grão de sorgo precipita 12 mg de albumina sérica bovina, e cada mg de ácido tânico 11 mg da mesma proteína.

Apesar da elegância desta técnica, ela é de difícil utilização por um laboratório vulgar, já que utiliza, para facilidade de mensuração, proteína marcada, radioactiva. Por isso utilizámos, alternativamente, um método turbidimétrico que, muito embora não permita uma quantificação da proteína precipitada, permite avaliar o nível de taninos presentes no extracto vegetal, através da mensuração da turvação desenvolvida com uma determinada quantidade de proteína, e relacioná-lo com o ácido tânico através de uma curva padrão. Por outro lado, a adição de quantidades crescentes de proteína a uma dada quantidade de tanino purificado permitiria, através da medição do ponto a partir do qual a adição de proteína adicional não provoca aumento mensurável no grau de complexação, determinar a quantidade máxima de proteína que pode formar complexos insolúveis com uma determinada quantidade de tanino purificado. O valor encontrado para a gelatina e ácido tânico (10,6 mg gelatina/mg ácido tânico) (ver em 2.3.1.) está próximo dos 11mg encontrados por *Hagerman e Butler (1980a)* para a albumina sérica e ácido tânico.

A partir de um extracto vegetal, *Peri e Pompei (1971)* separaram os compostos fenólicos com acção tanante, dos que a não possuem, por precipitação com sulfato de cinchonina. A adição de aldeído fórmico às duas fracções assim diferenciadas faz precipitar os compostos fenólicos de natureza flavana (condensados). O doseamento dos fenóis totais (reagente de Folin-Ciocalteu ou outro) nos sobrenadantes, e na totalidade do extracto permite determinar as percentagens dos diferentes tipos de compostos.

*Marigo (1973)* utilizou um fraccionamento semelhante, mas

substituiu o sulfato de cinchonina pela gelatina. As duas fracções, tanante e não tanante, são subdivididas em duas e tratadas pela PVP e formaldeído. Estes dois reagentes fazem precipitar respectivamente os "taninos totais" e os "taninos condensados". As percentagens destes taninos são determinadas por qualquer método de oxido-redução.

Estes métodos baseiam-se nas propriedades das moléculas de taninos darem combinações insolúveis com um reagente (proteína ou alcalóide). Eles pretendem determinar a proporção de "tanino verdadeiro" relativamente à quantidade de compostos fenólicos do meio. Por outro lado, a utilização do aldeído fórmico, reagente específico do núcleo floroglucinol, precisa a natureza flavana dos taninos. Embora úteis para caracterizar a natureza dos fenóis num determinado extracto, quaisquer dos métodos mais directos de precipitação da proteína, atrás referidos, são de mais fácil adequação a condições analíticas de rotina.

A técnica da hemanálise, inicialmente sugerida por *Bate-Smith* (1973), e posteriormente desenvolvida pelo mesmo autor (1977) e por *Schultz et al.*, (1981), apesar de alguns inconvenientes (necessidade de utilização de sangue recentemente colhido, interferência de alguns metabolitos vegetais como as saponinas), apresenta vantagens importantes. As soluções de hemoglobina são naturalmente tamponizantes e não necessitam a adição de soluções tampão, como acontece com outras proteínas, já que o grau de ligação dos taninos às proteínas é influenciado pelo pH (*Goldstein e Swain, 1965; Loomis e Battaile, 1966; Hagerman e Butler, 1978*), sendo máximo a valores próximos do ponto isoelectico das proteínas (ver em 2.3.2. e 2.3.3.) (*Hagerman e Butler, 1978; Oh, 1978*).

A possibilidade de medição directa da concentração do substrato naturalmente corado, por espectrofotometria, constitui outra vantagem, já que com outras proteínas o seu doseamento é complicado pelo facto das

técnicas mais expeditas utilizarem reagentes que são sensíveis igualmente à presença de fenóis .

Embora as técnicas de inibição enzimática pareçam sedutoras (Goldstein e Swain, 1965; Davis e Hosney, 1979), o elevado preço dos substratos, por um lado, e a dificuldade de interpretação dos resultados, dado o escasso conhecimento existente relativamente à relação entre actividade enzimática e a formação de complexos insolúveis (Hagerman e Butler, 1978), por outro, têm limitado a sua utilização e desenvolvimento. Bullard et al., (1981) utilizando o teste da inibição da  $\alpha$ -amilase verificaram que era necessário analisar uma testemunha enzimática com cada conjunto de amostras porque a actividade enzimática variava a intervalos horários. Problemas similares são referidos, para o método da inibição da  $\alpha$ -amilase, por Rooney et al., (1980) e Earp et al., (1981), e para o método da  $\beta$ -glucosidase por Gupta e Haslam (1980). O método da vanilina (Swain e Hillis, 1959; Burns, 1971; Broadhurst e Jones, 1978; Price et al., 1978a) tem sido largamente utilizado em análises quantitativas de taninos condensados ou dos seus componentes monoméricos. A principal vantagem deste método parece ser a sua especificidade para uma estreita gama de flavanóis (Sarkar e Howarth, 1976). Contudo, a vanilina reage igualmente com monómeros não taninos (antocianinas) o que pode conduzir a valores erroneamente altos de taninos, particularmente em alguns produtos, se não se fizerem correcções adequadas (Price et al., 1978a). Por outro lado, pelo facto de ser específica para taninos condensados, ignora os hidrolizáveis. Em alguns produtos (bolota, alfarroba) coexistem os dois tipos de taninos e, a não ser que se utilizem simultaneamente duas técnicas, ou se separem os dois tipos de taninos, e sejam analisados separadamente por técnica de oxido-redução, com os inconvenientes associados (Price e Butler, 1977), o método da vanilina pode subestimar o valor tanante de

alguns produtos que contêm os dois tipos de taninos (caso da alfarroba e bolota) e pode, pelo contrário, sobrestimar o valor de outros (caso do resíduo de uva), ricos em antocianidinas não taninos que reagem com a vanilina (Sarkar e Howarth, 1976). Embora as antocianidinas possam ser extraídas quantitativamente com soluções aquosas salinas (Goto et al., 1976) a técnica resulta morosa, e uma certa percentagem de tanino é extraída em simultâneo (Glories, 1974), não se adequando a análise de rotina.

Pelas considerações atrás feitas, não é de surpreender, pois, que o método do Azul da Prússia tenha fornecido os valores mais elevados. No entanto, e atendendo ao facto de tais valores terem sido apenas ligeiramente superiores aos obtidos com o da precipitação da proteína, parece sugerir que a presença de material oxidável não tanante não foi significativa. No entanto, embora os vários métodos concordem qualitativamente (à excepção do da vanilina), os valores não podem ser comparados directamente, já que cada método mede os taninos em bases diferentes. Os menores valores obtidos com o método turbidimétrico são difíceis de explicar. A turvação mensurável depende não só da natureza dos complexos tanino-proteína formados, como da sua dimensão. É possível que a formação de complexos com dimensões sedimentáveis dependa da natureza, não só da proteína utilizada, mas também do tanino. O reagente vanilina actua apenas sobre o grupo funcional específico dos monómeros dos taninos condensados (Sarkar e Howarth, 1976) e os valores obtidos com este método traduzem a presença de taninos condensados.

Lozano et al., (1983), encontraram, em frutos de *Quercus ilex*, valores de taninos totais variáveis, em função do tamanho do fruto, entre 4,24 e 5,76(%MS). A percentagem de taninos condensados oscilou entre 0,27% e 0,48%, estando praticamente presentes só na casca dos frutos. Os valores obtidos no presente estudo com o Azul da Prússia e a Vanilina estão pró-

ximos dos encontrados por aqueles autores que utilizaram métodos similares (Burns, 1963) para o doseamento dos taninos. Quanto aos valores encontrados para a alfarroba com a técnica da vanilina eles são bastante semelhantes aos 4% encontrados por Tamir et al., (1971) e aos 3,8% por Calixto e Canellas (1982), que utilizaram métodos similares de análise, usando catequina como padrão.

Os métodos bioquímicos, baseados na precipitação das proteínas, permitem em nossa opinião avaliar mais adequadamente o efeito nutricionalmente deletéreo dos taninos. O problema inerente à inadequação de padrões adequados para os métodos químicos pode ser ultrapassado exprimindo a "adstringência" relativamente ao ácido tânico comercialmente disponível, dada a reconhecida dificuldade de obtenção de taninos purificados para cada produto vegetal a ser estudado.

Influência do pH sobre a formação de complexos tanino-proteínas e tanino-PEG. O maior grau de complexação observado aos níveis de pH próximos dos pontos isoelectricos das proteínas está de acordo com o verificado para interações taninos-gelatina (Van Buren e Robinson, 1969) e entre taninos de uva e várias proteínas (Oh, 1978). Armstrong (1976) observou que as proteínas eram abluídas, dos taninos imobilizados, a valores de pH próximos dos seus pontos isoelectricos. Este fenómeno poderia ser devido a diminuição no número de cargas electricas positivas na molécula proteica (Gustavson, 1954), e a um aumento no grau de dissociação dos agrupamentos carboxílicos das proteínas na vizinhança do ponto isoelectrico. Alterações na conformação da proteína poderiam mediar alterações no arranjo tridimensional dos resíduos hidrofóbicos das proteínas e afectar assim a principal força de ligação dos taninos (Oh, 1978). A acessibilidade dos agrupamentos hidrofóbicos das proteínas poderia depender das conformações das mesmas, as quais por sua vez dependeriam de factores vários, tais como pH, tempera-



tura e força iônica.

Não existe nenhuma explicação adequada para a baixa turvação desenvolvida pelo PEG na presença dos taninos, a baixos valores de pH. Aquele polímero possui  $-CH_2 \cdot CH_2-$  como único agrupamento químico de importância, e as interações com os taninos serão apenas de natureza hidrofóbica.

Aos valores de pH normalmente verificados no intestino o grau de formação de complexos taninos-proteínas foi relativamente baixo, comparativamente ao verificado para valores de pH mais ácidos. A digestão intestinal das proteínas cujos pontos isoeletricos são relativamente baixos poderia assim não ser significativamente afectada pelos taninos estudados. Contudo, mesmo a pH 8 a tripsina evidenciou forte afinidade para os taninos. A insolubilização da enzima poderá inibir a sua actividade proteolítica. Seria adequado estudar o efeito do pH, entre outros factores, sobre o comportamento de outras enzimas proteolíticas, na presença de taninos.

Influência do pH sobre as quantidades de proteína e tanino precipitados, a vários níveis iniciais de tanino. Para além do pH outros factores influenciaram a complexação dos taninos com as proteínas, nomeadamente as respectivas quantidades em presença. *Hagerman e Butler (1978)* verificaram que o tanino era precipitado a 100%, a pH 4,6, quando a proteína (albumina sérica bovina) se encontrava em quantidade dupla daquele. No presente estudo observaram-se resultados similares (Fig. 2.6.), para ambos os valores de pH utilizados (3,0 e 6,0). Tal poderá explicar a observação (*Price e Butler, 1980; Kumar e Singh, 1984*) de que o aumento na quantidade de proteína nas dietas com taninos alivia o efeito depressivo que estes exercem sobre a digestão daquela. Com efeito, a diminuição da relação tanino:proteína conduziu à diminuição das quantidades precipitadas.

A natureza do tanino parece ser susceptível de influenciar a precipitação da proteína, em função do pH. O facto do de alfarroba (tanino con-

densado) ter precipitado mais gelatina que o de bolota (tanino hidrolizável), a pH 3,0, sugere a possibilidade de os taninos condensados poderem afectar em maior grau a digestão gástrica que os taninos hidrolizáveis. A labilidade destes, relativamente a determinados agentes hidrolíticos, tais como ácidos e determinadas enzimas (Haslam, 1966), poderá constituir a base explicativa do fenómeno observado.

Embora se não tenham observado diferenças na quantidade de proteína precipitada a pH 6,0, para relações tanino:proteína compreendidas entre 0,5 e 8,0 (Fig. 2.6.), para valores de pH compreendidos entre 3,0 e 6,0 e para uma relação tanino:proteína mais baixa (0,25) o tanino de alfarroba precipitou sempre mais proteína. Tal sugere a possibilidade (referida por vários autores - ver Cap. I) de os taninos condensados, pelo menos a baixos níveis, relativamente aos da proteína na dieta, exercerem efeitos negativos mais pronunciados sobre a digestão do que os hidrolizáveis.

Influência da quantidade inicial de proteína sobre a precipitação da proteína e do tanino em presença. Para uma dada quantidade de ácido tânico a percentagem de proteína precipitada foi diminuindo à medida que se aumentou a sua quantidade (Fig. 2.8.). O facto de ter diminuído simultaneamente a percentagem de tanino de bolota precipitado parece estar de acordo com as observações de Schultz et al., (1981) segundo as quais a ligação tanino-proteína exhibe cooperatividade na qual o primeiro tanino ligado facilita grandemente a ligação de taninos adicionais, e que é necessário que a concentração do tanino atinja um determinado limiar para que a proteína precipite.

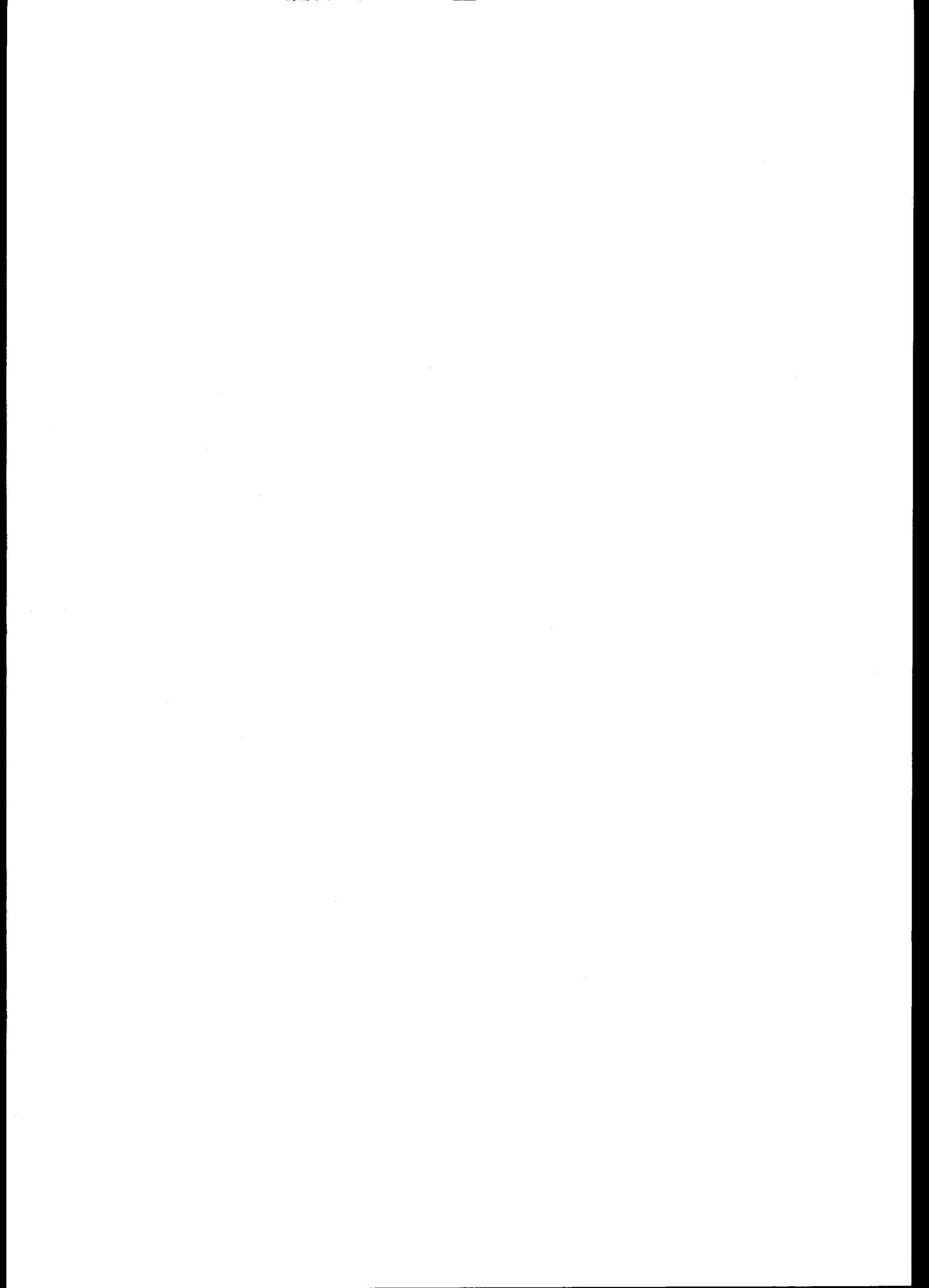
A ligação do tanino à proteína é influenciada não só pelo pH das soluções, mas também pelo tipo de substância tampão utilizada (Goldstein e Swain, 1965). Assim, é possível que os resultados ora observados pudessem ter sido diferentes caso se tivesse utilizado outro meio de tamponização.

Os resultados expressos na Fig.2.9. confirmam a validade dos estudos turbidimétricos utilizados na avaliação do grau de complexação dos taninos com as proteínas. Com efeito, os gráficos de precipitação dos taninos (resultante da complexação com as proteínas) têm uma configuração semelhante à dos gráficos representados na Fig.2.3. O facto de se ter utilizado ácido tânico em vez de tanino de bolota ou de alfarroba não permite, no entanto, comparações directas.

O PEG não só é capaz de se complexar com os taninos (Oh, 1978) como também de deslocar a proteína dos complexos prè-formados com aqueles (Jones e Mangan, 1977). No presente estudo o PEG exibiu as mesmas potencialidades (Quadros 2.5. e 2.6.) na presença tanto dos taninos de bolota, como dos de alfarroba, pelo que a sua utilização nos estudos relativos aos efeitos dos taninos sobre a digestão (vêr Capítulos seguintes) nos parece justificada, embora seja de ressaltar a possibilidade daquele polímero não conseguir aliviar totalmente o efeito precipitante do tanino sobre a proteína, nem de deslocar totalmente a proteína de complexos tanino-proteína prè-formados (ver em Resultados).

CAPÍTULO II

ANEXOS



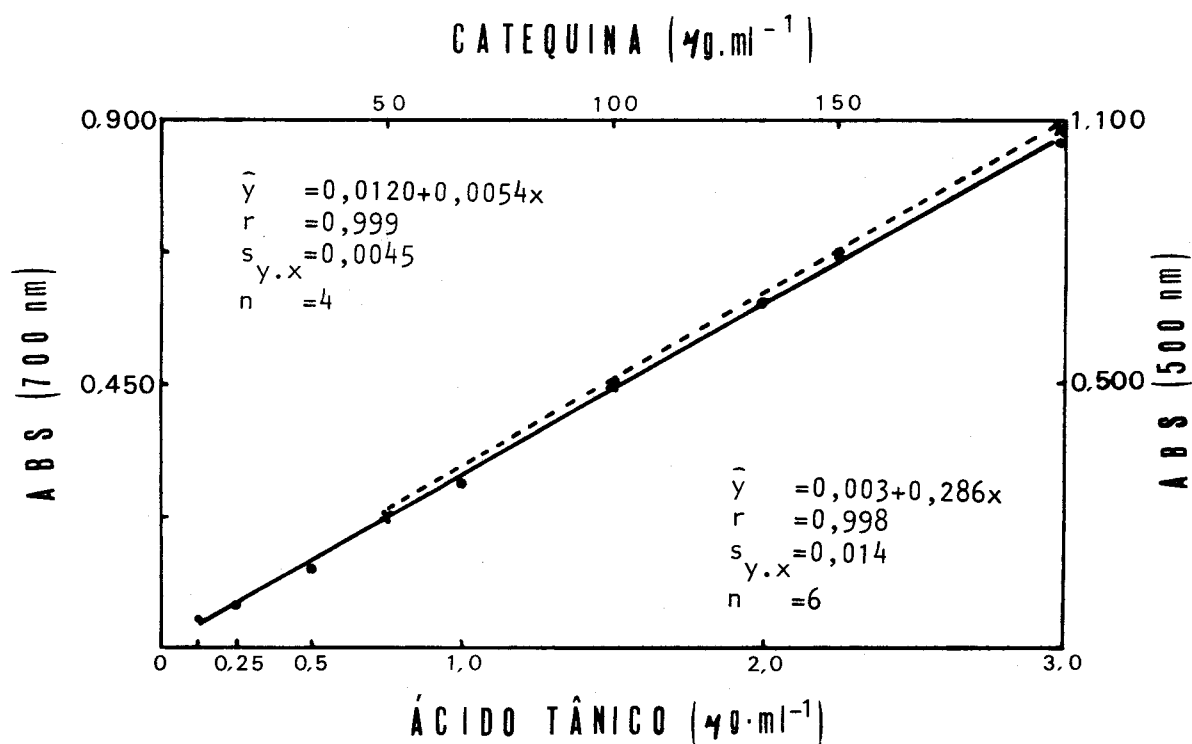


Fig. A 2.1. Curvas padrão do ácido tânico pela técnica do Azul da Prússia (•—•) e da catequina pelo método da vanilina (x---x).

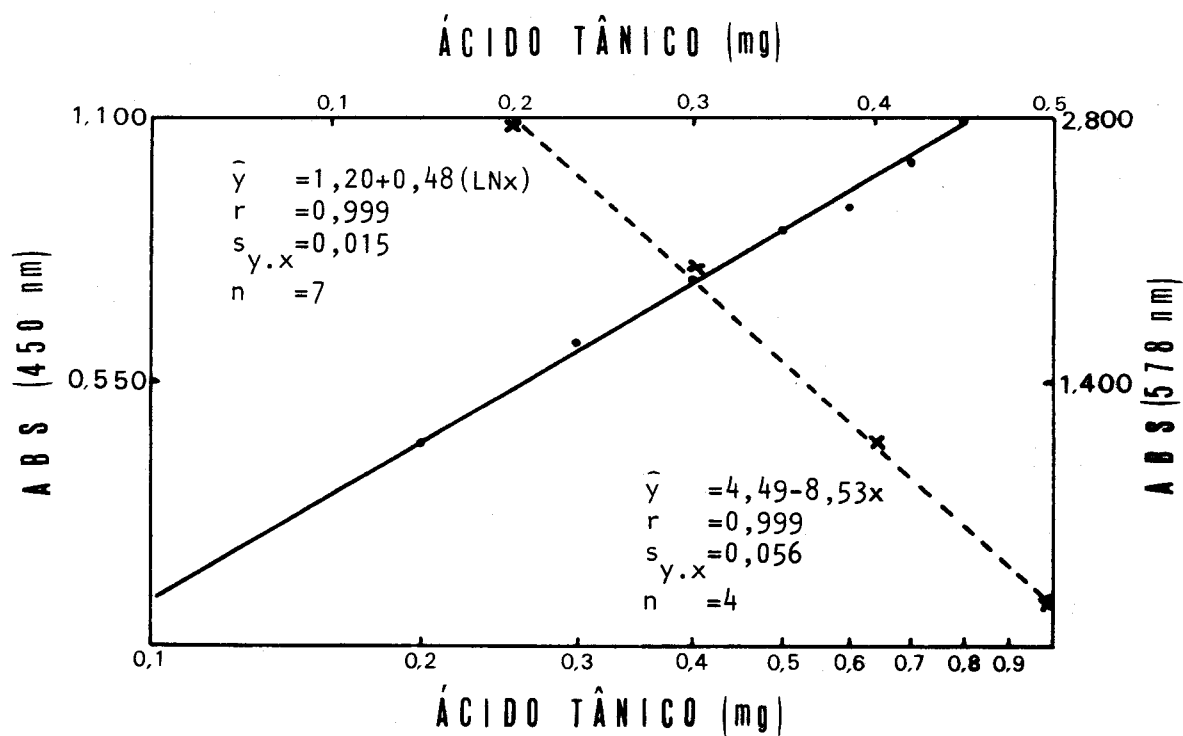


Fig. A 2.2. Curvas padrão do ácido tânico pelos métodos turbidimétrico (•—•) (escala logaritmica) e da precipitação da hemoglobina (x---x).

Quadro A 2.1. Formação de complexos entre a gelatina e o ácido tânico (leitura a 450 nm, da turvação desenvolvida) (n=3).

Ácido tânico (mg)	GELATINA (mg) ( $\bar{X} \pm s$ )														
	0,6	0,9	1,2	1,5	3	6	9	15							
0,1	0,095 (0,009)	0,030 (0,007)	0,135 (0,011)	0,156 (0,014)	0,089 (0,007)	0,027 (0,007)	0,018 (0,005)	0,000 (0,002)							
0,2	0,171 (0,013)	0,121 (0,013)	0,253 (0,023)	0,323 (0,021)	0,425 (0,013)	0,370 (0,009)	0,164 (0,009)	0,074 (0,004)							
0,3	0,210 (0,011)	0,211 (0,016)	0,355 (0,026)	0,414 (0,011)	0,640 (0,021)	0,795 (0,021)	0,750 (0,013)	0,378 (0,015)							
0,4	0,269 (0,010)	0,290 (0,022)	0,417 (0,025)	0,507 (0,013)	0,769 (0,017)	1,035 (0,024)	1,070 (0,017)	0,695 (0,014)							
0,5	0,270 (0,033)	0,344 (0,017)	0,490 (0,029)	0,596 (0,016)	0,869 (0,019)	1,238 (0,021)	1,319 (0,017)	0,930 (0,022)							
0,6	0,278 (0,014)	0,362 (0,011)	0,471 (0,032)	0,667 (0,019)	0,934 (0,017)	1,387 (0,014)	1,536 (0,025)	1,270 (0,028)							
0,7	0,272 (0,044)	0,382 (0,019)	0,521 (0,032)	0,658 (0,016)	1,012 (0,020)		1,689 (0,018)	1,500 (0,029)							
0,8	0,254 (0,033)	0,391 (0,024)	0,543 (0,027)	0,715 (0,021)	1,107 (0,033)	1,654 (0,020)	1,909 (0,028)	1,800 (0,031)							
0,9	0,263 (0,036)	0,378 (0,019)	0,493 (0,040)	0,694 (0,044)	1,107 (0,025)	1,748 (0,023)	2,010 (0,025)	1,760 (0,034)							
1,0	0,282 (0,040)	0,397 (0,028)	0,514 (0,037)	0,674 (0,041)	1,135 (0,033)	1,855 (0,019)	2,240 (0,022)	1,820 (0,046)							

Quadro A 2.2. Influência do pH sobre a formação de complexos entre o tanino de bolota, de alfarroba, e várias proteínas e PEG 20.000 (n=3).

PROTEINA	TANINO	ABS (450 nm)												
		3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S			
Albumina ovo	B	0,833a	1,205 <sup>b</sup>	1,108 <sup>b</sup>	0,520 <sup>c</sup>	0,320 <sup>d</sup>	0,081 <sup>e</sup>	0,015	0,028	0,024	0,026	0,026	0,026	0,011
	A	0,737a	0,994 <sup>b</sup>	0,677 <sup>a</sup>	0,354 <sup>c</sup>	0,200 <sup>d</sup>	0,042 <sup>e</sup>	0,033	0,027	0,054	0,018	0,030	0,030	0,017
$\alpha$ -Amilase	B	0,315a	0,347a	0,379a	0,463a	0,112 <sup>b</sup>	0,040 <sup>c</sup>	0,016	0,028	0,054	0,032	0,025	0,025	0,017
	A	0,449a	0,417a	0,467a	0,463a	0,086 <sup>b</sup>	0,013 <sup>c</sup>	0,018	0,040	0,023	0,032	0,013	0,013	0,025
Gelatina	A	1,097a	0,943a	0,498 <sup>b</sup>	0,113 <sup>c</sup>	0,113 <sup>c</sup>	0,053 <sup>c</sup>	0,093	0,050	0,026	0,032	0,012	0,012	0,015
	B	0,939a	0,588 <sup>b</sup>	0,153 <sup>c</sup>	0,079 <sup>d</sup>	0,039 <sup>d</sup>	-	0,039	0,030	0,042	0,035	0,022	0,022	-
Hemoglobina	B	0,216a	0,637 <sup>b</sup>	0,677 <sup>b</sup>	0,610 <sup>b</sup>	0,550 <sup>b</sup>	0,111 <sup>c</sup>	0,032	0,060	0,025	0,036	0,050	0,050	0,025
	A	0,112a	0,502 <sup>b</sup>	0,521 <sup>b</sup>	0,571 <sup>b</sup>	0,467 <sup>b</sup>	0,059 <sup>a</sup>	0,028	0,028	0,039	0,045	0,049	0,049	0,042
PEG 20.000	B	0,160a	0,711 <sup>b</sup>	0,700 <sup>b</sup>	0,698 <sup>b</sup>	0,706 <sup>b</sup>	-	0,014	0,014	0,021	0,023	0,010	0,010	-
	A	0,420a	0,600 <sup>b</sup>	0,579 <sup>b</sup>	0,580 <sup>b</sup>	0,602 <sup>b</sup>	-	0,018	0,012	0,017	0,019	0,024	0,024	-
Pepsina	B	0,920a	0,932a	0,635 <sup>b</sup>	0,561 <sup>b</sup>	0,287 <sup>c</sup>	0,066 <sup>d</sup>	0,017	0,031	0,044	0,028	0,055	0,055	0,005
	A	0,832 <sup>ab</sup>	0,807 <sup>ab</sup>	0,868a	0,708 <sup>b</sup>	0,236 <sup>c</sup>	0,057 <sup>d</sup>	0,035	0,030	0,109	0,034	0,029	0,029	0,029
Tripsina	B	0,543a	0,623a	0,345 <sup>b</sup>	0,436 <sup>b</sup>	0,512a	0,379 <sup>c</sup>	0,037	0,023	0,026	0,049	0,027	0,027	0,031
	A	0,621a	0,507 <sup>ab</sup>	0,426 <sup>b</sup>	0,394 <sup>b</sup>	0,319 <sup>d</sup>	0,412 <sup>e</sup>	0,067	0,064	0,044	0,040	0,046	0,046	0,022

B= Bolota  
A= Alfarroba

Dentro de cada linha, valores referenciados com letras diferentes diferem estatisticamente (P<0,01).



Quadro A 2.3. Formação de complexos entre o ácido tânico e o PEG 20 000 (n=3).

Ácido tânico (mg)	ABS (450 nm)	
	$\bar{X}$	s
0	0,000	
0,1	0,012	0,002
0,2	0,025	0,005
0,3	0,084	0,005
0,4	0,185	0,006
0,5	0,358	0,011
0,6	0,596	0,016
0,7	0,752	0,013
0,8	0,910	0,026
0,9	0,942 *	0,044
1,0	0,888 *	

\* Não entraram na regressão

Quadro A 2.4. Complexação do tanino de bolota com o PEG 20 000 (ABS a 450 nm)

PEG (mg)	Ácido tânico (mg)				
	0,2	0,5	1,0	2,0	4,0
0,2	0,036				
0,5		0,112	0,434	0,056	0,081
1,0		0,164	0,438	0,217	0,184
2,0	0,019	0,046	0,512	1,165	0,855
4,0		0,013	0,278	1,405	1,033

Quadro A 2.5. Influência do pH sobre as quantidades de proteína e taninos precipitados, a vários níveis iniciais de tanino (n=3).

Quantidade de tanino (mg)	Quantidade de gelatina precipitada (mg)						Quantidade de tanino precipitado (mg)					
	Tanino de bolota			Tanino de alfarroba			Tanino de bolota			Tanino de alfarroba		
	$\bar{X}$	S	pH	$\bar{X}$	S	pH	$\bar{X}$	S	pH	$\bar{X}$	S	pH
1,25	0,29 <sup>a</sup>	0,07	1,54 <sup>b</sup>	1,28 <sup>a</sup>	0,17	1,46 <sup>a</sup>	0,129 <sup>a</sup>	0,030	1,09 <sup>c</sup>	0,75 <sup>a</sup>	0,13	0,83 <sup>ab</sup>
2,50	0,62 <sup>b</sup>	0,07	2,00 <sup>e</sup>	2,10 <sup>b</sup>	0,19	1,95 <sup>b</sup>	0,52 <sup>b</sup>	0,05	2,10 <sup>c</sup>	1,60 <sup>b</sup>	0,24	1,14 <sup>bc</sup>
5,00	0,83 <sup>c</sup>	0,18	2,30 <sup>e</sup>	2,16 <sup>b</sup>	0,22	2,01 <sup>b</sup>	1,20 <sup>c</sup>	0,19	3,09 <sup>a</sup>	2,17 <sup>c</sup>	0,25	1,64 <sup>ce</sup>
10,00	1,28 <sup>d</sup>	0,17	2,30 <sup>e</sup>	2,46 <sup>c</sup>	0,12	1,99 <sup>b</sup>	1,69 <sup>d</sup>	0,17	3,27 <sup>a</sup>	2,43 <sup>c</sup>	0,39	1,75 <sup>e</sup>
20,00	1,31 <sup>d</sup>	0,27	2,28 <sup>e</sup>	2,41 <sup>c</sup>	0,24	2,39 <sup>c</sup>	2,29 <sup>e</sup>	0,27	3,88 <sup>b</sup>	3,24 <sup>d</sup>	0,28	3,35 <sup>d</sup>

Dentro de cada linha ou coluna, e para cada tipo de tanino, valores referenciados com letras diferentes diferem estatisticamente (P < 0,01).

Quadro A 2.6. Influência do pH sobre a formação de complexos tanino-gelatina (n=3).

Precipitado	Fonte de tanino	pH											
		3,0		3,5		4,0		4,5		5,0		5,5	
		$\bar{X}$	s	$\bar{X}$	s	$\bar{X}$	s	$\bar{X}$	s	$\bar{X}$	s	$\bar{X}$	s
Gelatina (mg)	B	0,67 <sup>a</sup>	0,07	1,31 <sup>b</sup>	0,12	1,85 <sup>c</sup>	0,14	2,18 <sup>d</sup>	0,13	1,74 <sup>c</sup>	0,12	0,33 <sup>a</sup>	0,15
	A	0,80 <sup>a</sup>	0,04	1,86 <sup>b</sup>	0,14	2,71 <sup>c</sup>	0,16	3,14 <sup>d</sup>	0,23	3,05 <sup>d</sup>	0,11	1,89 <sup>b</sup>	0,13
(%)	B	16,8	1,7	32,8	2,9	46,2	3,4	54,5	3,3	43,5	3,0	8,3	3,8
	A	20,1	1,0	46,5	3,4	69,7	3,5	78,5	5,7	76,2	2,8	47,2	3,1
Tanino (mg)	B	0,27 <sup>a</sup>	0,06	0,52 <sup>b</sup>	0,03	0,72 <sup>c</sup>	0,03	0,83 <sup>d</sup>	0,06	0,71 <sup>c</sup>	0,03	0,43 <sup>e</sup>	0,04
	A	0,27 <sup>a</sup>	0,04	0,52 <sup>b</sup>	0,05	0,74 <sup>c</sup>	0,03	0,81 <sup>d</sup>	0,04	0,81 <sup>d</sup>	0,04	0,72 <sup>c</sup>	0,04
(%)	B	27,2	5,6	52,0	3,2	72,2	3,2	82,5	5,8	71,5	2,9	42,5	3,2
	A	26,7	3,7	52,3	4,8	73,8	2,8	80,7	3,9	80,5	3,8	71,5	4,2

B=Bolota  
A=Alfarroba

Dentro de cada linha, valores referenciados com letras diferentes diferem estatisticamente ( P < 0,01)

Quadro A 2.7. Proteína e tanino de bolota precipitados com quantidades crescentes de gelatina (n=3).

		GELATINA ADICIONADA															
		1		2		3		4		5		6		7		8	
		$\bar{X}$	s	$\bar{X}$	s	$\bar{X}$	s	$\bar{X}$	s	$\bar{X}$	s	$\bar{X}$	s	$\bar{X}$	s	$\bar{X}$	s
Precipitados		0,86	0,08	1,35	0,22	1,72	0,23	2,07	0,30	2,08	0,20	1,38	0,33	1,15	0,26	0,94	0,20
Gelatina (mg)		85,8	8,1	67,4	10,8	57,2	7,7	51,8	7,5	41,6	3,9	22,9	5,5	16,5	3,7	11,7	2,5
Tanino (mg)		0,80	0,09	0,94	0,10	0,75	0,07	0,62	0,08	0,61	0,09	0,47	0,08				
(%)		80	4,6	94	5,2	75	5,2	62	4,2	61	4,6	47	3,8				

Quadro A 2.8. Influência do pH sobre a afinidade do ácido tânico para algumas proteínas e PEG (n=3).

pH	ÍNDICE DE TANINOS (a) NOS PRECIPITADOS											
	Gelatina		Pepsina		Tripsina		PEG					
	$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S				
2,0	0,081 a	0,022	0,343 a	0,042	0,092 a	0,028	0,078 a	0,018				
2,5	0,123 a	0,023	0,413 b	0,042	0,194 b	0,029	0,221 b	0,036				
3,0	0,516 b	0,072	0,472 b	0,024	0,356 c	0,057	0,479 c	0,046				
3,5	0,527 b	0,064	0,417 b	0,045	0,416 c	0,031	0,588 d	0,042				
4,0	0,675 c	0,069	0,404 b	0,033	0,489 d	0,062	0,666 e	0,019				
5,0	0,200 d	0,065	0,414 b	0,043	0,523 d	0,056	0,695 e	0,018				
6,0	0,111 a	0,028	0,382 ba	0,045	0,508 d	0,051	0,716 e	0,044				
7,0	0,083 a	0,013	0,091 c	0,023	0,487 d	0,039	0,615 e	0,044				
8,0	0,017 e	0,010	0,052 c	0,030	0,482 d	0,041						

(a) Azul da Prússia.

Dentro de cada coluna, valores referenciados com letras diferentes diferem estatisticamente ( $P < 0,01$ ).

## CAPÍTULO III

EFEITOS DOS TANINOS SOBRE A DIGESTÃO  
*in vitro* DAS PROTEÍNAS

3.	EFEITO DOS TANINOS SOBRE A DIGESTÃO <i>IN VITRO</i> DAS PROTEÍNAS	
3.1.	Introdução . . . . .	117
3.2.	Materiais e métodos . . . . .	118
3.2.1.	Materiais . . . . .	118
3.2.2.	Sistemas modelo . . . . .	118
3.2.3.	Análises químicas . . . . .	119
3.2.4.	Medição da digestão . . . . .	119
3.2.5.	Análise estatística . . . . .	122
3.3.	Resultados . . . . .	122
3.3.1.	Composição química . . . . .	122
3.3.2.	Efeito dos taninos de bolota e alfarroba sobre a di- gestão da caseína pela pepsina e pela tripsina . . . .	122
3.3.3.	Efeitos do ácido tânico e do PEG sobre a digestão <i>in</i> <i>vitro</i> da caseína, pela pepsina. . . . .	126
3.3.4.	Influência do PEG sobre o azoto pepsino-insolúvel de misturas alimentares contendo proporções variáveis de bolota ou alfarroba . . . . .	127
3.4.	Discussão e conclusões . . . . .	130
ANEXOS	. . . . .	139

### 3. EFEITO DOS TANINOS SOBRE A DIGESTÃO *IN VITRO* DAS PROTEÍNAS

#### 3.1. Introdução

Os taninos interferem com a digestão enzimática das proteínas, quer pela formação de complexos insolúveis com os substratos (diminuindo assim a biodisponibilidade), quer pela inactivação de várias enzimas digestivas por um processo similar à da formação dos complexos (Chibber *et al.*, 1980). Estudos conduzidos *in vitro* demonstraram que várias enzimas digestivas, nomeadamente tripsina (Feeney, 1969; Romero e Ryan, 1978),  $\alpha$ -amilase (Tamir e Alumot, 1969) e pepsina (Oh, 1978) são inibidas pelos taninos. Contudo, Oh (1978) refere que a maioria das enzimas digestivas não são significativamente inibidas por baixas concentrações de tanino, na presença de uma proteína (ASB). Jones e Mangan (1977) referem que os taninos condensados formam complexos insolúveis a pH 6-7 (pH do líquido ruminal) sendo tais complexos dissociados a pH 1 - 2, sugerindo a possibilidade dos taninos não exercerem efeitos inibidores sobre a digestão gástrica das proteínas. Goldstein e Swain (1965) sugerem que em condições ácidas, em que a ionização do agrupamento ácido fraco é suprimida, os taninos hidrolizáveis exibem características de afinidade similares aos taninos condensados, mas que a pH superior os efeitos da repulsão electrónica e maior solubilidade são de maior importância que a ligação hidrogénio. Tal explicaria a diferença entre a reactividade dos taninos condensados e a dos hidrolizáveis. Tal como as pontes protónicas, as interacções das cargas iónicas influenciam a ligação do tanino à proteína, particularmente no caso dos taninos hidrolizáveis que possuem numerosos agrupamentos carboxílicos. As ligações hidrogénio, reversíveis,



seriam independentes do pH quando este é inferior a 8; as interações iônicas, reversíveis, são pH-dependentes e podem enfraquecer ou reforçar a ligação hidrogênio. Finalmente, a ligação oxidativa, que se opera em condições aeróbias, não é provável que ocorra no tubo digestivo, embora constitua um sério problema na tecnologia dos produtos ricos em fenóis (escurecimento dos produtos e reações irreversíveis com ácidos aminados e proteínas).

O presente trabalho visou (1) o estudo da influência dos taninos (de bolota e alfarroba) sobre a digestão da caseína pelas enzimas (pepsina e tripsina), *in vitro*; (2) o estudo do efeito do ácido tânico e do PEG sobre a digestão *in vitro* da caseína pela pepsina, e (3) o estudo da influência do PEG sobre a digestão da proteína em misturas alimentares contendo quantidades crescentes de bolota ou alfarroba.

### 3.2. Materiais e métodos

3.2.1. Materiais - Os taninos semi-purificados de bolota e alfarroba foram obtidos conforme o descrito no Anexo A2.1.. A bolota foi apanhada no Outono, de *Quercus suber* e *Quercus ilex* na Herdade Experimental da Mitra da Universidade de Évora. A caseína, a tripsina (E.C. 3.4.21.4) pancreática (crist.), a zeína e o PEG 20 000 foram obtidos da Sigma Chem. Co.; a pepsina (E.C. 3.4.4.1) 1:10 000 da Difco Lab., e o ácido tânico da Carlo Erba.

3.2.2. Sistemas modelo - Sistema gástrico: o pH do modelo utilizado simulou o verificado no abomaso dos ruminantes (Church, 1979). Utilizou-se um valor de pH 1,8: solução de pepsina a  $500\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; solução de caseína a  $5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  e solução de tanino a  $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  ou  $3\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Todas as soluções foram

efectuadas com HCl 0,0075M, contendo NaCl (0,1M).

Sistema intestinal: O pH da digesta intestinal aumenta lentamente desde o valor 3,0 no duodeno até cerca de 8,0 na porção terminal do íleo (Church, 1979). Nos ovinos, devido à fraca alcalinidade das secreções pancreáticas, o pH da digesta mantém-se ácido num percurso de aproximadamente 7 metros no intestino (Ben-Ghedalia et al., 1974). No entanto nos restantes 12-15 metros de percurso a digesta atinge valores de pH 6,5-8,8. Utilizou-se um valor de pH 7,0 e soluções de tripsina ( $500\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ), caseína ( $5\text{mg}.\text{ml}^{-1}$ ) e tanino ( $1\text{mg}.\text{ml}^{-1}$  ou  $3\text{mg}.\text{ml}^{-1}$ ) em tampão fosfato, contendo NaCl (0,1M). Inicialmente utilizou-se uma solução de tripsina em HCl 0,0075N. Contudo a tripsina em ácido clorídrico resiste à inactivação pelo calor. Embora a enzima perca a sua actividade a temperatura elevada, recupera-a logo que a temperatura baixe. A temperatura de incubação foi de  $37^{\circ}\text{C}$ .

3.2.3. Análises químicas- A matéria seca foi determinada em estufa a  $103^{\circ}\text{C}$ . durante 24h; o azoto, pelo método de Kjeldahl, utilizando o selênio como catalizador; a "NDF" e "ADF" pelo método de Van Soest (1970).

3.2.4. Medição da digestão - No ensaio 1, as misturas reagentes, em tubos de centrífuga, foram incubadas em banho de água termostaticado a  $37^{\circ}\text{C}$ , com agitação periódica. Utilizaram-se 2 ml de solução de proteína, 1 ml de solução de enzima e volumes variáveis de solução de taninos para dar a concentração desejada. As misturas reagentes foram ajustadas ao volume de 4 ml com adição de HCl 0,0075M ou tampão fosfato. Para além dos ensaios a branco sem proteína adicionada, utilizaram-se em todos os ensaios (1, 2 e 3) testemunhas com enzima inactivada pelo calor (0% de hidrólise) e sem tanino (hidrólise máxima). Após 4 horas de digestão, adicionou-se

1 ml de solução de ácido tricloroacético a 40% (P/V) e os tubos foram mantidos a 4°C durante 2 horas. No fim daquele período foram centrifugados a 1 500xg e o sobrenadante eliminado. Após lavagem do sedimento com solução de ácido tricloroacético a 10% (P/V) a proteína precipitada, não digerida, foi medida utilizando o método do Biureto, modificado por *Blackburn e Hobson (1960)*: adição ao precipitado de 3 ml de NaOH 1M e 1 ml de solução de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  a 2,5% (P/V). Após recentrifugação a coloração do sobrenadante foi lida em espectrofotômetro Beckman, modelo 35, a 555 nm, ajustado a "zero" com água destilada.

No ensaio 2, o efeito do PEG e do ácido tânico sobre a digestão das proteínas do feno e do milho foi estudado fazendo incubar 500 mg de feno + 500 mg de milho grão com quantidades crescentes de ácido tânico (0 a 5% da MS incubada) adicionadas directamente aos substratos antes da adição da solução de pepsina.

No ensaio conduzido com a introdução de bolota ou alfarroba (ensaio 3), para testar o efeito do PEG sobre a digestão da proteína em misturas de alimentos contendo quantidades crescentes daqueles produtos, utilizaram-se seis misturas com a mesma quantidade de feno de aveia e vícia, e proporções variáveis de milho grão e bolota ou alfarroba. Esta formulação visou igualmente a sua utilização em estudos no rumen *in vitro* (ver capítulo IV). A introdução do feno nas misturas alimentares visou a obtenção de condições normais de fermentação no rumen *in vitro*. No presente estudo incubou-se 1 g da MS de cada uma das misturas atrás referidas (Quadro 3.1.), e a quantidade de N presente em cada mistura foi igualada a 2,08% da MS (13% de PB) através da adição de zeína.

Cada um dos tratamentos (níveis de bolota ou alfarroba) foi testado na ausência e na presença (5% da MS) de PEG 20 000.

Quadro 3.1. Composição das misturas de alimentos utilizadas no ensaio 3.

	MS (mg)					
Feno	----- 500 -----					
Milho grão	500	400	300	200	100	0
Bolota ou Alfarroba	0	100	200	300	400	500
Zeína	q.b. para 13% PB					

Antes do início das incubações, nos ensaios 2 e 3, adicionou-se aos balões Erlenmeyer contendo os substratos, 15 ml de solução de NaCl 0,1M. Ao fim de 1 hora adicionou-se 100 ml de solução de pepsina ( $250\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) em HCl 0,0075M e a incubação processou-se durante 4 horas, a  $37^{\circ}\text{C}$ , com agitação ocasional. Ao fim daquele período de incubação os conteúdos foram filtrados através de papel de filtro Whatman nº 54 e os resíduos lavados com água destilada (2x150 ml) a  $90^{\circ}\text{C}$ . Os papéis de filtro com os resíduos foram introduzidos em tubos de digestão e o azoto não solubilizado pelas enzimas determinado pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1970) utilizando selênio como catalizador. O azoto não solubilizado foi determinado utilizando a relação:

$$\text{N pepsino ou tripsino - insolúvel (\%)} = \frac{\text{N do resíduo} \times 100}{\text{N incubado}}$$

Todos os ensaios (1,2 e 3) foram conduzidos em duplicado e repetidos 3 vezes.

3.2.5. Análise estatística. A fim de pôr em evidência a existência de relações entre as medidas *in vitro* das quantidades de azoto não solubilizadas pelas enzimas e as quantidades de taninos adicionadas, estabeleceram-se equações de regressão a uma variável ( *Snedecor e Cochran, 1971* ).

### 3.3. Resultados

3.3.1. Composição química - A composição química dos substratos utilizados nos presentes estudos está representada no Quadro 3.2.

Quadro 3.2. Composição química dos substratos utilizados.

Substratos	MS (%)	% MS			
		Cinzas	PB	"NDF"	"ADF"
Feno	90,3	6,2	9,8	62,4	35,4
Milho grão	84,1	2,4	10,8	10,2	2,6
Bolota	64,8	1,7	4,6	34,0	22,2
Alfarroba	86,9	2,7	7,1	não determinado	
PEG	98,7	-	0,3	-	-
Zeína	98,9	-	97,7 <sup>a)</sup>	-	-
Ácido tânico	99,4	-	0,6	-	-

a) N x 6,90

3.3.2. Efeito dos taninos de bolota e alfarroba sobre a digestão da caseína pela pepsina e pela tripsina. - O efeito dos taninos, e da bolota ou da alfarroba, sobre a digestão *in vitro* da caseína foi estudado

em condições gástrica e intestinal, simuladas. As figuras 3.1.-3.4. mostram o efeito dos taninos de bolota e de alfarroba sobre a digestão da caseína, pela pepsina e tripsina, *in vitro*.

A digestão da caseína diminuiu acentuadamente à medida que se incrementaram as quantidades de taninos adicionadas. Embora a tripsina tenha solubilizado mais proteína que a pepsina na ausência de tanino (Quadro 3.3.), a tripsina foi inibida em maior grau, tanto pelo tanino da bolota ( 1,5 X ) como da alfarroba ( 1,4 X ). Por outro lado, a regressão dos valores de taninos adicionados em relação aos do azoto insolúvel forneceu coeficientes de regressão ( % de azoto insolúvel/mg de tanino adicionado) de 11,4 e 17,7 para o tanino de bolota e 47,8 e 69,6 para o tanino de alfarroba, para a pepsina e tripsina, respectivamente.

Quadro 3.3. Regressão dos valores de tanino adicionado relativamente ao azoto insolúvel em pepsina ( $Y_p$ ) e tripsina ( $Y_T$ ). ( $Y$ =% de azoto insolúvel;  $X$ =mg de tanino adicionado)

Tanino de bolota	$Y_p = 11,4 X + 26,4$	$r = 0,988$	$s_{y.x}^2 = 3,4$	$n = 8$
	$Y_T = 17,7 X + 16,8$	$r = 0,990$	$s_{y.x}^2 = 7,05$	
Tanino de alfarroba	$Y_p = 47,8 X + 18,0$	$r = 0,992$	$s_{y.x}^2 = 4,8$	$n = 9$
	$Y_T = 69,6 X + 5,8$	$r = 0,994$	$s_{y.x}^2 = 7,5$	

O efeito inibidor do tanino de alfarroba foi cerca de 4 vezes superior ao do tanino de bolota, tanto sobre a pepsina (4,2) como sobre a tripsina (3,9).



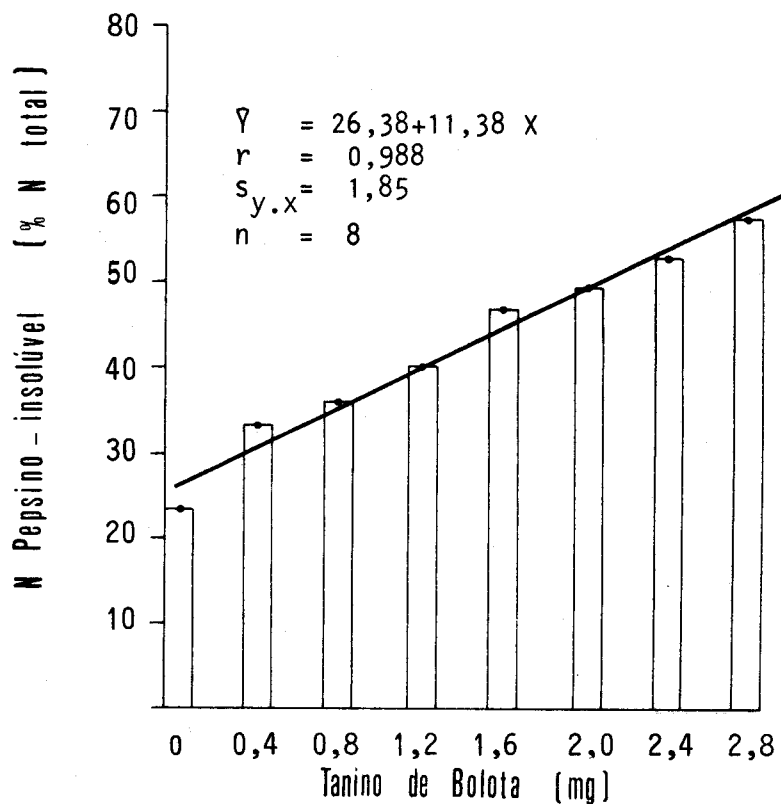


Fig. 3.1. Influência do tanino de bolota sobre a digestão *in vitro* da caseína pela pepsina. (Quadro A 3.1).

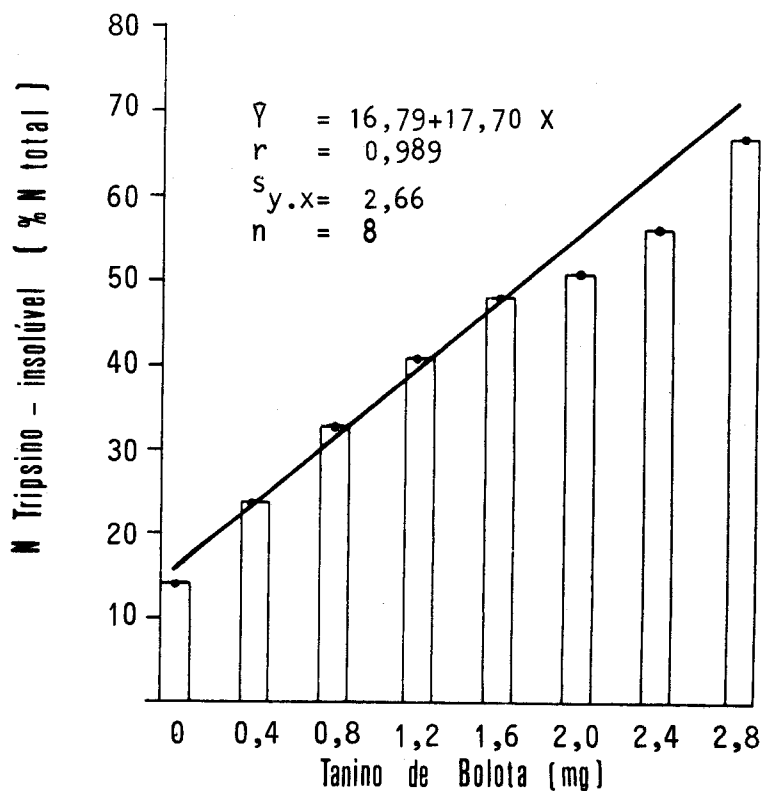


Fig. 3.2. Influência do tanino de bolota sobre a digestão *in vitro* da caseína pela tripsina. (Quadro A 3.1).

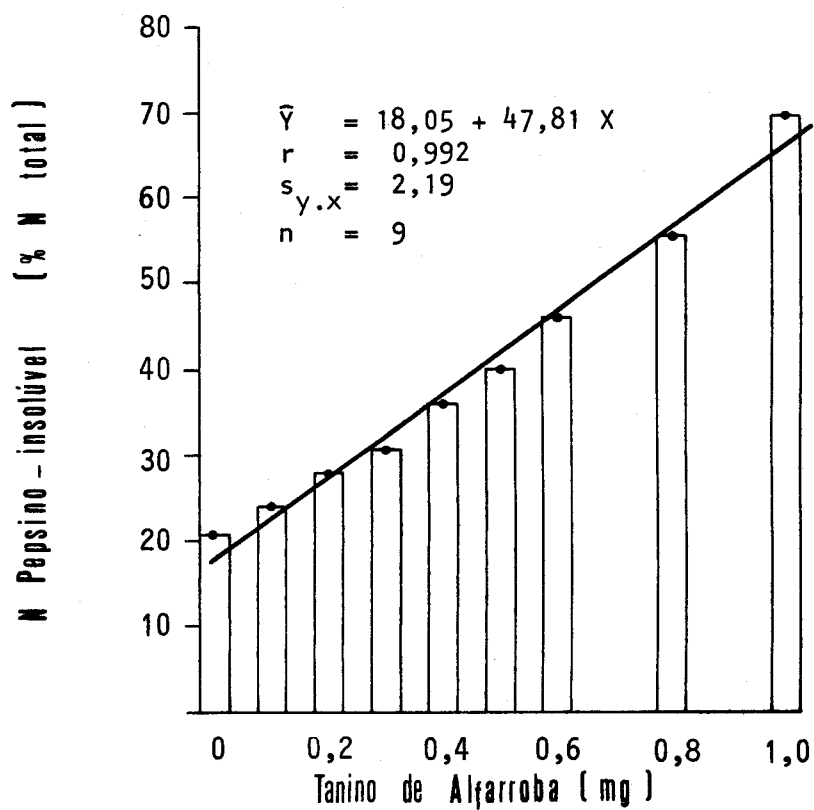


Fig. 3.3. Influência do tanino de alfarroba sobre a digestão *in vitro* da caseína pela pepsina. (Quadro A 3.2.)

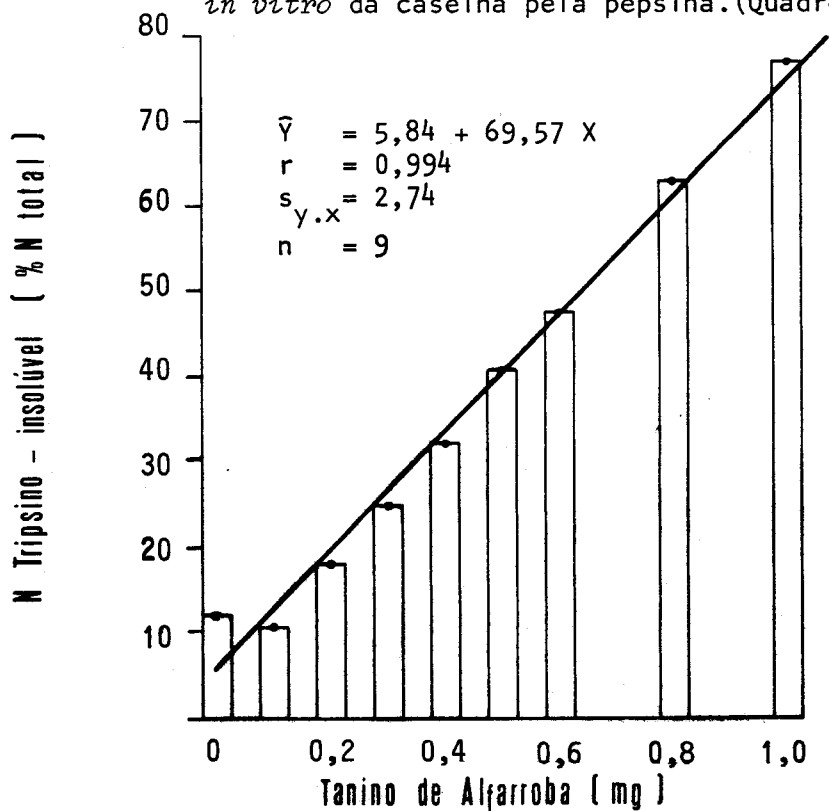


Fig. 3.4. Influência do tanino de alfarroba sobre a digestão *in vitro* da caseína pela tripsina. (Quadro A 3.2.)



3.3.3. Influência do ácido tânico e do PEG sobre a digestão *in vitro* da caseína, pela pepsina. - A figura 3.5. representa a quantidade de azoto pepsino-insolúvel, na presença e ausência de PEG, em função da quantidade de ácido tânico adicionado.

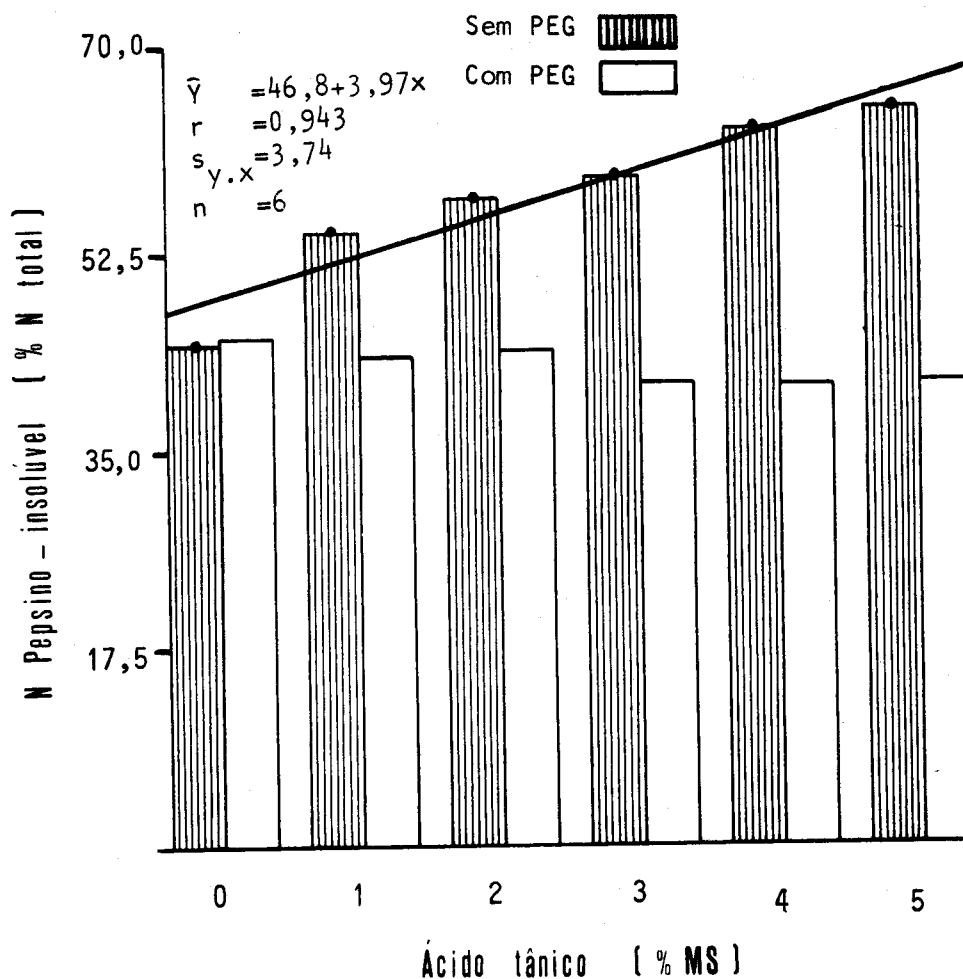


Fig. 3.5. Influência do ácido tânico e do PEG sobre a digestão *in vitro* da caseína pela pepsina. (Quadro A 3.3.)

Quando a quantidade de ácido tânico adicionada aumentou, verificou-se um incremento na quantidade de azoto não solubilizado pela pepsina. Contudo, tal incremento não foi regular. A quantidade de azoto não solubilizado aumentou abruptamente entre 0% e 1% de ácido tânico, tendo então exibido incrementos menores entre 1% e 5% de tanino. Estes incrementos foram regulares entre 2% e 4% de ácido tânico, tendo diminuído entre 4% e 5%. Estas

variações nas quantidades de azoto pepsino-insolúvel (% N total), em função das quantidades de ácido tânico adicionadas, podem ser representadas pela equação  $Y = 43,980 + 8,140X - 0,834X^2$ .

Na presença de PEG, não se verificou interacção significativa entre o ácido tânico e a solubilidade do azoto ( $r = 0,80$ ;  $P > 0,05$ ).

Dentro de cada nível de ácido tânico as diferenças observadas entre os valores de azoto pepsino-insolúvel, na presença e ausência de PEG, assume-se que traduzem o efeito do tanino presente. À medida que se aumentaram os níveis de ácido tânico, tais diferenças foram-se acentuando (Fig. 3.6.). Os incrementos nas diferenças não foram contudo lineares ( $Y = 1,186 + 8,553X - 0,793X^2$ ).

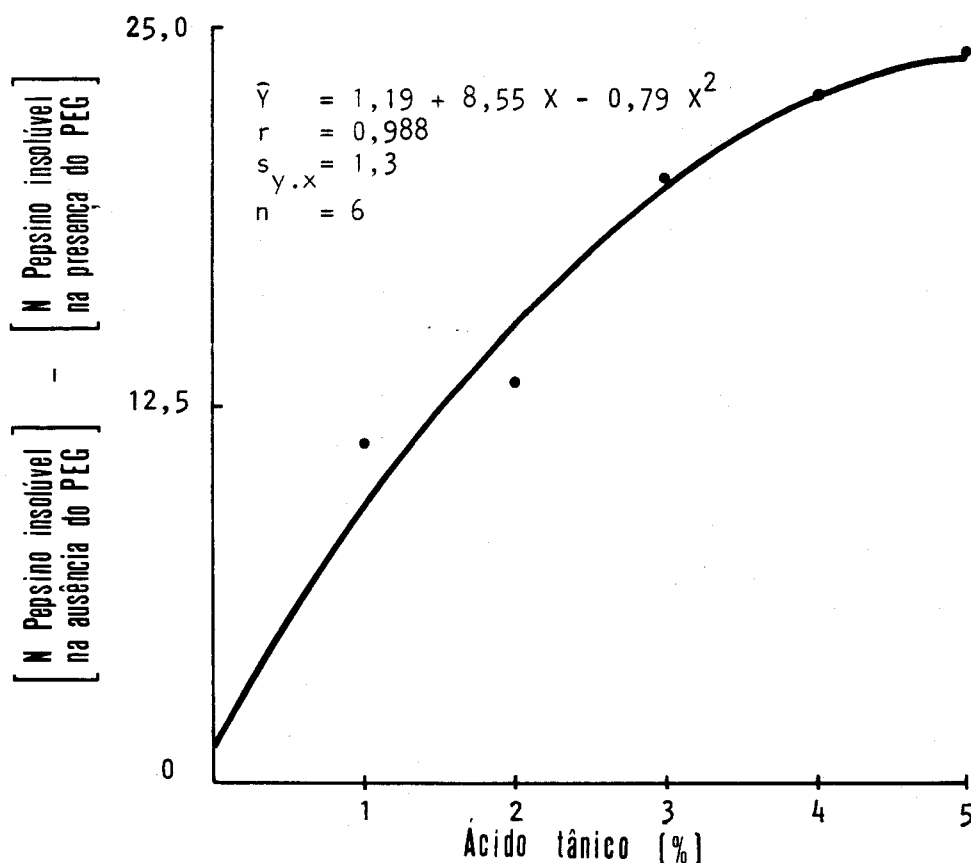


Fig. 3.6. Influência do PEG sobre a digestão *in vitro* da caseína pela pepsina. (Quadro A 3.3.)

3.3.4. Influência do PEG sobre o azoto pepsino-insolúvel de misturas alimentares contendo proporções variáveis de bolota ou alfarroba. - Os

resultados das experiências estão expressos nas figuras 3.7. e 3.8.

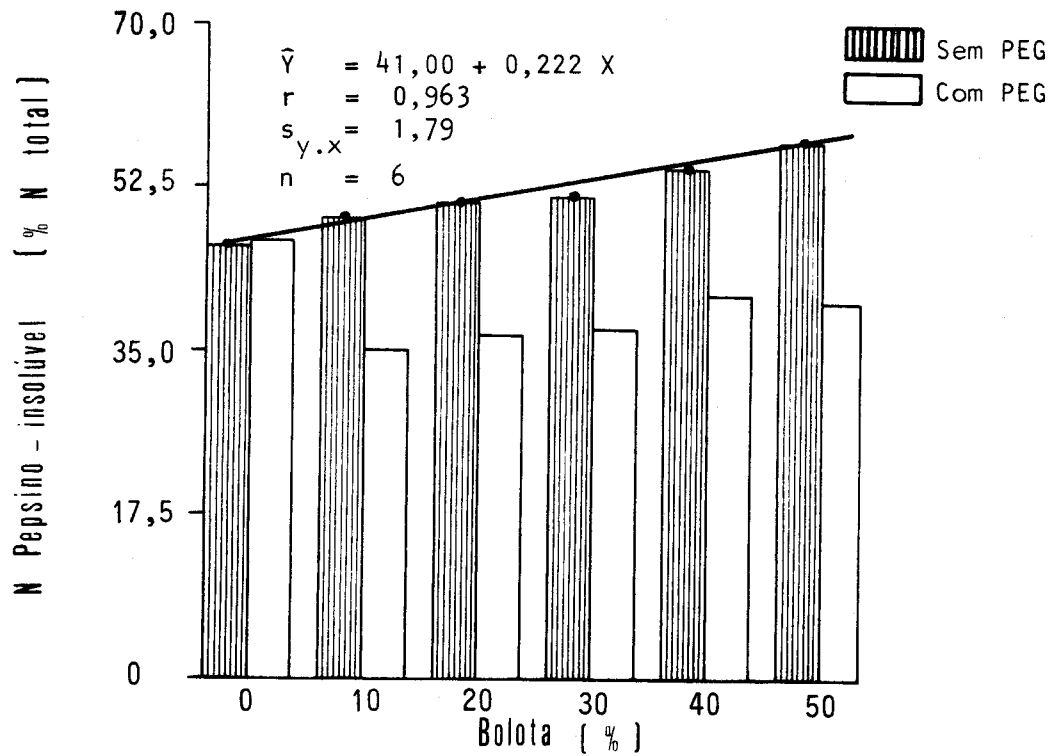


Fig. 3.7. Influência do PEG sobre a digestão *in vitro* da proteína, pela pepsina, em dietas com quantidades crescentes de bolota. (Quadro A 3.4.)

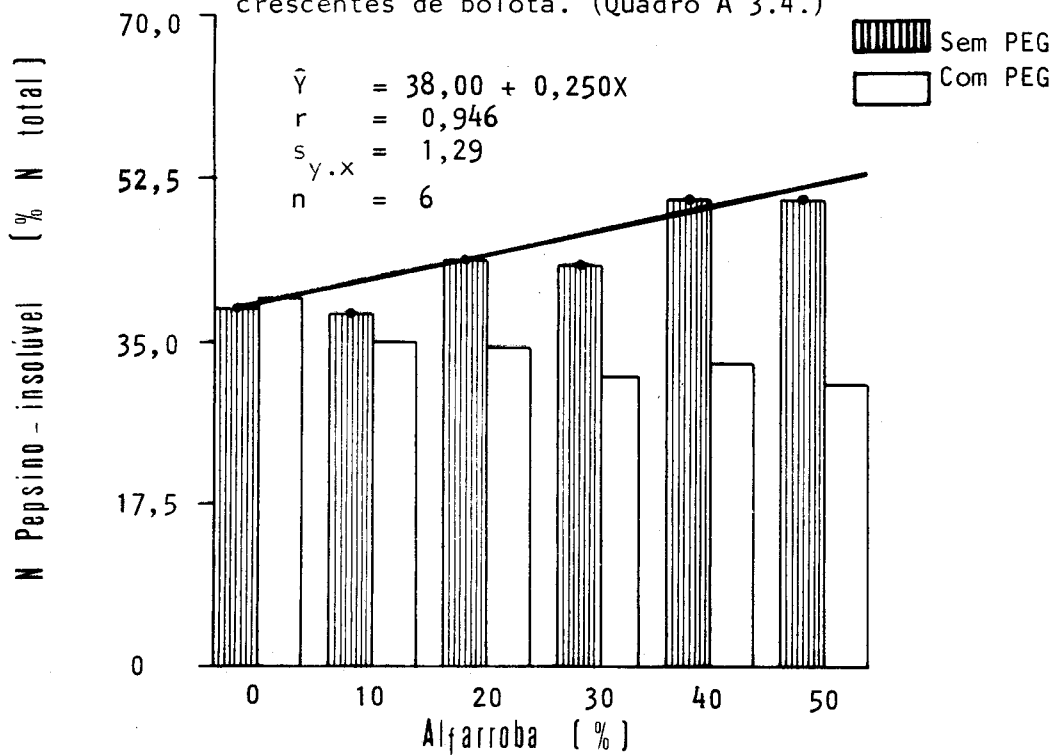


Fig. 3.8. Influência do PEG sobre a digestão *in vitro* da proteína, pela pepsina, em dietas com quantidades crescentes de alfarroba. (Quadro A 3.4.)

A adição de bolota ou alfarroba (em substituição do milho), às misturas alimentares, resultou num incremento da percentagem de azoto não solubilizado pela pepsina, ao fim de 4 horas de incubação. Tal incremento foi superior com a adição de alfarroba ( $b=0,250$ ) que com a de bolota ( $b=0,222$ ).

Não se observou nenhuma correlação significativa entre os níveis de bolota ou alfarroba nas misturas alimentares, por um lado, e a quantidade de azoto pepsino-insolúvel, por outro, quando se adicionou PEG aos substractos incubados. No entanto verificou-se uma diferença significativa na percentagem de azoto pepsino-insolúvel, aos níveis de 10% de bolota ou alfarroba, entre os incubados sem e com PEG.

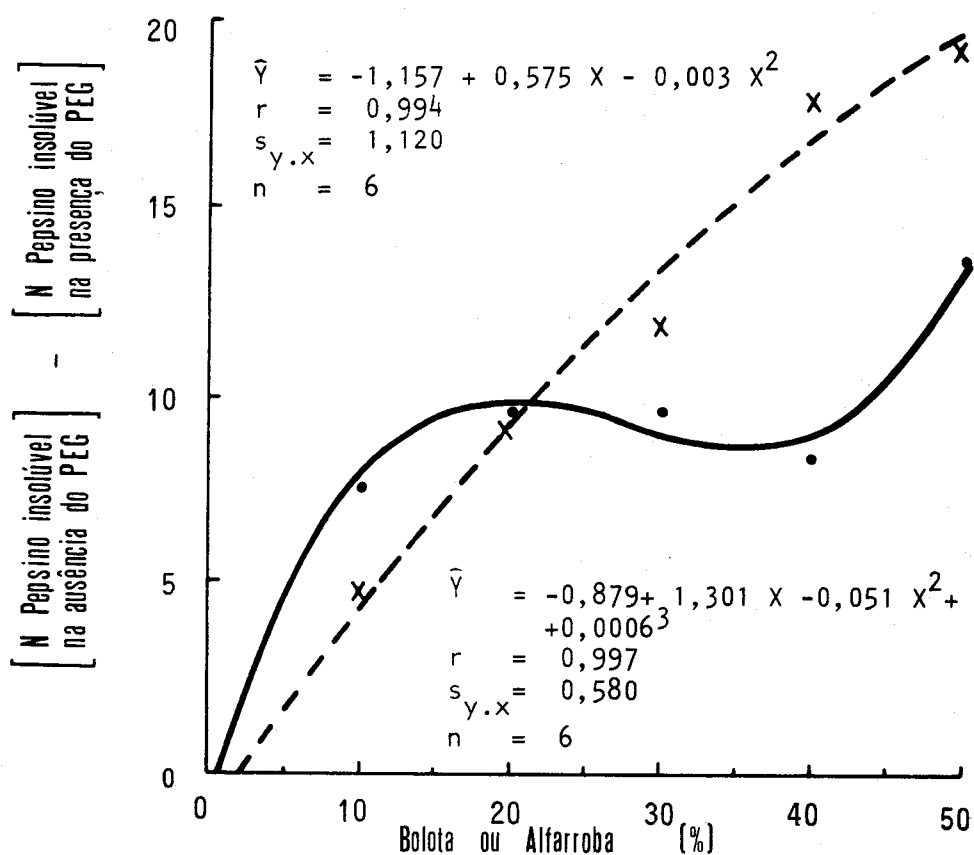


Fig. 3.9. Influência do PEG sobre a digestão da proteína, pela pepsina, em dietas contendo quantidades crescentes de bolota (—) ou alfarroba (---). (Quadro A 3.4.)

Na figura 3.9. representam-se as relações entre os níveis de

bolota ou alfarroba nas misturas alimentares, por um lado, e as diferenças observadas entre as quantidades de azoto pepsino-insolúvel na ausência e na presença de PEG, por outro. Tais diferenças (Quadro A 3.4.) pretendem traduzir os efeitos dos taninos veiculados por aqueles dois componentes alimentares. Dentro de cada nível de bolota ou alfarroba o efeito do PEG foi o de reduzir a quantidade de azoto pepsino-insolúvel, excepto na ausência de quaisquer daqueles produtos, em que não se observaram diferenças. No caso da bolota, observaram-se aumentos nas referidas diferenças até ao nível de 30%, e entre 40% e 50% de bolota. Entre 30% e 40% observou-se uma ligeira diminuição. Estas relações podem ser descritas pela parábola cúbica representada na fig.3.9. No caso da alfarroba observaram-se incrementos mais regulares nas diferenças, sendo as relações melhor expressas por uma parábola simples.

Os incrementos observados, numa base percentual, foram menos elevados para a alfarroba que para a bolota, aos níveis de 10 - 20%, tendo sido, pelo contrário, mais elevados aos níveis de 30 - 50%.

### 3.4. Discussão e conclusões

Na experiência 1 a quantidade de proteína não solubilizada pelas enzimas foi determinada pelo método do Biureto. Embora seja reconhecido que a maioria das técnicas de doseamento das proteínas sofrem interferência dos taninos, não foram observadas interferências significativas, no presente estudo, com este método. A recuperação da proteína foi de  $99,1\% \pm 1,8$ , entre 0 e 3% de tanino, não se tendo verificado diferenças significativas entre as respectivas médias (Quadro A 3.5.). A figura A 3.1. representa uma típica curva de calibração do método do Biureto.

Em ensaios preliminares verificou-se que a hidrólise da caseína não aumentava significativamente entre as 4 e 8 horas de incubação, razão pela qual se escolheu um período de incubação de 4 horas.

O efeito dos taninos de bolota e alfarroba sobre a digestão da caseína pela pepsina e tripsina, está de acordo com o referido por outros autores (Haslam, 1966; Oh, 1978). O maior efeito inibidor dos taninos da alfarroba relativamente aos da bolota, observado sobre a digestão da proteína, tanto em condições gástricas como intestinais, poderá dever-se aos tipos de tanino. Os taninos de bolota são essencialmente do tipo hidrolizável (Lozano *et al.*, 1983) enquanto que os da vagem madura da alfarrobeira são essencialmente do tipo condensado (Nachtomí e Alumot, 1963). Os taninos condensados exerceriam um efeito inibidor mais pronunciado que os hidrolizáveis sobre os sistemas enzimáticos (Gustavson, 1956; Pridham, 1960; Feeney, 1969). Ramachandra *et al.*, (1977) verificaram uma diminuição na percentagem de digestibilidade da proteína do sorgo, por acção da pepsina, de 8,58% por cada unidade de percentagem de aumento no nível de taninos do sorgo (tanino condensado), e uma diminuição de 7,89% na digestibilidade para cada 1% de aumento no ácido tânico adicionado ao sorgo pobre em tanino.

Tanto com os taninos de bolota, como com os de alfarroba, a digestão da caseína foi mais deprimida em condições intestinais que gástricas. Gustavson (1954; 1956) observou respostas ao pH marcadamente diferentes entre taninos hidrolizáveis e condensados. Estes últimos ligar-se-iam quase independentemente do pH (abaixo de 7-8), enquanto que os hidrolizáveis se ligariam mais fortemente a pH 3-4, diminuindo a ligação a pH superior a 5. No entanto, o grau de ligação tanino-proteína dependeu estreitamente do pH (Goldstein e Swain, 1965; Loomis e Battaile, 1966), particularmente do ponto isoeléctrico das proteínas (Hagerman e

Butler, 1978; Oh, 1978), em que a força de ligação foi máxima. Tamir e Alumat (1969) observaram que a tripsina,  $\alpha$ -amilase e lipase eram fortemente inibidas pelos taninos condensados da alfarroba, e que este tipo de tanino inibiu a actividade da tripsina em maior grau que o ácido tânico (tanino hidrolizável), enquanto que a lipase era inibida em maior grau pelo tanino hidrolizável. A  $\alpha$ -amilase foi inibida em igual grau por ambos os tipos de taninos. A natureza das proteínas e dos taninos, as concentrações relativas de uns e de outros (nomeadamente as relações proteína: tanino e enzima: substrato), bem como a ordem de adição dos reagentes (oportunidade para que o tanino se ligue fundamentalmente à enzima ou ao substrato) constituem, entre outros, factores que influenciam os resultados neste tipo de estudos. Assim, por exemplo, é possível que se verifique maior precipitação das enzimas na presença de algumas proteínas em relação a outras, verificando-se nessas situações uma maior depressão da actividade enzimática. Os taninos parecem associar-se predominantemente e fortemente às proteínas marcadamente hidrofóbicas (Chibber et al., 1978). A gelatina (particularmente rica em ácidos aminados hidrofóbicos) é capaz de fixar uma quantidade dupla de taninos relativamente à maioria das proteínas. Nas condições utilizadas no ensaio 1, os taninos condensados da alfarroba exerceram um efeito inibidor mais acentuado que os da bolota, tanto sobre a actividade da pepsina como sobre a da tripsina. Dado que se utilizaram extractos de taninos não purificados, não deve ser rejeitada a hipótese de parte das diferenças observadas terem sido devidas a diferentes quantidades de tanino por unidade de peso.

Em condições naturais, os efeitos dos taninos, presentes nos diferentes alimentos, sobre os sistemas enzimáticos estão dependentes das solubilidades desses mesmos taninos nas soluções em que se encontram as enzimas e os substratos. Por outro lado, o grau de associação dos ta-

ninos às próprias proteínas do substrato que os contêm, pode igualmente influenciar, não só a sua solubilidade, como também a digestibilidade das proteínas a que estão ligados. Os efeitos dos taninos de qualquer alimento sobre a digestão poderiam ser melhor avaliados submetendo esse alimento a digestão, na presença de uma substância capaz de se ligar preferencialmente aos taninos, por um lado, e que não influenciasse os fenômenos digestivos, por outro. Os taninos podem ser removidos de soluções pela adição de certos adsorventes ( PVP, PEG ), aos quais os taninos se ligam mais fortemente que às proteínas (Loomis, 1974). A PVP e o PEG têm sido utilizados para adsorverem fenóis vegetais durante a extração de enzimas foliares (Goldstein e Swain, 1965). Estes autores observaram que a PVP e o PEG eram igualmente eficazes como reactivadoras do complexo  $\beta$ -glucosidase-ác. tânico. No capítulo II ( Pág. 91 ) observou-se que o PEG era capaz de libertar a proteína do complexo tanino-proteína. No ensaio 2 foi estudada a capacidade do PEG prevenir o efeito depressivo do ácido tânico sobre a digestão da proteína alimentar, pela pepsina. Foi preferido o PEG à PVP pelo seu menor teor em azoto. A quantidade de PEG utilizada, nos ensaios 2 e 3, foi escolhida com base na observação (Capítulo II) de que o PEG parece complexar-se quantitativamente com o tanino desde que aquele se encontre pelo menos em quantidade igual à do tanino presente. Jones e Mangan (1977), em estudos com tanino de sanfeno, observaram que o PEG libertava o tanino dos complexos tanino-proteína quando se encontrava a concentrações de 1 a 5 vezes as da proteína. A concentrações de PEG superiores, verificaram supressão da libertação da proteína. O resultado da adição de ácido tânico, à mistura alimentar incubada, foi o esperado: diminuição na percentagem de azoto solubilizado pela pepsina. No entanto, tal diminuição não foi linear. Ao contrário do observado por outros autores (Ramachandra et al., 1977),



o aumento na percentagem de azoto pepsino-insolúvel foi decrescendo com o aumento no teor em ácido tânico adicionado. O facto de a adição de PEG ter eficazmente evitado a depressão na digestão da proteína ( Fig. 3.5.) confirma o observado por outros autores que utilizaram quer ácido tânico (Rayudu et al., 1970b) quer sorgo rico em tanino (Mc Ginty, 1969; Ford e Hewitt, 1979) em ensaios *in vivo*, com aves. Assim, as diferenças de digestibilidade observadas, para cada nível de tanino, na ausência e presença de PEG, traduzem os efeitos dos taninos, já que o PEG não parece influenciar a digestão enzimática da proteína na ausência de tanino (Quadros A 3.3. e A 3.4.). Contudo o PEG pode não complexar todo o tanino se este se encontra previamente ligado à proteína. Jones e Mangan (1977) verificaram que a reacção de permuta do tanino do sanfeno, no complexo tanino-proteína, com o PEG dependia da quantidade de tanino no complexo (relação tanino-proteína) e da idade do complexo antes da adição do PEG. Aumentos nestes dois factores diminuíram a permuta. O efeito idade dos complexos tanino-proteína poderia ser devido, quer a um rearranjo molecular do complexo, tempo-dependente, de forma que alguns dos sítios de ligação hidrogénio não seriam acessíveis ao PEG, quer a auto-oxidação do tanino em quinonas, seguida de ligação covalente aos grupos funcionais da proteína (Loomis, 1974). A primeira hipótese parece ser a correcta já que em condições acídicas (pH 3) os complexos envelhecidos (24 h) foram quase completamente dissociados ( $> 90\%$ ) (Jones e Mangan, 1977). No presente estudo estes factores não estiveram presentes já que a oportunidade de ligação do tanino às proteínas, ou ao PEG, foi idêntica (adição simultânea). As diferenças observadas na percentagem de azoto pepsino-insolúvel, para cada nível de tanino adicionado, entre os incubados sem e com PEG, aumentaram à medida que aumentou a quantidade de tanino, embora de forma não linear (Fig. 3.6.). Os incrementos decrescentes

observados poderiam dever-se ao facto de o PEG ter complexado cada vez menos tanino à medida que aumentou a relação tanino-proteína. No entanto, tal hipótese não parece ser verdadeira já que os aumentos observados nas percentagens de azoto pepsino-insolúvel em função dos níveis de ácido tânico adicionados também foram curvilíneos.

No ensaio 3, conduzido para avaliar o nível a partir do qual a incorporação de bolota ou alfarroba numa mistura alimentar influencia negativamente a digestão da proteína pela pepsina, devido aos taninos veiculados por aqueles componentes, determinou-se a quantidade de azoto pepsino-insolúvel em misturas alimentares com quantidades crescentes de bolota ou alfarroba incubadas durante 4 horas com e sem PEG. Na ausência de PEG, a depressão observada na digestão da caseína foi apenas ligeiramente superior para a alfarroba relativamente à bolota. Numa base percentual a alfarroba contém menor quantidade de taninos extraíveis (3,6) que a bolota (5,0) (ver Cap. II). Apesar desse menor teor em taninos extraíveis a alfarroba exerceu um efeito depressivo (a níveis idênticos) ligeiramente superior ao da bolota, confirmando assim o efeito mais depressivo observado no ensaio 1. Apesar da menor solubilidade dos taninos condensados em meios aquosos, relativamente aos hidrolizáveis (Haslam, 1966), em condições acídicas os taninos condensados são facilmente extraídos (Burns, 1966), enquanto que os taninos hidrolizáveis podem sofrer certo grau de hidrólise (Haslam, 1966). No entanto o material finamente moído é capaz de, através dos taninos, fixar proteína em solução (Hagerman e Butler, 1980a), pelo que nas condições utilizadas os efeitos distintos exercidos pela bolota e alfarroba poderão ser devidos exclusivamente à quantidade e natureza dos taninos veiculados por aqueles produtos. Assim, confirmar-se-ia o verificado no ensaio 1: um efeito depressivo mais acentuado por parte dos taninos da alfarroba sobre a digestão enzimática da caseína. Os resultados expressos na Fig. 3.9. para a alfarroba seguem a

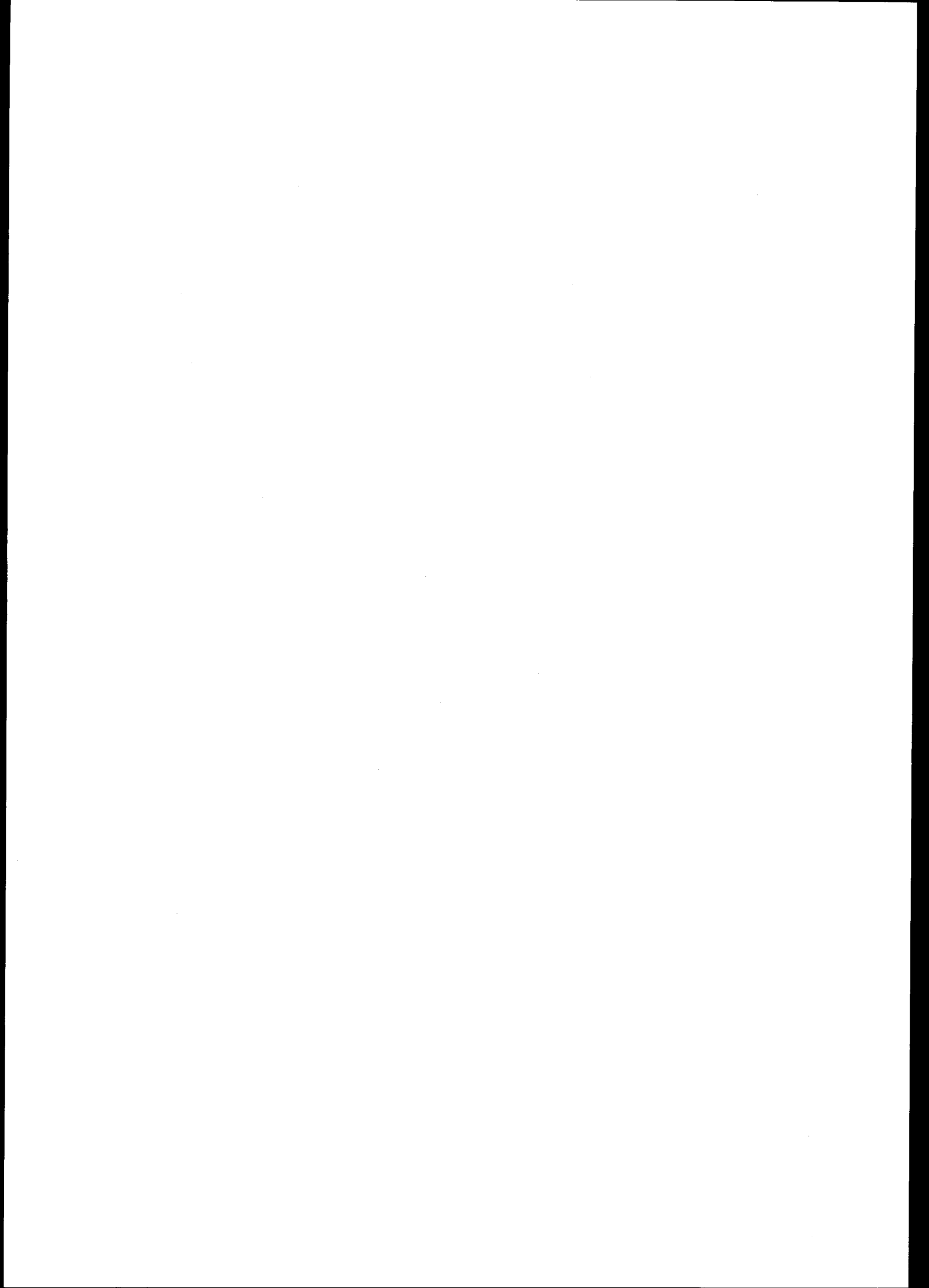
mesma tendência dos observados na Fig.3.6. para o ácido tânico adicionado ao substrato incubado na presença e ausência de PEG. Contudo, a curva representativa dos valores obtidos com a bolota é algo atípica. A ligeira diminuição observada no efeito aparente dos taninos (diferenças entre os valores observados na ausência e presença do PEG) pode ter sido devida à grande variação ocorrida entre réplicas que afectou negativamente os valores das médias.

A adição de zeína às misturas alimentares visou a correcção do nível proteico das mesmas com minimização das variações na natureza das proteínas presentes. Contudo a quantidade de zeína total nas misturas foi diminuindo à medida que o milho foi sendo substituído pela bolota ou alfarroba, em favor das proteínas destes dois componentes. A zeína, proteína do milho altamente hidrofóbica, é bastante resistente à hidrólise pela pepsina (Lehninger, 1976). É possível que parte das diferenças observadas entre os valores de azoto pepsino-insolúvel nos incubados sem e com PEG tenham sido devidas ao efeito detergente do PEG sobre a zeína adicionada já que, pela sua hidrofobicidade é de fraca solubilidade em solventes não alcoólicos (Mc Donald, 1954; Ely et al., 1967).

Saliente-se que existem evidências de que a quimotripsina é mais fortemente inibida pelos taninos que a tripsina (Oh, 1978). Este autor verificou que a tripsina não era inibida pelo tanino de uva (tanino condensado) à concentração de 1%, sendo pelo contrário a quimotripsina fortemente inibida àquela concentração. Este fenómeno resultaria, não de uma maior afinidade do tanino para a quimotripsina, mas antes do facto desta enzima clivar preferencialmente as ligações peptídicas resultantes da participação de ácidos aminados hidrofóbicos (aromáticos).

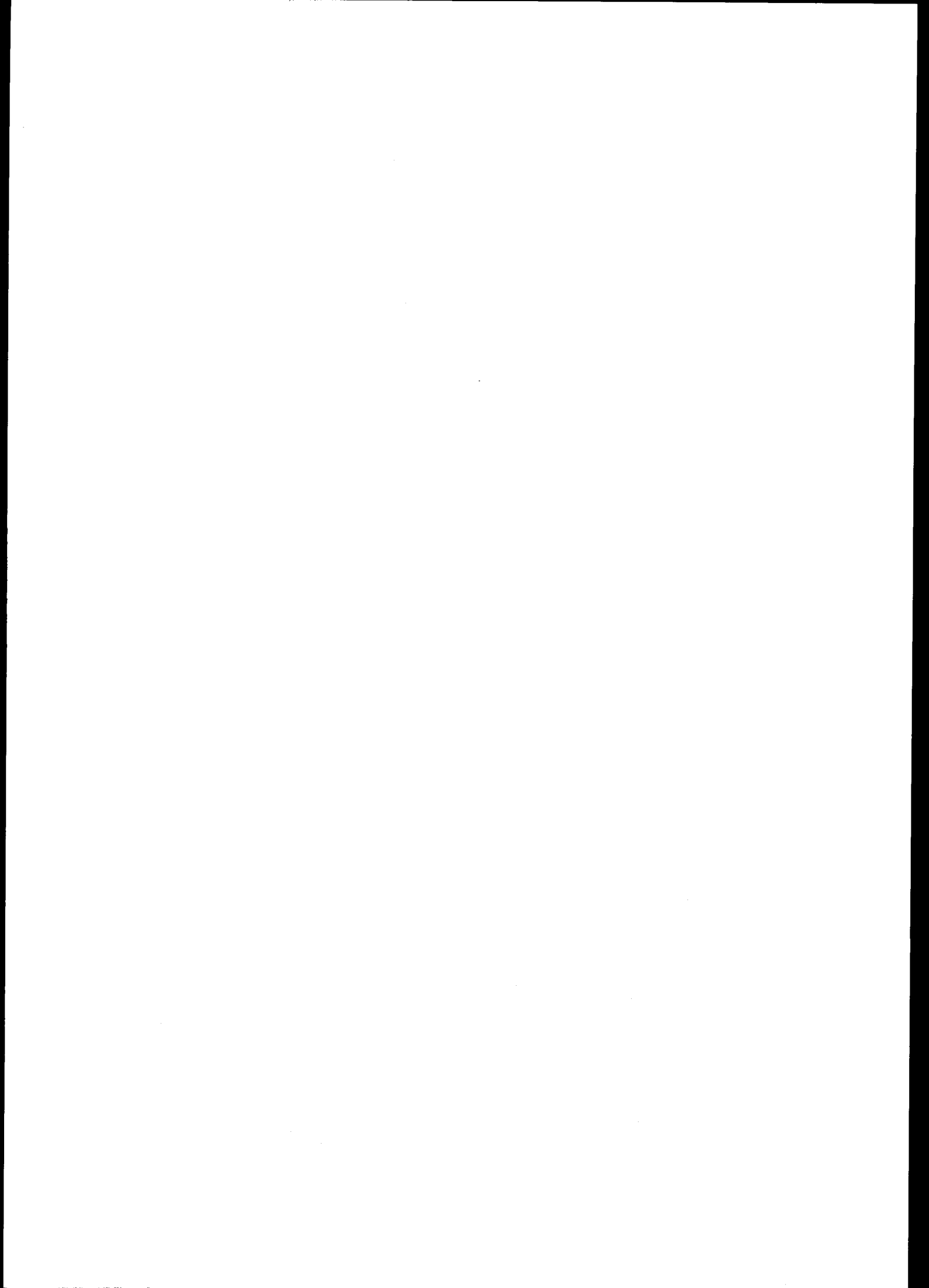
A natureza do substrato proteico pode afectar a expressão deletérea do tanino, e os resultados dos diversos ensaios podem ser afectados

de forma variável pelos tipos de proteínas utilizados. *Oh (1978)*, em estudos com tanino de uva e várias proteínas, observou que o tanino a baixa concentração inibia a digestão da albumina sérica bovina e  $\beta$ -lactoglobulina pela pepsina, mas aumentava a da mioglobina. Em condições intestinais, o tanino de uva em concentrações variáveis entre 0,1% e 1%, exerceu efeitos positivos sobre a digestão da albumina sérica bovina pela tripsina, não tendo a digestão de outras proteínas sido afectada significativamente. *Oh (1978)* sugeriu que os taninos poderiam desnaturar as proteínas naquelas condições, provocando deformações estruturais e tornando-as mais vulneráveis ao ataque enzimático. *Gustavson (1954)* verificou que as proteínas desnaturadas fixavam mais tanino que as proteínas nativas. É possível que os agrupamentos hidrofóbicos internos sejam expostos ao tanino aumentando as interacções hidrofóbicas entre os taninos e as proteínas desnaturadas. A maior exposição da proteína à enzima poderia ser em parte anulada por uma maior força de ligação do tanino à proteína. Alternativamente *Oh (1978)* sugeriu a possibilidade das diferentes respostas das várias proteínas terem sido devidas a um fraccionamento dos peptídeos no decurso da digestão. Assim, quando a  $\beta$ -lactoglobulina foi digerida pela tripsina poder-se-iam ter formado maiores quantidades de peptídeos básicos que com a albumina. Os taninos poderiam então ligar-se preferencialmente àqueles peptídeos, enquanto que pequenos peptídeos e peptídeos ácidos permaneceriam em solução e seriam digeridos pela enzima. Outra possibilidade é a de que se tenha precipitado maior quantidade de enzima, por acção do tanino, na presença de uma proteína relativamente à outra, diminuindo mais severamente a actividade enzimática. Com a albumina sérica bovina os complexos tanino-tripsina formados sofreram permuta quando se adicionou o substrato proteico (*Oh, 1978*). Não se sabe se, e em que grau, tais permutas ocorrem com outros tipos de proteínas ou taninos.



CAPÍTULO III

ANEXOS



Quadro A 3.1. Influência do tanino de bolota sobre a digestão da caseína pela pepsina e tripsina *in vitro*. ( n=8 )

Quantidade de tanino (mg)	Azoto pepsino-insolúvel (% do N total)		Azoto tripsino-insolúvel (% do N total)	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
0	23,4	1,4	13,9	1,7
0,4	33,5	1,5	23,6	1,5
0,8	35,7	0,69	32,5	2,3
1,2	39,9	1,0	40,7	2,5
1,6	46,4	0,6	48,5	2,4
2,0	49,4	1,8	50,4	1,6
2,4	52,6	0,6	56,2	2,6
2,8	57,6	1,5	66,8	2,2

Quadro A 3.2. Influência do tanino de alfarroba sobre a digestão da caseína pela pepsina e tripsina *in vitro*. ( n=9 )

Quantidade de tanino (mg)	Azoto pepsino-insolúvel (% do N total)		Azoto tripsino-insolúvel (% do N total)	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
0	20,7	1,2	11,7	1,2
0,1	23,8	1,4	10,4	0,9
0,2	27,9	1,0	17,7	0,9
0,3	30,7	1,2	24,9	0,9
0,4	35,8	0,9	32,1	0,8
0,5	39,8	0,5	40,6	0,3
0,6	45,7	0,5	47,5	0,5
0,8	55,0	1,2	62,5	0,8
1,0	69,5	0,6	76,5	0,8



Quadro A 3.3. Influência do ácido tânico e do PEG sobre a digestão da caseína pela pepsina, *in vitro*. (n=3)

Ácido tânico (% MS)	PEG (% MS)	N pepsino-insolúvel (% N total)	
		$\bar{X}$	s
0	0	42,8	0,8
	5	42,5	1,2
1	0	53,6	1,4
	5	42,3	0,3
2	0	56,5	1,8
	5	43,2	0,5
3	0	60,1	0,3
	5	40,2	0,3
4	0	62,7	0,3
	5	39,9	0,5
5	0	64,4	0,4
	5	40,2	0,3

Quadro A 3.4. Influência do PEG sobre a digestão *in vitro* da proteína pela pepsina, em dietas com quantidades crescentes de bolota ou alfarroba (n=6).

Produto rico em tanino (% MS)	PEG (% MS)	N Pepsino-insolúvel (% do N total)			
		Bolota		Alfarroba	
		$\bar{X}$	s	$\bar{X}$	s
0	0	40,9	1,3	38,5	2,5
	5	41,7	0,9	39,9	2,7
10	0	43,9	0,8	40,0	2,0
	5	36,4	1,1	35,2	2,4
20	0	46,2	0,8	43,7	3,6
	5	36,6	1,0	34,4	2,0
30	0	45,7	1,0	43,1	3,3
	5	36,2	0,8	31,2	2,1
40	0	49,3	1,3	50,4	3,5
	5	40,9	0,9	32,4	2,3
50	0	53,3	0,8	49,9	2,7
	5	39,8	1,0	30,5	3,0

Quadro A 3.5. Recuperação da caseína, na presença de taninos de bolota, pelo método do Biurêto (n=3).

Caseína adicionada (mg)	Tanino adicionado (mg)	Caseína encontrada (mg ± s)	Recuperação (% ± s)
10	0	9,93 0,07	99,3 0,7
10	1	10,20 0,24	101,6 2,4
10	2	9,80 0,60	98,0 6,0
10	3	9,75 0,20	97,5 2,0
TOTAL		9,92 0,20	99,1 1,8

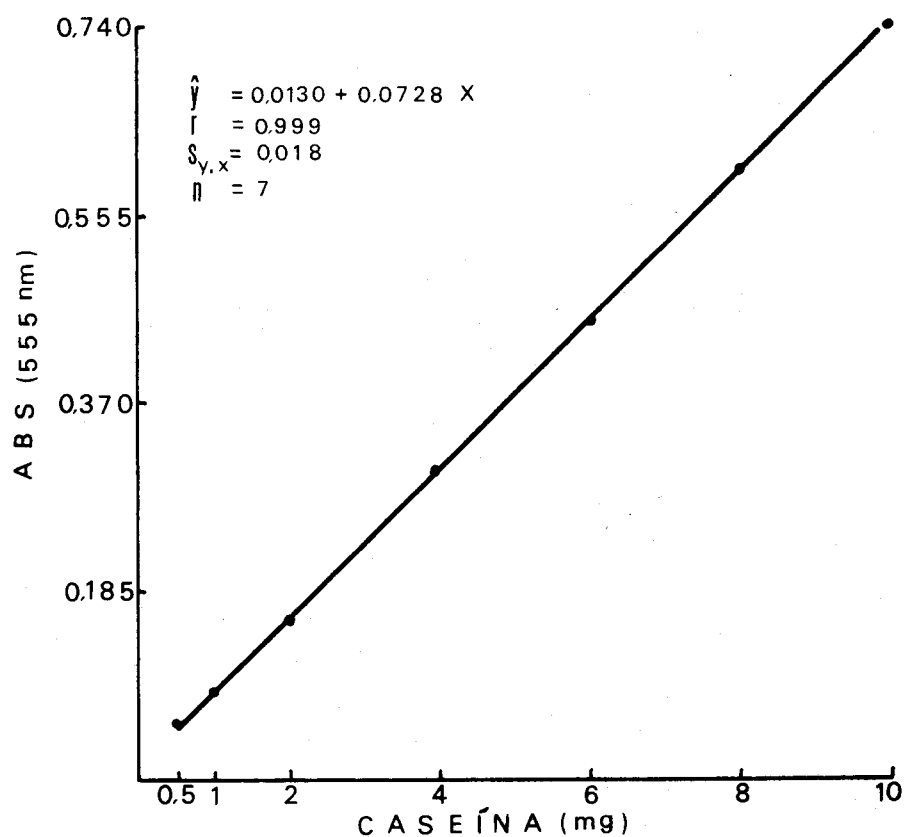
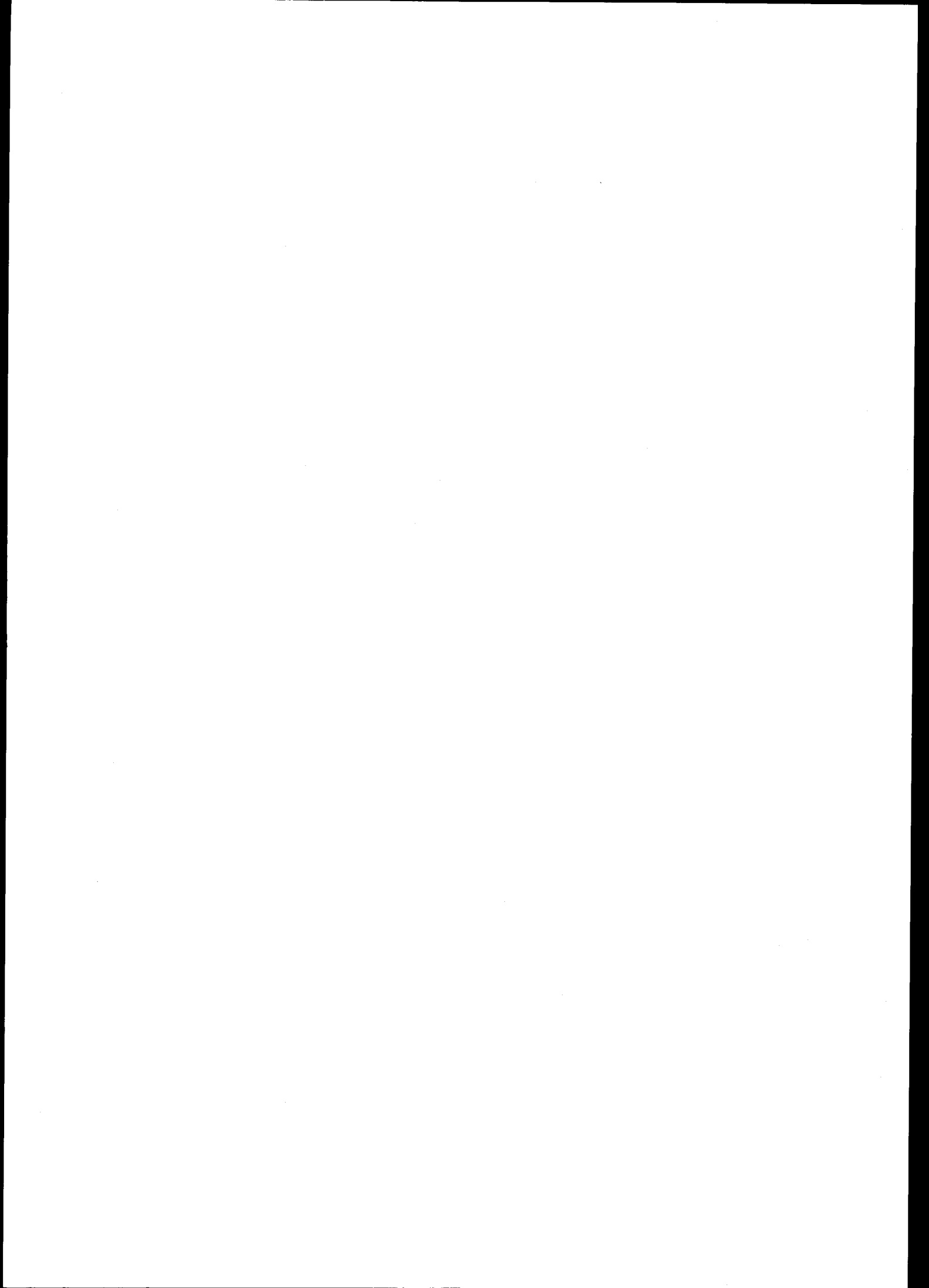


Fig. A 3.1. Curva padrão da caseína com reagente biurêto

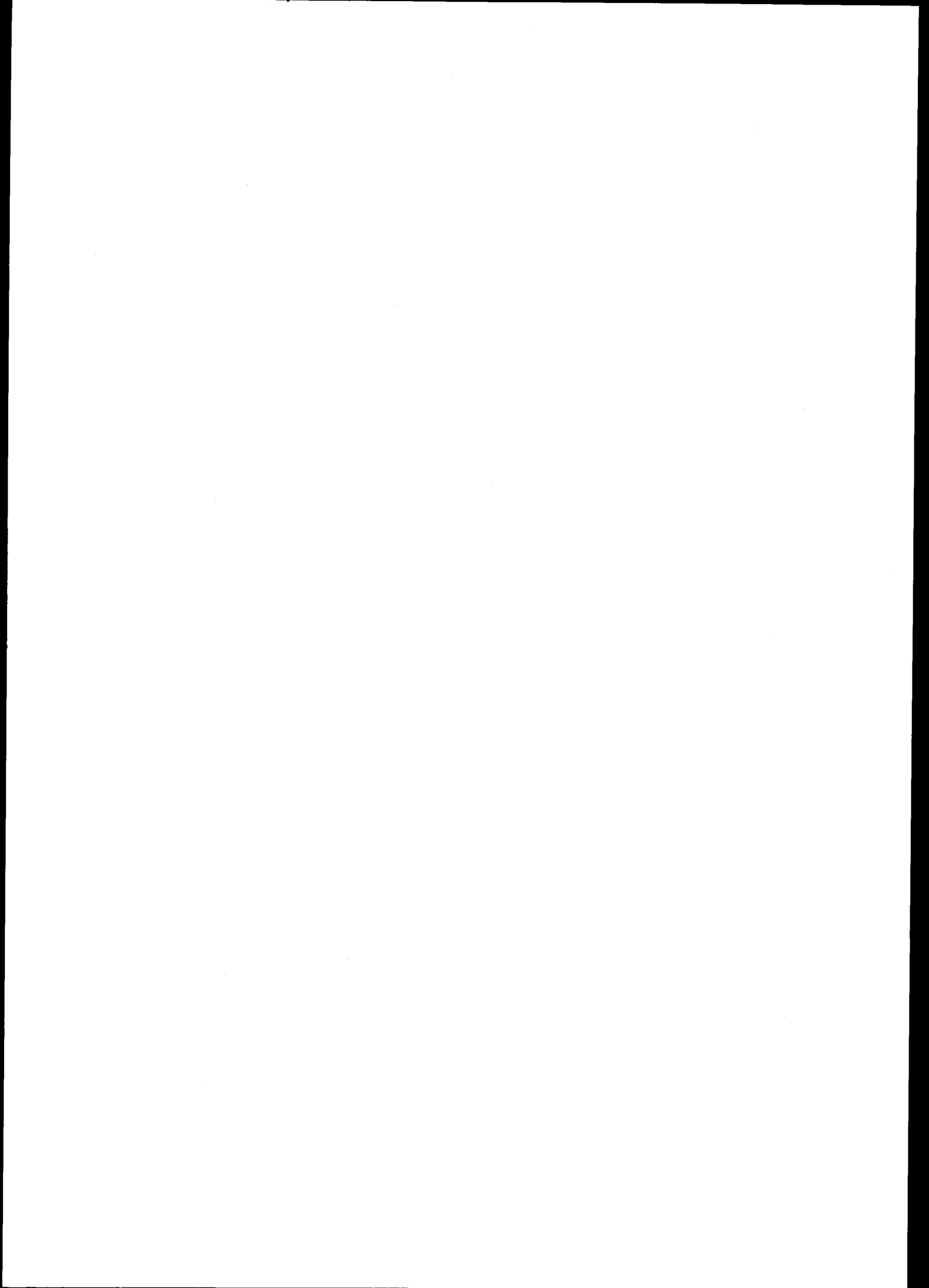


## CAPÍTULO IV

INFLUÊNCIA DOS TANINOS DA BOLOTA, E DO PEG,  
SOBRE A FERMENTAÇÃO NO RUMEN *in vitro*

4.	INFLUÊNCIA DOS TANINOS DA BÓLOTA, E DO PEG, SOBRE A FERMENTAÇÃO NO RUMEN <i>IN VITRO</i>	
4.1.	Introdução . . . . .	149
4.2.	Materiais e métodos . . . . .	151
4.2.1.	Materiais . . . . .	151
4.2.2.	Análises químicas . . . . .	152
4.2.3.	Adaptação e desenvolvimento de técnicas de estudo da fermentação no rumen <i>in vitro</i> . . . . .	154
4.2.3.1.	Aparelho de incubação . . . . .	162
4.2.3.2.	Alimentação dos ovinos fistulados dadores de inóculo . . . . .	163
4.2.3.3.	Colheita, processamento e diluição do inóculo ruminal . . . . .	164
4.2.3.4.	Preparação dos substratos e do meio de incubação . . . . .	164
4.3.	Análise estatística . . . . .	164
4.4.	Resultados e discussão . . . . .	165
4.4.1.	Método baseado nas quantidades de gases produzidos no rumen <i>in vitro</i> . . . . .	165
4.4.1.1.	Produção de gás a diferentes tempos de incubação com quantidades crescentes de substratos . . . . .	165
4.4.2.	Influência do PEG sobre a fermentação no rumen <i>in vitro</i> . . . . .	172
4.4.3.	Influência do PEG sobre a fermentação de misturas alimentares contendo proporções variáveis de bolota ou alfarroba . . . . .	175

	Pág.
4.4.4. Influência do PEG e do nível azotado sobre a fermentação da bolota ou alfarroba . . . . .	187
4.4.5. Influência do PEG e do nível azotado sobre a degradação do azoto de misturas contendo bolota e bagaço de girassol . . . . .	194
4.4.6. Discussão global e conclusões finais . . . . .	200
ANEXOS . . . . .	207



#### 4. INFLUÊNCIA DOS TANINOS DA BOLOTA, E DO PEG, SOBRE A FERMENTAÇÃO NO RUMEN *IN VITRO*

##### 4.1. Introdução

Os taninos no alimento, diminuem a digestibilidade da matéria sêca (Burns e Cope, 1974) e do azoto (Van Soest, 1982) em ruminantes.

Os taninos parecem influenciar o metabolismo do rumen em geral. Smart et al., (1961) e Cope et al., (1971) referiram que os taninos da *S. lespedeza* inibiu a hidrólise enzimática da celulose. Henis et al., (1964) observaram que os extractos aquosos de vagens de alfarrobeira exerceram efeitos bacteriostáticos sobre o *Cellvibrio fulvus*, uma bactéria celulolítica. Tagari et al., (1965) demonstraram que os taninos da alfarroba inibem a proteólise e síntese microbiana no rumen artificial. Leroy et al., (1964) referiram que a adição de taninos a bagaços de amendoim e soja reduziu, *in vitro*, a produção de amônia, sem afectar a digestibilidade. Tripathi (1978) observou que a degradação da proteína do amendoim era inibida, no rumen da cabra, pela adição de ácido tânico ou de tanino de *Shorea robusta*. O tanino de *Ziziphis mummularia* também inibiu a proteólise da caseína, no rumen *in vitro* (Kumar e Singh, 1984).

Benoit e Starkey (1968b) observaram que a urease era inibida pelos taninos da acácia. Lohan et al., (1981) referiram a inibição da actividade ureásica do fluido ruminal por extractos de *Quercus incana*. No entanto, Singh e Arora (1980) demonstraram que o tanino das sementes de *Shorea robusta* não afectava a actividade ureásica.

Os taninos inibem igualmente as produções de gás, de AGV e a



síntese microbiana no rumen. Ensaio *in vitro* evidenciaram uma forte correlação negativa entre a produção de gás, digestibilidade da MS e PB e a presença de taninos (Donnelly e Anthony, 1960; Mc Ginty, 1969; Saba et al., 1972; Burns et al., 1974; Ramachandra et al., 1977; Waterman et al., 1980). Os taninos de *Shorea robusta* inibiram a produção de AGV no rumen (Singh, 1977; 1978), mas apenas a elevadas concentrações. Sadanandan e Arora (1979) observaram no rumen de *Bos bubalus*, que o ácido tânico e o tanino de sementes de *Shorea robusta* diminuíram os níveis de N-RNA, N-DNA e AGV, bem como de N proteico microbiano total. Ben-Ghedalia e Tagari (1977) observaram que a silagem de sorgo, contendo 18,7 g de tanino/Kg de MS, era ingerida em menor quantidade, por ovinos, que a silagem de milho contendo 6,6 g de tanino/Kg de MS, e que a digestibilidade da fibra bruta e a actividade microbiana eram menores com a dieta de silagem de sorgo. Barry e Duncan (1984) observaram que os taninos do *Lotus pedunculatus* aumentaram a absorção pós-ruminal de NNA, mas deprimiram a digestão ruminal dos glúcidos facilmente fermentescíveis e da hemicelulose.

A digestibilidade *in vitro* da *Lespedeza* foi de 59% e 65%, respectivamente, em plantas de elevado (5,2% - 7,3%) e baixo (2,5% - 2,9%) teor em tanino (Donnelly e Anthony, 1970). As digestibilidades *in vitro* da *C. varia* (Burns e Cope, 1974), *S. lespedeza* (Cope e Burns, 1971), sorgo forrageiro (Arora et al., 1975), grão de sorgo (Harris et al., 1970; Hibberd et al., 1982), milho miúdo (Ramachandra et al., 1977) e fava (Bond, 1976; Buckley et al., 1983) apresentaram correlações negativas com o teor em tanino. Van Hoven (1984) observou, em quarenta espécies de arbustos, elevada correlação entre teor em polifenóis e digestibilidade da MS *in vitro*.

Apesar da evidência sugerida pela bibliografia de que os taninos deprimem, acima de determinadas concentrações, a actividade fermen-

tiva no rumen, o teor proteico da dieta é susceptível de influenciar a expressão deletérea daqueles (Price e Butler, 1980), já que percentagens elevadas de PB na dieta aleviam os efeitos depressivos dos taninos.

Apesar dos diversos ensaios conduzidos com ruminantes para avaliação do valor nutritivo da bolota (Ferreira, 1984), nenhum dos estudos se debruçou sobre a possível acção depressora dos taninos da bolota sobre a actividade fermentativa da microbiota do rumen, embora o efeito mais aparente da inclusão de bolota em dietas para ruminantes seja a diminuição da digestibilidade aparente da PB (Ferreira, 1984). Os objectivos do presente estudo foram:

- Adaptação e desenvolvimento de técnicas *in vitro* de estudo da actividade fermentativa ruminal;
- Aplicação das técnicas *in vitro* ao estudo da influência da bolota e do nível proteico da dieta sobre a actividade fermentativa no rumen.

Dado que a maior parte dos taninos da bolota são do tipo hidrolizável, e dado que a maior parte dos trabalhos realizados por diferentes autores relativamente à influência dos taninos sobre o ecossistema ruminal envolveram produtos (sorgo, fava, alfarroba, sementes de *Shorea robusta*, cãrtamo ...) que contêm fundamentalmente taninos condensados (Price e Butler, 1980; Kumar e Singh, 1984) introduziu-se igualmente a alfarroba, em alguns dos estudos, para efeitos comparativos.

#### 4.2. Materiais e métodos

4.2.1. Materiais. - A bolota e alfarroba utilizadas foram do mesmo lote das utilizadas nos ensaios descritos nos capítulos 2 e 3. O feno de aveia e vicia foi obtido na Herdade Experimental da Mitra da Universidade de Évora. Os bagaços de soja e girassol foram obtidos de lotes comerciais.

A zeína e o PEG<sub>20 000</sub> foram adquiridos à Sigma Ch. Inc., sendo os restantes reagentes de grau analítico.

4.2.2. Análises químicas.- A MS, MO, PB, amido e açúcares solúveis foram determinados conforme as técnicas usuais de análise (AOAC, 1970); a "NDF" e "ADF" pelo método de Van Soest, (1970); o N-NH<sub>3</sub> foi determinado pelo método do fenol-hipoclorito nas experiências descritas em 4.4.3. e 4.4.4. e com electrodo específico, de membrana, nas experiências descritas em 4.4.5.

Técnica do fenol-hipoclorito ( Reacção de *Berthelot* catalizada pelo pentacianonitrosiloferrato).

Reagente A - Para 1 litro: 13g NaOH + 4g EDTA dissódico

Reagente B - Para 1 litro: 10g de fenol + 0,05g nitroprussiato de sódio

Reagente C - Para 1 litro: 5g NaOH + 10ml hipoclorito de sódio (10-14%Cl)  
+ 31,8g fosfato trissódico

Dada a extrema sensibilidade da técnica os reagentes devem ser preparados com água bidestilada e tratada com uma resina de intercâmbio iônico (PERMUTIT) a fim de eliminar vestígios de amônia, e as amostras de licôr ruminal devem ser diluídas várias vezes (usualmente 5 vezes) com solução de NaCl a 12,5% (P/V) e filtradas ou centrifugadas antes das análises:

Pipeta-se para tubo de ensaio:

0,5ml de líquido do incubado, após diluição;

3,0ml de reagente A

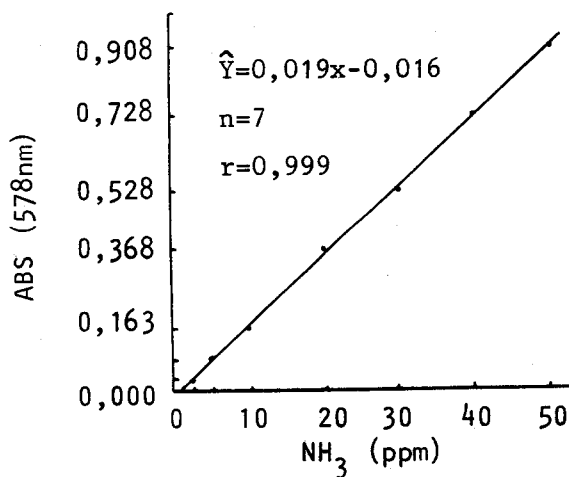
5,0ml de reagente B

5,0ml de reagente C

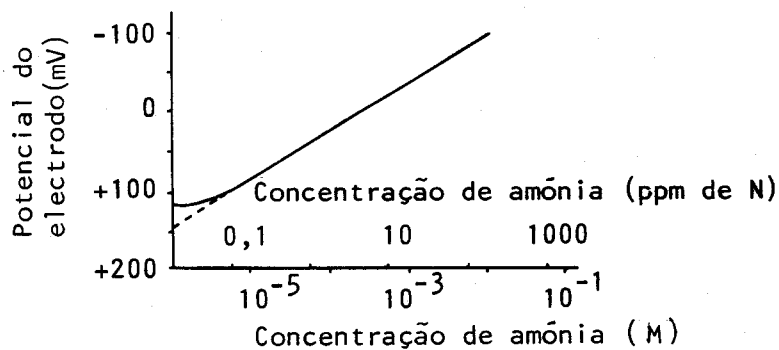
Em todos os conjuntos de amostras a analisar, são incluídos padrões e brancos. Os padrões deverão conter entre 0,25 e 8mM de amônia.

São muitas as versões desta técnica, citadas na bibliografia da especialidade, situando-se a principal diferença na quantidade de nitroprussiato utilizado; concentrações mais elevadas de nitroprussiato aumentam a sensibilidade da técnica, mas tendem a fornecer valores elevados para os brancos.

Para a curva de calibração prepara-se uma solução contendo 1 000 ppm de amônia, dissolvendo 0,382 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  em água bidestilada, tratada com PERMUTIT, e perfazendo o volume a 100 ml. As soluções padrão de trabalho são feitas diluindo alíquotas apropriadas da solução padrão (1 000 ppm). As soluções padrão de trabalho, por nós utilizadas, continham geralmente 2,5; 5; 10; 20; 30; 40 e 50 ppm de  $\text{N-NH}_3$ . Nas nossas condições a temperatura foi mantida sempre constante ( $20^\circ\text{C}$ ) e as leituras efectuadas



Curva padrão da amônia com o reagente fenól-hipoclorito



Exemplo de resposta do electrodo de amônia (Orion, mod. 95-10)

45 minutos após a adição do reagente C, a 578 nm.

Medição directa da concentração de amônia com um electrodo específico de membrana (Orion, mod. 95-10) e um medidor de pH/mV (Orion, mod. 701A). O electrodo de amônia permite a medição de baixas concentrações de  $N-NH_3$  (a partir de  $10^{-5}M$ ) com excelente reprodutibilidade e as leituras são rápidas, sendo possível a leitura de mais de 100 amostras por dia. A sua utilização seguiu as instruções descritas no catálogo que acompanha o electrodo.

4.2.3. Adaptação e desenvolvimento de técnicas de estudo da fermentação no rumen *in vitro*.- Dada a estreita relação existente entre produção de gás e a fermentação do amido (Cafantaris, 1981) e celulose (Czerkawski e Breckenridge, 1969a ; Steingab, 1983), e a produção de AGV (Cafantaris, 1981) no rumen *in vitro*, e entre a produção de gás *in vitro* e a digestibilidade da MO, a EM e ENL determinadas *in vivo* (Menke et al., 1979; Steingab, 1983), a medição da produção do gás produzido durante o processo fermentativo parece constituir, para além das limitações inerentes a qualquer método *in vitro*, um excelente método de estudo dos metabolismos no ecossistema retículo-ruminal. A facilidade de leitura da quantidade total dos gases produzidos a qualquer momento confere a este método vantagens únicas, relativamente a outros (Tilley-Terry, 1963; Hungate, 1966; Gill et al., 1969; Mertens e Ely, 1979), em estudos da cinética do processo fermentativo. No entanto dever-se-á ter em conta que os estudos de cinética da fermentação ruminal baseados na medição do gás, AGV, ou outros produtos terminais, podem ser confundidos por variáveis eficiências microbianas já que tais produtos estão relacionados não só com o crescimento microbiano mas também com a eficiência desse mesmo crescimento.

Em muitos métodos *in vitro*, utilizados durante os últimos 20

anos, o incremento na amônia livre era tomado como medida da degradabilidade do azoto do substrato incubado. Contudo, tal medida não é mínimamente adequada já que a degradação da proteína é acompanhada da síntese microbiana que reduz o teor em amônia do sistema. O grau da síntese depende não só da natureza do azoto incubado mas também da quantidade e natureza da energia disponível do mesmo substrato. Um método *in vitro* alternativo deverá separar o efeito da síntese proteica sobre o conteúdo em amônia, do da degradação da proteína sobre aquele teor. Se aceitarmos que a síntese proteica microbiana no rumen é afectada principalmente pela quantidade de energia fermentescível dos glúcidos, desde que a amônia não constitua um factor limitante, deveremos, num método alternativo, ter em consideração a quantidade de glúcidos fermentados pelas bactérias.

A produção de  $\text{CO}_2$  e  $\text{CH}_4$  durante a fermentação constitui uma medida adequada da energia glucídica fermentada (Hungate, 1966; Menke et al., 1979; Steingab, 1983). Adições de amido (50 - 150 mg) a uma certa quantidade de um alimento resultam num incremento linear na produção de gás quando incubados durante 24 horas (Raab, 1980) (Fig.4.1.). Simultaneamente, verifica-se um decréscimo linear da quantidade de amônia no sistema, relativamente à quantidade de amido adicionado (Fig.4.2.) e à quantidade de gás produzida (Fig. 4.3.). Verificam-se diferenças menores nos coeficientes de regressão das equações lineares, quando derivadas de experiências com vários substratos (Quadro 4.1.). Estes indicam diferenças na eficiência da utilização da energia para a síntese proteica, os quais se podem explicar por diferenças no curso das fermentações. Os glúcidos facilmente fermentescíveis, tal como o amido, exibem maiores produções de gás que os lentamente fermentescíveis, como a celulose (Fig. 4.6.). Contudo, durante o mesmo tempo de incubação -24h - o primeiro deve dar origem a uma maior autólise de bactérias, apesar da maior produção de gás. Por isso,

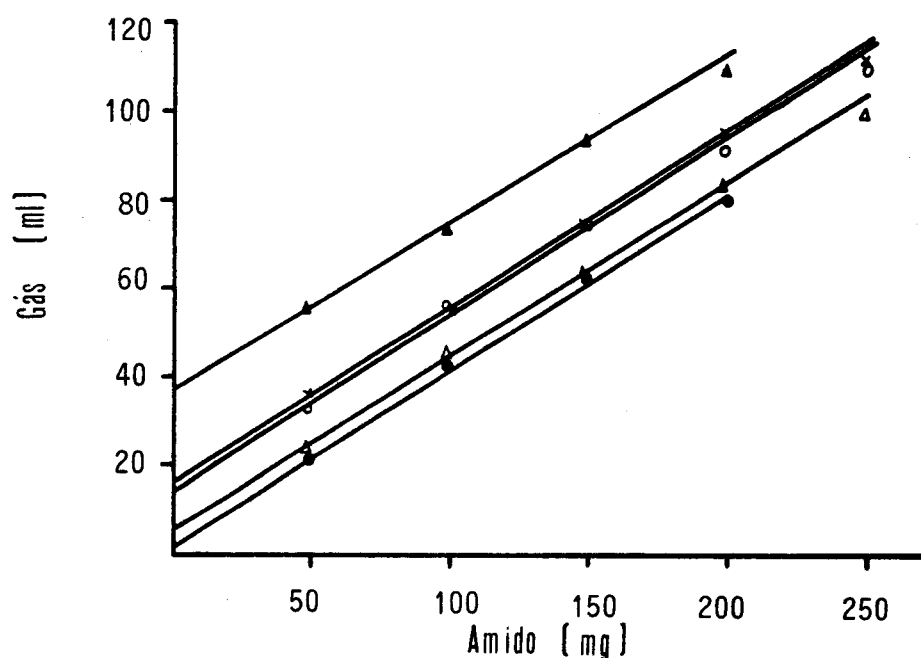


Fig. 4.1. Produção de gás após 24 h de incubação da caseína ( $\Delta$ ),bagaço de soja (o),bagaço de colza (x), feno ( $\blacktriangle$ ) e farinha de penas ( $\bullet$ ) com quantidades crescentes de amido ( Raab,1980).

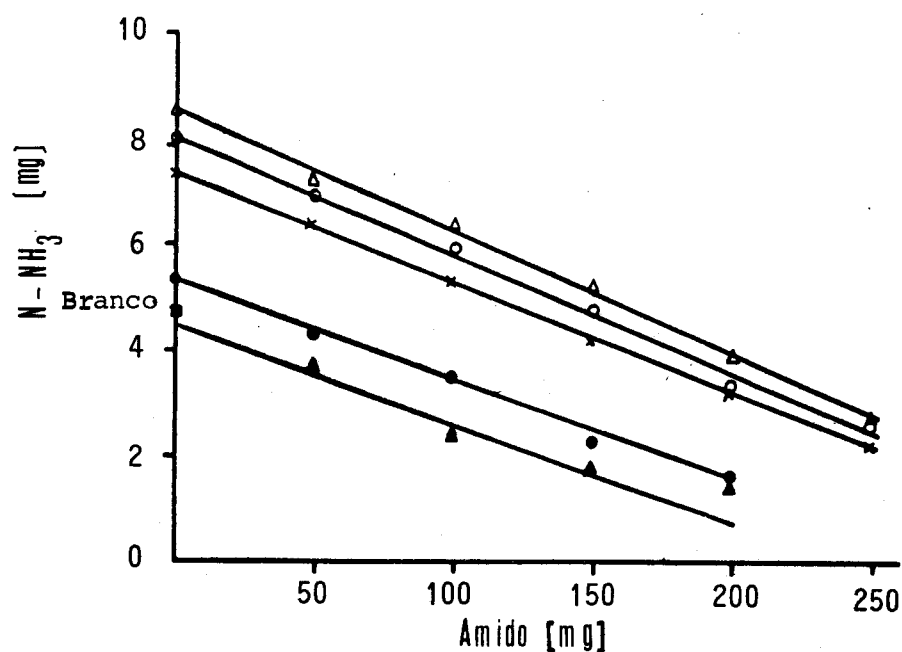


Fig. 4.2. Concentrações de amônia após 24 h de incubação da caseína ( $\Delta$ ),bagaço de soja (o),bagaço de colza (x), feno ( $\blacktriangle$ ) e farinha de penas ( $\bullet$ ) com quantidades crescentes de amido ( Raab,1980).

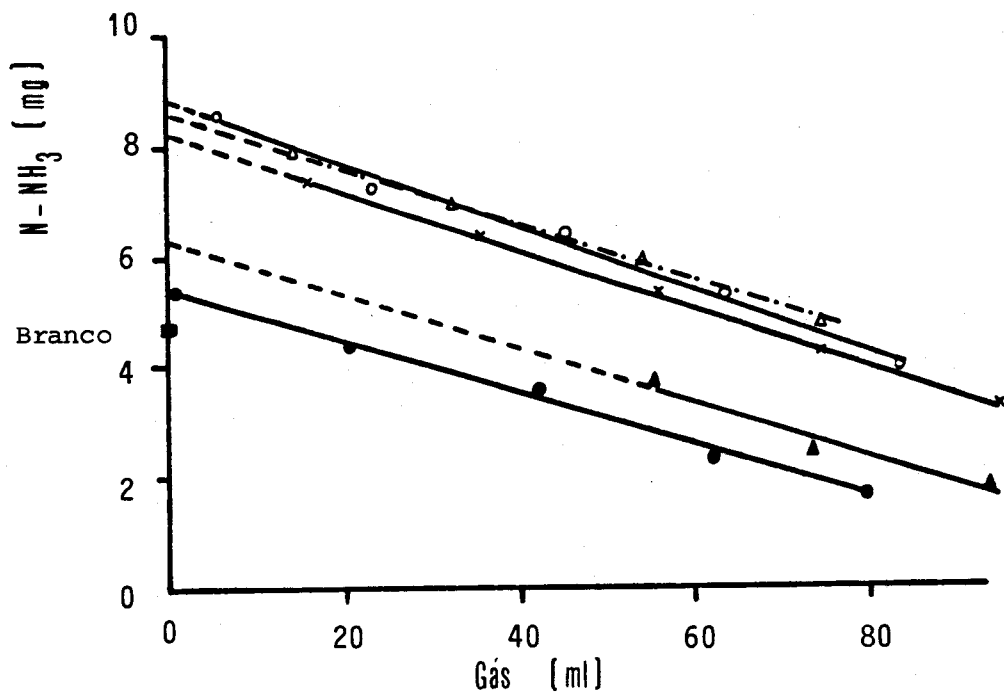


Fig. 4.3. Concentrações de amônia após 24 h de incubação da caseína ( $\Delta$ ), bagaço de soja (o), bagaço de colza (x), feno ( $\blacktriangle$ ) e farinha de penas ( $\bullet$ ) em função das quantidades de gás produzidas (Raab, 1980).

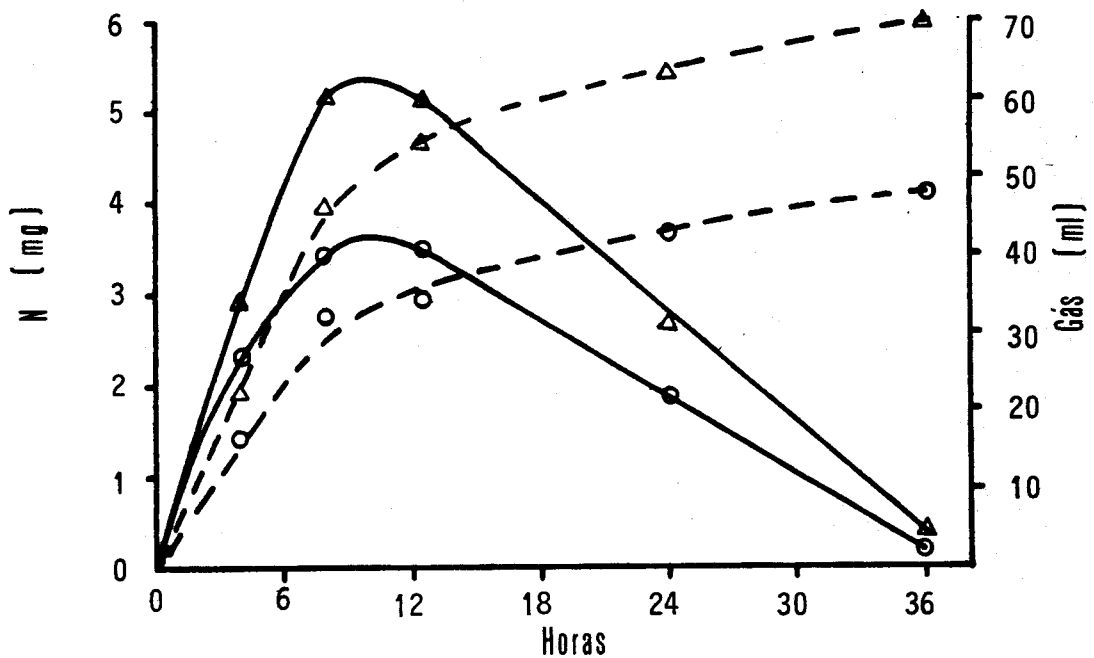


Fig. 4.4. Azoto fixado pelos microorganismos (—) e produção de gás (---), com 100mg (o) e 150mg ( $\Delta$ ) de amido, em função do tempo de incubação (Raab, 1980).



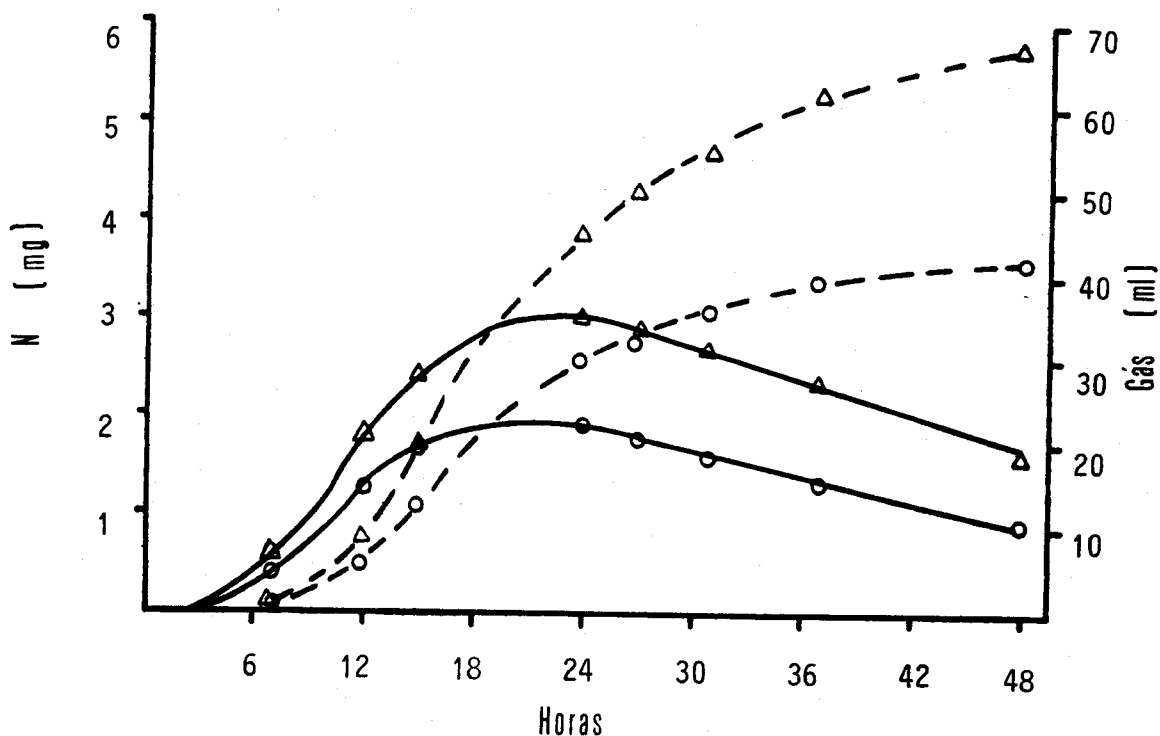


Fig. 4.5. Azoto fixado pelos microorganismos (—) e produção de gás (----), com 100 mg (o) e 150 mg (Δ) de celulose, em função do tempo de incubação (Raab, 1980).

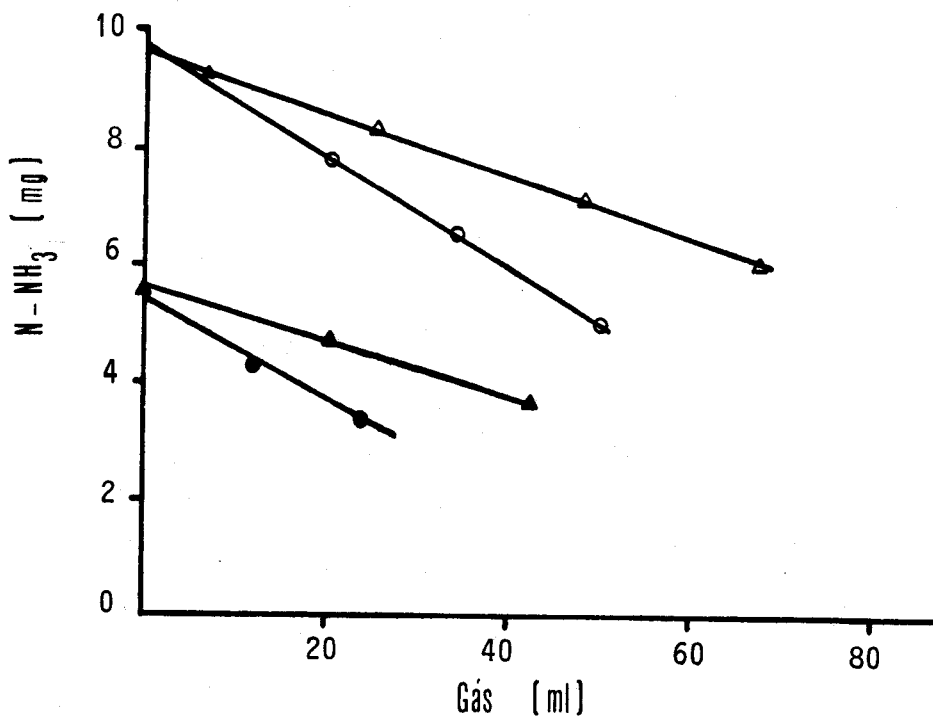


Fig. 4.6. Concentrações de  $\text{NH}_3$  após 24 h de incubação da caseína com amido (Δ) ou celulose (o), ou só do amido (▲) ou da celulose (●) (Raab, 1980).

Quadro 4.1. Regressão dos valores de concentração de amônia relativamente aos de amido adicionado (Raab, 1980).

Caseína	$Y = 8,542(\pm 0,0405) - 0,0230X(\pm 0,0006)$	$r = -0,997$
Bagaço de soja	$Y = 7,955(\pm 0,0520) - 0,0220X(\pm 0,0007)$	$r = -0,995$
Bagaço de colza	$Y = 7,322(\pm 0,0159) - 0,0205X(\pm 0,0002)$	$r = -0,999$
Feno	$Y = 4,499(\pm 0,0903) - 0,0189X(\pm 0,0023)$	$r = -0,972$
Farinha de penas	$Y = 5,299(\pm 0,0409) - 0,0186X(\pm 0,0007)$	$r = -0,996$

Y = mg N-NH<sub>3</sub>

X = mg amido

a adição de celulose em vez de amido mostra (Raab, 1980) maior eficiência da síntese proteica, quando medida às 24 horas. Dado tratar-se de incubações em sistema fechado, os fenômenos de crescimento críptico são mais acentuados que *in vivo*, ou noutro sistema aberto, e não é de estranhar que a eficiência da síntese diminua acentuadamente à medida que avança o tempo de incubação (Fig. 4.4. e 4.5.). Neste tipo de técnica a eficiência da síntese é medida através da diminuição da amônia por cada ml de gás produzido (com adição de amido) ou por mg de amido adicionado (Raab, 1980).

Apesar destas diferenças na eficiência da síntese proteica as intercepções das rectas, com amido ou com celulose, são as mesmas (Fig. 4.6.). Estas intercepções são os pontos que já não dependem da síntese proteica (produção de gás igual a "0"). Todas as alterações no N-NH<sub>3</sub> a este nível devem ser devidas a degradação. Os valores calculados para o N-NH<sub>3</sub> têm no entanto de ser corrigidos para a quantidade derivada de outras substâncias que não o alimento em questão. Subtraindo-se portanto o valor de amônia presente em amostras de licôr ruminal sem substrato adicionado (Raab, 1980):

$$\text{Azoto degradado (\%)} = \frac{\text{mg N-NH}_3 \text{ (0 ml gás)} - \text{mg N-NH}_3 \text{ (branco)}}{\text{mg N no alimento incubado}} \times 100$$

A técnica originalmente desenvolvida por Raab (1980) requer um grande número de frascos (ou seringas) para cada produto do qual se pretende conhecer a degradabilidade do azoto (15 por cada tempo de incubação). Assim, para estudar a percentagem de degradação do azoto às 8, 12 e 24 h, por exemplo, requerem-se 50 frascos para uma única amostra:

	8h						12h <sup>a)</sup>	24h <sup>a)</sup>
Frasco n.º. (Seringa)	1-3	4-6	7-9	10-12	13-15	16-18	19-34	35-50
Amostra (PB, mg)	26	26	26	26	26	0	Ibid	Ibid
Amido (mg)	0	50	100	150	200	0	Ibid	Ibid

a)- Sem tubos testemunha

Raab et al., (1983) sugeriram posteriormente a utilização de apenas dois níveis de amido, já que a intercepção da recta de regressão linear depende fundamentalmente dos valores extremos (0 e 150mg de amido) não sendo afectada significativamente pelos valores intermédios:

$$\text{Azoto degradado (\%)} = \frac{A - \left(\frac{A - B}{C - D}\right) \times C - (\text{N-NH}_3 \text{ branco})}{\text{N total do alimento incubado}} \times 100$$

A= mg N-NH<sub>3</sub> às 24h, sem amido; B= mg N-NH<sub>3</sub> às 24h com amido;

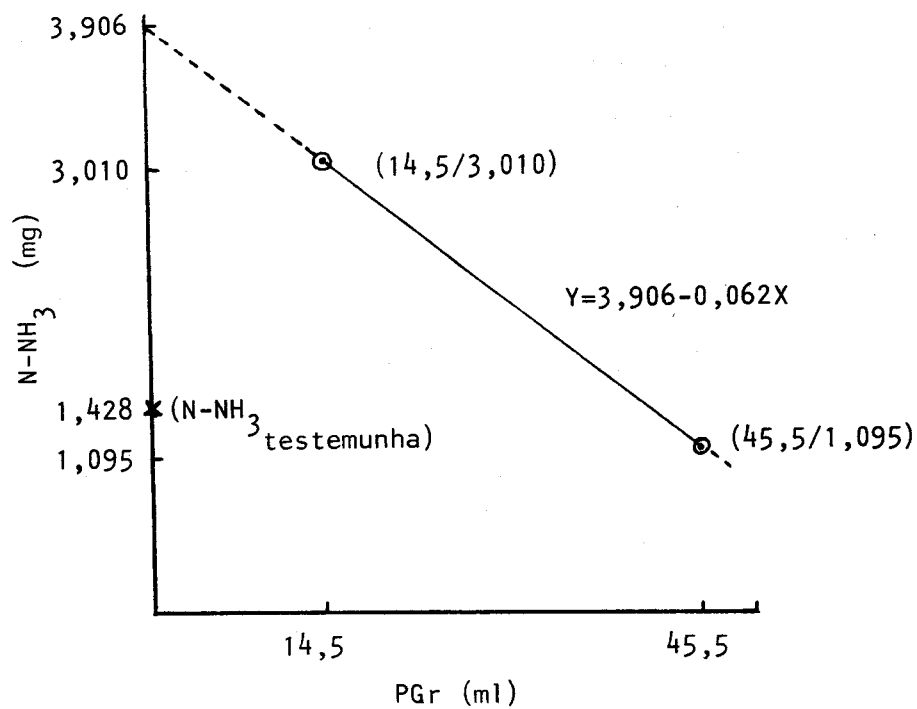
C= ml gas às 24h sem amido; D= ml gas às 24h, com amido.

Jilg (1982) utilizou apenas dois níveis de amido sobre produtos cuja degradabilidade do azoto tinha sido estudada por Raab (1980) e Matthes (1981) usando a técnica original. Confrontando os resultados obtidos pelas duas técnicas, a original e a simplificada, verificou não ter havido diferenças significativas. Em ensaios preliminares também não encontramos diferenças significativas entre as duas versões, pelo que seguimos sempre, no presente estudo, o esquema a seguir representado com exemplificação do

cálculo da degradabilidade do bagaço de girassol ao fim de 24 horas de incubação:

Frasco No.	Bagaço de girassol		PGa (ml)	PGr (ml)	N-NH <sub>3</sub> (mg) <sup>3</sup>
	N (mg)	Amido (mg)			
1 - 3	4,16	0	18,5	14,5	3,010
4 - 6	4,16	150	49,5	45,5	1,095
7 - 10	0	0	4,0	-	1,428

$$\% \text{Degradação} = \frac{3,906 - 1,428}{4,16} \times 100 = 59,6$$



4.2.3.1. Aparelho de incubação. - Vários tipos de aparelhos têm sido utilizados pelos autores para a colheita e medição dos gases de fermentação do rumen (Hungate, 1966; O'Hara e Sugihashi, 1972; Forsberg, 1978; Menke et al., 1979; Genest, 1982), sendo a utilização de seringas o método mais divulgado. Contudo, as dimensões úteis limitam a utilização de seringas com quantidades adequadas de substratos, exigindo-se o frequente esvaziamento das mesmas.

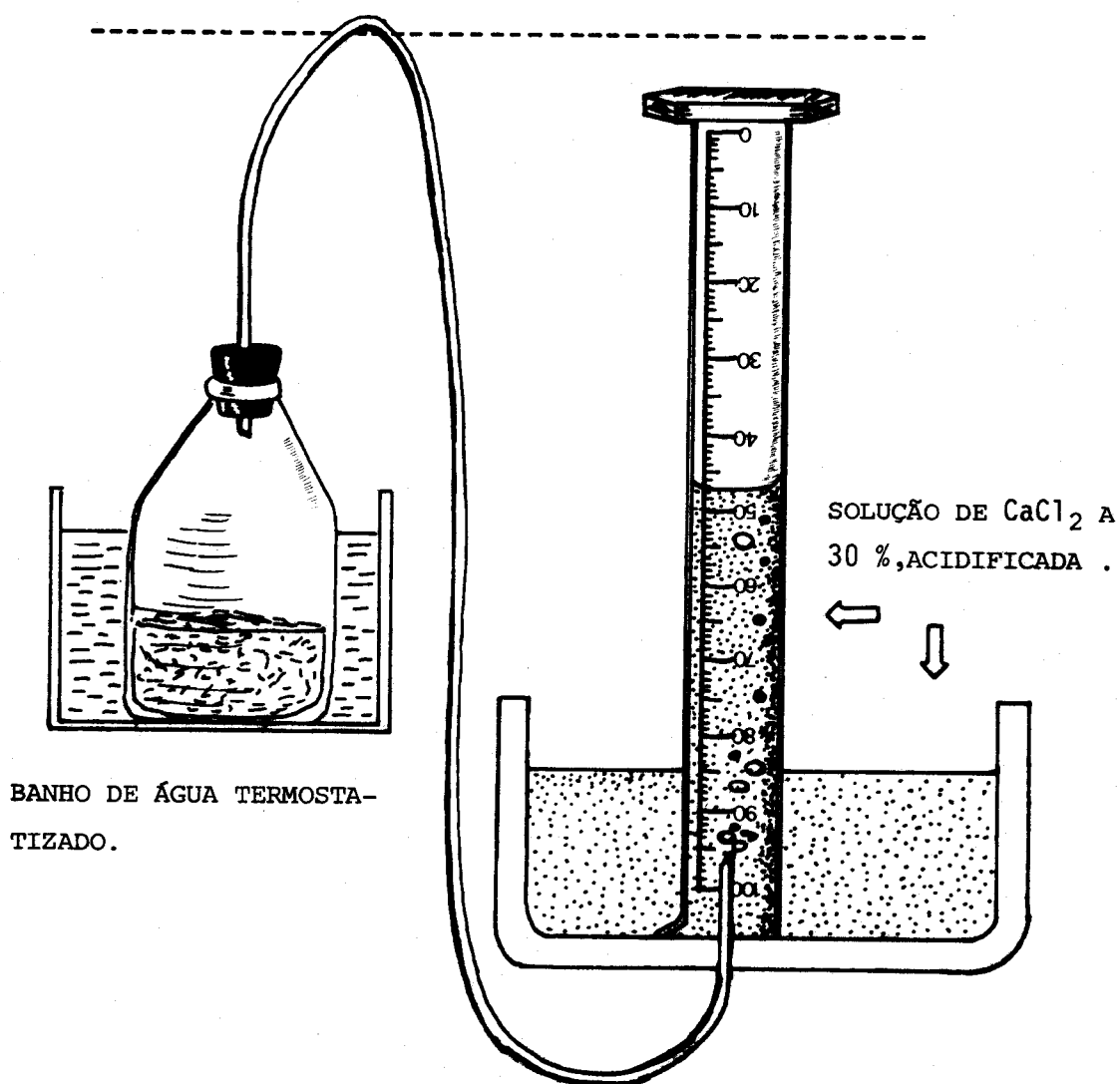


Fig. 4.7. Esquema simplificado do aparelho de incubação utilizado para os estudos no rumen *in vitro*.

Embora a sua utilização permita medições rigorosas, optámos pela utilização de um sistema diferente, da nossa autoria (Fig. 4.7.), baseado no sistema utilizado por autores Franceses no estudo da degradação da proteína no rumen *in vitro* (Verité e Journet, 1978; Genest, 1982), o qual permite a utilização de um maior número de amostras em cada conjunto e que se adequava melhor às nossas condições. Os gases de fermentação foram colhidos em provetas invertidas sobre um tabuleiro e cheias com uma solução de  $\text{CaCl}_2$  a 30%, acidificada a pH 3,5 com HCl. A fim de facilitar a leitura do nível do líquido nas provetas adicionou-se à solução a contida um corante adequado. Os substratos foram incubados em frascos de vidro com 130 ml de capacidade, rolhados com rolhas de borracha silicone, impermeável aos gases. Os tubos condutores de gases eram de plástico maleável, com cerca de 1 mm de diâmetro interno. Para tornar estanques as junções dos tubos colectores através das rolhas e do tabuleiro, utilizámos a vulcanização a frio com borracha silicone.

4.2.3.2. Alimentação dos ovinos fistulados dadores de inóculo.- O inóculo ruminal foi colhido de dois ovinos fistulados e com cânulas ruminais. Para os ensaios descritos em 4.4.3. e 4.4.4. utilizaram-se ovinos alimentados, ao nível de manutenção, com 70% de feno de luzerna (DMO = 0,67) e 30% de alimento concentrado comercial. Para os ensaios descritos em 4.4.5. os ovinos foram alimentados com 30% de feno de aveia e vicia (DMO = 0,57) e 70% de bolota integral (DMO = 0,70), suplementados com bagaço de girassol para obtenção de uma dieta com 13g de PB/100g de MS. Visou-se com esta dieta a obtenção de inóculo ruminal adaptado ao tanino da bolota.

Os animais foram alimentados duas vezes por dia, às 9h e 17h, e as colheitas de inóculo efectuadas imediatamente antes da refeição matinal.

4.2.3.3. Colheita, processamento e diluição do inóculo ruminal.- O inóculo ruminal diluído era preparado diariamente misturando 1 parte de inóculo ruminal filtrado, com 3 partes de solução tampão ruminal.

O inóculo ruminal, depois de colhido para um frasco de Erlenmeyer previamente aquecido a 39°C, e cheio de CO<sub>2</sub>, era filtrado através de 2 camadas de tecido de nylon (ETAMINE) possuindo poros de 200 µm de diâmetro.

A solução tampão ruminal era preparada diariamente, com a composição sugerida por *Tilley e Terry (1963)*. Antes da diluição do inóculo ruminal a saliva sintética era saturada com CO<sub>2</sub> e o pH ajustado, quando necessário, a 6,9. Durante todo o processamento todo o material era mantido sob fluxo de CO<sub>2</sub> e à temperatura de 39°C, a fim de garantir as condições de temperatura e anaerobiose indispensáveis à viabilidade do inóculo.

4.2.3.4. Preparação dos substratos e do meio de incubação. - Todos os materiais, à exceção do PEG<sub>20 000</sub>, zeína e bolota, foram previamente moídos através de crivo de 0,8 mm. A bolota foi ralada utilizando um ralador de cozinha. Os frascos contendo os substratos eram pré-aquecidos no banho de água a 39°C e o inóculo diluído debitado imediatamente após a sua obtenção, à razão de 40 ml por frasco, com o auxílio de um pipetador automático.

As quantidades de substratos incubados foram as indicadas em cada uma das experiências (vêr nos quadros e figuras).

#### 4.3. Análise estatística.

Para a análise estatística dos resultados relativos aos efeitos

de factores quantitativos estabeleceram-se equações de regressão e realizaram-se os respectivos ensaios de significância. Para os restantes dados, resultantes dos efeitos de factores considerados qualitativos, e após realização da análise de variância, fez-se a comparação de médias com o auxílio do teste t de STUDENT (Hicks, 1982). Dentro de cada coluna, e para cada nível de tanino, ou de produto contendo tanino, valores referenciados com asterísticos diferem estatisticamente (\* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001).

#### 4.4. Resultados e discussão

##### 4.4.1. Método baseado nas quantidades de gases produzidos no rumen *in vitro*.

##### 4.4.1.1. Produção de gás a diferentes tempos de incubação com quantidades crescentes de substratos: Fixação do tempo de incubação.

No quadro 4.2. está representada a composição química dos substratos utilizados nas diversas experiências.

Quadro 4.2. Composição química dos substratos.

SUBSTRATOS	MS (%)	% MS					
		Cinzas	PB	"NDF"	"ADF"	Amido	Açúcares solúveis em H <sub>2</sub> O
Amido de arroz	96,0	0,00	0,39	-	-	98,1	-
Celulose	97,4	0,25	0,14	97,0	93,8	-	-
Milho grão	84,1	2,40	10,80	10,2	2,6	66,1	-
Erva (azevém e trevo branco)	16,7	16,0	24,6	53,7	39,5	-	-
Feno de aveia e vicia	90,3	5,2	7,5	62,1	32,8	-	-
Bolota	64,8	1,7	4,6	34,0	22,2	44,5	5,0
Alfarroba	86,9	2,7	7,1	28,3	22,4	5,9	46,3
PEG <sub>20.000</sub>	98,9	-	0,3	-	-	-	-
Ácido tânico	99,4	-	0,6	-	-	-	-



Nas figuras 4.8. a 4.10. representam-se as produções cumulativas de gás no rumen *in vitro* com quantidades crescentes de diversos substratos a diferentes tempos de incubação. A produção de gás aumentou na medida em que se aumentaram as quantidades dos diversos substratos incubados. A cinética da produção de gás variou com a natureza dos substratos incubados (Quadro 4.3.). Assim, enquanto que com o amido a produção de gás ao fim de 12h foi de aproximadamente 61% do total produzido ao fim de 48h, com a celulose, milho grão, feno de aveia e vicia, bolota e erva foi de 14%, 54%, 47%, 62% e 63%, respectivamente (Quadro A 4.1.). A produção de gás às 24h, relativamente às 48 horas foi de 0,87; 0,67; 0,89; 0,79; 0,77 e 0,88 respectivamente.

Quadro 4.3. Produção de gás às 12h e 24h relativamente às 48h de incubação.

Substrato	PG 12h/PG 48h		PG 24h/PG 48h	
	$\bar{X}$	$\pm s$	$\bar{X}$	$\pm s$
Amido	0,61	0,06	0,87	0,06
Celulose	0,14	0,02	0,67	0,08
Milho grão	0,54	0,04	0,89	0,06
Feno de aveia e vicia	0,47	0,03	0,79	0,03
Bolota	0,62	0,05	0,77	0,02
Erva de Outono	0,63	0,06	0,88	0,02

Steingab (1983) encontrou valores de 0,83 para a glucose, 0,79 para o amido, 0,72 para a celulose de madeira, 0,37 para o pó de celulose, 0,83 para o milho grão, 0,89 para a farinha de erva desidratada, 0,79 para o feno e 0,75 e 0,60 para a palha tratada com amoníaco, pulverizada ou moída através de crivo de 3mm, respectivamente.

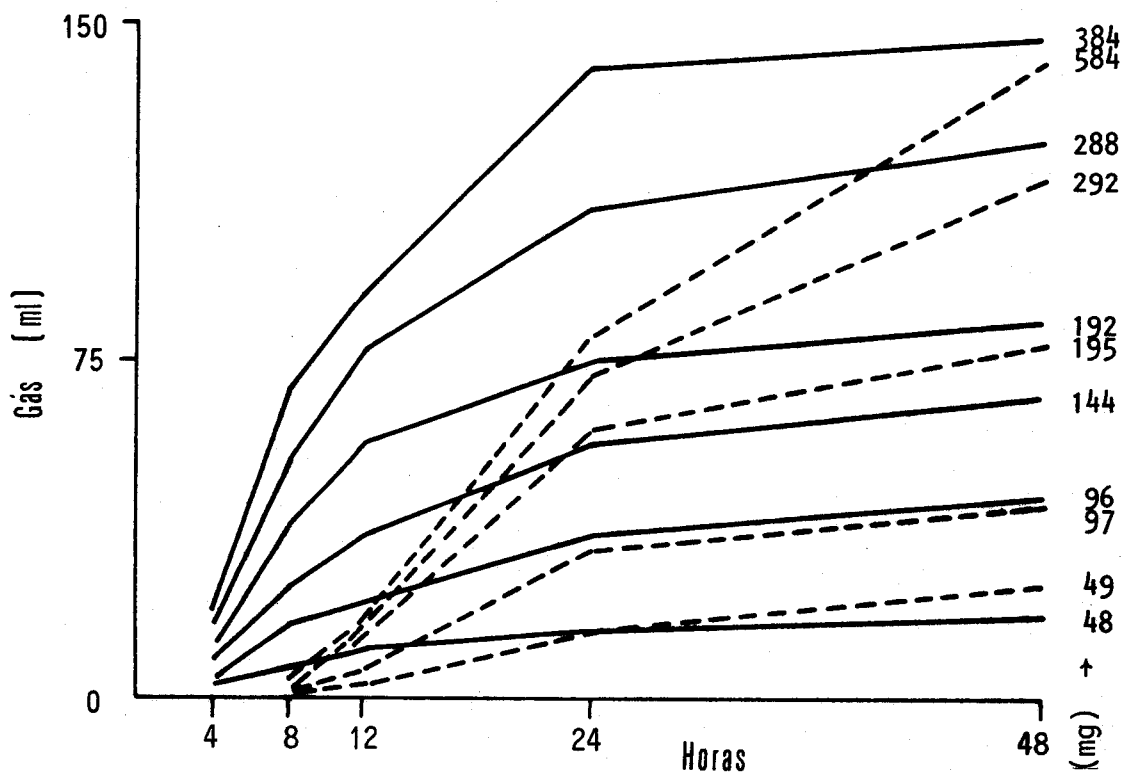


Fig. 4.8. Produção cumulativa de gás com quantidades crescentes de amido (—) ou celulose (---) incubados *in vitro* durante diferentes períodos de tempo. (Quadro A 4.1.)

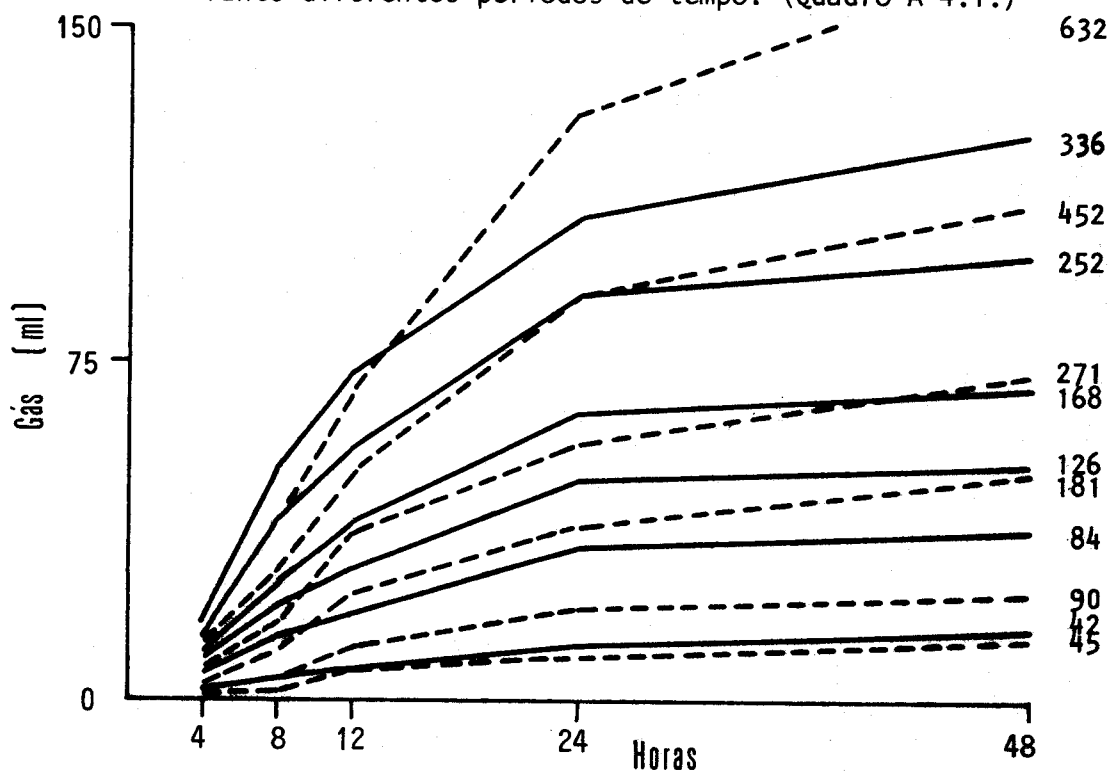


Fig. 4.9. Produção cumulativa de gás com quantidades crescentes de milho grão (—) ou feno (---) incubados *in vitro* durante diferentes períodos de tempo. (Quadro A 4.1.)

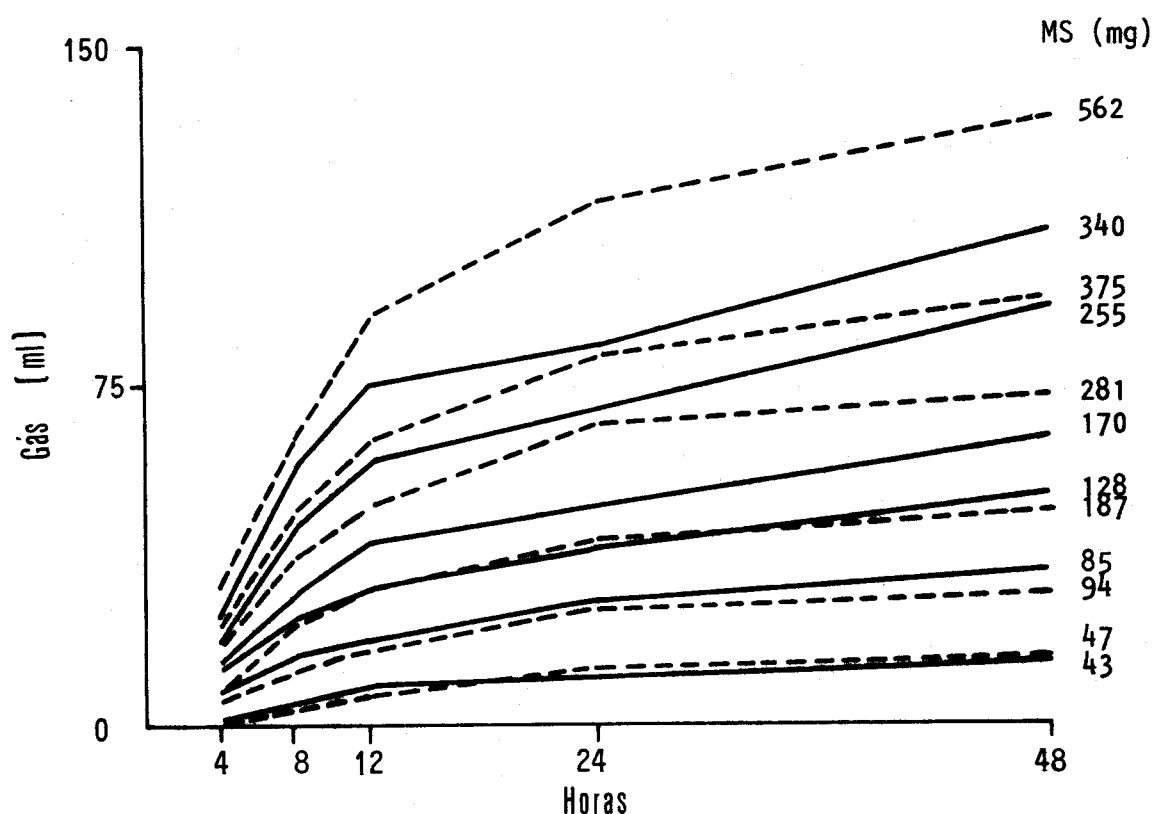
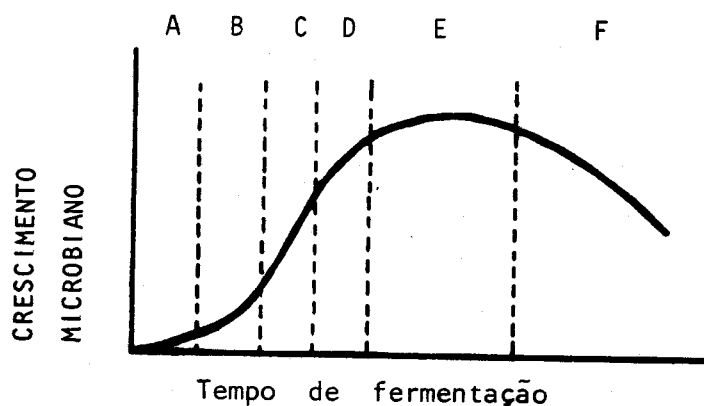


Fig. 4.10. Produção cumulativa de gás com quantidades crescentes de bolota integral (—) ou erva de Outono (--) incubadas *in vitro* durante diferentes períodos de tempo. (Quadro A 4.1.)

Dada a íntima relação existente entre produção de gás e desaparecimento do substrato (Czerkawski e Breckenridge, 1969a; Menke *et al.*, 1979; Cafantaris, 1981; Steingaß, 1983) os valores da produção de gás traduzem a digestão da MO pela microbiota no rumen. As percentagens de gás produzidas ao fim de 24 h, relativamente às 48 h de incubação situam-se dentro dos limites de valores de digestibilidade da MO dos diversos alimentos, grosseiros e concentrados, referidos pelos autores (Jarri-ge, 1978; ARC, 1980). Entre as 24 h e as 48 h de incubação os incrementos na produção de gás foram relativamente pequenos e dada a natureza do sistema estático utilizado é lícito supor que os fenômenos de cresci-

mento críptico microbiano tenham influenciado marcadamente a produção de gás para além das 24 horas de incubação. De facto, o crescimento da população microbiana num sistema não contínuo pode ser representado por 6 fases distintas: A = latência; B = aceleração; C = exponencial; D = desaceleração; E = estacionária; F = declínio e morte. Nas fases E e F manifestam-se fenómenos de crescimento críptico, e os dados experimentais in-



dicam que, *in vitro*, as fases D e E são atingidas entre as 8 e 12 horas de incubação, conforme a natureza do substrato (Raab, 1980).

Quadro 4.4. Produção de gás às 24h em função da quantidade de substrato incubado ( $Y = PG\ 24h$ ,  $X = mg$  de MS de substrato)

Substrato	Equação de regressão	n	r	Sy.x
Amido	$Y = 1,491 + 0,368X$	6	0,998	3,197
Celulose	$Y = 9,107 + 0,227X$ ( $Y = 3,022 + 0,336X - 0,0004X^2$ )	4 (6)	0,981 (0,994)	5,983 (3,700)
Milho grão	$Y = 0,374 + 0,363X$	5	0,996	3,013
Feno de aveia e vicia	$Y = 0,793 + 0,202X$	6	0,999	2,214
Bolota	$Y = 0,365 + 0,281X$	5	0,996	2,366
Erva de Outono	$Y = 5,200 + 0,199X$ ( $Y = 1,041 + 0,242X - 0,00007X^2$ )	6 (6)	0,996 (0,998)	3,450 (2,800)

As regressões dos valores das quantidades de gases produzidas, ao fim de 24h, relativamente às quantidades de substrato forneceram intercepções e coeficientes de regressão diferentes de substrato para substrato (Quadro 4.4.). As intercepções encontradas para a celulose e erva de Outono foram relativamente elevadas. A natureza dos materiais poderá justificar tais resultados, já que para os mesmos uma componente quadrática foi significativa.

As equações obtidas por *Steingäß*(1983) apresentam intercepções mais baixas e menores erros padrão residuais. No entanto, as gamas de quantidades de substrato para as quais se observou linearidade em relação à produção de gás foram superiores nas nossas experiências, relativamente às de *Steingäß* (1983). Tais diferenças poderão traduzir as diferentes condições experimentais. *Steingäß* (1983) deverá ter obtido leituras de gás mais rigorosas ao utilizar seringas de 100 ml de capacidade. Por outro lado, ao termos utilizado maior quantidade de licor ruminal (40 ml em vez de 30 ml) e mais diluído (1:3 em vez de 1:2) deveríamos ter assegurado uma melhor tamponização do meio de incubação, retardando o acumular de metabolitos e conseqüente abaixamento do pH, embora à custa de uma fase de latência mais prolongada. Nas condições experimentais utilizadas o substrato poderá estar em excesso acima de 250mg para o milho grão e bolota. Para o feno de aveia e vicia, e erva, o substrato não esteve em excesso nas quantidades utilizadas. A inflexão da curva acima daqueles valores de milho grão e bolota poderá ter sido devida a uma acumulação de metabolitos e conseqüente diminuição de pH. O  $\text{CO}_2$  libertado no processo fermentativo resulta fundamentalmente da neutralização dos AGV pelo  $\text{HCO}_3^-$  (*O'Hara et al.*, 1974 ). *Cafantaris* (1981) calculou esta quantidade de gás através da equação  $Y=0,024X^{1,300}$  ( $R^2=1,000$ ,  $s=0,02$ ) em que  $Y=\text{ml CO}_2$  e  $X=\mu \text{ mol AGV}$ . A diminuição na quantidade de gás produzido com aumento dos

níveis de substrato é devida, provavelmente, à depleção do tampão bicarbonato. No entanto outras razões poderão ser invocadas, nomeadamente fermentações atípicas. *Steingäß* (1983) observou que para produções de gás inferiores a 80-90ml existia proporcionalidade entre a quantidade de substrato adicionado e a quantidade de gás produzido, e que a quantidade de substrato não exerceu influência sobre os resultados, para aquela gama de valores de produção de gás. *Shöner* (1981) recomendou a utilização de 150-250mg (MS) de concentrados e 200-350mg (MS) de fibrosos, já que nessas condições a quantidade de gás produzido não atinge os 90ml. Com estas quantidades o pH ao fim de 48 h de incubação situou-se entre 6,12 e 6,85, limites considerados fisiológicos. Por dificuldades inerentes ao material disponível não procedemos no presente trabalho a medições dos valores finais de pH.

Para além das 48 horas de incubação observou-se pouca ou nenhuma produção de gás, e atendendo ao tempo médio de permanência no rumen da maior parte dos alimentos (*Jilg*, 1982), a escolha das 24 horas, para efeito de avaliação do alimento, parece justificada. *Steingäß* (1983) utilizando a mesma técnica, (200mg de substrato e 30ml de inóculo ruminal diluído a 1:2) observou, em 262 alimentos, simples e compostos, elevada correlação entre a produção de gás *in vitro* às 24 horas e o valor energético desses mesmos alimentos determinado *in vivo*. Esta técnica constitui a base de um novo sistema *in vitro* de avaliação do valor energético de alimentos para ruminantes, e foram propostas equações de regressão apropriadas (*Menke et al.*, 1979 ; *Steingäß*, 1983), baseadas num grande número de alimentos (n=262) testados *in vivo*. Tais equações apresentaram elevados coeficientes de correlação (r=0,960) e baixos erros padrão residuais (Sy.x=3,88). A base da técnica é, contudo, bastante antiga. Partindo do conhecimento de que da fermentação dos glúcidos pelos microor -

ganismos resultam como produtos finais AGV, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> e biomassa microbiana Hungate(1966), El Shazly e Hungate(1965) e El-Din e El-Sazly(1969) utilizaram a produção de gás *in vitro*, com um excesso de substrato, como medida da actividade fermentativa da microbiota do rumen, tendo observado que a taxa de produção de gás era maior com cereais que com feno. O'Hara e Sugihashi (1972) não observaram especificidade da produção total de gás relativamente a diferentes alimentos, mas sim taxas de produção de gás características para cada tipo de glúcido, e estreita correlação entre produção de gás e quantidade de substrato fermentado (O'Hara e Sugihashi, 1973). Foram ainda observadas elevadas correlações entre produção de gás no rumen *in vitro* e digestibilidade da MO (Menke et al., 1979 ; Steingäß, 1983), quantidade de amido (Cafantaris, 1981) e celulose (Czerkawski e Breckenridge, 1969a ; Steingäß, 1983) fermentados, e AGV produzidos (O'Hara e Ohki, 1973; Cafantaris, 1981).

Parece-nos assim justificada, pela sua simplicidade e economia, a utilização da técnica de estudo das fermentações no rumen *in vitro* através da medição do gás produzido. Mais informação relativa à natureza dos processos fermentativos poderá ser obtida mediante análise das percentagens relativas de CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> produzidos.

4.4.2. Influência do PEG sobre a fermentação no rumen *in vitro*. - A fim de testar a utilidade do PEG na determinação do efeito dos taninos sobre a fermentação ruminal testou-se o efeito daquele polímero sobre a fermentação de substratos, contendo ou não taninos, no rumen *in vitro*. Utilizou-se para o efeito um excesso de substrato e as condições experimentais definidas em 4.2.3. Nos resultados expressos no quadro 4.5. omitiram-se, para simplificação, os valores intermédios de PEG utilizados. 5% foi a percentagem de PEG com a qual se conseguiu sempre a maior pro-

Quadro 4.5. Influência do PEG sobre a fermentação no rumen *in vitro* <sup>a)</sup> (n=3)

Substrato (g de MS)	PEG (%MS)	Produção de gás ( ml ± s )			
		3 h	6 h	12 h	24 h
Milho Grão (1)	0	24,5 1,7	40,0 2,0	106,0 1,4	195,0 2,7
	5	25,0 1,6	40,0 1,7	107,0 2,1	193,0 2,9
Milho grão (1) + 4% ác. tânico	0	18,5 1,5	39,0 2,0	70,2 2,4	142,0 3,0
	5	22,0* 1,7	37,0 1,7	87,0*** 2,3	169,0*** 3,2
Bolota sem cas- ca (1,2) + ba- gaço de soja (0,12)	0	17,5 1,1	44,0 1,3	99,0 1,6	127,0 1,8
	5	21,0** 0,9	51,0*** 1,3	130,0*** 2,4	165,0*** 2,8
Alfarroba (1)	0	53,3 4,2	85,2 3,9	- -	151,5 3,1
	5	78,5*** 4,0	124,8*** 3,7	- -	174,6*** 6,2
Folhas de azinheira (Q.ilex) (1)	0	11,0 0,4	28,5 1,1	- -	45,0 1,6
	5	16,5*** 0,4	37,0*** 1,4	- -	62,0*** 1,6
Feno de aveia e vicia (1)	0	16,8 2,0	40,4 2,1	67,8 1,9	127,0 3,1
	5	17,0 2,1	41,0 2,2	70,3 2,4	126,3 3,7

a) Todos os materiais a incubar estavam já no interior dos frascos quando se adicionou o inóculo diluído.

dução de gás com os substratos que contêm taninos. Acima de 5% de PEG, e até 10%, não se observou, contudo, nenhuma depressão na fermentação. A produção de gás dos substratos que não contêm taninos (milho grão e feno de aveia e vicia) não foi diferente quando se adicionou o PEG; a dos substratos que contêm taninos foi contudo muito superior na presença daquele polímero (bolota, alfarroba, folha de azinheira). No caso do milho ao qual se adicionou ácido tânico, embora o PEG tenha determinado um aumento na produção de gás, esta não atingiu os valores observados para



o milho sô. Aparentemente, o PEG não aleviou totalmente o efeito depressivo do ácido tânico. A zeína, proteína hidrofóbica do milho, poderá exibir forte afinidade para o tanino (ver Cap. II), impedindo uma ligação preferencial total por parte do PEG. O tanino não complexado com o PEG poderá igualmente ter-se ligado à parede celular bacteriana de uma parte da população, atrasando o seu crescimento e desenvolvimento. Contudo, no decurso destes estudos foi observado que a adição de PEG à bolota ou alfarroba ao fim de 3h de incubação provocava um aumento imediato na produção de gás, sugerindo que a depressão poderá ser devida mais à menor disponibilidade do substrato que a uma diminuição da actividade fermentativa dos microorganismos presentes. Seja como for, o PEG parece constituir um bom adsorvente dos taninos e um bom auxiliar no estudo dos efeitos daqueles compostos polifenólicos sobre os sistemas biológicos. O PEG não influenciou significativamente a produção de  $N-NH_3$  no rumen *in vitro* (Quadro 4.6.) na ausência de tanino. O ácido tânico, ao nível de 5%, inibiu a degradação do azoto do milho, tendo tal inibição sido aleviada pela presença de PEG. O PEG tem sido utilizado como marcador da fase líquida em estudos da digestão nos ruminantes (Czerkwaski e Breckenridge, 1969b; Genest, 1982) por ser um composto que não intervém no processo digestivo e satisfaz a maior parte das condições exigíveis de um marcador (Kotb e Luckey, 1972). Dada a sua grande afinidade para os compostos fenólicos tem sido utilizado pelos autores em estudos de isolamento de proteínas foliares, prevenindo assim a complexação destas com os fenóis que usualmente se encontram nas folhas (Haslam, 1966). Kay (1969) verificou que o PEG era precipitado no rumen de animais alimentados com produtos ricos em taninos. A precipitação do PEG resulta da formação de complexos PEG-polifenóis insolúveis. Durante os estudos exploratórios, para além do PEG estudou-se também a capacidade da PVP e do Tween 80 de alevariarem o efeito depressivo do tanino

( resultados não apresentados). Embora eficazes aos níveis máximos de 5% e 5,22%, respectivamente, não foram tão eficientes como o PEG. A interação máxima PEG-tanino foi observada com uma relação 1:1 (ver capítulo 2).Atendendo às percentagens de tanino encontradas para a bolota e alfarroba (4,0 e 4,6, respectivamente), não é de surpreender que os melhores resultados tenham sido obtidos com 5% de PEG (embora não tenha havido diferenças com concentrações de até 10%).

Quadro 4.6. Influência do ácido tânico, do PEG e da PVP sobre o nível de  $N-NH_3$  (%) no rumen *in vitro* (n=3).

Substrato incubado (MS)	Tempo de incubação			
	$\bar{X}$	6 h s	$\bar{X}$	12 h s
0,5 g de bagaço de soja	1,83	0,10	2,40	0,27
Idem + PVP (5%)	1,98	0,16	2,73	0,31
Idem + PEG (5%)	1,89	0,16	2,76	0,29
0,5 g de Milho grão + 0,025 g de ác.tânico	0,05	0,01	0,07	0,03
Idem + PVP (5%)	0,67 <sup>***</sup>	0,11	0,87 <sup>***</sup>	0,27
Idem + PEG (5%)	0,63 <sup>***</sup>	0,13	0,77 <sup>***</sup>	0,33

4.4.3. Influência do PEG sobre a fermentação de misturas alimentares contendo proporções variáveis de bolota ou alfarroba.- A fim de tentar determinar os níveis de bolota ou alfarroba a partir dos quais os taninos possam exercer efeito deletêreo sobre o ecossistema ruminal, incubaram-se misturas alimentares, na presença e ausência de PEG, em que as proporções de bolota ou alfarroba se fizeram variar. Numa primeira fase testaram-se mis-

turas de bolota ou alfarroba, e milho grão, em que as percentagens variaram entre 0% e 100% (Quadro A 4.2.). Numa segunda fase, e a fim de se obterem condições mais fisiológicas, incubaram-se quantidades fixas de feno de aveia e vicia (50% da MS) e quantidades variáveis de bolota ou alfarroba, e milho (Quadro A 4.3.). A PB das misturas foi ajustada a 13% através da adição de bagaço de soja (1ª fase) ou zeína (2ª fase).

Os resultados são expressos nas figuras 4.11. a 4.17.

A fermentação do milho produziu maior quantidade de gás às 24 horas que a da bolota ou a da alfarroba (Fig. 4.11.). No entanto, ao fim de 12h e 10h de incubação a produção de gás foi muito superior, tanto com a bolota como com a alfarroba. Na ausência de PEG não se observaram diferenças na produção de gás ao fim de 24 horas para concentrações de bolota compreendidas entre 20% e 60% e entre 80% e 100%. Com a alfarroba, verificaram-se diminuições na produção de gás entre 0% e 40% e entre 80% e 100%, não tendo havido diferenças estatisticamente significativas entre 60% e 80% (Quadro A 4.2.). Às 12h e 10h, pelo contrário, não se observaram diferenças entre 0% e 20% e entre 60% e 80% para a bolota, e entre 20% e 40% e entre 60% e 100% para a alfarroba. O PEG não exerceu nenhuma influência estatisticamente significativa sobre a produção de gás das misturas contendo até 40% de bolota, tanto às 12h como às 24h. Entre 60% e 100% de bolota a quantidade de gás produzida foi superior nos incubados na presença de PEG. As diferenças foram significativas entre 60% e 100% de bolota, às 12h e entre 60% e 80% às 24h, altura em que se não verificou diferença no incremento da produção de gás entre 80% e 100%. Com a alfarroba, o PEG exerceu efeito positivo sobre a produção de gás a partir dos 20%, tanto às 10h como às 24h. Os incrementos na produção de gás devidas ao PEG foram significativamente diferentes entre 20% e 80%, tanto às 10h como às 24h. A ligeira diminuição no incremento observada ao nível de 60% pode ter sido

resultante do elevado coeficiente de variação observado com a alfarroba.

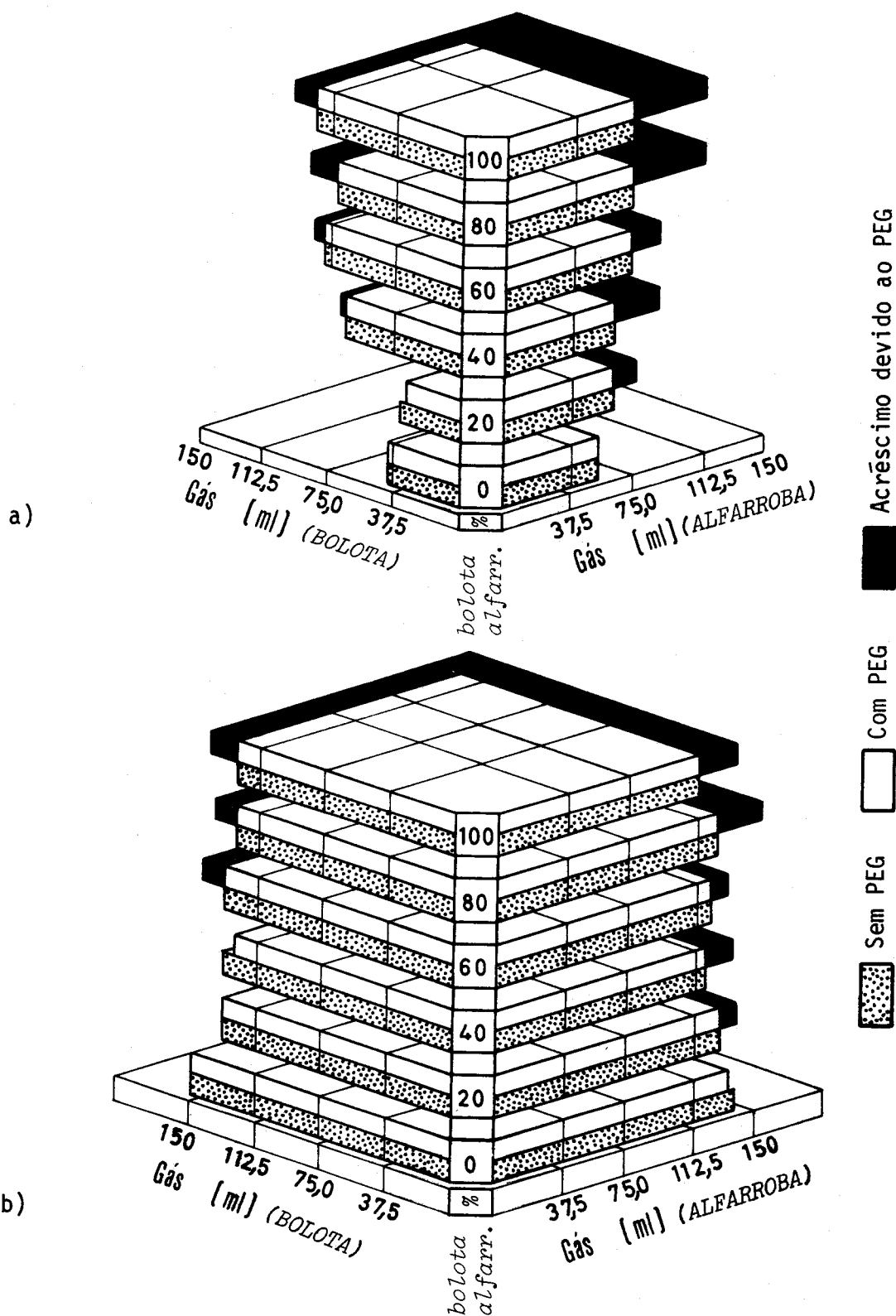


Fig. 4.11. Influência do PEG e das percentagens de bolota ou alfarroba sobre a produção cumulativa de gás às 12h ou 10h (bolota ou alfarroba) (a) e às 24h (b) de incubação. (Quadro A 4.2.)

Os taninos ligam-se mais fortemente ao PEG que às proteínas (Loomis, 1974) e assim pretende-se que o efeito positivo do PEG seja devido à inactivação, pelo menos parcial, dos taninos, através da formação de complexos taninos-PEG insolúveis. Os taninos da bolota, aparentemente, exerceram efeito depressivo sobre a fermentação no rumen *in vitro* quando aquele componente alimentar atingiu 40% da mistura bolota+milho. A este nível a percentagem de tanino relativamente à MS total foi de 1,6% (ver Quadro 2.2.). Os taninos da alfarroba exerceram, aparentemente, um efeito depressivo a partir de 0,9% (20% de alfarroba). As diferenças observadas na produção de gás por acção do PEG foram mais acentuadas para a alfarroba, relativamente à bolota (cerca de 3 vezes superior).

As relações PG com PEG:PG sem PEG às 12 e 24 h foram sensivelmente iguais para a bolota, mas foram superiores às 10 h, relativamente às 24 h, para a alfarroba. Tal poderá ter sido devido ao excesso de substrato utilizado, e à elevada fermentescibilidade da alfarroba conducente à acumulação excessiva de metabolitos às 24 h de incubação. Contudo, na fermentação de misturas alimentares menos acidificantes (Quadro A 4.3.) aquelas diferenças foram maiores às 12 h que às 24 h, tanto para a bolota como para a alfarroba, sugerindo que o efeito do tanino se pode atenuar com o aumento no tempo de incubação.

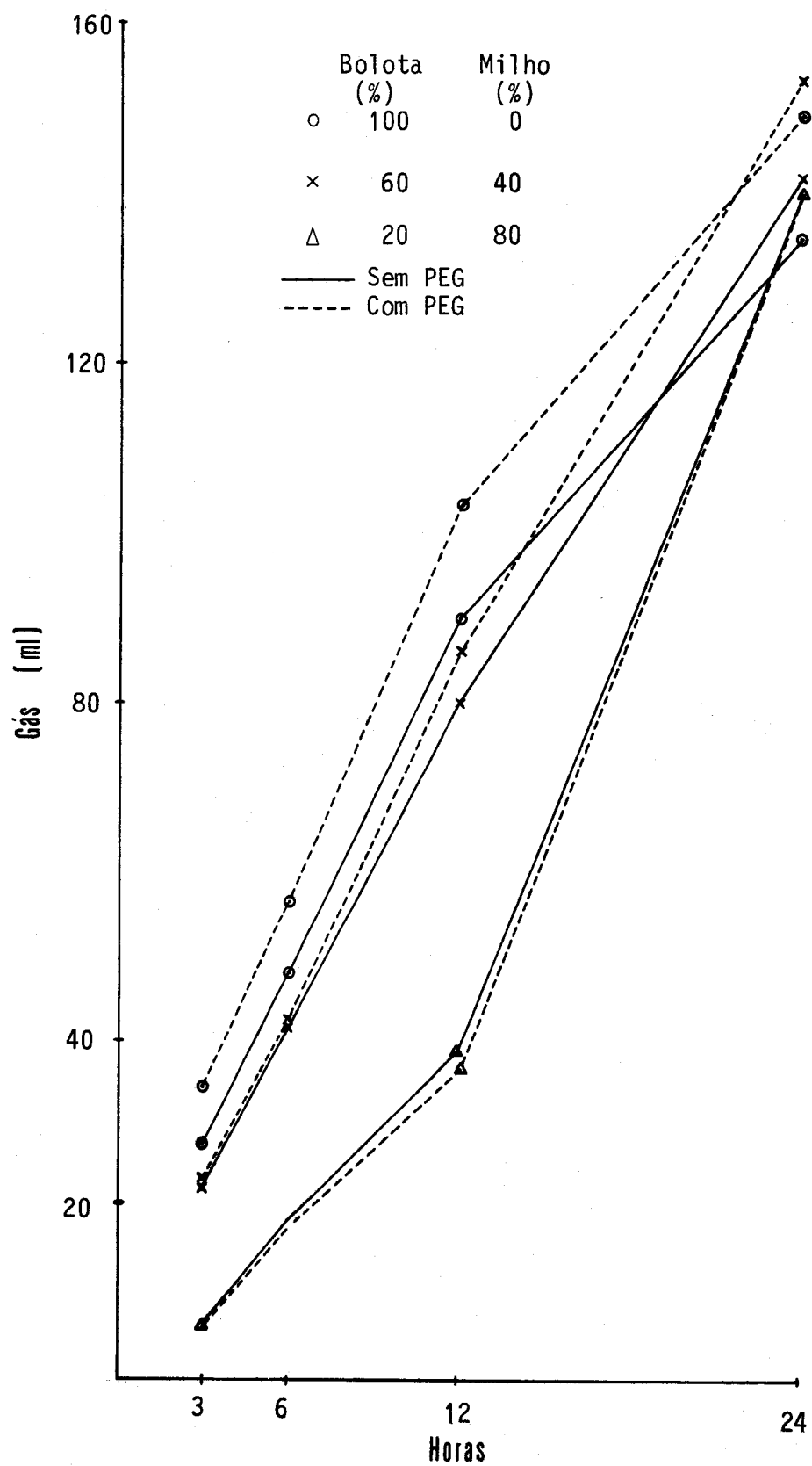


Fig. 4.12. Influência do PEG e da percentagem de bolota sobre a produção cumulativa de gás a diversos tempos de incubação. (Quadro A 4.2.).

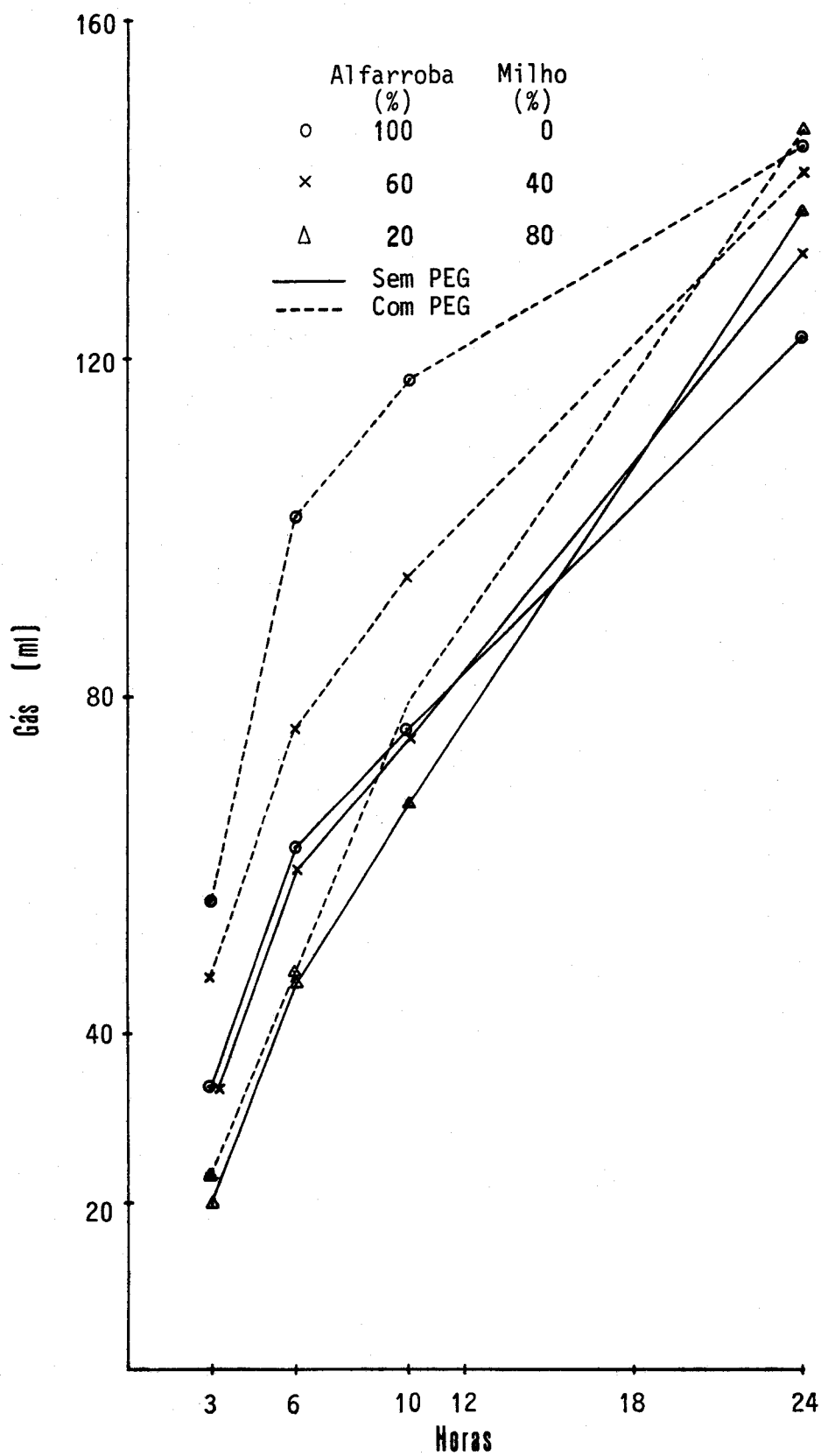
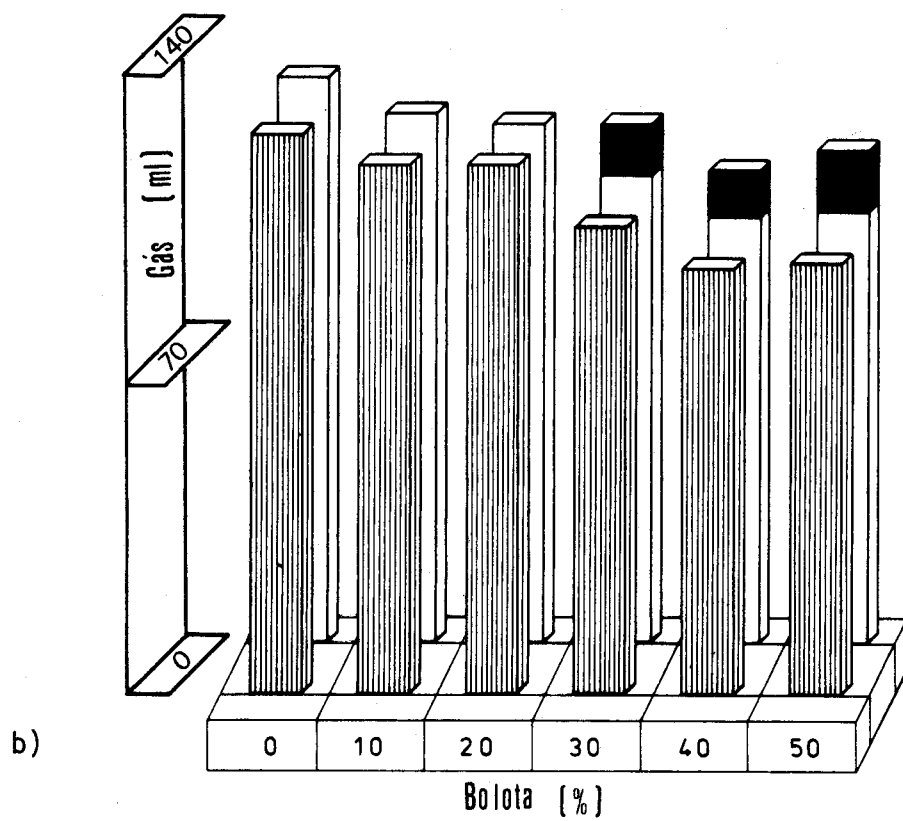
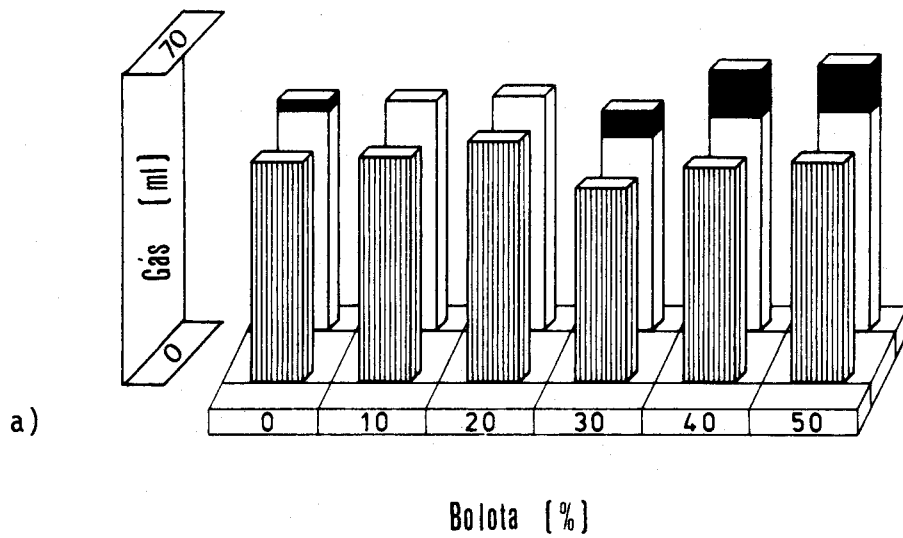


Fig. 4.13. Influência do PEG e da percentagem de alfarroba sobre a produção cumulativa de gás a diversos tempos de incubação. (Quadro A 4.2.)

Quando a bolota ou alfarroba foram incluídas em misturas alimentares contendo quantidades fixas de feno de aveia e vicia os resultados observados na produção de gás foram muito semelhantes (Figuras 4.14. e 4.15.). Ao fim de 24h de incubação a mistura de feno e milho produziu maior quantidade de gás que a mistura de feno e bolota ou que a de feno e alfarroba (Quadro A 4.3.). Ao fim de 12h a produção do gás do feno+milho e feno+bolota foi sensivelmente igual, enquanto que às 11h a mistura contendo alfarroba produziu muito mais gás que a que continha milho. Estas diferenças traduzem a grande riqueza da alfarroba em glúcidos solúveis, que fermentam rapidamente (Fig. 4.17.). Às 12h não se observaram diferenças significativas na produção de gás das misturas contendo 0% a 50% de bolota. Para um tempo de incubação aproximado (11h) a produção de gás aumentou significativamente à medida que aumentou a percentagem de alfarroba na mistura. Às 24h a produção de gás das misturas contendo bolota diminuíram à medida que se aumentou a sua percentagem. No entanto, as diferenças não foram significativamente diferentes entre 10% e 20%, e 40% e 50%. Com a alfarroba não se observaram diferenças significativas entre os vários níveis utilizados.

Quando se adicionou PEG aos meios de incubação verificou-se um incremento na produção de gás a partir de certos níveis de bolota ou alfarroba nas misturas alimentares (Fig. 4.14. e 4.15.). Às 12 horas de incubação o PEG exerceu um efeito positivo sobre a produção de gás a partir dos 30% de bolota e 10% de alfarroba. Às 24 horas tal efeito foi observado a partir de 30%, tanto de bolota como de alfarroba. Estes efeitos corresponderam a níveis de taninos de aproximadamente 1,2% e 1,4% para a bolota e alfarroba, respectivamente. A percentagem de aumento na produção de gás, induzida pelo PEG, foi muito mais pronunciada às 6 horas, tanto para a alfarroba (Fig. 4.17.) como para a bolota (Fig. 4.16.), traduzindo possivelmente a elevada fermentescibilidade daqueles dois componentes.





Com PEG
  Sem PEG
  Acr. devido ao PEG

Fig. 4.14. Influência do PEG e da percentagem de bolota sobre a produção cumulativa de gás às 12h (a) e 24h (b) de incubação. (Quadro A 4.3.)

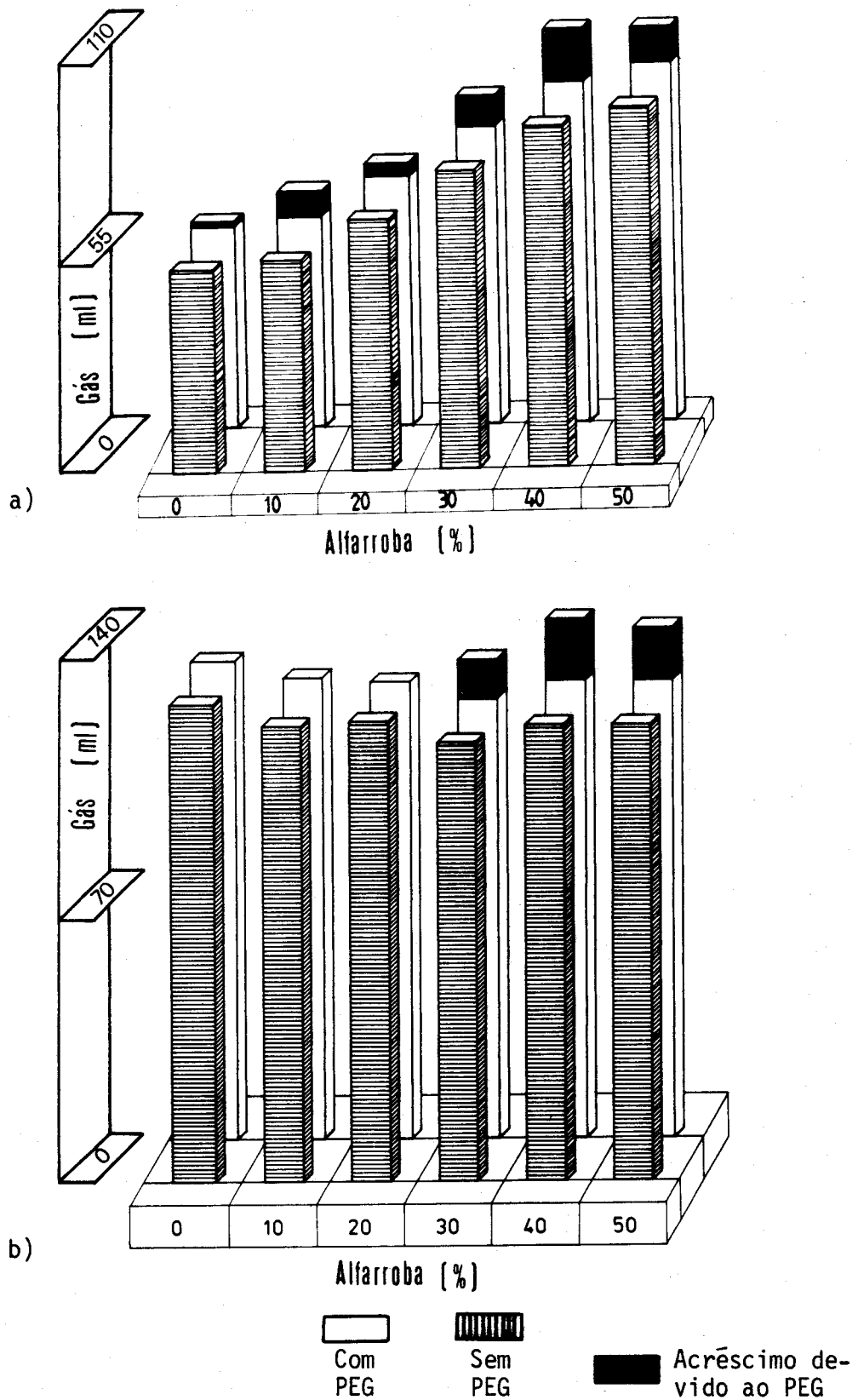


Fig. 4.15. Influência do PEG e da percentagem de alfarroba sobre a produção cumulativa de gás às 11 h (a) e 24 h (b) de incubação. (Quadro A 4.3.)

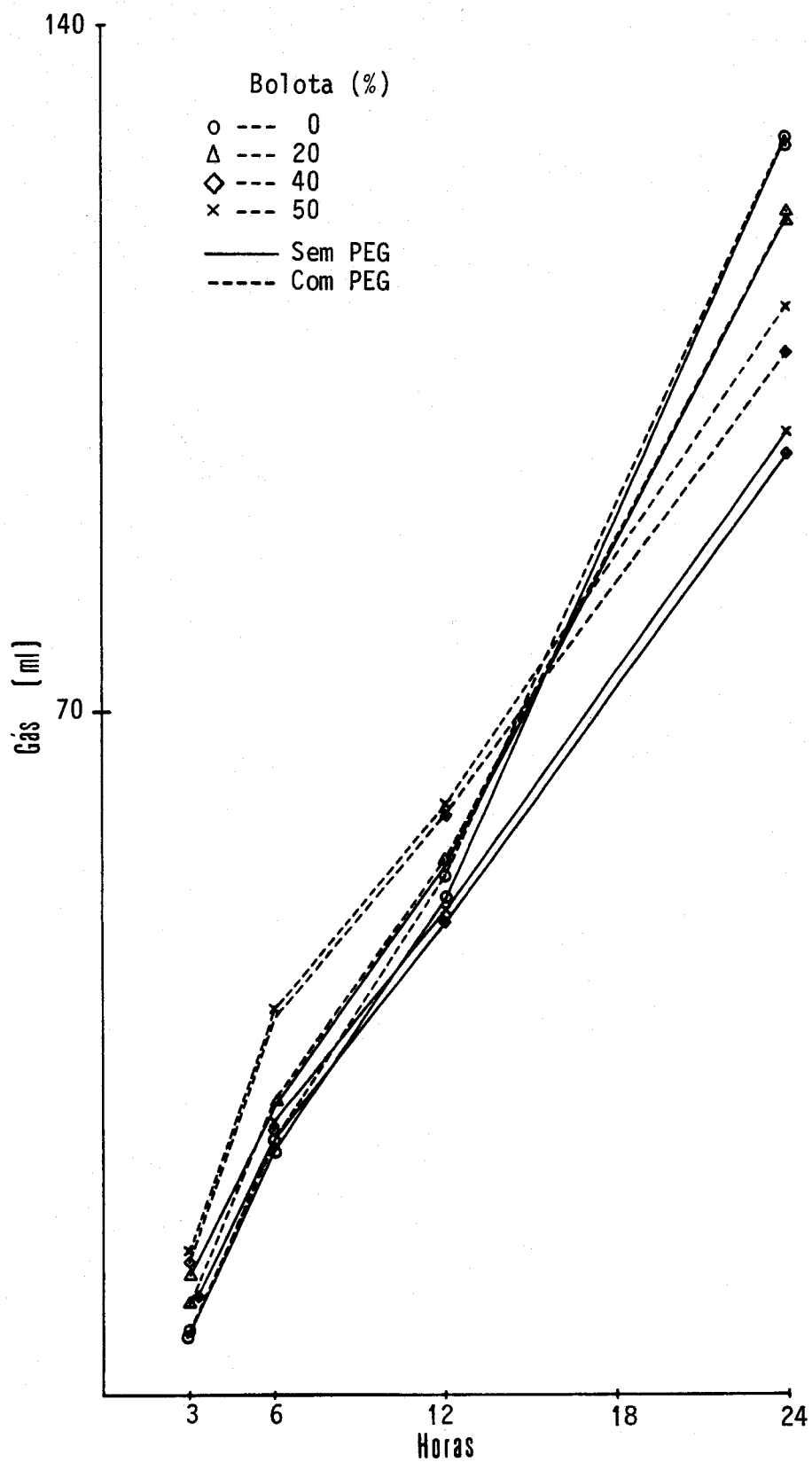


Fig. 4.16. Influência do PEG e da percentagem de bolota sobre a produção cumulativa de gás a diversos tempos de incubação. (Quadro A 4.3.)

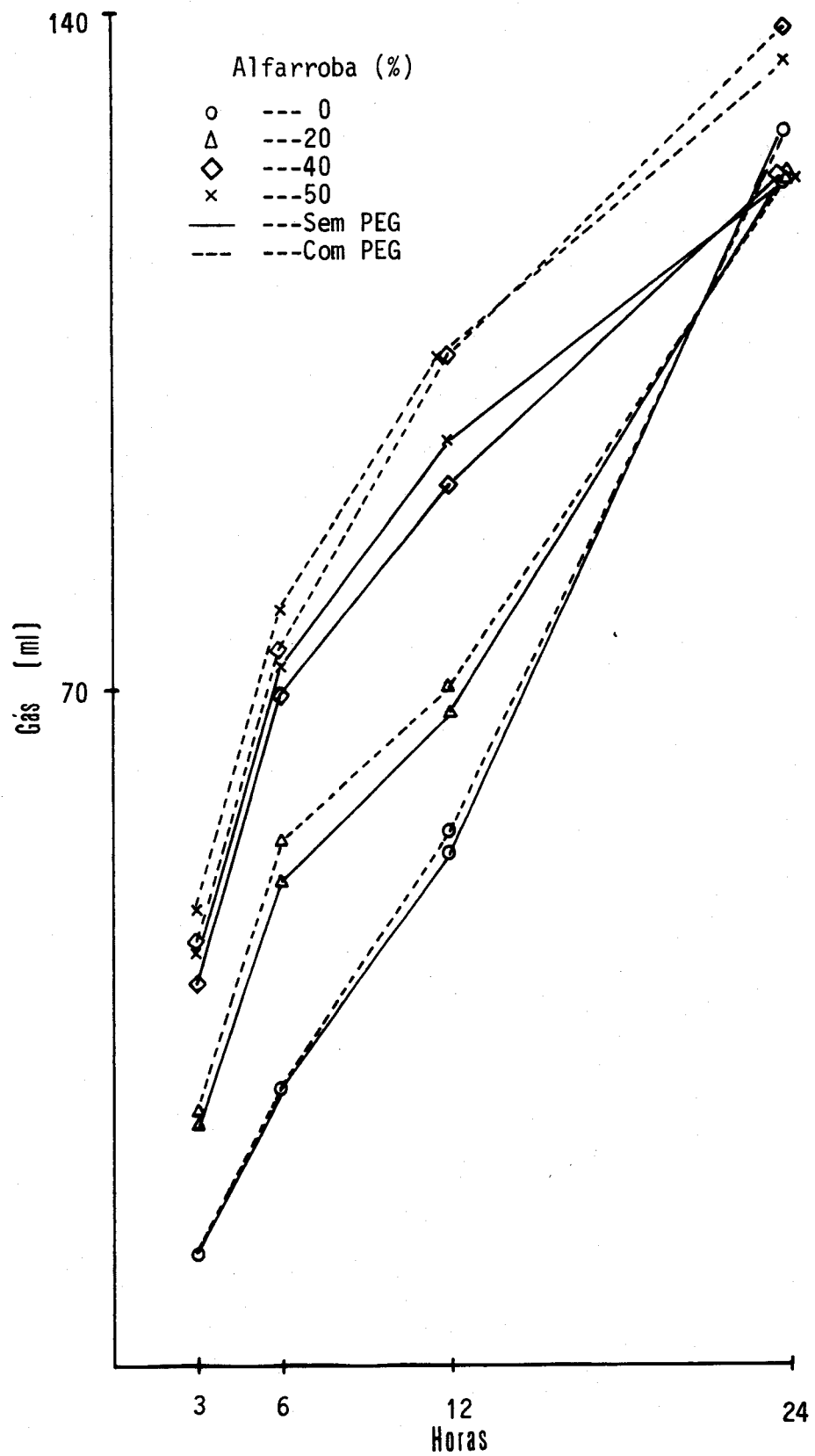


Fig. 4.17. Influência do PEG e da percentagem de alfarroba sobre a produção cumulativa de gás a diversos tempos de incubação. (Quadro A 4.3.)

A maior produção de gás traduz, ou um aumento da biomassa, ou um aumento na disponibilidade do substrato, ou, mais provavelmente, ambos. No entanto, no decurso dos presentes estudos verificou-se que a adição de PEG ao meio de incubação contendo só bolota ou alfarroba, ao fim de 3 horas de incubação, resultava num aumento instantâneo na produção de gás, o que sugere que nessas circunstâncias terá sido o substrato o factor mais limitante. Outro efeito aparente do PEG foi o de incrementar o nível de amônia nos sistemas. Com efeito, a adição de PEG aos meios de incubação determinou um incremento no nível de amônia nas misturas que contiveram bolota ou alfarroba (Quadro 4.7.).

Quadro 4.7. Influência dos níveis de PEG, e da bolota ou alfarroba (Quadro A 4.3.) sobre o  $N-NH_3$  ( $mg.100ml^{-1} \pm s$ ) dos meios de incubação.  
(B=bolota; A=alfarroba)

BOLOTA ou ALFAR- ROBA (%)	PEG (%)	Tempo de incubação (h)					
		3		8		24	
		B	A	B	A	B	A
0	0	2,93 0,11	3,08 0,21	2,83 0,12	2,30 0,09	3,10 0,30	3,46 0,08
	5	2,83 0,13	3,18 0,54	2,71 0,21	2,35 0,10	2,60 0,36	3,48 0,15
10	0	2,50 0,13	2,56 0,08	2,55 0,16	1,35 0,07	2,82 0,14	3,19 0,31
	5	2,98 0,41	2,53 0,11	2,50 0,19	1,58 0,15 *	2,68 0,26	3,68 0,18 *
20	0	2,62 0,14	1,71 0,07	2,29 0,13	0,87 0,11	2,73 0,22	3,21 0,13
	5	2,77 0,13	1,90 0,11 *	2,43 0,11 *	1,21 0,11 **	2,79 0,26	4,44 0,20 ***
30	0	2,53 0,12	1,29 0,08	2,33 0,18	0,55 0,07	2,17 0,14	2,97 0,14
	5	2,80 0,19 *	1,78 0,24 **	2,55 0,19	0,80 0,10 **	2,61 0,19 **	4,33 0,24 ***
40	0	2,38 0,10	1,01 0,10	2,13 0,12	0,43 0,05	2,26 0,07	3,30 0,22
	5	2,62 0,09 *	1,45 0,12 **	2,32 0,12	0,53 0,08	2,64 0,11 *	4,75 0,17 ***
50	0	2,57 0,13	0,86 0,09	1,95 0,15	0,43 0,06	2,04 0,16	3,37 0,20
	5	2,95 0,14 *	1,28 0,10 ***	2,46 0,16 **	0,40 0,03	3,01 0,30 ***	5,35 0,24 ***
BRANCOS	0	1,817	0,390	2,610	0,300	8,060	2,740
	5	1,940	0,373	2,727	0,286	10,040	2,386

Este incremento foi mais aparente a partir de 30% de quaisquer de ambos os produtos. Na sua ausência, ou a baixa percentagem (10%), o PEG não exerceu influência significativa sobre os níveis de amônia. Às 8h de incubação não houve diferenças entre os incubados com e sem PEG quando a alfarroba esteve presente em concentrações elevadas. Tal poderá ser resultante do esgotamento do substrato amoniaco o qual atingiu níveis extremamente baixos. O efeito observado terá sido devido à ligação preferencial dos taninos ao PEG, ficando a proteína mais disponível para a actuação microbiana. A maior disponibilidade em substrato azotado poderá explicar a maior produção de gás observada nas mesmas condições. Estudos *in vivo*, contudo, revelaram que quando a bolota (Ferreira, 1984) ou alfarroba (Louca e Papas, 1973) são introduzidos em rações para animais a digestibilidade aparente do azoto decresceu acentuadamente, mas a da MO foi afectada em muito menor grau.

Embora se não tenham feito medições dos níveis de amônia nos incubados em que a bolota ou alfarroba variaram em função do milho, é muito provável que os níveis de amônia tenham atingido valores ainda mais baixos que os representados no quadro 4.7., dada a maior quantidade de glúcidos facilmente fermentescíveis presentes nos meios de incubação. Os baixos níveis de amônia poderão ter limitado o crescimento microbiano, ou determinado fermentações energeticamente desacopladas ( fermentações sem produção de ATP para o crescimento microbiano) (Smith, 1979).

4.4.4. Influência do PEG e do nível azotado sobre a fermentação da bolota ou alfarroba.- A fim de determinar o efeito do nível proteico e do PEG sobre a fermentação da bolota e alfarroba no rumen *in vitro* incubaram-se estes substratos (1g MS) com quantidades de ureia ou bagaço de soja suficientes para se obterem níveis de 10%, 13% e 16% de PB nos substratos. A

bolota e alfarroba foram igualmente incubadas isoladamente, sem adição de quaisquer daqueles complementos (4,6% e 7,1% de PB, respectivamente). Os resultados estão expressos nas figuras 4.18. e 4.19.

Quando se adicionou ureia, tanto à bolota como à alfarroba, verificou-se um incremento significativo na produção de gás às 12h e 24h de incubação. Contudo, no caso da bolota não se observaram diferenças entre 10% e 13% de PB. Ao nível de 16% observou-se uma depressão na produção de gás relativamente aos de 10% e 13%; no caso da alfarroba não se observaram diferenças entre 10% e 13%, mas ao nível de 16% a produção de gás foi superior à observada para aqueles dois níveis. Esta diferença relativamente à bolota pode ser a expressão da maior riqueza da alfarroba em glúcidos facilmente fermentescíveis, que se poderá ter traduzido em maior crescimento microbiano e maior fixação de azoto. De facto, as quantidades de gás produzido foram superiores aos da bolota (Quadro A 4.4. e A 4.5.).

Quando à bolota e alfarroba se adicionaram quantidades crescentes de bagaço de soja observaram-se incrementos na produção de gás, excepto para a alfarroba e para os níveis de 10% e 13% de PB em que se não observou nenhuma diferença significativa, provavelmente devido à grande variação registada (Quadro A 4.5.). Tal como o observado para a ureia, também neste caso a produção de gás da alfarroba foi superior ao da bolota.

As diferenças observadas na produção de gás entre os incubados com e sem PEG pretende-se que traduzam os efeitos dos taninos para os diferentes níveis de PB dos substratos incubados. Na ausência de ureia ou soja o PEG provocou incrementos na produção de gás de 86,3% e 41% às 12h e de 54,4% e 33,3% às 24h, para a bolota e alfarroba, respectivamente. Quando se adicionou ureia à bolota o efeito do PEG foi muito irregular e não se traduziu por um incremento apreciável na produção de gás, excepto às 6h de incubação (Quadro 4.8.). No caso da alfarroba, pelo contrário, o

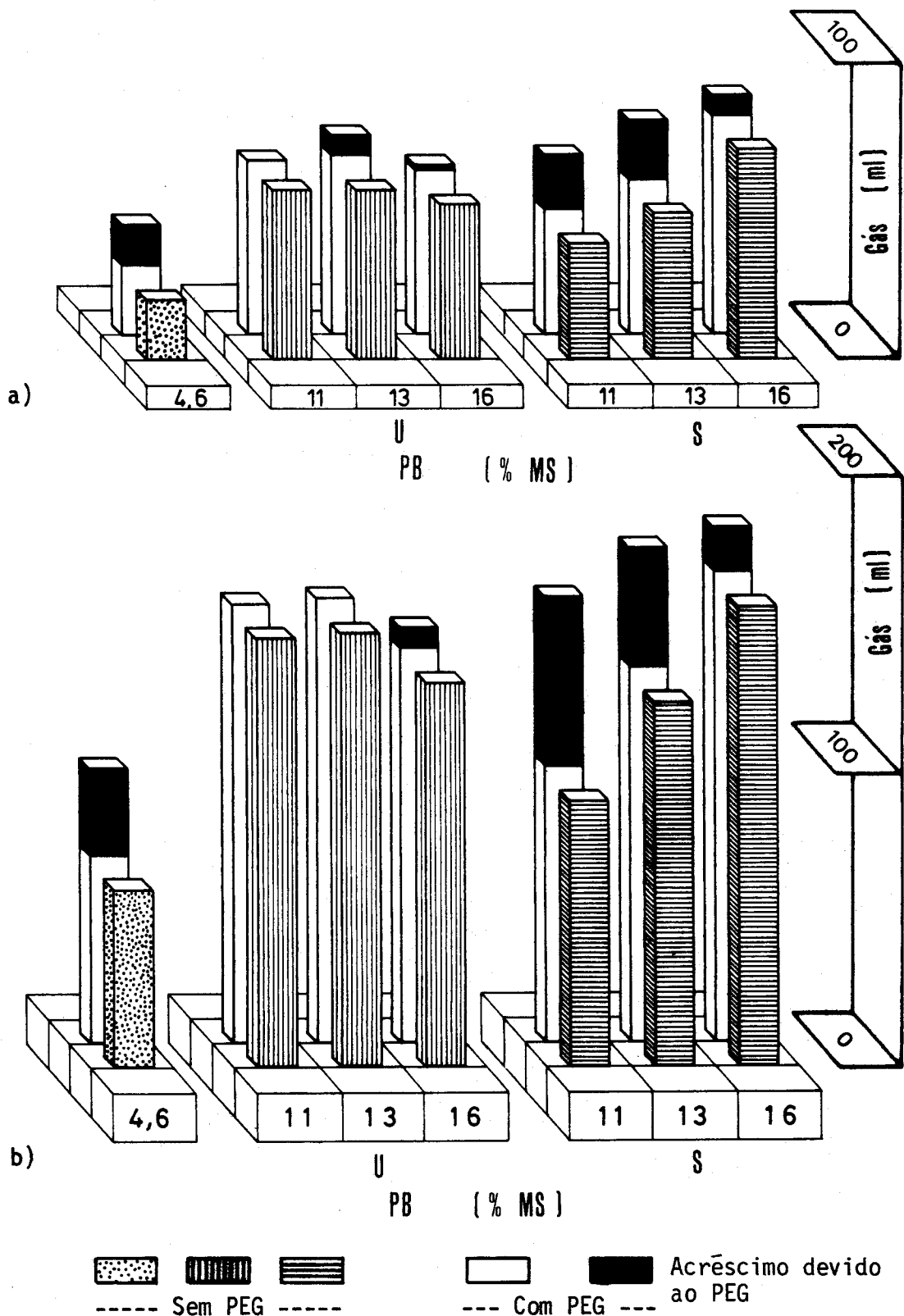


Fig. 4.18. Influência do PEG e do nível de ureia (U) ou bagaço de soja (S) sobre a produção de gás da bolota (1 g MS) incubada durante 12h (a) e 24h (b). (Quadro A4.4.)





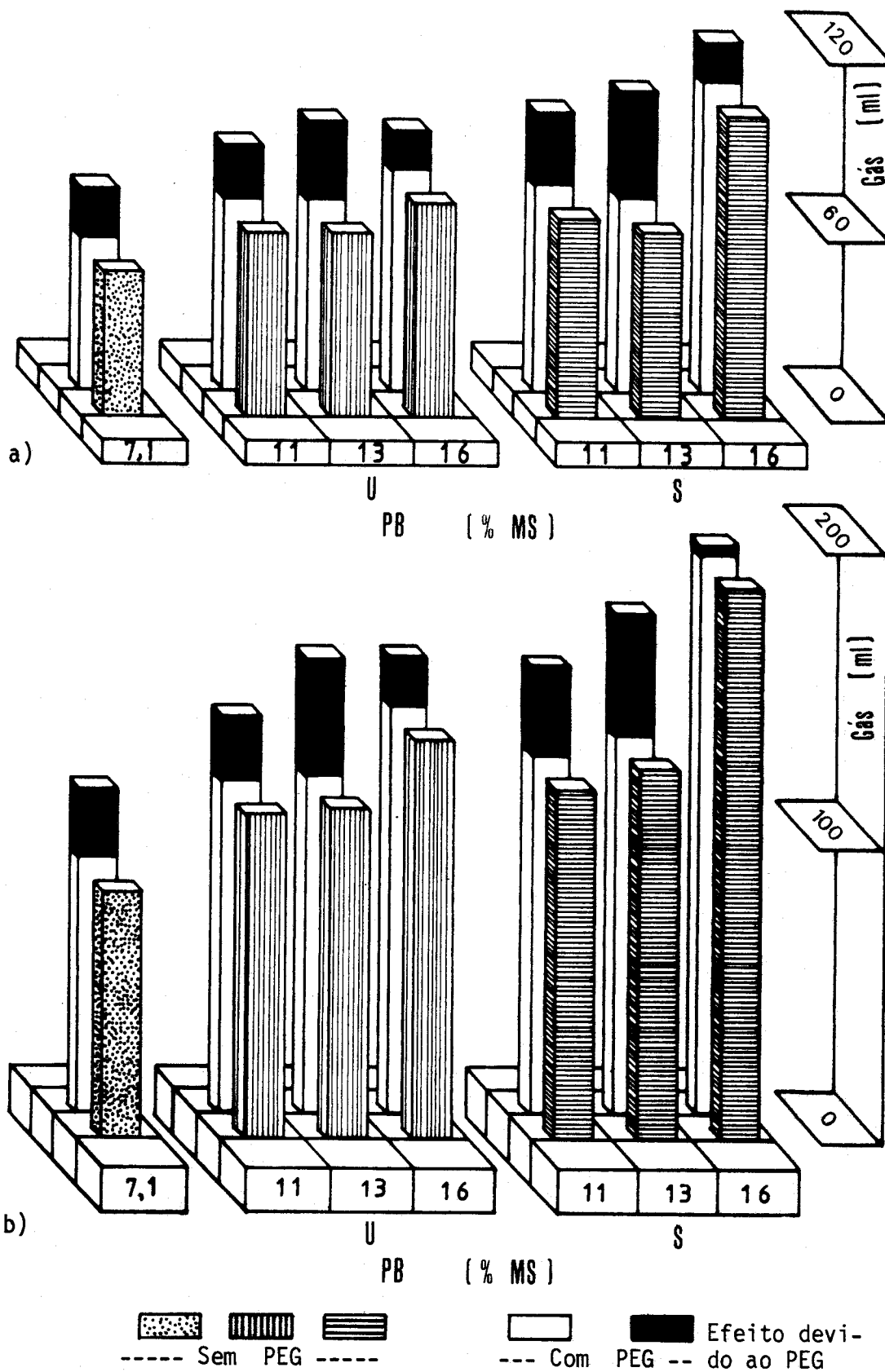


Fig. 4.19. Influência do PEG e da ureia (U) ou bagaço de soja (S) sobre a produção de gás da alfarroba (1g MS) incubada durante 12h (a) e 24h (b). (Quadro A 4.5.)

PEG provocou um incremento apreciável na produção de gás para os diferentes níveis de azoto da ureia, tendo o menor aumento sido observado para 16% de PB, quando se observou igualmente o máximo de produção de gás.

Nos incubados com bagaço de soja, o PEG exerceu um efeito extremamente positivo sobre a produção de gás. Este efeito foi mais acentuado para a alfarroba ao fim de 6h de incubação (Quadro 4.8.). Os incrementos na produção de gás decresceram à medida que se aumentou a quantidade de azoto presente, excepto para o nível de 13% de PB e para a alfarroba. Este incremento, observado entre 10% e 13% de PB, poderá ter sido devido

Quadro 4.8. Influência do PEG e do nível azotado sobre a produção de gás da bolota (B) e Alfarroba (A) incubados durante vários intervalos de tempo (Quadro A 4.4. e A 4.5.).

NÍVEL AZOTADO (%)	PRODUÇÃO DE GÁS COM PEG					
	PRODUÇÃO DE GÁS SEM PEG					
	6h		12h		24h	
	B	A	B	A	B	A
4,6/7,1 UREIA	2,63	1,52	1,86	1,41	1,54	1,33
10	3,50	1,76	1,04	1,35	1,03	1,22
13	7,57	1,65	1,19	1,50	1,03	1,40
16	2,30	1,34	1,09	1,23	1,08	1,15
SOJA						
10	1,61	1,66	1,53	1,43	1,67	1,28
13	1,35	1,72	1,46	1,63	1,35	1,36
16	1,30	1,27	1,16	1,16	1,12	1,04

às grandes exigências da população microbiana dispendo de grandes quantidades de energia facilmente fermentescível.

Dos presentes resultados parece poder-se concluir que, ao nível de 16% de PB, o efeito do PEG foi bastante menos acentuado que para os outros níveis utilizados, tendo-se observado a este nível a produção máxima de gás, tanto na ausência como na presença de PEG. O nível azotado parece assim influenciar a expressão deletérea do tanino. Dadas as limitações físicas do aparelho de incubação utilizado não foi possível a utilização em simultâneo de níveis ainda mais elevados de azoto nos meios de incubação. Contudo, numa experiência separada, em que se utilizaram concentrações de azoto até 20%, não se observaram efeitos positivos do PEG a este nível. Estas observações confirmam as de outros autores ( *Price e Butler, 1980* ) de que elevados teores em PB aleviam os efeitos nutricionalmente deletéreos dos taninos. Ao nível do ecossistema ruminal esta resposta positiva poderá ser devida a maior disponibilidade em azoto para o crescimento microbiano. De facto, na ausência do PEG, mesmo com 16% de PB, os níveis de amônia não atingiram, às 6h e 12h de incubação, as concentrações julgadas necessárias ( *Satter e Slyter, 1974; Satter, 1982* ) para um crescimento microbiano máximo (Quadro 4.9.).

Também com a amônia o efeito do PEG (N-NH<sub>3</sub> nos incubados com PEG - N-NH<sub>3</sub> sem PEG) foi menor nos incubados com 16% de PB. No entanto, quando a bolota ou alfarroba foram incubados sem adição das fontes azotadas, o PEG não exerceu, aparentemente, algum efeito. Na realidade, tal efeito deverá ter existido, já que a resposta na produção de gás foi muito elevada. Possivelmente, o azoto dos substratos foi degradado em maior extensão na presença de PEG, mas dada a sua limitação quantitativa ele foi fixado na quase totalidade pelos microorganismos.

Se a resposta na produção de gás por acção do PEG se deve à maior disponibilidade em substrato azotado degradado, ou a outra qualquer razão, não é perfeitamente claro. Embora os polifenóis sejam capazes de se

ligarem aos glúcidos, particularmente amido e celulose (Davis e Hosney, 1979), a sua afinidade maior é para as proteínas. O facto de o PEG ter exercido um efeito positivo sobre o nível de amônia nos incubados com ureia faz supor que terá havido uma maior actividade ureásica, resultante, provavelmente, de uma maior biomassa activa.

Quadro 4.9. Níveis de  $N-NH_3$  ( $mg.100ml^{-1}$ ) nos meios de incubação contendo bolota ou alfarroba, com diferentes percentagens de PB (adição de ureia ou soja). (Média de 3 observações).

PB (%)	PEG (%)	TEMPO DE INCUBAÇÃO (h)			
		6		12	
		BOLOTA	ALFARROBA	BOLOTA	ALFARROBA
4,6/7,1 UREIA	0	0,13	0,06	0,05	0,317
	5	0,11	0,06	0,04	0,521
11	0	2,16	1,13	1,18	2,14
	5	2,73	1,27	1,29	2,37
13	0	4,42	1,84	1,57	3,94
	5	8,56	2,12	1,79	4,93
16 SOJA	0	7,00	2,54	2,14	5,84
	5	9,19	2,78	2,36	6,47
11	0	0,21	0,11	1,01	1,86
	5	0,40	0,29	1,77	2,71
13	0	0,21	0,15	2,13	3,31
	5	1,03	0,64	3,24	5,11
16	0	1,26	0,43	2,85	4,0
	5	1,59	0,79	4,27	7,1

Neste caso, os taninos seriam responsáveis pela inactivação, ou depressão, em parte ou no todo, da população microbiana do inóculo, na ausência do PEG. Note-se que o efeito positivo do PEG, tanto sobre a produção de gás,

como sobre a de amônia, foi decrescendo à medida que aumentou o tempo de incubação.

O nível mais elevado de amônia, na presença de PEG, deverá ter traduzido uma maior degradação do azoto do substrato, já que a fixação do  $N-NH_3$  pelos microorganismos terá sido igualmente maior, atendendo ao acréscimo verificado na produção de gás.

4.4.5. Influência do PEG e do nível azotado sobre a degradação do azoto de misturas contendo bolota e bagaço de girassol. - A maior produção de gás e maior nível de  $N-NH_3$ , por um lado, e a menor diferença induzida naqueles parâmetros pelo PEG no rumen *in vitro*, por outro, quando à bolota ou alfarroba se adicionou azoto (ureia ou bag. de soja), a fim de se obter um nível de PB, na mistura, de 16%, pode ter resultado de uma maior degradação do azoto, garantindo um suprimento mais adequado de azoto ao ecossistema ruminal. Contudo, os níveis de amônia só por si não significam necessariamente uma maior proteólise do substrato incubado, já que degradação e síntese microbiana estão confundidas. A fim de se estudar a influência dos taninos e do nível azotado sobre a degradação do azoto em misturas alimentares contendo produtos ricos em taninos, aplicou-se a técnica de Raab (1980), modificada, tal como descrita em 4.2.. Escolheu-se a bolota como produto típico, à qual se adicionaram quantidades crescentes de bagaço de girassol a fim de se obterem misturas com 11%, 13%, 15% e 17% de PB. Cada uma destas misturas foi analisada pela técnica referida, e os resultados são expressos nas figuras 4.20. - 4.22. (Quadro A 4.6.).

Na ausência do PEG, a degradação do azoto às 12 h aumentou à medida que se aumentou a percentagem de PB na mistura.

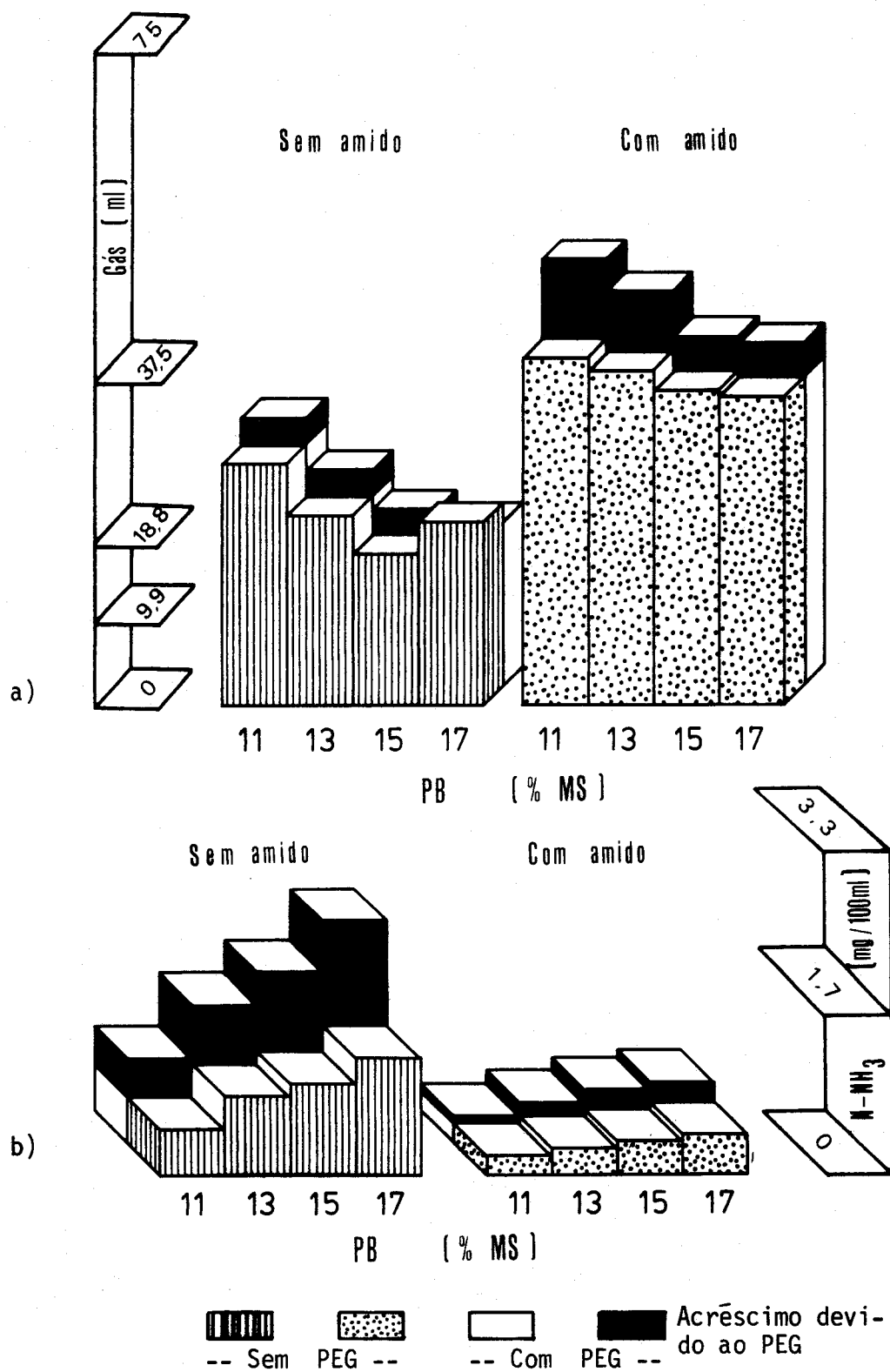


Fig. 4.20. Influência do PEG e do amido sobre a produção de gás (a) e o nível de amônia (b) de dietas com bolota, e níveis crescentes de proteína bruta de girassol, incubadas *in vitro* durante 12h.

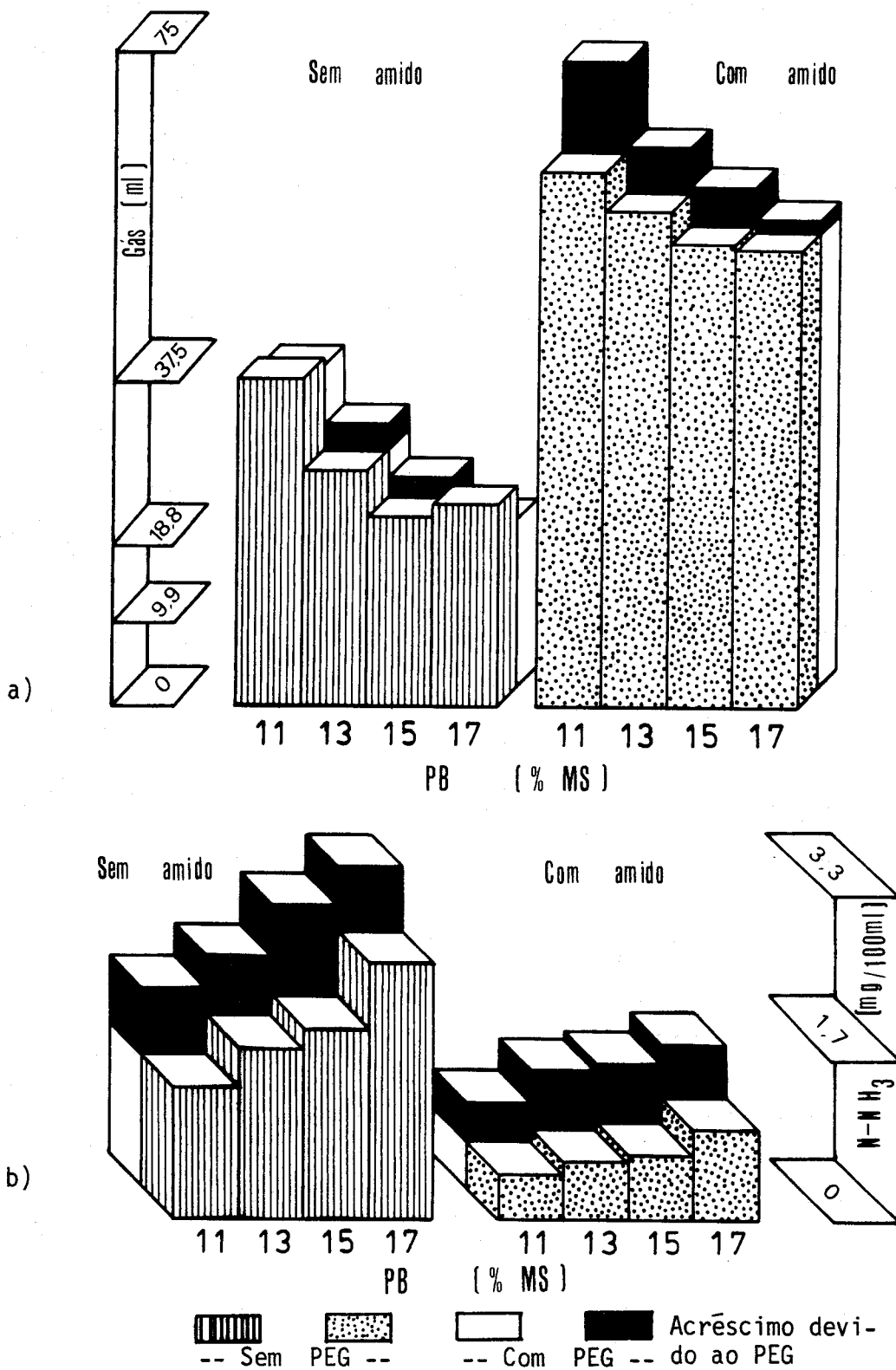


Fig. 4.21. Influência do PEG e do amido sobre a produção de gás (a) e o nível de amônia (b) de dietas com bolota, e níveis crescentes de proteína bruta de girassol, incubadas *in vitro* durante 24h.

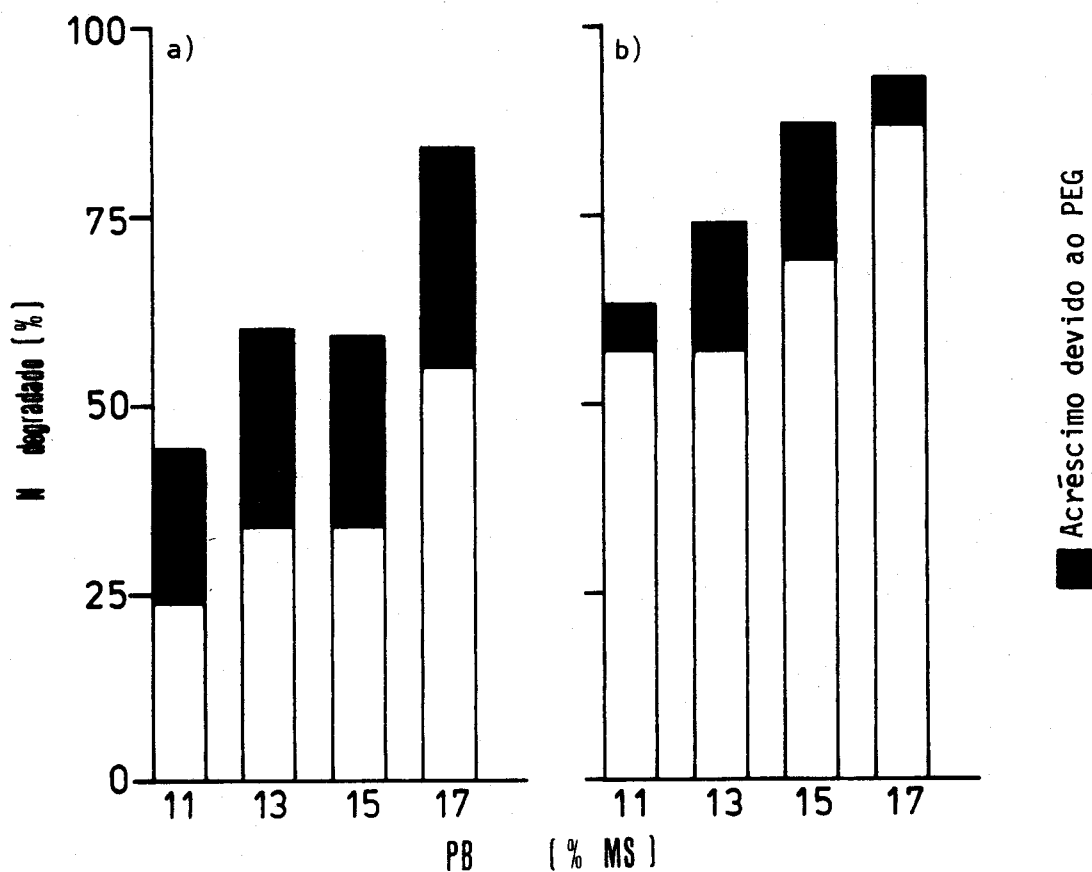


Fig. 4.22. Influência do PEG sobre a degradação do N de misturas alimentares à base de bolota, com 4 níveis diferentes de bagaço de girassol, incubadas *in vitro* durante 12h (a) e 24h (b).

Não houve, contudo, diferenças entre as misturas com 13% e 15% de PB. Às 24 horas a degradação do azoto apenas foi mais elevada para a de 17% de PB.

Quando se adicionou PEG aos meios de incubação a percentagem de degradação aumentou substancialmente, mas mais às 12h que às 24h (Quadro A 4.6.). A maior diferença foi observada para a mistura (bolota+bagaço de girassol) com 15% de PB. Para o nível de 17% a influência do PEG foi relativamente pequena ao fim de 24 h de incubação.

A maior degradabilidade do azoto das misturas com maior percentagem de proteína bruta poderá dever-se à maior contribuição do bagaço de girassol, relativamente à bolota, para o azoto total da mistura. Ao nível de 11% a bolota contribuiu com relativamente mais azoto para a mistura e



tal poderá explicar a mais baixa degradação observada, tanto às 12h como às 24h. Note-se, contudo, que às 24h não se observaram diferenças na degradação das misturas com 11%, 13% e 15% quando incubadas sem PEG. Na presença de PEG a degradação foi directamente proporcional à concentração proteica das misturas. O efeito do PEG sobre a degradação do azoto foi mais acentuado ao fim de 12h de incubação.

Atendendo a que a quantidade de azoto incubado, de cada mistura, foi constante (4,16mg), os meios de incubação com as misturas mais ricas em PB contiveram as menores quantidades de glúcidos (bolota), e não é de admirar, pois, que tenham produzido menores quantidades de gás, e tenham revelado os maiores níveis de  $N-NH_3$  (Figs. 4.20. e 4.21.). Quando se adicionou amido aos meios de incubação, o efeito do PEG, sobre a produção de gás, foi mais acentuado que na ausência de amido. Contudo, o efeito aparente sobre o  $N-NH_3$  foi mais evidente na ausência de amido. Tal poderá ter sido devido ao esgotamento do substrato amoniacal por uma população microbiana mais activa e numerosa. A uma maior proteólise deverá ter correspondido uma maior biossíntese, e níveis muito baixos de amônia. A mistura com 17% de PB, quando incubada sem amido, não revelou diferença significativa na produção de gás, por acção do PEG. Contudo, os níveis de amônia foram significativamente maiores (tendo a diferença sido mais pronunciada às 12h), o que faz supor que os níveis de amônia tenham sido adequados à energia fermentescível presente. No entanto, os níveis de  $N-NH_3$  encontrados para as outras misturas foram bastante baixos.

Como principal conclusão pensamos poder salientar que o nível proteico da mistura alimentar influencia o efeito depressivo dos taninos da bolota sobre a fermentação ruminal. O efeito deletéreo parece ser particularmente notório quando existe um largo excesso de energia, relativamente ao substrato azotado. Deve-se notar, contudo, que as diversas mistu-

ras alimentares incubadas contiveram quantidades variáveis de bolota (e consequentemente de taninos), pelo que o menor efeito observado para o nível de 17% de PB pode igualmente ter sido devido ao menor conteúdo do meio em taninos. Seja como fôr, o que interessa comparar são as relações tanino:proteína das misturas alimentares. À medida que aquela relação foi diminuindo, foi-se atenuando o efeito depressivo atribuído aos taninos.

Estas observações foram confirmadas numa experiência complementar em que se incubaram quantidades fixas de bagaço de girassol (96 mg; 26 mg PB) com quantidades crescentes de bolota (Quadro 4.10.).

Quadro 4.10. Produção de gás, e níveis de amônia, do bagaço de girassol incubado com quantidades crescentes de bolota (n=3).

BOLOTA (mg)	PEG (%)	PG (ml) $\pm$ s		N-NH <sub>3</sub> (mg.100ml <sup>-1</sup> ) $\pm$ s	
		12h	24h	12h	24h
0	0	9,5 1,3	14,5 2,1	2,120 0,293	3,308 0,355
0	5	8,5 0,8	14,5 3,5	2,350 0,085	3,605 0,134
85	0	22,8 1,5	28,8 1,5	1,010 0,090	1,99 0,060
85	5	23,8 1,0	31,0 1,8	1,290 0,110	2,87 0,110
128	0	25,7 0,6	35,3 0,9	0,800 0,091	1,650 0,022
128	5	33,0 1,8	41,8 1,7	0,910 0,120	2,310 0,190
171	0	36,3 3,1	40,0 2,6	0,400 0,080	1,320 0,079
171	5	40,7 2,2	50,2 3,1	0,670 0,030	1,930 0,080

As diferenças percentuais, na produção de gás, induzidas pelo PEG, foram crescendo à medida que aumentou a quantidade de bolota incubada em simultâneo com o bagaço. A diferença maior foi observada para 128mg de bolota às 12h, e 171mg às 24h, altura em que as diferenças percentuais

nos níveis de amônia foram igualmente as maiores. Às 12h, a diferença na produção de gás, obtida com 171mg, foi menor que a obtida com 128mg. Para o mesmo tempo de incubação, e com aquela quantidade de bolota, o efeito do PEG sobre o nível de amônia foi o maior observado, e os níveis de amônia, os mais baixos. É provável que o esgotamento do substrato amoniacal justifique a menor diferença induzida pelo PEG sobre a produção de gás às 12h com 171 mg de bolota.

Note-se que para os incubados com 0, 85, 128 e 171 mg de bolota corresponderam substratos com 27%, 16,6%, 14,2% e 12,7% de PB (atendendo às quantidades de bagaço de girassol e bolota incubados e à concentração de PB em cada um daqueles componentes).

Seria interessante saber se a natureza da proteína exerce alguma influência sobre a expressão dos efeitos dos compostos polifenólicos tanantes.

4.4.6. Discussão global e conclusões finais.- O ecossistema ruminal, pela diversidade de vida que apresenta, e pelo grande número de nichos ecológicos que alberga, apenas pode ser comparado aos ecossistemas tropicais (Hungate, 1975). Os mais de 20.000 trabalhos referenciados, são nos últimos 15 anos, conferem-lhe o estatuto de ecossistema mais bem estudado em toda a biosfera. Mesmo assim, estamos longe de o conhecer em toda a sua complexidade. Uma classe de microorganismos quantitativamente importante no rumen, os fungos anaeróbios, só foram descobertos há 6 anos (Bauchop, 1979). É tal a complexidade das interações microbianas, cooperativas e competitivas, na nutrição e crescimento dos indivíduos, que ocupam cada nicho particular, digestão dos glúcidos, azoto e lípidos, e fermentação dos substratos solubilizados, que a definição quantitativa da ecologia do rumen requer a aplicação de técnicas de modelação por computador.

Sómente por este processo seremos capazes de avaliar os dados e conceitos disponíveis, para adequação ao domínio quantitativo e dinâmico.

Nenhum sistema *in vitro* é capaz de simular a complexidade e número de nichos ecológicos existentes no rumen *in vivo*, em que factores muito diversos, tais como a complexidade dos substratos alimentares (Hungate, 1966; Tamminga, 1979) a frequência e nível de ingestão alimentares (Ganev et al., 1979; Zinn e Owens, 1983) a natureza física e química dos alimentos (Genest, 1982), entre outros, determinam taxas de degradação e de passagem que afectam não só as eficiências dos crescimentos microbianos individuais como, em última análise, a eficiência de todo o ecossistema. Seja como for, estas técnicas são insubstituíveis, se não para estudos quantitativos, pelo menos para os qualitativos.

As técnicas de estudo *in vitro* utilizadas permitem detectar diferenças nas fermentações que não poderiam ser detectadas por qualquer outra, por falta de sensibilidade. Além disso é ideal para estudos em que o conhecimento da cinética fermentativa é importante.

Um dos factores que poderá ter influenciado, de várias maneiras, os resultados dos presentes estudos, foram os baixos níveis de amônia verificados nos meios de incubação. Menke et al., (1979), Raab (1980), Cafantaris (1981), e Jilg (1982), verificaram concentrações de amônia, nos seus estudos, bastante superiores. Estes autores introduziram bicarbonato de amônia nos meios tamponizantes, o que poderá justificar, pelo menos em parte, as diferenças observadas. Os baixos níveis de amônia deverão ter resultado, quer de insuficiente proteólise e desaminação, quer de esgotamento da amônia por excesso de energia. A população microbiana deriva a maior parte dos seus ácidos aminados do  $N-NH_3$ . Mesmo com dietas normais, 30% a 80% do N bacteriano, e 25% a 64% do protozoário, pode derivar do  $N-NH_3$  (Nolan, 1975).

Não existe unanimidade relativamente à concentração de  $\text{N-NH}_3$  mais adequada para o crescimento microbiano máximo. Vários autores referem valores de 5 a  $8 \text{ mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$  (Allison, 1970; Annison, 1975; Nikolic et al., 1975; Satter e Slyter, 1974), enquanto que Miller (1973) refere valores de  $29 \text{ mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$ . Estudos *in vivo* indicam valores de  $9 \text{ mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$  (Hume et al., 1970),  $5 \text{ mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$  (Okorie et al., 1977) e mesmo  $23,5 \text{ mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$  (Mehrez et al., 1977). Contudo, Ortega et al., (1979) não confirmaram estas últimas observações. O efeito da disponibilidade em azoto sobre a taxa de crescimento microbiano não é o de uma relação simples dose-resposta. A proteólise ocorre após ligação da proteína à bactéria (Nugent e Mangan, 1981). Os protozoários contribuem igualmente para a proteólise, mas a actividade proteolítica bacteriana é dez vezes superior à daqueles (Williams, 1982). A desaminação não oxidativa no rumen parece ser superior à da proteólise, já que raramente há acumulação de ácidos aminados. A desaminação processa-se basicamente através da reacção de Stickland (Broderick e Balthrop, 1979).

Se o nível de azoto não for adequado, pode ocorrer fermentação desacoplada (sem produção útil de ATP) (Mc Meniman et al., 1976; Buttery, 1977). Em contraste, se o nível de azoto for excessivo, a energia pode ser o factor limitante para a eficiente utilização do azoto. Buttery (1976) e Buttery e Lewis (1976) descreveram recentemente as vias metabólicas de fixação da amônia pelas bactérias. Seria de esperar, a partir de considerações teóricas, que a concentração de amônia no rumen, que satura a capacidade dos microorganismos para sintetizar proteína, fosse relativamente baixa. As constantes de saturação de amônia observadas por Schaefer et al., (1980) para 9 espécies de bactérias do rumen variaram entre 15 e  $55 \mu\text{M}$ , o que é indicativo de que 95% da taxa máxima de crescimento deveria ter ocorrido a concentrações de amônia inferiores a  $1 \text{ mM}$ . A via mais

importante no rumen parece envolver a glutamato desidrogenase ( $K_m=5 \times 10^{-4}$ ) (Bhatia et al., 1980). O  $\text{NH}_3$  é primeiramente assimilado em ácido glutâmico e depois transferido para outros esqueletos carbonados pelas transaminases (Chalupa et al., 1970; Bhatia et al., 1980). Contudo, algumas bactérias (v.g. *B. ruminicola*) não têm citrato sintetase nem isocitrato desidrogenase, duas enzimas essenciais à síntese (via ciclo de Krebs) do  $\alpha$ -cetoglutarato, o precursor imediato na síntese do glutamato pela glutamato desidrogenase. Muitos microorganismos utilizam a via da glutamina sintetase (Hobson e Wallace, 1982), a qual é útil para a captação de baixas concentrações de amônia devido ao baixo  $K_m$  para o  $\text{NH}_3$  da glutamina sintetase ( $K_m=1,8 \times 10^{-3}$  M). Esta via apenas é activada por baixas concentrações de  $\text{NH}_3$  (Erfle et al., 1977).

Apesar da existência daquela última via, a eficiência energética da síntese proteica diminui com baixas concentrações de amônia (Okorie et al., 1977), ocorrendo normalmente, em tais condições, fermentação energeticamente desacoplada (Kang-Meznarich e Broderick, 1981). Assim, as baixas concentrações de amônia observadas nos presentes estudos *in vitro* deverão ter afectado de alguma forma o significado global das observações. Note-se, contudo, que o nível da amônia no rumen dos ovinos dadores de inóculo, alimentados com bolota, feno e bagaço de girassol (ração com 13% de PB) não ultrapassou normalmente os  $3 \text{mg} \cdot 100 \text{ml}^{-1}$ .

Quanto à influência dos substratos energéticos, não é aparente nenhum efeito directo do tipo de glúcido fermentado sobre a produção de ATP e a taxa de crescimento microbiano. Tammínga (1979) refere que, com base em cálculos bioquímicos teóricos, se verificam apenas pequenas diferenças na produção de ATP por equivalente de hexose fermentada quando a fermentação do tipo acetato se desvia para a do tipo propionato ou butirato. A degradação dos glúcidos facilmente fermentescíveis pode, no en-

tanto, ter resultado na formação de ácido láctico como produto final, ou de propionato através da ineficiente via do acrilato. Nestas condições a produção final de ATP por equivalente de hexose fermentada pode ser reduzida em 50% e as células microbianas podem ter derivado uma parte substancial do substrato energético para manutenção.

Aos incrementos na produção de gás podem não ter correspondido, necessariamente, crescimentos microbianos equivalentes.

Dos resultados obtidos podem-se salientar as seguintes conclusões genéricas:

- Os métodos de estudo do rumen *in vitro* utilizados adequaram-se melhor aos estudos da cinética da fermentação ruminal que aos da degradação do azoto.
- Para as fermentações *in vitro* seria mais adequada a utilização de um meio tamponizante mais complexo, contendo uma fonte de azoto não proteico, como por exemplo o sugerido por Menke *et al.*, (1979).
- Para as condições utilizadas nos presentes estudos no rumen *in vitro* os substratos estiveram, aparentemente em excesso acima de 250mg para os energeticamente mais concentrados, como o milho grão, enquanto que para os menos concentrados, como o feno, não se verificou nenhum excesso aparente até 500mg.
- A percentagem de bolota ou alfarroba, nas misturas alimentares, a partir da qual se observou efeito depressivo dos taninos foi diferente consoante os tempos de incubação considerados:

Nas misturas de bolota+milho grão foi de 40% para as 12h e 60% para as 24h de incubação; nas de alfarroba+milho grão foi de 20% para ambos os tempos de incubação.

Nas misturas de bolota+milho+feno foi de 30% tanto ao fim de 12h como de 24h de incubação; nas de alfarroba+milho+feno foi de 30% para ambos

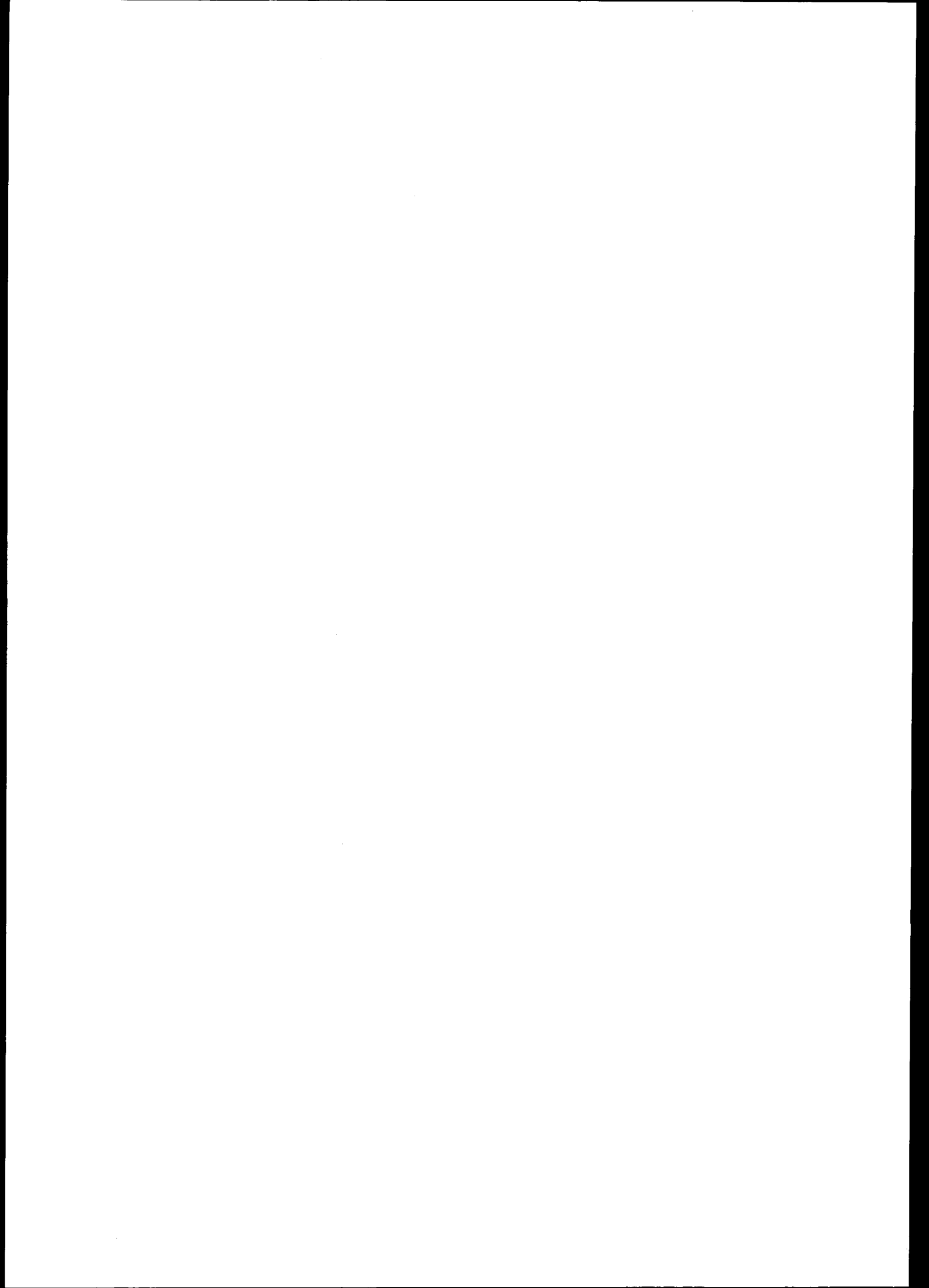
os tempos de incubação.

- Com substratos incubados em excesso os níveis de PB das misturas alimentares influenciaram o efeito dos taninos tanto da bolota como da alfarroba. Os efeitos mais pronunciados foram observados para 4,6% e 7,1% de PB, para a bolota e alfarroba, respectivamente. Os decréscimos nos efeitos deletéreos estiveram positivamente correlacionados com os níveis azotados, ao fim de 12h de incubação, exceção feita para 13% de PB e para a alfarroba. Os efeitos benéficos foram mais aparentes com a adição de bagaço de soja que de ureia.

- Com quantidades limitantes de bolota e bagaço de girassol os efeitos dos taninos foram mais atenuados para as concentrações azotadas mais elevadas, às quais corresponderam igualmente os mais baixos níveis de taninos.

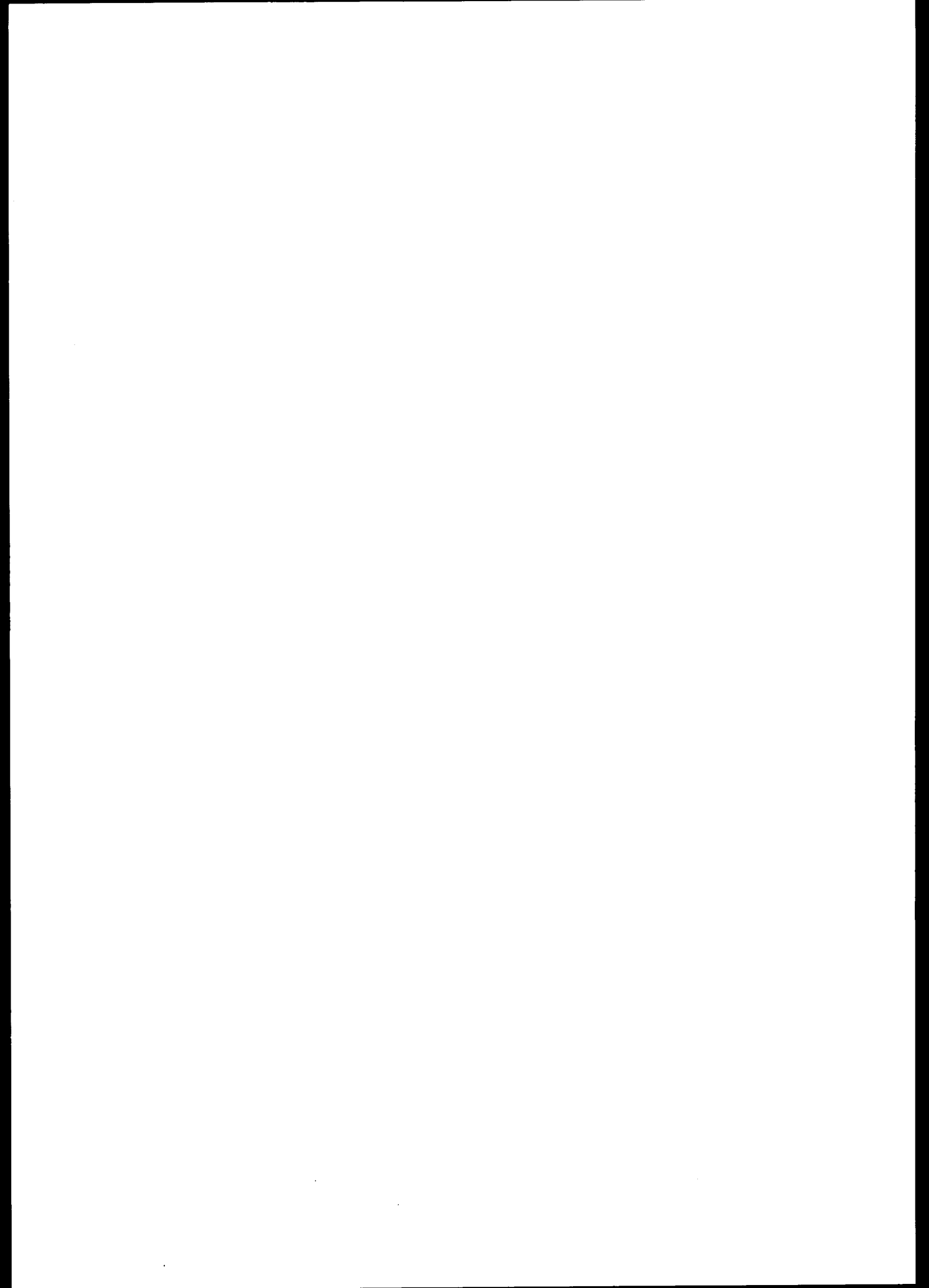
- Os efeitos depressivos dos taninos, tanto da bolota como da alfarroba, foram atenuados com o avançar do tempo de incubação. Tais atenuações poderão ter sido resultantes de fermentações energeticamente desacopladas, ou atípicas.





CAPÍTULO IV

ANEXOS



Quadro A 4.1. Produção de gás (ml) em função do tipo e quantidade de substrato, e do tempo de incubação. (n=3).

SUBSTRATO	MS (mg)	Tempo de incubação (h)												PG <sub>r</sub> 12h PG <sub>r</sub> 48h	PG <sub>r</sub> 24h PG <sub>r</sub> 48h
		4		8		12		24		48					
		PG <sub>r</sub>	s	PG <sub>r</sub>	s	PG <sub>r</sub>	s	PG <sub>r</sub>	s	PG <sub>r</sub>	s				
AMIDO (96%MS)	46,6	1,4	0,2	6,6	0,9	12,3	2,3	15,3	1,8	18,8	1,8	0,65	0,81		
	96,0	5,4	0,8	16,5	1,2	22,3	1,6	36,3	2,3	45,6	1,8	0,51	0,81		
	144,0	8,2	0,6	24,3	3,8	37,2	1,9	57,3	1,9	66,0	2,5	0,56	0,87		
	192,0	11,7	0,6	37,5	2,5	56,2	2,7	75,7	2,9	83,0	2,6	0,68	0,91		
	288,0	16,4	1,4	52,7	2,2	77,2	2,0	107,7	2,0	122,8	3,2	0,63	0,88		
	384,0	20,2	1,5	67,8	4,0	90	3,5	140,2	2,8	146,2	3,2	0,62	0,96		
CELULOSE a) (97,4%MS)	48,7	-0,1	0,6	0,6	-0,2	2,5	-0,2	16,1	1,1	25,0	2,9	0,10	0,64		
	97,4	0,1	0,1	0,9	-0,2	6,1	-0,4	33,3	2,0	43,1	2,7	0,14	0,77		
	194,8	0,1	0,1	2,1	-0,2	13,3	-1,4	59,2	2,3	78,9	2,4	0,17	0,75		
	292,2	0,2	0,1	2,4	-0,2	17,0	-1,9	71,4	1,5	114,8	5,0	0,15	0,62		
	389,6	0,2	0,1	2,5	-0,2	17,2	-1,9	76,5	1,4	123,7	1,6	0,14	0,62		
	584,4	0,1	0,1	3,3	0,2	18,7	1,4	80,7	1,2	139,3	6,6	0,13	0,58		
MILHO (grão) (84,1%MS)	42,0	1,2	-0,2	5,1	-0,4	7,4	0,4	12,1	2,0	15,6	1,1	0,47	0,78		
	84,1	4,7	-0,5	13,6	-0,5	17,6	1,6	33,3	2,0	36,1	2,2	0,48	0,92		
	126,2	7,9	-1,1	20,6	-2,9	28,3	1,9	48,2	3,3	51,9	3,8	0,54	0,93		
	168,2	9,3	-1,1	25,3	-2,4	37,9	-3,2	62,7	2,7	68,0	2,5	0,56	0,92		
	252,3	12,9	-2,3	37,8	-2,0	54,7	2,6	90,1	4,5	97,8	4,1	0,56	0,92		
	336,4	16,7	-1,7	49,4	-2,9	71,9	2,1	107,0	7,6	124,6	12,0	0,58	0,86		
FENO (90,3%MS)	45,2	1,3	1,4	2,0	0,4	6,0	0,5	9,4	0,9	12,7	1,5	0,47	0,74		
	90,3	1,4	0,3	4,9	0,8	11,0	1,9	19,2	2,8	23,4	3,4	0,47	0,82		
	180,6	3,7	0,8	10,4	1,7	23,7	2,3	38,0	2,5	49,4	3,8	0,48	0,77		
	270,9	6,5	0,7	16,7	1,8	35,9	2,7	57,0	3,3	71,3	3,6	0,50	0,80		
	451,5	12,0	1,9	27,9	3,0	50,3	3,2	88,3	3,9	110,4	7,6	0,46	0,80		
	632,1	14,8	1,6	38,7	2,7	68,3	2,8	130,2	5,3	164,8	4,8	0,41	0,79		

.../

.../

BOLOTA a) (85%MS)	42,5	1,4	0,5	5,8	1,1	7,8	1,3	9,5	1,3	13,0	2,0	0,60	0,73
	85,0	6,5	0,6	15,5	1,5	18,6	3,4	26,1	2,6	32,7	2,0	0,57	0,80
	127,5	11,3	1,6	23,6	2,4	29,8	3,0	37,7	1,5	50,1	2,2	0,59	0,75
	170	13,3	1,2	28,7	2,7	39,9	2,9	49,0	2,5	63,6	3,5	0,63	0,77
	255	18,5	2,7	43,3	3,2	57,6	3,7	70,4	3,6	92,1	3,5	0,63	0,76
340,0	23,9	3,3	56,6	2,7	75,8	4,0	83,2	4,2	108	12,0	0,71	0,78	
ERVA (93,7%MS)	46,9	1,6	0,2	4,4	0,7	7,3	0,7	11,5	1,4	12,7	0,8	0,57	0,89
	93,7	4,2	0,7	11,6	2,1	15,8	2,4	25,3	1,8	28,5	1,8	0,55	0,89
	187,4	6,9	1,1	22,0	1,9	30,7	2,8	40,8	3,1	46,9	1,9	0,65	0,87
	281,1	16,0	1,4	36,7	1,9	48,6	4,8	66,0	5,2	72,5	5,1	0,67	0,91
	374,8	21,4	2,3	46,5	2,8	63,0	3,8	80,9	3,2	93,0	3,4	0,67	0,87
562,2	29,2	2,0	63,8	2,1	89,9	3,2	114,4	6,0	133,0	5,3	0,68	0,86	

a) Adicionou-se caseína à saliva sintética a fim de obter uma concentração de 8% de PB (% da MS) no meio de incubação

Quadro A 4.2. Influência do PEG sobre a produção de gás (ml, ±s) de misturas alimentares a), contendo proporções variáveis de bolota ou alfarroba e milho grão, incubadas (1g de MS) no rumen *in vitro*. (n=3).

MS (%)		PEG (%)	Tempo de incubação (h)			
MILHO	BOLOTA		3	6	12	24
100	0	0	5,8 <sup>a</sup> 0,8	16,5 <sup>a</sup> 1,7	41,0 <sup>a</sup> 2,4	158,5 <sup>a</sup> 3,1
		5	4,7 <sup>b</sup> 0,8	15,7 <sup>a</sup> 1,6	40,0 <sup>a</sup> 2,6	153,2 <sup>a</sup> 3,3
80	20	0	6,7 <sup>a</sup> 1,5	18,8 <sup>a</sup> 2,6	38,4 <sup>a</sup> 2,0	140,2 <sup>b</sup> 4,0
		5	6,0 <sup>a</sup> 1,0	18,5 <sup>a</sup> 2,9	36,5 <sup>a</sup> 2,7	141,0 <sup>b</sup> 4,3
60	40	0	14,3 <sup>c</sup> 2,5	30,5 <sup>b</sup> 2,9	66,7 <sup>b</sup> 2,9	141,4 <sup>b</sup> 5,1
		5	14,2 <sup>c</sup> 3,0	24,8 <sup>c</sup> 1,6 *	70,3 <sup>b</sup> 3,1	138,2 <sup>b</sup> 3,1
40	60	0	22,8 <sup>d</sup> 2,7	41,3 <sup>d</sup> 2,5	79,9 <sup>c</sup> 2,4	142,2 <sup>b</sup> 2,9
		5	23,2 <sup>d</sup> 2,9	42,7 <sup>d</sup> 2,7	85,9 <sup>d</sup> 2,6 *	153,2 <sup>a</sup> 3,4 ***
20	80	0	26,5 <sup>d</sup> 2,6	42,3 <sup>d</sup> 1,6	73,7 <sup>e</sup> 3,0	132,8 <sup>c</sup> 3,1
		5	28,0 <sup>df</sup> 2,6	47,5 <sup>e</sup> 1,3 **	88,0 <sup>d</sup> 3,3 ***	146,7 <sup>d</sup> 3,3 ***
0	100	0	28,2 <sup>f</sup> 1,9	48,2 <sup>e</sup> 1,2	89,7 <sup>d</sup> 3,3	134,7 <sup>c</sup> 2,9
		5	34,5 <sup>g</sup> 1,7 **	56,5 <sup>f</sup> 2,8 ***	103,2 <sup>f</sup> 2,9 ***	149,0 <sup>d</sup> 3,7 ***
MILHO	ALFARROBA			10		
100	0	0	8,0 <sup>a</sup> 1,9	25,4 <sup>a</sup> 2,7	59,3 <sup>a</sup> 4,4	146,5 <sup>a</sup> 3,1
		5	7,0 <sup>a</sup> 2,3	25,3 <sup>a</sup> 2,7	59,3 <sup>a</sup> 4,6	145,3 <sup>a</sup> 6,2
80	20	0	20,0 <sup>b</sup> 4,7	46,1 <sup>b</sup> 4,8	67,5 <sup>b</sup> 4,7	137,0 <sup>b</sup> 5,3
		5	23,0 <sup>b</sup> 4,7	47,3 <sup>b</sup> 4,3	79,5 <sup>c</sup> 4,0 **	146,5 <sup>a</sup> 5,3 **
60	40	0	28,8 <sup>c</sup> 4,9	51,9 <sup>b</sup> 3,5	68,5 <sup>b</sup> 4,8	127,8 <sup>c</sup> 3,4
		5	34,8 <sup>d</sup> 3,8 *	70,6 <sup>c</sup> 3,6 ***	93,8 <sup>d</sup> 5,0 ***	143,5 <sup>a</sup> 3,3 ***
40	60	0	34,3 <sup>d</sup> 5,7	59,2 <sup>d</sup> 5,1	75,8 <sup>c</sup> 4,6	132,5 <sup>b</sup> 2,6
		5	46,8 <sup>e</sup> 4,3 **	75,9 <sup>e</sup> 5,5 ***	93,8 <sup>d</sup> 3,9 ***	142,0 <sup>a</sup> 3,4 ***
20	80	0	34,5 <sup>d</sup> 4,7	60,4 <sup>d</sup> 3,9	75,8 <sup>c</sup> 3,8	134,5 <sup>b</sup> 2,7
		5	53,0 <sup>f</sup> 6,4 **	98,6 <sup>f</sup> 4,9 ***	119,3 <sup>e</sup> 5,1 ***	159,5 <sup>d</sup> 4,2 ***
0	100	0	33,8 <sup>d</sup> 4,2	61,7 <sup>d</sup> 3,9	75,8 <sup>c</sup> 4,9	122,5 <sup>e</sup> 2,4
		5	59,0 <sup>g</sup> 4,0 ***	101,3 <sup>f</sup> 4,5 ***	117,3 <sup>e</sup> 5,7 ***	145,0 <sup>a</sup> 3,8 ***

a) As misturas foram ajustadas a 13% de PB através da adição de bagaço de soja.

Dentro de cada coluna, e para cada tipo de produto nas misturas, valores referenciados com letras diferentes diferem estatisticamente (P<0,01)

Quadro A 4.3. Influência do PEG sobre a produção de gás (ml,  $\pm$ s) de misturas alimentares a), contendo proporções fixas de feno de aveia e vicia, e variáveis de bolota ou alfarroba, incubadas (1g de MS) no rumen *in vitro*. (n=3).

MS (%)			PEG (%)	Tempo de incubação (h)			
Feno de aveia e vicia	Milho	Bolota		3	6	12	24
50	50	0	0 5	6,2 <sup>a</sup> 2,4 6,0 <sup>a</sup> 1,3	25,0 <sup>a</sup> 3,3 26,3 <sup>a</sup> 2,4	50,5 <sup>a</sup> 3,3 53,0 <sup>a</sup> 2,2	127,5 <sup>a</sup> 3,9 128,2 <sup>a</sup> 3,1
	40	10	0 5	5,8 <sup>a</sup> 1,3 6,0 <sup>a</sup> 1,0	27,2 <sup>ab</sup> 2,0 27,5 <sup>ab</sup> 2,0	51,2 <sup>a</sup> 1,3 51,8 <sup>a</sup> 2,3	120,0 <sup>b</sup> 4,1 120,2 <sup>b</sup> 4,0
	30	20	0 5	12,5 <sup>b</sup> 0,5 9,3 <sup>c</sup> 0,5 *	29,7 <sup>b</sup> 1,9 30,3 <sup>b</sup> 1,5	54,6 <sup>a</sup> 2,2 53,8 <sup>a</sup> 1,9	120,4 <sup>b</sup> 5,7 118,0 <sup>b</sup> 6,2
	20	30	0 5	9,8 <sup>dc</sup> 4,5 10,0 <sup>c</sup> 1,2	28,9 <sup>ab</sup> 2,9 28,8 <sup>ab</sup> 2,2	44,8 <sup>b</sup> 1,3 50,6 <sup>a</sup> 1,9 **	106,5 <sup>c</sup> 6,9 118,0 <sup>b</sup> 7,2 *
	10	40	0 5	9,3 <sup>c</sup> 2,8 11,8 <sup>bc</sup> 2,9	26,3 <sup>a</sup> 1,9 38,7 <sup>c</sup> 1,8 ***	48,5 <sup>c</sup> 1,8 59,3 <sup>d</sup> 2,1 ***	96,5 <sup>d</sup> 5,1 107,0 <sup>c</sup> 2,5 **
	0	50	0 5	12,0 <sup>c</sup> 2,1 12,5 <sup>c</sup> 1,6	28,0 <sup>ab</sup> 2,6 39,3 <sup>c</sup> 2,2 ***	49,8 <sup>ac</sup> 4,9 60,2 <sup>d</sup> 1,2 ***	98,3 <sup>d</sup> 2,8 111,7 <sup>cb</sup> 4,6 **
		Alfarroba			11		
50	50	0	0 5	11,8 <sup>a</sup> 2,6 12,0 <sup>a</sup> 3,0	28,6 <sup>a</sup> 2,6 29,3 <sup>a</sup> 2,2	53,3 <sup>a</sup> 2,9 55,3 <sup>a</sup> 3,4	128 <sup>a</sup> 2,9 127,3 <sup>a</sup> 4,7
	40	10	0 5	17,0 <sup>b</sup> 4,0 19,8 <sup>b</sup> 4,9	37,5 <sup>b</sup> 3,9 44,8 <sup>c</sup> 2,5 *	56,0 <sup>a</sup> 6,0 63,0 <sup>b</sup> 4,8 *	123,0 <sup>b</sup> 2,0 123,3 <sup>ab</sup> 5,1
	30	20	0 5	24,8 <sup>c</sup> 4,6 27,0 <sup>c</sup> 5,8	50,3 <sup>d</sup> 3,3 54,0 <sup>d</sup> 2,9	67,0 <sup>bc</sup> 5,3 70,0 <sup>c</sup> 3,9	123,8 <sup>b</sup> 1,3 122,3 <sup>b</sup> 2,2
	20	30	0 5	35,3 <sup>d</sup> 1,7 38,3 <sup>d</sup> 1,7	59,3 <sup>e</sup> 3,1 66,3 <sup>f</sup> 2,5 **	79,3 <sup>d</sup> 5,3 87,8 <sup>e</sup> 2,8 **	118,3 <sup>b</sup> 3,3 129,3 <sup>a</sup> 2,7 **
	10	40	0 5	39,5 <sup>e</sup> 1,2 44,0 <sup>f</sup> 3,9 *	69,3 <sup>f</sup> 3,1 74,3 <sup>gi</sup> 2,9 *	91,0 <sup>e</sup> 5,4 104,3 <sup>f</sup> 5,0	122,5 <sup>ab</sup> 4,1 138,3 <sup>c</sup> 3,8 **
	0	50	0 5	42,8 <sup>f</sup> 0,9 47,5 <sup>g</sup> 0,8 **	72,5 <sup>g</sup> 2,4 78,3 <sup>hi</sup> 3,2 **	95,5 <sup>eg</sup> 3,7 104,0 <sup>f</sup> 3,5 *	122,3 <sup>b</sup> 3,3 134,8 <sup>c</sup> 2,4 ***

a) As misturas foram ajustadas a 13% de PB através da adição de Zeína. Dentro de cada coluna, e para cada tipo de produto nas misturas, valores referenciados com letras diferentes diferem estatisticamente (P<0,01)

Quadro A 4.4. Influência do PEG, e do azoto da ureia e da soja, sobre a produção de gás (ml,  $\pm$ s) da bolota (1g de MS) incubada no rumen *in vitro*. (n=3).

PB no substrato incubado (%)	PEG (% MS)	Tempo de incubação (h)				
		3	6	12	24	
UREIA	4,6	0	1,0 <sup>a</sup> 1,4	5,2 <sup>a</sup> 1,2	19,7 <sup>a</sup> 2,1	60,7 <sup>a</sup> 2,5
		5	5,3 <sup>b</sup> <sub>***</sub> 1,5	13,7 <sup>b</sup> <sub>***</sub> 1,3	36,7 <sup>b</sup> <sub>***</sub> 3,0	93,7 <sup>b</sup> <sub>***</sub> 4,8
	10,0	0	3,3 <sup>b</sup> 1,5	1,2 <sup>c</sup> 1,5	57,0 <sup>ce</sup> 4,9	144,5 <sup>c</sup> 7,4
		5	0,8 <sup>a</sup> <sub>**</sub> 1,5	4,2 <sup>a</sup> <sub>**</sub> 1,0	59,0 <sup>c</sup> 2,2	149,0 <sup>ce</sup> 3,3
13,0	0	4,0 <sup>b</sup> 1,4	0,7 <sup>c</sup> 1,2	57,0 <sup>c</sup> 2,4	146,0 <sup>c</sup> 3,6	
	5	1,0 <sup>a</sup> <sub>*</sub> 1,6	5,3 <sup>a</sup> <sub>***</sub> 1,8	67,6 <sup>d</sup> <sub>***</sub> 1,9	150,7 <sup>de</sup> <sub>***</sub> 2,9	
SOJA	16,0	0	2,2 <sup>c</sup> 1,0	2,7 <sup>c</sup> 1,2	52,1 <sup>e</sup> 2,6	130,0 <sup>f</sup> 3,8
		5	0,2 <sup>a</sup> 1,6	6,2 <sup>a</sup> <sub>*</sub> 2,2	56,8 <sup>fc</sup> <sub>*</sub> 3,7	140,0 <sup>c</sup> <sub>**</sub> 5,0
	10,0	0	3,2 <sup>b</sup> 2,3	10,7 <sup>b</sup> 2,5	38,6 <sup>b</sup> 3,0	90,5 <sup>b</sup> 3,9
		5	6,3 <sup>d</sup> <sub>*</sub> 2,2	17,2 <sup>d</sup> <sub>***</sub> 1,6	59,2 <sup>fc</sup> <sub>***</sub> 4,1	150,8 <sup>cde</sup> <sub>***</sub> 6,1
13,0	0	5,8 <sup>d</sup> 1,5	16,5 <sup>d</sup> 1,4	48,4 <sup>g</sup> 1,9	123,5 <sup>g</sup> 2,9	
	5	7,3 <sup>d</sup> 2,6	22,2 <sup>e</sup> <sub>**</sub> 1,6	70,9 <sup>hd</sup> <sub>***</sub> 2,2	166,8 <sup>h</sup> <sub>***</sub> 3,4	
16,0	0	6,8 <sup>d</sup> 2,0	21,3 <sup>e</sup> 1,7	69,7 <sup>hd</sup> 4,0	155,5 <sup>ie</sup> 6,7	
	5	9,3 <sup>d</sup> 1,6	27,7 <sup>f</sup> <sub>**</sub> 2,0	80,8 <sup>i</sup> <sub>***</sub> 3,0	173,8 <sup>j</sup> <sub>***</sub> 4,6	

Quadro A 4.5. Influência do PEG, e do azoto da ureia e da soja, sobre a produção de gás (ml,  $\pm$ s) da alfarroba (1g de MS) incubada no rumen *in vitro*. (n=3).

PB no substrato incubado (%)	PEG (% MS)	Tempo de incubação (h)				
		3	6	12	24	
UREIA	4,6	0	7,8 <sup>a</sup> 0,9	27,8 <sup>a</sup> 2,6	55,3 <sup>a</sup> 1,3	99,0 <sup>a</sup> 3,3
		5	13,5 <sup>b</sup> <sub>***</sub> 1,8	42,3 <sup>b</sup> <sub>***</sub> 3,3	78,0 <sup>b</sup> <sub>***</sub> 2,2	132,0 <sup>b</sup> <sub>***</sub> 5,2
	10,0	0	-4,2 <sup>c</sup> 1,5	24,5 <sup>a</sup> 2,2	73,8 <sup>b</sup> 5,4	132,3 <sup>b</sup> 7,5
		5	4,8 <sup>d</sup> <sub>***</sub> 1,5	43,3 <sup>b</sup> <sub>***</sub> 0,9	99,8 <sup>c</sup> <sub>***</sub> 3,2	161,5 <sup>c</sup> <sub>***</sub> 6,1
13,0	0	-1,2 <sup>e</sup> 1,3	26,3 <sup>a</sup> 3,5	73,0 <sup>b</sup> 7,0	133,3 <sup>b</sup> 13,1	
	5	0,3 <sup>e</sup> 1,0	43,3 <sup>bc</sup> <sub>***</sub> 3,4	109,3 <sup>de</sup> <sub>***</sub> 8,9	186,0 <sup>d</sup> <sub>***</sub> 17,3	
SOJA	16,0	0	-2,5 <sup>f</sup> 0,8	29,0 <sup>a</sup> 3,9	86,5 <sup>e</sup> 3,5	161,5 <sup>c</sup> 2,4
		5	-0,5 <sup>e</sup> 2,1	39,0 <sup>c</sup> <sub>**</sub> 3,8	106,8 <sup>d</sup> <sub>***</sub> 3,5	186,0 <sup>d</sup> <sub>***</sub> 2,8
	10,0	0	12,0 <sup>b</sup> 3,4	36,5 <sup>c</sup> 4,8	79,5 <sup>b</sup> 8,9	141,0 <sup>bf</sup> 10,5
		5	16,0 <sup>g</sup> <sub>*</sub> 1,3	60,5 <sup>d</sup> <sub>***</sub> 1,2	113,3 <sup>e</sup> <sub>***</sub> 2,6	181,0 <sup>e</sup> <sub>***</sub> 3,3
13,0	0	12,0 <sup>b</sup> 1,2	36,0 <sup>c</sup> 1,6	74,8 <sup>b</sup> 5,6	150,0 <sup>f</sup> 4,0	
	5	15,3 <sup>g</sup> <sub>*</sub> 0,9	62,0 <sup>d</sup> <sub>***</sub> 0,6	121,8 <sup>g</sup> <sub>***</sub> 3,8	204,0 <sup>g</sup> <sub>***</sub> 4,2	
16,0	0	14,8 <sup>bg</sup> 2,1	61,8 <sup>d</sup> 0,9	122,0 <sup>g</sup> 4,1	223,0 <sup>h</sup> 3,4	
	5	11,0 <sup>b</sup> <sub>*</sub> 1,7	78,5 <sup>e</sup> <sub>***</sub> 2,2	141,3 <sup>h</sup> <sub>***</sub> 3,9	231,0 <sup>i</sup> <sub>**</sub> 4,8	

Dentro de cada coluna, e para cada quadro, valores referenciados com letras diferentes diferem estatisticamente (P<0,01)



Quadro A 4.6. Influência do PEG e do nível azotado sobre a degradação do azoto de misturas alimentares contendo bolota e bagaço de girassol. (n=3).

PB (%MS)	PEG (%MS)	Tempo incub. (h)	N (mg)	Branco N-NH <sub>3</sub> mg ±s	A M I D O (mg MS)						N Degradado (%) ±s						
					0			144				N-NH <sub>3</sub> ao mg ±s					
					PGR ml	±s	N-NH <sub>3</sub> mg	±s	PGR ml	±s			N-NH <sub>3</sub> mg	±s			
11	0	12	4,16	0,057	0,007	27,8	2,5	0,423	0,051	39,8	1,9	0,153	0,018	1,071	0,182	24,4 <sup>a</sup>	4,4
	24	4,16	0,486	0,028	37,8	2,2	1,332	0,124	61,3	1,5	0,418	0,026	2,851	0,554	56,9 <sup>b</sup>	7,6	
13	5	12	4,16	0,057	0,007	31,0	1,0	0,831	0,026	49,0	2,0	0,252	0,012	1,895	0,127	44,2 <sup>c</sup>	3,0
	24	4,16	0,486	0,028	37,0	1,2	1,956	0,141	72,0	2,1	0,838	0,037	3,097	0,362	62,8 <sup>b</sup>	8,7	
15	0	12	4,16	0,068	0,025	22,0	0,8	0,780	0,065	38,3	1,3	0,251	0,098	1,497	0,144	34,4 <sup>d</sup>	3,5
	24	4,16	0,370	0,054	27,0	1,4	1,711	0,108	57,0	1,8	0,567	0,024	2,747	0,189	57,2 <sup>b</sup>	4,6	
17	5	12	4,16	0,068	0,025	24,3	1,5	1,400	0,085	45,3	1,6	0,400	0,195	2,566	0,112	60,0 <sup>b</sup>	2,7
	24	4,16	0,370	0,054	30,0	3,9	2,325	0,150	62,5	1,3	1,139	0,051	3,452	0,420	74,0 <sup>e</sup>	8,4	
15	0	12	4,16	0,068	0,033	17,5	1,3	0,911	0,074	36,3	1,9	0,296	0,025	1,484	0,106	34,0 <sup>d</sup>	2,6
	24	4,16	3,700	0,104	21,8	1,7	1,918	0,271	53,3	1,5	0,625	0,082	2,813		58,7 <sup>b</sup>	8,9	
17	5	12	4,16	0,068	0,041	19,8	0,5	1,729	0,082	40,0	2,2	0,498	0,019	2,932	0,126	68,9 <sup>e</sup>	3,0
	24	4,16	3,700	0,111	24,3	0,5	2,853	0,154	57,8	0,9	1,263	0,014	4,004	0,238	87,4 <sup>f</sup>	5,7	
17	0	12	4,16	0,068	0,040	21,0	1,2	1,200	0,093	35,5	3,6	0,390	0,047	2,373	0,138	55,4 <sup>b</sup>	4,1
	24	4,16	0,370	0,072	23,5	1,7	2,532	0,123	52,3	1,5	0,911	0,099	3,855	0,244	83,8 <sup>f</sup>	6,3	
17	5	12	4,16	0,068	0,033	18,5	0,6	2,211	0,114	39,0	3,8	0,590	0,086	3,674	0,217	86,6 <sup>f</sup>	4,6
	24	4,16	0,370	0,084	19,3	2,1	3,216	0,117	53,8	2,2	1,413	0,113	4,225	0,309	92,7 <sup>g</sup>	5,3	

Valores referenciados com letras diferentes diferem estatisticamente (P<0,01)

## CAPÍTULO V

ESTUDOS *in vivo* DA DIGESTÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA  
E DO AZOTO, E DA SÍNTESE PROTEICA MICROBIANA EM  
OVINOS ALIMENTADOS COM ERVA DE OUTONO E BOLOTA

	Pág.
5. ESTUDOS <i>IN VIVO</i> DA DIGESTÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA E DO AZOTO, E DA SÍNTESE PROTEICA MICROBIANA, EM OVINOS ALIMENTADOS COM ERVA DE OUTONO E BOLOTA.	
5.1. Introdução . . . . .	217
5.2. Materiais e métodos . . . . .	223
5.2.1. Animais . . . . .	223
5.2.2. Alimentos . . . . .	223
5.2.3. Técnica dos saquinhos . . . . .	223
5.2.4. Marcadores de trânsito . . . . .	225
5.2.5. Condução das experiências . . . . .	227
5.2.6. Processamento das amostras . . . . .	229
5.2.7. Análises laboratoriais . . . . .	230
5.2.8. Análise estatística . . . . .	233
5.3. Resultados e discussão . . . . .	234
5.3.1. Composição química dos alimentos . . . . .	234
5.3.2. Digestibilidade aparente . . . . .	234
5.3.3. Fluxo e digestão da matéria orgânica. . . . .	235
5.3.4. Fluxo e digestão do azoto . . . . .	239
5.3.5. Desaparecimento do azoto, dos saquinhos . . . . .	248
ANEXOS . . . . .	251

5. ESTUDOS *IN VIVO* DA DIGESTÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA E DO AZOTO E DA SÍNTESE PROTEICA MICROBIANA EM OVINOS ALIMENTADOS COM ERVA DE OUTONO E BOLOTA.

5.1. Introdução

Não são exaustivos os trabalhos efectuados no sentido de avaliar o valor nutritivo e alimentar dos frutos da azinheira e do sobreiro. A maioria dos poucos trabalhos publicados foram realizados por pesquisadores espanhóis e incidiram sobre monogástricos.

Os valores relativos à composição química e valor nutritivo citados pelos autores raramente se referem à sua origem (*Q. suber L.* ou *Q. ilex L.*) e representam usualmente valores médios:

Quadro 5.1. Composição química da bolota

FRUTO	MS	% da Matéria Seca							Referências
		PB	EE	FB	ENA	Açú- cares	Amido	Cin- zas	
<i>Quercus ilex L.</i>									
Integral	57,1	2,6	5,4	7,0	41,0	-	-	1,1	EZN(1956)
Sem casca	57,9	2,8	6,6	2,1	45,2	-	-	1,2	EZN(1956)
Sêca e moída									
Integral	90,0	4-4	4-5	6-12	-	5-8	38-40	-	CATYD (1979)
	90,0	4,3	8,9	6,3	67,3	-	-	3,2	EZN(1956)
	-	6,3	13,5 13,7	5,4	-	-	-	2,04	Macarro, (1976)
Sem casca	90,0	5-6,5	4,7 7,0	4-7	70-74	6-9	42-47	2,75	CATYD (1979)
	88,8	6,4	8,5	3,3	69,0	-	-	1,7	Blanco e Macarro, (1965)

.../										
Integral, desengordurada	-	4,2	1,4	6,2	86,9	-	-	1,30	Luque e Murillo (1971)	
	-	6,1	-	8,7	-	16,4	65,9	2,3	Carvalho, (1979)	
<i>Quercus suber</i> L.										
Integral	53,0	3,3	3,2	5,4	39,9	-	-	1,02	EZN(1956)	
	-	8,1 8,6	7,0 8,7	-	-	-	-	2,14	Macarro, (1976)	
Sem casca	54,6	3,5	3,8	1,7	44,4	-	-	1,20	EZN(1956)	
Sêca e moída										
Integral	86,5	5,7	6,6	5,0	67,1	-	-	2,1	EZN(1956)	
desengordurada	-	6,4	-	13,3	-	19,7	58,6	1,0	Carvalho, (1979)	
<i>Não especificado</i>										
Integral	64,8 73,7	3,7 4,2	3,7 4,4	5,4 7,3	49,2 53,9	-	-	1,50	EZN(1956)	
verde	50	2,2	1,9	4,1	32,6	-	-	-	De Juana(1953)	
Seco e moído	85,8	4,9	7,08	11,69	74,01	-	-	2,3	Torrent et al., (1961)	
	89,6	4,9	8,70	4,5	68,9	-	-	2,6	Zorita e Arias (1965)	
	MS	PB	EE	NDF	ADF	-	Lenhina	Cinzas		
<i>Quercus ilex</i> L. + <i>Quercus suber</i> L.	89,7	5,1	17,4	30,3	16,0	-	6,23	1,4	Ferreira (1984)	

Quadro 5.2. Valor nutritivo da bolota

FRUTO	Digestibilidade (% MS)					Energia metabolizável (MJ/Kg)	TDN	Referências
	MO	PB	EE	FB	ENA			
<i>Quercus ilex</i> L.	71,7	18,2	87,3	47,3	77,1	11,9	79,3	Boza et al., (1966)
<i>Quercus serrata</i>	80,0					10,7	71	Iwata e Hirouchi (1941) - citados por Boza et al., (1966)
<i>Quercus ilex</i> L. + <i>Quercus suber</i> L. Integral						10,6 12,1 <sup>a</sup> 12,7	61,8 70,6 <sup>a</sup> 74,2	EZN(1956) Torrent et al., (1961)
	68,7	59,7	83,8	18,3	75,3	12,4	72,4	Varela et al., (1965)
	65,7	-	(NDF= 23,8)	(ADF= 12,2)	-	10,4	-	Ferreira(1984)
Sem casca						11,7	74,2	CATVD (1979)
Torrada	76,1	8,6	89	26,6	82,8	14,3	85,5	Varela et al., (1965)
50:50 -Mistura de milho e bolota integral	79,8	68,3	72,6	34,5	85,6	13,9	82,8	Varela et al., (1965)
50:50 -Mistura de milho e bolota descascada e torrada	81,7	44,2	88,8	38,2	86,5	14,5	86,7	Varela et al., (1965)

Se o valor energético da bolota não oferece dúvidas, o mesmo já não acontece no que se refere à proteína, cuja digestibilidade é bastante baixa. Tal facto poderá ser devido à riqueza da bolota em polifenóis taninos, os quais se podem complexar igualmente com a proteína dos outros componentes da dieta, e afectar assim negativamente a digestibilidade da proteína da ração. Várias experiências realizadas com porcos ( *Torrent et al.*, 1961; *Macarro*, 1964, 1973 ; *Varela et al.*, 1965 ; *Cuesta et al.*, 1969), ovinos ( *Boza et al.*, 1966 ; *C.O.C.SA.*, 1967; *Ferreira*, 1984 ) , pintos ( *Zorita e Arias*, 1965; *Blanco e Macarro*, 1965; *Ferreira e Castro*, 1966; *Cuesta et al.*, 1966; *C.O.C.SA.*, 1967) galinhas poedeiras ( *C.O.C.SA.*, 1967; *Cuesta et al.*, 1970) e bovinos ( *C.O.C.SA.*, 1967) confirmam aquelas considerações, ressaltando que, embora a bolota ou a sua farinha sejam muito palatáveis , acima de determinados níveis de incorporação em dietas equilibradas determina diminuição nos níveis das produções animais.

Os níveis máximos de incorporação dependeriam da espécie animal e do eventual tratamento sofrido pela bolota ou farinha de bolota: 40% de farinha desengordurada em rações para suínos em crescimento ( *Cuesta et al.*, 1966); 50% de farinha de bolota sem casca, para frangos ( *Blanco*, 1965); 30% de farinha de bolota, para frangos, e 20% para pintos ( *Ferreira e Castro*, 1966) ; até 40% ( *Temperton*, 1943 - citado por *Zorita e Arias*, 1965), ou 8% a 16% ( *Cuesta et al.*, 1970) para galinhas poedeiras. Muito do efeito depressivo poderá ser devido aos taninos veiculados pela bolota. Com efeito, acima de determinados níveis de incorporação de bolota em rações observou-se o aparecimento de coloração verde na gema dos ovos ( *Temperton*, 1943 - citado por *Morrison*, 1956; *Zorita e Arias*, 1965) produzidos pelas aves alimentadas com tais rações. Outro efeito observado é o de obstrução ( *Ferreira e Castro*, 1966) e diminuição do trânsito intestinal.

Ambos os efeitos poderão ser atribuídos aos taninos da bolota. No entanto, em nenhum dos trabalhos citados se procurou estudar os efeitos nutricionais dos taninos. Também com ruminantes existem observações do efeito negativo exercido pela bolota, acima de determinados níveis, em rações equilibradas. Num extenso trabalho realizado pela C.O.C.S.A., (1967) foi observado que os níveis aceitáveis de incorporação eram de 15% para borregos; 25% para ovelhas lactantes; 15% para vitelos até 150 Kg e 25% para vacas leiteiras.

Embora não existam trabalhos publicados sobre o assunto, é do conhecimento geral que os ruminantes, (tal como os porcos) mantidos em pastoreio de montado, não só não crescem adequadamente, como inclusive estão sujeitos a grande mortalidade, em anos de fraco ou nulo crescimento outonal da erva. É usual ouvir-se dizer que, quando chove no Outono, a bolota é "lavada" e não exerce um efeito tóxico tão aparente. A nossa opinião é diferente. Em anos de chuvas outonais abundantes o crescimento da erva é suficiente para, apesar do seu baixo teor em MS e EM, colmatar o grande "déficit" da bolota em PB. Nas regiões de montado o teor médio em PB da erva no Outono é de 26% (vêr em resultados). Sabe-se que o nível proteico da dieta afecta a expressão deletérea dos taninos (Schaffert et al., 1974; Ford e Hewitt, 1979; Combs e Wallace, 1976 - citado por Price e Butler, 1980). É provável que o efeito benéfico observado seja, pelo menos em parte, devido a uma remoção mais completa dos taninos solúveis ao nível do tubo digestivo, permitindo que parte da proteína não complexada seja digerida e absorvida, por um lado, e que os taninos, ao serem adequadamente complexados com a proteína, precipitem não sendo nem hidrolizados nem absorvidos (ou o sejam em menor grau), prevenindo assim os efeitos nutricionalmente negativos e tóxicos, por outro. Ao serem considerados os efeitos dos taninos dever-se-á ter em conta a quantidade de PB da dieta, e



particularmente a relação tanino-proteína (Capítulos 2,3 e 4).

Embora os escassos trabalhos realizados sugiram que a bolota apresenta uma boa digestibilidade da MO, estamos longe de conhecer a real contribuição da bolota para a satisfação das necessidades alimentares dos ruminantes mantidos em pastoreio de montado, por um lado, e os efeitos dos taninos da bolota sobre a utilização dos componentes da dieta, por outro. Inicialmente tinha-se como objectivo o estudo da utilização digestiva, em ovinos, de dietas contendo proporções variáveis de bolota, erva de outono e proteína bruta. Os efeitos dos taninos seriam estudados, para cada nível, utilizando o princípio de que o PEG se liga preferencialmente aos taninos relativamente à proteína e liberta a proteína dos complexos tanino-proteína pré-formados (Jones e Mangan, 1977). Barry e Forss (1983) aplicou este princípio a estudos *in vitro* com *Lotus pedunculatus*, e Barry e Duncan (1984) e Barry e Manley (1984) aplicaram-no igualmente com *Lotus pedunculatus*, mas em estudos *in vivo*. O número de animais cirurgicamente fistulados e canulados necessários, por um lado, e as dificuldades técnicas e económicas inerentes a estes tipos de experiências, por outro, impediram a prossecução do objectivo inicialmente definido. Assim, e a fim de obter alguma informação preliminar relativamente à utilização digestiva da erva de Outono e da bolota optou-se por estudar, em ovinos fistulados, a utilização digestiva da erva e da erva+bolota. Não tendo sido possível, pelas razões atrás expostas, a utilização de dietas com diferentes quantidades de bolota e erva, optou-se pelo estudo de apenas dois níveis de bolota, 0% e 50%. A dieta de 50% de erva e 50% de bolota pretendeu representar uma situação alimentar normal num período outonal com disponibilidade de erva.

A fim de estudar a actividade proteolítica no rumen utilizou-se a técnica dos saquinhos, para determinar a cinética da degradação do azoto

da erva no rumen dos ovinos, submetidos às duas dietas.

## 5.2. Materiais e métodos

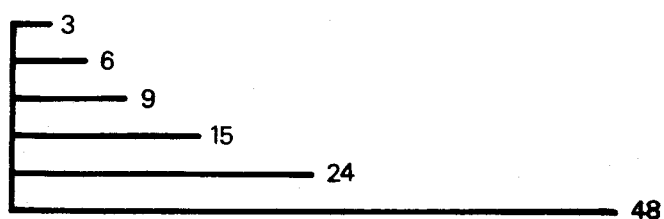
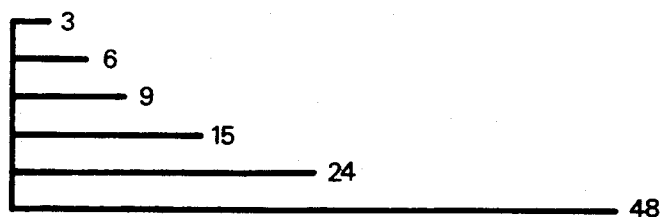
5.2.1. Animais. Utilizaram-se 3 carneiros adultos de raça merino, fistulados, de 66,36 e 62Kg, munidos cada um de duas cânulas, uma no rumen e outra na porção inicial do duodeno, a cerca de 5 cm a jusante da desembocadura dos canais pancreático e biliar.

5.2.2. Alimentos. A bolota foi apanhada na Herdade Experimental da Mitra da Universidade de Évora, durante os meses de Outubro e Novembro de 1983, em montados mistos de sobro (*Q. suber L.*) e azinho (*Q. ilex L.*). A erva foi colhida também no Outono, de um campo semeado na Estação Zootécnica Nacional, e continha fundamentalmente azevém (*Lolium perenne L.*), trevo branco (*Trifolium repens L.*) e trevo da Pérsia (*Trifolium resupinatum L.*). Bolota e erva foram congelados até administração.

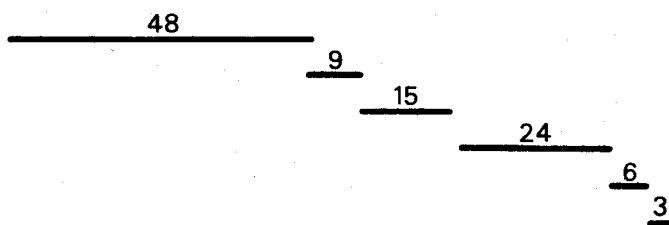
5.2.3. Técnica dos saquinhos. Utilizaram-se saquinhos de nylon, de pano de pára-quadras. As dimensões dos saquinhos e a relação superfície:peso da amostra a incubar *in situ* obedeceram ao preconizado por Ørskov et al., (1981). Estes autores recomendaram a utilização de pano com dimensões de poros de 30 - 100 µm, suficientemente grandes para evitar a acumulação de gás no interior dos saquinhos [ que faz com que flutuem no rumen, inibindo a degradação (Uden et al., 1974) ], mas suficientemente pequenos para evitar a perda de material por lavagem. O pano de nylon utilizado na confecção dos saquinhos tinha poros de dimensões significativamente maiores. O substrato utilizado foi a erva de Outono moída através de crivo de 5mm.

Em cada conjunto utilizaram-se 2 saquinhos para cada tempo de incubação por forma a obter 4 sacos/hora/carneiro.

No método usualmente utilizado os saquinhos são introduzidos todos ao mesmo tempo no rumen e vão sendo retirados para cada um dos tempos de incubação seleccionados:



O método apresenta dois grandes inconvenientes práticos. Por um lado exige trabalho nocturno, e por outro a necessidade de marcação dos saquinhos (ou dos fios em que estão suspensos). Este método foi utilizado durante trabalhos exploratórios para adaptação da técnica. Nos estudos referidos no presente capítulo os saquinhos foram introduzidos a horas diferentes. A cada tempo de incubação todos os saquinhos foram removidos e substituídos por um novo conjunto (Paine et al., 1982):



Este método evita a necessidade de marcação dos saquinhos e de trabalho

nocturno. Além disso, durante todo o período experimental é mantido o mesmo número de saquinhos no rumen, permitindo o máximo de utilização da sua capacidade.

Após serem retirados do rumen, os saquinhos foram lavados simultaneamente, durante 5 minutos, sob jacto de água contínuo, utilizando um aparelho desenvolvido pelo Doutor Ramalho Ribeiro (Departamento de Nutrição da Estação Zootécnica Nacional), o qual ligado a uma torneira permite a lavagem de vários sacos em simultâneo.

5.2.4. Marcadores de trânsito. Hogan e Weston (1967) sublinharam a dificuldade de obtenção, aquando de amostragens do conteúdo duodenal através de uma cânula simples, de amostras nas quais as fases sólida e líquida estejam na mesma proporção que no conteúdo digestivo que transita no intestino. A utilização simultânea de dois marcadores, infundidos em contínuo, resolve este problema (Hogan e Weston, 1967; Weston e Hogan, 1967).

Utilizou-se o Co-EDTA como marcador da fase líquida, e o sesquióxido de cromo como marcador da fase sólida. As doses de marcadores administradas foram calculadas a partir da seguinte expressão (Ellis et al., 1982):

$$\text{dose ( } \mu\text{g/100 Kg P.V.)} = \text{NAM} \times \text{F} / 100 \text{ Kg P.V.} \times 1 / \text{K}_2^{-\text{dia}} \times \text{D} \times (1/0,5)$$

NAM = nível analítico mínimo para o marcador,  $\mu\text{g/g MS}$

F = volume de MS ("dry matter fill") para o segmento intestinal, g/100 Kg P.V.

$\text{K}_2$  = taxa fraccional de renovação, aproximada, esperada para o marcador e expressa em dias

D = dias, após administração, da última colheita.

O volume de MS não digerida no tracto gastrointestinal total (equivalente

ã MS fecal) foi calculada na base de 1% de P.V. e  $1/K_2^{-\text{dia}}$  avaliado em 24. Dado que os marcadores foram administrados continuamente, utilizou-se o valor 1 para D.

Nos anexos A.5. representam-se os resultados dos ensaios conduzidos para estudar o comportamento de alguns marcadores, e descrevem-se os critérios de selecção utilizados e os princípios subjacentes aos cálculos dos trânsitos.

Preparação do complexo Co - EDTA. O processo utilizado foi basicamente o de Uden *et al.*, (1980):

1. Peser para copo de 2l, 25g de acetato de cobalto (II). $4H_2O$ , 29,2g de EDTA, e 4,0g de NaOH. Adicionar 200 ml de água destilada.
2. Dissolver com aquecimento mínimo
3. Deixar arrefecer e adicionar 20 ml de peróxido de hidrogênio a 30%. Deixar repousar 2 - 3 horas à temperatura ambiente.
4. Adicionar 300 ml de etanol a 95% (V/V) e deixar no frigorífico durante a noite.
5. Filtrar e lavar com etanol a 80% (V/V).

Os cristais de NaCo-EDTA assim obtidos são estáveis a 100°C e o seu peso molecular é de 424,2.

Preparação dos "pellets" de  $Cr_2O_3$ . A fim de facilitar a administração do marcador da fase sólida, e evitar perdas nos comedouros, fizeram-se "pellets" com a composição seguinte (% da MS):

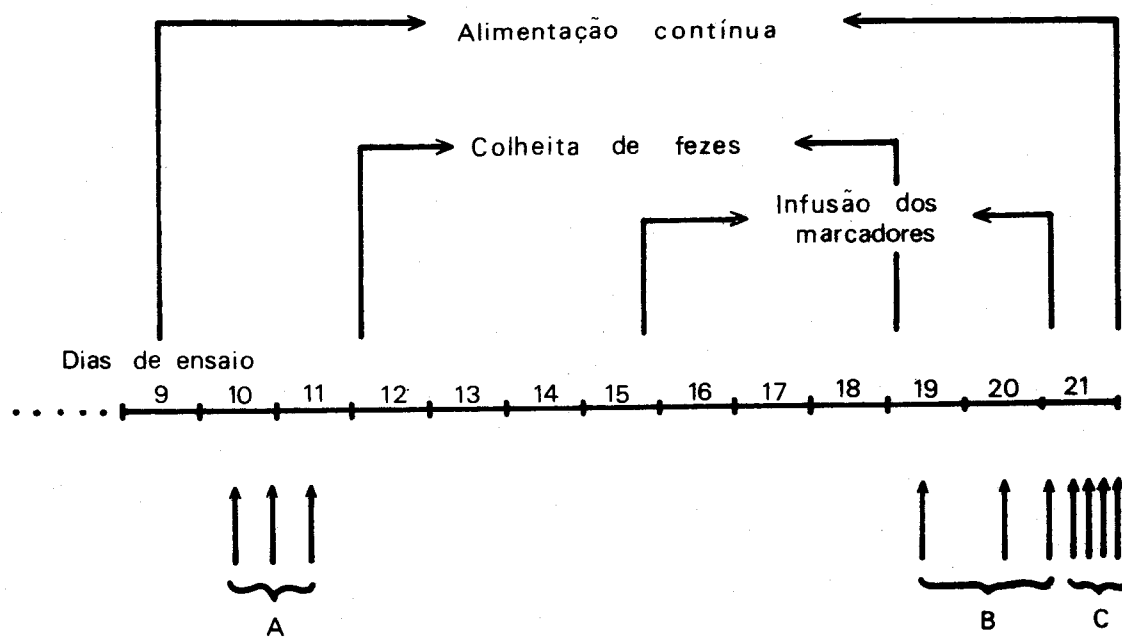
Milho grão	....	....	....	92,22
Bentonite	....	....	....	1,44
Melaço	....	....	....	3,46
$Cr_2O_3$	....	....	....	2,88

A mistura foi adicionada água suficiente para permitir a formação de

"pellets", numa peletizadora de laboratório. Estes foram seguidamente mantidos em estufa, a 80°C, durante 24h, tendo-se assim conseguido uma consistência que impediu a sua fácil desagregação.

5.2.5. Condução das experiências. As duas dietas, erva de outono e erva +bolota foram estudadas em dois períodos consecutivos.

Em cada período as experiências decorreram segundo o esquema seguinte:



A= 1º conjunto de saquinhos

B= Colheita de amostras do rumen e duodeno, conforme o esquema da página 229, e amostragem de fezes e urinas para análise de marcadores

C= Colheitas de amostras do rumen e 2º conjunto de saquinhos

Os alimentos eram administrados continuamente ao longo das 24 h do dia, tendo-se utilizado para o efeito alimentadores automáticos (ver Anexos). O local de alojamento dos animais foi mantido iluminado durante os períodos experimentais.

As quantidades oferecidas foram calculadas para satisfazerem 1,5 vezes as necessidades de manutenção.

O Co - EDTA (solução a 0,32%, P/V) foi infundido para o rumen à razão de 200ml por dia. Utilizou-se para o efeito uma bomba peristáltica, e um tubo condutor de 1 mm de diâmetro que foi introduzido no rumen, numa extensão de 30 cm, através de um orifício realizado na tampa da cânula.

A solução de Co - EDTA a infundir foi mantida em proveta graduada a fim de controlar permanentemente a quantidade infundida (ver nos Anexos).

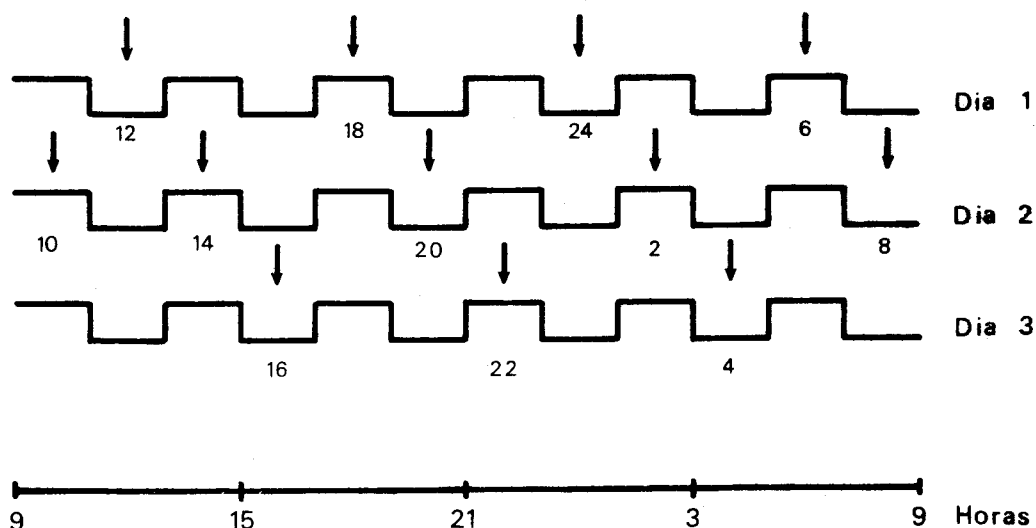
Os "pellets", contendo aproximadamente 33 mg de  $Cr_2O_3/g$ , foram administrados de forma contínua, à razão de 50g/d aos carneiros números 1 e 3 e de 30g/d ao carneiro número 2. Para o efeito, os "pellets" foram distribuídos uniformemente com o alimento sobre o tapete rolante do alimentador automático.

As colheitas de amostras obedeceram ao calendário atrás referido. Resumidamente:

- uma semana de medição da digestibilidade aparente da dieta.
- três dias de colheitas ruminais e duodenais para determinação dos fluxos e das concentrações médias do conteúdo ruminal em Co - EDTA. As amostras ruminais serviram ainda para o isolamento da fracção bacteriana para análise do azoto e D-alanina.
- um dia de colheitas, de 2 em 2 horas, após cessação da administração dos marcadores de trânsito, para cálculo do tempo de permanência da fase líquida e do volume do rumen (análise de Co- EDTA).

Dado que a alimentação foi contínua, seria de esperar que os processos digestivos se processassem igualmente de forma contínua, e não periódica. Em conformidade, é possível que as colheitas ruminais e duodenais pudessem ser feitas apenas uma ou duas vezes por dia, durante 2 a 3

dias, seguidos ou intercalados. No entanto, e dado não termos experiência neste tipo de estudos, optou-se por colheitas de duas em duas horas por forma a cobrir um ciclo alimentar completo, conforme o esquema seguinte:



A cada hora, colheram-se cerca de 50 g de digesta duodenal, e 100 g de digesta ruminal, obtendo-se assim 12 amostras individuais de digesta ruminal e duodenal. As amostras duodenais foram reunidas numa única amostra compósita para ulterior análise. As 12 amostras ruminais foram divididas em duas porções cada, num total de 24. 12 foram reunidas numa amostra compósita destinada a posterior análise laboratorial e à colheita de bactérias, igualmente para fins analíticos. As restantes 12 amostras destinaram-se a análise individual para Co - EDTA para avaliar das condições de equilíbrio ("steady-state") no rumen.

5.2.6. Processamento das amostras. Todas as amostras foram imediata -



mente congeladas até serem analisadas.

As amostras de digesta ruminal destinadas à análise do  $N-NH_3$ , e de N total, foram acidificadas até pH 2,0 com ácido metafosfórico, antes de serem congeladas.

As fases líquidas das digestas foram obtidas por centrifugação a 2.500xg durante 30 minutos.

5.2.7. Análises laboratoriais. A matéria seca (MS) foi determinada por secagem em estufa a  $80^{\circ}C$  durante 48 h. A matéria orgânica (MO) foi determinada por incineração das matérias secas, em mufla a  $550^{\circ}C$ , durante 9 horas. O azoto total (NT) foi determinado pelo método de *Kjeldahl* (AOAC, 1970) utilizando selênio e sulfato de cobre como catalizadores (2 g de mistura contendo 2% de selênio, 6% de sulfato de cobre e 92% de sulfato de potássio). O azoto amoniacal ( $N-NH_3$ ) foi doseado nas fases líquidas do rumen e do duodeno por destilação em aparelho de Markkam. As amostras a destilar não foram previamente desproteïnadas, e apenas se adicionou hidróxido de sódio na altura da destilação. Ensaïos preliminares permitiram observar recuperações de 100% de amônia, sulfato de amônio e cloreto de amônio adicionados a amostras de líquido ruminal. O cobalto dos complexos Co - EDTA foi analisado por espectrofotometria de absorção atômica, utilizando um espectrofotômetro Perkin Elmer, modelo 380. As condições analíticas foram as sugeridas no catálogo do aparelho. Os líquidos a analisar foram aspirados directamente para o espectrofotômetro. Dados os cálculos inicialmente realizados relativamente às quantidades de marcadores a infundir (vêr em 5.2.4.), não foram necessárias diluições prévias. Na medida em que os líquidos do rumen e duodeno não foram previamente desproteïnados, houve necessidade de lavar frequentemente o sistema de aspiração do aparelho a fim de evitar diminuições

nos fluxos, determinantes de baixas recuperações. O dióxido de crômio nos "pellets", matéria orgânica da digesta ruminal e duodenal e nas fezes foi analisado pela técnica de *Stevenson e Langen (1960)*, conforme adaptada à rotina analítica pelo laboratório de nutrição animal da Estação Zootécnica Nacional:

- 1 - A amostra incinerada, contendo 1 a 5 mg de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  é transferida quantitativamente para balão de Erlenmeyer de boca larga, de 100 ml, graduado a 100.
- 2 - Adiciona-se 6 ml de mistura ácida (250 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado+250ml de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (d=1,75)+500 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada+50 ml de  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  a 10% em  $\text{H}_2\text{O}$ ).
- 3 - Aquece-se até ferver. A fervura deve iniciar-se aos 30 segundos.
- 4 - Adiciona-se 3 ml de solução de  $\text{KBrO}_3$  a 4,5% e deixa-se ferver durante 1 minuto.
- 5 - Retira-se o balão da placa de aquecimento e deixa-se arrefecer. Adiciona-se então 20 ml de solução de  $\text{KBrO}_3$  a 0,45% (50 ml de solução de  $\text{KBrO}_3$  a 4,5%+450 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada) e deixa-se ferver durante 3 minutos.
- 6 - Deixa-se arrefecer e completa-se ao volume de 100 ml com  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Agita-se.
- 7 - Transfere-se 10 ml para tubo ou balão graduado de 25 ml.
- 8 - Adiciona-se 5 ml de solução de NaOH a 10%.
- 9 - Aquece-se em banho de água fervente durante 1,5 minutos a fim de que precipite o  $\text{MnO}_2$  formado.
- 10 - Deixa-se arrefecer e completa-se ao volume de 25 ml com  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Inverte-se cuidadosamente uma vez. (É importante não agitar a solução final antes da leitura porque o  $\text{MnO}_2$  precipitado desagrega-se facilmente formando uma suspensão coloidal).

11 - Filtra-se, através de papel de filtro Whatman nº 40, uma quantidade suficiente para ser lida em espectrofotômetro a 400 nm.

12 - As amostras são acompanhadas de testemunhas isentas de Cr (fezes colhidas dos ovinos, antes da administração dos marcadores).

13 - Para a curva padrão utiliza-se uma solução de  $K_2CrO_4$  contendo  $2,555 \text{ g.l}^{-1}$  ( $1 \text{ mg de } Cr_2O_3 \cdot \text{ml}^{-1}$ ).

Os ácidos aminados das amostras foram determinados por cromatografia gás-líquido capilar dos ésteres isopropílicos dos N-Heptafluorobutirilaminoácidos. A histidina como éster  $N^{im}$ -etoxicarbonil-N-HPFB-isopropílico. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Química Orgânica Fundamental da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. A D-alanina foi determinada nos mesmos hidrolisados ácidos pelo método descrito por *Garret et al.*, (1982):

#### Reagentes

1. Tampão pirofosfato de sódio 0,1M (pH=8,3) (arrefecido e oxigenado durante 10 min.) (26,61g/l).
2. D-amino ácido oxidase ( $4\mu\text{/mg}$ ) (5mg/ml de tampão) (Porcine Kidney, =6308, Worthington Biochemical).
3. Catalase (2,5 mg/5ml de  $H_2O$ ) (preparada diariamente) (Bovine liver, = 1849, Worthington Biochemical).
4. FAD (1 mg/ml de  $H_2O$ ) (F-6625, Sigma Chemical Co.).
5. Trietanolamina com EDTA (665-5, Sigma Chemical Co.).
6.  $NADH_2$  (100 mg/10 ml de  $H_2O$ ) (340-1100, Sigma Chemical Co.).
7. Lactato desidrogenase ( $224 \mu\text{/mg}$ ) (32,3 mg/ml) (Bovine heart, = 1224, Worthington Biochemical).
8. D-alanina Padrão (0,4 mg/ml de  $H_2O$ ) (A-7377, Sigma Chemical Co.).

#### Processo

1. Pipetar para tubo de ensaio de 16x125 mm:

- a. 1,58 ml de tampão pirofosfato de sódio
  - b. 100 µl de hidrolizado neutro
  - c. 10 µl de solução de catalase
  - d. 5 µl de solução de FAD
  - e. 10 µl de solução de D-amino ácido oxidase
2. Incubar durante 2h a 39°C. Borbulhar O<sub>2</sub> durante 5 segundos de 20 em 20 minutos.
  3. Pipetar 1,0 ml da mistura reagente para cuvete de espectrofotômetro.
  4. Adicionar para a cuvete:
    - a. 60 µl de solução de NADH<sub>2</sub>
    - b. 1,93 ml de trietanolamina com EDTA
  5. Agitar e deixar equilibrar durante 3 minutos.
  6. Colocar a cuvete no espectrofotômetro e ler a absorção a 340 nm.
  7. Sem remover a cuvete, injectar 10 µl de lactato desidrogenase
  8. Aguardar 3 minutos e ler a absorção.
  9. Lavar a cuvete com metanol, depois com água destilada, e novamente com metanol. Remover o máximo de metanol possível e reiniciar.
    - A. Deve-se traçar uma curva padrão com cada conjunto de amostras.
    - B. Cada amostra é analisada em duplicado com ensaios em branco também em duplicado.
    - C. Os ensaios em branco são realizados com os mesmos reagentes, mas a D-amino ácido oxidase é substituída por água destilada.
    - D. A NADH<sub>2</sub>, a trietanolamina e a LDH devem ser mantidas em banho de gelo.

### 5.3. Resultados e discussão

5.3.1. A composição química dos alimentos utilizados está expressa no quadro 5.3.

Quadro 5.3. Composição química dos alimentos

	MS (%)	% da MS					
		MO	PB	SES	"NDF"	"ADF"	N-"ADF"
Erva de Outono	13,9	84,0	24,6	4,1	53,7	39,3	0,65
Bolota	61,3	98,3	4,6	10,0	34,0	22,2	0,23

Apesar da erva utilizada nestes estudos ser diferente, na sua composição florística, da erva que normalmente se encontra nas zonas de montado das regiões do Sul do País, apresenta um nível proteico semelhante. Amostras de erva colhida na mesma altura em zonas de montado da Herdade da Mitra da Universidade de Évora apresentaram 26% de PB e 49% de "NDF".

5.3.2. Digestibilidade aparente. No quadro 5.4. representam-se os valores da digestibilidade aparente das dietas estudadas. A digestibilidade aparente da MO foi semelhante para as duas dietas, sendo a da erva idêntica à encontrada por outros autores (Ribeiro, 1979; Barry e Manley, 1984; MacRae et al., 1985). A digestibilidade aparente calculada para a bolota foi de 73,5; 77,0 e 76,0 para os ovinos 1, 2 e 3 respectivamente, pressupondo não ter havido efeitos associativos entre a erva e a bolota. Estes

valores são próximos dos encontrados por alguns autores espanhóis, embora superiores aos observados por *Ferreira (1984)* para a bolota apanhada na mesma origem (Quadro 5.2.).

Quadro 5.4. Digestibilidade aparente de alguns componentes das dietas estudadas (%).

	D I E T A					
	ERVA			ERVA + BOLOTA		
	Carneiro nº			Carneiro nº		
	1	2	3	1	2	3
MO	73,2	74,9	75,4	72,7	73,9	74,8
N	76,6	76,6	79,9	62,2	63,4	65,7
NDF	70,9	69,0	72,6	61,1	60,4	62,4
ADF	69,4	64,0	71,4	54,5	52,5	55,9
ADIN	8,4	37,3	19,7	-56,1	-38,7	-30,4
$\frac{\text{ADIN excretado}}{\text{ADIN ingerido}}$	0,92	0,63	0,80	1,56	1,39	1,30

5.3.3. Fluxo e digestão da matéria orgânica. Os valores das digestibilidades parciais ao nível dos compartimentos gástricos e dos intestinos estão expressas no quadro 5.5. A proporção de MO aparentemente digerida entre a boca e o duodeno foi marcadamente superior para a erva, excepto para o ovino 2 em que a diferença foi muito pequena. O comportamento alimentar daquele ovino foi bastante distinto dos outros. Raramente ingeria a sua ração com o mesmo apetite dos outros e as digestas do rumen e duodeno apresentaram sempre percentagens de MS duplas das dos outros ovinos, sugerindo uma menor secreção salivar. Daí que, como observaremos para outros parâmetros estudados, o ovino 2 tenha exibido um comportamento dis-

Quadro 5.5. Fluxo e digestão do MO das dietas estudadas

Fluxos e digestão da MO	D I E T A S								
	Erva de Outono			Erva de Outono+Boiota					
	O V I N O S								
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
E	918	509	890	462	307	448			
B	47	28	47	497	318	482			
P	965	537	937	47	28	47			
TOTAL	374	278	367	1 006	652	977			
Fezes (g.d <sup>-1</sup> )	259	135	230	619	360	553			
Digestibilidade aparente	0,73	0,75	0,75	0,73	0,74	0,75			
Digestão aparente no rumen:									
Proporção do ingerido	0,61	0,48	0,61	0,39	0,45	0,43			
Proporção do total digerido	0,84	0,64	0,81	0,53	0,61	0,58			
Digestão aparente nos intestinos:									
Proporção do total ingerido	0,12	0,27	0,15	0,34	0,29	0,31			
Proporção do total digerido	0,16	0,36	0,19	0,47	0,39	0,42			
Proporção da MO chegada ao duodeno	0,31	0,51	0,37	0,56	0,53	0,56			

tinto do dos outros dois. Não inferimos daí que o seu comportamento tenha sido atípico.

As proporções de MO aparentemente digeridas nos intestinos foram, pelo contrário, bastante superiores para a dieta de erva + bolota.

As diferenças na digestão aparente nos compartimentos gástricos entre as duas dietas podem ser atribuídas a vários factores: uma maior resistência da MO da bolota à degradação, um menor tempo de permanência médio, ou influência negativa exercida pelos taninos da bolota. Este último efeito poderia ser testado mediante administração de PEG.

A proporção de MO da erva aparentemente digerida no rumen foi superior aos valores referidos por outros autores (Ulyatt e MacRae, 1974; Johnson e Bergen, 1982; Corbett et al., 1982). No entanto na maioria dos trabalhos efectuados foi utilizada erva colhida na Primavera. MacRae et al., (1985) realizaram recentemente estudos com erva de Outono, mas não apresentaram resultados sobre a digestão da MO. É possível que as condições de alimentação contínua tenham resultado numa maior digestão parcial ao nível do retículo-rumen, ou que a erva de Outono apresente uma degradabilidade maior dos seus componentes parietais relativamente à erva colhida na Primavera.

A menor digestão aparente, no rumen, da MO da erva + bolota poderá ter resultado de uma inibição da digestão da MO, por acção dos taninos, em conformidade com o observado por outros autores para alimentos ricos em taninos tais como *Lotus pedunculatus* (Barry e Manley, 1984), silagem de sorgo (Ben-Ghedalia e Tagari, 1977), *Sesice lespedeza* (Donnelly e Anthony, 1970), *Coronilla varia* (Burns e Cope, 1974), grão de sorgo (Hibberd et al., 1982), milho miúdo (Ramachandra et al., 1977), fava (Bond, 1976; Buckley et al., 1983) e folhagens de arbustos (Van Hoven, 1984). A MO da bolota não parece apresentar uma degradabilidade intrínsecamente baixa, pelo menos quando comparada com a da MO do milho grão (vêr Cap. IV).



Quadro 5.6. Fluxo e digestão do N das dietas estudadas

Fluxos e digestão do azoto	Erva de Outono			Erva de Outono+Bolota		
	O V I N O			O V I N O		
	1	2	3	1	2	3
Azoto ( $\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$ ):						
Ingerido :-N total	43,6	27,8	42,2	25,9	17,2	25,1
Duodeno :-N total	35,3	29,7	32,2	28,8	20,9	26,4
-NNA	32,1	28,6	29,4	27,5	20,2	25,6
Fezes :-N total	10,2	6,5	8,5	9,8	6,3	8,6
Digestibilidade aparente:						
Proporção do ingerido	0,77	0,77	0,80	0,62	0,63	0,66
Ganho de N através do rumen:						
$\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$ (c-a)	-11,5	+0,8	-12,8	+1,6	+3,0	+0,5
Proporção do N ingerido ( $\frac{c-a}{a}$ )	-0,26	+0,03	-0,30	+0,06	+0,17	+0,02
NNA aparentemente digerido nos intestinos:						
$\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$	21,9	22,1	20,9	17,7	13,9	17,0
Proporção do N total chegado ao duodeno	0,68	0,77	0,71	0,64	0,69	0,66
Proporção do NNA chegado ao duodeno	0,50	0,79	0,50	0,68	0,80	0,68

5.3.4. Fluxo e digestão do azoto. No quadro 5.4. representam-se os dados calculados das digestões parciais do N ao nível dos compartimentos gástricos e dos intestinos. As digestibilidades aparentes do N da erva assemelham-se aos encontrados por outros autores (0,75:MacRae, 1976;0,72:Barry e Manley, 1984), embora sejam bastante superiores aos encontrados por Ribeiro et al., (1981) (0,62) e MacRae et al.,(1985) (0,65) para erva de composição florística semelhante. A digestibilidade aparente do N da erva + bolota foi marcadamente inferior ao da erva. Tal diferença não pode ser atribuída apenas ao N da bolota já que com a dieta de erva + bolota a percentagem de N contribuída por aquele fruto foi de apenas 16% do N total ingerido. Ferreira (1984) observou, em ovinos alimentados com feno e bolota, que a digestibilidade aparente do N do feno (0,69 ) foi deprimida quando se adicionou 30% de bolota à ração(0,63).

Devido às condições experimentais as quantidades de N ingeridas pelos ovinos foram muito superiores com a dieta só de erva. Os ovinos assim alimentados evidenciaram perdas significativas de azoto entre a boca e o duodeno, excepto o ovino 2 que exibiu um ligeiro ganho. Os mesmos animais, quando alimentados com erva + bolota, mostraram, pelo contrário, um ligeiro ganho de N, tendo este sido maior para o ovino 2.

A digestão intestinal do NNA (como proporção do NNA que fluiu diariamente pelo duodeno) foi ligeiramente inferior para a dieta de erva + bolota relativamente à de erva. Apesar dos ovinos, quando alimentados com erva + bolota, terem ingerido apenas 59,4; 61,9 e 59,5% do N ingerido com a dieta só de erva, o NNA digerido nos intestinos foi de 80,8; 63 e 81,3% do digerido com a dieta só de erva. A ligeira depressão observada na digestão intestinal foi largamente compensada pelo maior ganho de N entre a boca e o duodeno. A digestibilidade aparente do N da erva nos intestinos foi bastante similar à média de 0,70 referida por Armstrong et al., (1977) num

estudo de revisão sobre o assunto. *MacRae* (1976) observou um valor de 0,75 para o azevém perene e *MacRae et al.*, (1985) 0,68 para uma erva com composição florística idêntica à utilizada no presente estudo. A digestibilidade intestinal aparente envolveu o intestino delgado, o cego e o colon. A fermentação dos glúcidos residuais no colon, com a consequente síntese de biomassa microbiana e sua excreção fecal, contribui não só para os efeitos associativos dos alimentos, particularmente no que se refere à digestão do N (*Lindsay e Armstrong, 1982*), como também para mascarar a digestibilidade enzimática do NNA ao nível do intestino delgado. As digestibilidades aparentes do NNA, medidas ao nível das fezes, são usualmente inferiores às medidas ao nível do íleo terminal. Assim sendo, os valores por nós calculados poderiam estar acima da média calculada por outros autores (*ARC, 1980; Lindsay e Armstrong, 1982*) embora autores Franceses (*INRA, 1978*) considerem valores de absorvabilidade da proteína alimentar não degradada no rumen variando de 60 a 95%. Os cloroplastos contêm cerca de 75% da proteína total na folha, e 50% dessa proteína é constituída pela ribulose - 1,5 - difosfato carboxilase, a primeira enzima no ciclo fotosintético de Calvin (*Mangan, 1982*). Esta proteína apresenta, nos monogástricos, uma digestibilidade aparente semelhante à da caseína (*Pirie, 1971*).

Nos quadros 5.7. e 5.8. representam-se os valores de azoto e D-alanina nas bactérias do rumen e os cálculos da degradação do N alimentar e da síntese microbiana no retículo-rumen. A degradabilidade do azoto da erva no rumen do ovino 2 foi bastante inferior à verificada para os outros animais, para os quais o valor de 67 e 68% se aproximam dos valores encontrados por outros autores. *MacRae e Ulyatt* (1974) e *Ulyatt et al.*, (1975) observaram valores de degradabilidade do N total de pastagem de azevém e trevo branco, no rumen de ovinos, da ordem dos 70%. Valores médios semelhantes são apresentados pelo *ARC* (1980). O valor nitidamente inferior

Quadro 5.7. Conteúdo em azoto total (N) e em D-alanina das bactérias do rumen e de digesta duodenal dos ovinos alimentados com erva de outono e bolota.

	<u>Erva de Outono</u>			<u>Erva + Bolota</u>		
	O V I N O			O V I N O		
	1	2	3	1	2	3
<b>Bactérias</b>						
Azoto (g/100g MS) . . . . .	5,80	6,11	5,49	5,17	6,72	6,37
D-alanina (g/100g MS) . . . . .	0,47	0,41	0,40	0,40	0,37	0,43
Azoto/D-alanina . . . . .	12,34	14,90	13,73	12,93	18,16	14,81
D-alanina/Azoto (g/16g) . . . . .	1,30	1,07	1,17	1,24	0,88	1,08
<b>Digesta duodenal</b>						
Azoto (g/100g MS) . . . . .	5,40	5,67	4,98	3,20	3,80	3,52
D-alanina (g/100g MS) . . . . .	0,202	0,119	0,161	0,108	0,085	0,105
N/D-alanina . . . . .	26,7	47,65	30,93	29,63	44,71	33,52
% N Bacteriano no NNA duodenal . . . . .	46,1	31,4	44,3	43,8	40,8	44,1

Quadro 5.8. Natureza da proteína que atingiu o duodeno dos ovinos e cálculo da eficiência da síntese proteica bacteriana.

	Erva de Outono			Erva + Bolota		
	1	2	3	1	2	3
M0 ingerida (g/d) . . . . .	965	537	937	1006	652	977
Azoto ingerido (g/d) . . . . .	43,6	27,8	42,2	25,9	17,2	25,1
M0 aparentemente digerida no rumen (g/d) . . . . .	591	259	570	387	292	424
Fluxo de azoto não amoniacal ao nível do duodeno (g/d) . . . . .	32,1	28,6	29,4	27,5	20,2	25,6
Azoto bacteriano . . . . .	14,81	8,97	13,01	12,05	8,24	11,3
Azoto protozoário a) . . . . .	0,9	0,56	0,8	0,5	0,3	0,5
Azoto endógeno b) . . . . .	2	1	2	2	1	2
Azoto alimentar . . . . .	14,39	18,07	13,50	12,95	10,66	11,80
% N alimentar degradado no rumen . . . . .	0,67	0,35	0,68	0,50	0,38	0,53
N Bacteriano sintetizado (g/Kg M0 aparentemente digerida no rumen) . . . . .	25,06	34,63	22,98	31,14	28,2	26,65
N bacteriano (g/d)/N ingerido . . . . .	0,34	0,32	0,31	0,47	0,48	0,45

a) 2% do N ingerido (Weller e Pilgrim, 1974).

b) Mac Rae e Reeds, 1980.

observado com o ovino 2 não parece ter resultado de erros de medição de fluxos, já que o seu comportamento foi igualmente diferente com a dieta de erva + bolota (ver em 5.3.3.). Contudo não se pode afastar tal hipótese. Dos resultados baseados em 259 medições em ruminantes em pastagem de azevém e trevo branco no Grassland Research Institute (Hurley, Inglaterra) Thomson (1982) concluiu que flui menor quantidade de N total no duodeno, relativamente à quantidade ingerida, excepto em ovinos com baixo nível de ingestão de N ( $< 18\text{g N/d}$ ) em que, presumivelmente devido a reciclagem, aquela quantidade é maior. Concluiu igualmente (o que não deixa de ser surpreendente) que não há distinção entre espécies forrageiras ou estação de colheita. Contudo, o erro da determinação do fluxo total de N no duodeno é grande e a ingestão de N uma base inaceitável para previsão do fluxo de azoto no duodeno (Ulyatt e Egan, 1979). No presente estudo o ganho de azoto entre a boca e o duodeno foi negativo, tendo a perda de N sido de 26% e 30% para os ovinos 1 e 3, respectivamente. O ovino 2 apresentou um balanço nulo. Ulyatt et al., (1975) e Thomson (1982) referem fluxos duodenais de NNA de 0,75 do N total ingerido, valor com o qual se assemelham os obtidos com os ovinos 1 e 3.

A menor degradabilidade do N com a dieta de erva + bolota não pode ser atribuída apenas ao N daquele fruto. É possível que os taninos tenham inibido a degradação do N da dieta, tal como observado *in vitro* (Capítulo IV). A par da menor degradação do N pode ter-se verificado uma maior reciclagem de N para o retículo-rumen devido ao maior suprimento de energia e ambos os factores poderão ter contribuído para o ganho de N observado entre a boca e o duodeno. Devido a problemas resultantes da contaminação das urinas recolhidas não foi possível medir as perdas urinárias de azoto nem a retenção azotada dos ovinos alimentados só com erva. Atendendo aos níveis de amônia no líquido ruminal (Quadro 5.9.) é de espe-

rar que as perdas de amônia tenham sido grandes no caso dos animais alimentados só com erva (Tammíngá, 1979; Satter, 1982; Miller, 1982).

Quadro 5.9. Taxas de renovação do líquido do rumen e níveis de N-NH<sub>3</sub> nesse líquido.

	DIETA					
	Erva de Outono			Erva + bolota		
	OV 1	OV 2	OV 3	OV 1	OV 2	OV 3
-K	0,1055	0,0968	0,1028	0,0786	0,0722	0,0864
T	9,5	10,3	9,7	12,7	13,9	11,6
N-NH <sub>3</sub> (mg/100ml)	38,9	47,6	41,3	23,5	36,4	32,9

A eficiência da síntese microbiana foi superior com a dieta de erva + bolota, excepto para o ovino 2 em que foi menor. Os valores encontrados com a dieta só de erva são ligeiramente inferiores aos referidos por Hogan e Weston (1981) e Corbett e Pickering (1981), mas semelhantes aos calculados por Vêritê et al., (1979). A maior eficiência da síntese microbiana calculada para os mesmos ovinos com a dieta de erva + bolota pode ter resultado de vários factores em simultâneo, mas nenhum deles de forma evidente: os taninos da bolota podem ter exercido um efeito depressivo sobre populações menos adaptadas ou menos eficientes (Hungate, 1975); pode ter-se verificado uma melhor sincronização entre a disponibilidade de energia e azoto, já que a taxa de degradação da MS da bolota é superior à da erva (vêr Cap. IV) e pode adaptar-se melhor à elevada degradabilidade do N da erva (vêr 5.3.5.). A riqueza em matérias lipídicas da bolota utilizada poderia, de alguma forma, ter afectado a digestão no rumen e a síntese microbiana. Os lípidos podem deprimir a digestão dos

glúcidos estruturais e diminuir o nível de amônia no rumen ( *Tamminga, 1983*) através da inibição dos protozoários. Seja como for, a eficiência da síntese microbiana foi relativamente elevada e apesar da baixa digestão aparente da MO no rumen a relação N bacteriano (g/d)/N ingerido (g/d) foi superior para a dieta erva + bolota. No entanto não se podem fazer comparações directas já que, como referido, a ingestão de N foi inferior.

A composição da proteína duodenal pode ser importante relativamente à absorção intestinal subsequente. Os ácidos aminados contribuem aproximadamente em 80% da proteína bruta total e o N dos ácidos nucleicos em 14 a 25% (*Smith, 1979*). Ao contrário do que acontece nos monogástricos em que a composição da digesta duodenal reflecte a composição da dieta ingerida, nos ruminantes, devido à acção tamponizante do rumen, a composição da digesta duodenal é notavelmente constante e independente da dieta (*Hogan e Weston, 1981*). No quadro 5.10. contrastam-se as informações publicadas por *Hogan e Weston (1981)* referentes a 8 dietas de forragens, por *Proud (1972)* e *Ulyatt et al., (1975)* para os ovinos alimentados com erva verde (congelada), e por *Clarke et al., (1966)* para uma dieta de feno e concentrado, com as obtidas no presente estudo. Com excepção da prolina e serina, em que as concentrações foram significativamente diferentes entre as duas dietas experimentadas, não se observaram diferenças significativas para os outros ácidos aminados. Dado que os coeficientes de variação entre ovinos foram elevados, e que o erro médio da determinação dos ácidos aminados nas diversas amostras foi de 16%, devem-se colocar sérias reservas na interpretação daqueles dados.

A composição em ácidos aminados das bactérias do rumen parece ser relativamente constante (*Purser e Buechler, 1966; Thomson, 1982*), embora *Hogan e Weston (1981)* tenham observado grande variação no que con-



Quadro 5.10. Composição em ácidos aminados da digesta duodenal de ovinos submetidos a várias dietas (mol/100 mol). [  $\bar{X}$  ( $\pm$ s)], n=3.

Dieta	Erva verde	Forragem Feno, desidrat.	Feno, milho e bagaço de soja	Erva	Erva+bolo	
Autor	<i>Proud (1972)</i>	<i>Hogan e Weston (1981)</i>	<i>Clarke et al., (1975)</i>	<i>Ulyatt et al., (1975)</i>	Presente estudo	
Arginina	9,3	3,9	3,9	4,8	5,4 (2,0)	5,5 (1,4)
Histidina	1,8	1,6	1,7	2,1	-	-
Isoleucina	5,5	5,5	5,5	5,6	4,8 (1,3)	4,3 (0,3)
Leucina	9,0	8,8	8,3	8,8	11,5 (0,7)	8,5 (0,7)
Lisina	5,9	5,7	5,9	7,2	8,7 (1,0)	7,0 (0,9)
Metionina	2,5	2,8	-	2,4	2,9 (0,3)	2,9 (0,4)
Fenilalanina	4,5	4,4	4,1	5,7	5,2 (0,9)	5,2 (0,3)
Treonina	6,5	5,7	5,7	5,9	5,9 (0,7)	5,3 (0,7)
Valina	6,4	7,3	6,8	6,4	7,5 (1,5)	8,1 (1,4)
Alanina	-	10,6	9,5	7,1	6,3 (0,7)	6,7 (1,1)
Ác. aspártico	10,4	10,8	10,8	11,1	7,4 (0,7)	10,3 (1,3)
Cisteína	2,9	-	-	-	5,7 (0,5)	7,1 (2,1)
Ác. glutâmico	5,5	9,9	12,5	12,8	11,4 (1,8)	10,7 (1,3)
Glicina	10,0	8,2	9,0	6,1	6,9 (0,5)	8,0 (0,8)
Prolina	6,1	5,6	5,1	4,2	6,0 (0,3)	1,7 (0,5)
Serina	9,6	5,9	6,1	5,5	4,4 (1,3)	8,7 (1,4)
Tirosina	2,9	3,3	3,4	4,2	-	-

cerne à lisina, treonina, metionina e cisteína. Dos valores representados no quadro 5.11. não parece ter havido diferença significativa na composição em ácidos aminados das bactérias colhidas do rumen dos ovinos quando alimentados só com erva ou com erva + bolota, à exceção da prolina e ácido glutâmico que foram menores para a dieta só de erva. Atendendo contudo ao erro analítico de 16% encontrado na análise quantitativa dos ácidos aminados, estas diferenças podem ser apenas aparentes.

Quadro 5.11. Composição em ácidos aminados da erva, bolota e bactérias do rumen (g/100g de ácidos aminados totais). [  $\bar{X}$  ( $\pm$  s) ], n=3.

	Erva	Bactérias do rumen	
		Dieta	
		Erva	Erva + Bolota
Arginina	7,2 (0,7)	3,9 (0,4)	4,2 (0,2)
Histidina	2,7 (0,2)	-	-
Isoleucina	4,0 (0,5)	5,2 (0,3)	3,6 (0,9)
Leucina	7,8 (1,0)	8,3 (1,6)	10,5 (0,2)
Lisina	6,7 (1,6)	9,9 (2,4)	7,9 (0,9)
Metionina	2,2 (0,3)	2,9 (0,3)	2,8 (0,1)
Fenilalanina	5,2 (0,7)	5,4 (1,6)	6,5 (0,4)
Treonina	6,0 (0,5)	2,9 (0,8)	2,5 (0,4)
Valina	7,3 (1,0)	6,3 (0,2)	4,2 (1,0)
Alanina	7,2 (1,1)	5,3 (0,9)	4,4 (1,4)
Ác. aspártico	9,9 (2,1)	9,3 (0,6)	9,8 (0,8)
Cisteína	2,1 (0,9)	6,8 (0,6)	6,8 (1,1)
Ác. glutâmico	13,2 (3,2)	12,8 (3,8)	20 (2,1)
Glicina	5,0 (0,8)	4,7 (1,2)	4,5 (0,6)
Prolina	4,8 (0,8)	4,2 (0,3)	5,1 (0,1)
Serina	5,5 (1,3)	5,6 (1,1)	6,0 (0,7)
Tirosina	3,2 (0,6)	6,0 (1,1)	4,0 (1,3)

5.3.5. Desaparecimento do azoto, dos saquinhos. - Nos quadros 5.12 e 5.13 representam-se os valores de MS e N desaparecidos dos saquinhos ao fim de diversos tempos de incubação.

A MS saída dos sacos foi menor, ao fim de 9 e 12 h de incubação, para os ovinos 1 e 3, quando alimentados com erva+bolota. Para as 6 primeiras horas de incubação para os ovinos 1 e 3, e para todos os tempos de incubação para o ovino 2, não se observaram diferenças apreciáveis nos valores de MS saída dos saquinhos para as duas dietas estudadas. As taxas de saída da MS foram mais baixas quando os ovinos foram alimentados com erva mais bolota.

No que respeita à saída do N dos sacos observou-se um fenómeno semelhante: menor percentagem de N desaparecido, principalmente a partir das 6 h de incubação, quando os animais foram alimentados com erva+ bolota, relativamente ao observado quando os mesmos animais foram alimentados só com erva. Ainda aqui o ovino nº 2 exibiu um comportamento distinto. Apesar das diferenças observadas, os valores dos coeficientes de regressão obtidos para o N ( $y = \% \text{ de N desaparecido}; x = \text{tempo de incubação, h}$ ) foram iguais, ovino a ovino, para as duas dietas.

Estes dados são difíceis de interpretar, por vários motivos. O pano de dacron utilizado na confecção dos saquinhos tinha poros de dimensões muito superiores às recomendadas pelos autores. A medição, ao microscópio, de 200 poros (40 poros x 5 retalhos diferentes) permitiu evidenciar que as dimensões médias eram  $86(\pm 16,3) \times 65(\pm 16,7) \mu\text{m}$ , ( $5590 \mu\text{m}^2$ ), valores 2,5 vezes maiores que os actualmente recomendados (Orskov et al., 1981). Nestas condições a fracção de MS ou N que desaparece instantaneamente é elevada já que tal desaparecimento resulta de mera lavagem. Os elevados valores de MS e N desaparecidos ao fim da 1ª hora de incubação poderão ter resultado desta circunstância, aliada ao facto da erva grosseiramente moída que foi

Quadro 5.12. Desaparecimento da MS da erva, dos saquinhos de nylon incubados no rumen *in situ* (% da MS inicial) (médica de 2 saquinhos por animal).

Tempo de permanência (h)	Dieta dos ovinos					
	Erva			Erva+Bolota		
	Ovino nº			Ovino nº		
	1	2	3	1	2	3
1	37,2	30,0	34,7	37,4	35,2	37,5
3	40,1	36,4	38,0	41,8	37,3	39,4
6	50,9	43,5	46,7	47,5	42,1	49,9
9	61,3	55,5	58,1	54,1	53,7	52,3
12	66,0	60,0	64,2	61,4	59,9	60,0
r	0,98	0,98	0,99	0,99	0,98	0,98
b	0,056	0,064	0,059	0,044	0,051	0,044

Quadro 5.13. Desaparecimento do N da erva, dos saquinhos de nylon incubados no rumen *in situ* (% do N inicial) (médica de 2 saquinhos por animal).

Tempo de permanência (h)	Dieta dos ovinos					
	Erva			Erva+Bolota		
	Ovino nº			Ovino nº		
	1	2	3	1	2	3
1	50,9	49,2	49,8	48,7	48,0	46,5
3	52,7	51,6	51,6	50,9	49,2	48,0
6	59,0	55,5	60,0	54,9	53,1	53,4
9	65,2	60,9	65,0	61,0	57,7	60,0
12	72,7	65,1	73,0	70,2	64,0	66,0
r	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
b	0,033	0,026	0,036	0,033	0,026	0,033

Coefficientes de correlação e de regressão segundo a equação exponencial  $y = e^{-bx}$

introduzida nos saquinhos ter apresentado uma elevada proporção de material pulverento que saía dos saquinhos por mera manipulação destes. Para resultados mais consistentes deveríamos ter utilizado material vegetal verde (sem secagem) e cortado com tesoura em partículas de 1 a 2 cm.

Pelas razões expostas decidimos optar, em alternativa ao de Orskov, por um modelo mais simples sugerido por Miller (1980): Fazer a regressão dos logaritmos dos valores de N desaparecido em função dos tempos de incubação. Tal modelo não se ajusta adequadamente a valores obtidos para além das 12 h de incubação, no entanto, como salientado por Miller, a maior parte da degradação das proteínas verifica-se dentro daquele período de tempo (Miller, 1980).

As menores quantidades de MS e N saídos dos saquinhos introduzidos no rumen dos ovinos quando alimentados com erva + bolota dificilmente poderão ser explicadas por uma maior fase de latência microbiana já que os animais foram alimentados de forma contínua. É possível que tais diferenças, particularmente as verificadas ao fim de 6 a 12 h de incubação se tenham ficado a dever, quer a uma menor população microbiana total, quer a um certo grau de insolubilização do N da erva por acção dos taninos veiculados pela bolota, ou a ambos. Poder-se-á igualmente ter verificado, não uma diminuição do crescimento da microbiota ruminal, mas antes um decréscimo no número de organismos celulolíticos (que são os mais proteolíticos), em favor dos amilolíticos, quando 50% da erva foi substituída por bolota. Seja como for estes resultados confirmam a menor degradação do azoto calculada através das medições duodenais (quadro 5.8.).

Dadas as limitações inerentes a estas experiências, não é possível retirar conclusões. Estes resultados deverão ser considerados como preliminares para estudos ulteriores baseados na metodologia sugerida (página 222). Por este motivo optámos pela apresentação individual dos resultados e não tentámos nenhuma inferência estatística.

**ESTUDOS COMPLEMENTARES;  
ENSAIOS COM MARCADORES**

## ESTUDOS COMPLEMENTARES E ENSAIOS COM MARCADORES

C 5.1. Princípios das medições, definições e metodologias envolvidas em estudos da digestão <i>in vivo</i> . . . . .	253
- Digestibilidade da ração . . . . .	253
- Cinética da digesta . . . . .	254
- Cálculo da proteína bacteriana e alimentar que flui ao nível do duodeno e modo de expressão da eficiência da síntese . . . . .	265
- Determinação da taxa de degradação do azoto no rumen <i>in situ</i> - Técnica dos saquinhos . . . . .	272
C 5.2. Ensaio conduzidos para medir as taxas de recuperação dos marcadores . . . . .	277
C 5.2.1. Preparação dos marcadores . . . . .	278
C 5.2.2. Comportamento dos marcadores no rumen <i>in vitro</i> . . . . .	279
C 5.2.3. Comportamento <i>in vivo</i> dos marcadores . . . . .	280
C 5.2.4. Resultados . . . . .	283

C 5.1. Princípios das medições, definições e metodologias envolvidas em estudos da digestão *in vivo*.

Digestibilidade da ração. A quantidade de um nutriente "aparentemente" digerida é a diferença entre uma quantidade de um nutriente que entrou, após aplicação oral ou ingestão numa secção ou no tracto gastro-intestinal total (I), e a quantidade do mesmo nutriente que é rejeitada aboralmente à secção ou tracto gastro-intestinal total (E)

$$= I - E$$

A digestibilidade "aparente" é a relação entre a quantidade "aparentemente" digerida de um nutriente e a quantidade ingerida desse nutriente (I)

$$= \frac{I - E}{I} \text{ ( de 0 a 1 )}$$

O coeficiente de digestibilidade aparente é a digestibilidade "aparente" expressa, em percentagem da quantidade de material ingerida

$$= \frac{I - E}{I} \times 100 \text{ ( de 0 a 100 )}$$

A quantidade "verdadeiramente digerida" de um nutriente (= quantidade absorvida de um nutriente) é a diferença entre a quantidade de um nutriente que entrou oralmente numa secção ou no tracto gastro-intestinal total (I) e a quantidade do mesmo nutriente que é rejeitada aboralmente à secção ou tracto gastro-intestinal total (E), deduzida da quantidade endógena do nutriente (e)

$$= I - (E - e)$$

A digestibilidade "verdadeira" (= absorbabilidade) é a relação entre a quantidade "verdadeiramente digerida" de um nutriente e a quantidade ingerida (I)

$$= \frac{I - (E - e)}{I} \text{ ( 0 a 1 )}$$

O coeficiente de digestibilidade "verdadeira" (= absorbabilidade, em %)

$$= \frac{I - (E - e)}{I} \times 100 \text{ ( 0 a 100 )}$$



Cinética da digesta. O alimento ingerido e a água desaparecem do rumen de duas maneiras: por digestão e absorção, e por passagem. Somente a matéria não digerida passa para o compartimento digestivo seguinte. Neste contexto a taxa de desaparecimento, do rumen, de qualquer componente alimentar será a soma das taxas de digestão e passagem, a qual iguala a taxa de aparecimento nos efluxos (produtos absorvidos e materiais saídos). A taxa de saída ou passagem, num sentido matemático estrito, refere-se exclusivamente à passagem ou saída de material não digerido. Por outro lado, a renovação ("turnover") é função tanto da taxa de digestão como da taxa de saída ou passagem. A saída e digestão oferecem maneiras competitivas para remoção da digesta. A taxa de digestão associada à taxa de saída determinará a extensão da digestão no interior de um compartimento. Estas taxas relativas também determinam a quantidade de matéria potencialmente digestível que escapa à digestão e que chega às fezes. A passagem ou trânsito refere-se ao fluxo de resíduos indigeridos através do tubo digestivo. Existem dois métodos gerais para medição do trânsito. O mais simples é a medição ou cálculo do volume do rumen e divisão dessa quantidade pela ingestão para obter um tempo de renovação ("turnover time") calculado. O cálculo é relevante para o trânsito desde que na base da determinação esteja um marcador indigestível, recuperável, de referência. Alternativamente pode-se administrar uma dose única de marcador indigestível seguida de colheitas frequentes durante algum tempo. A fistulação e canulação do compartimento digestivo em estudo facilita a administração dos marcadores e a colheita de amostras para determinação da sua concentração na digesta. Dadas as confusões que por vezes se estabelecem relativamente ao significado de muitos termos usualmente utilizados, e dado que nem sempre é nítida a derivação de algumas das equações utilizadas nos cálculos acima referidos, nem fácil de encontrar na bibliografia mais co-

mum, achou-se oportuno definir adequadamente as bases dos cálculos.

O organismo animal pode ser encarado como sendo composto por um conjunto variado de "pools" ou compartimentos, contendo moléculas características, envolvidos em parte por barreiras anatómicas. As dimensões de tais "pools" tendem a permanecer relativamente constantes quando os "inputs" igualam os "outputs". Vários conceitos são utilizados para definir o movimento dos constituintes de qualquer "pool" (Warner, 1981):

Velocidade - Conceito apenas aplicável a fluxos tubulares, em que um bolo de digesta retém a sua coerência e atravessa o segmento do tubo digestivo em estudo, mais ou menos directamente, sem divergência. Exprime-se em unidades tais como mm/s.

Taxa de fluxo, ou apenas fluxo - Refere-se a quantidades de material digerido ou transformado (nomeadamente em biomassa microbiana) nos, absorvido dos, ou segregado para, segmentos do tubo digestivo. Exprime-se em unidades tais como l/h ou Kg/h. Autores Franceses (Genest, 1982) utilizam igualmente termos como débito (ml/h) e fluxo (ml/24h) para exprimirem a mesma idéia.

Taxa de passagem - É uma medida da duração de retenção de porções individuais de digesta no tubo digestivo ou em qualquer dos seus segmentos, ou seja, o tempo a que aí são sujeitas aos processos de mixagem mecânica, digestão, fermentação microbiana, absorção, etc. Exprime-se em unidades tais como  $h^{-1}$ , ou, mais usualmente, o recíproco, h. Como medida da taxa de passagem utiliza-se por vezes a taxa de fluxo fraccional ( $K.h^{-1}$ ) - a fracção do conteúdo do tubo digestivo, ou de qualquer dos seus segmentos, que dele sai por unidade de tempo. Como sinónimo deste termo encontramos outros, tais como taxa de alimentação, taxa de passagem, taxa de renovação... . O significado é basicamente o mesmo: Refere-se à quantidade de material (ou moléculas) que abandona o "pool" por unidade de tempo, e

representa-se usualmente por  $K$ . Este conceito pressupõe um sistema em equilíbrio ("steady state") com todas as taxas e volumes mantidos constantes. Apesar de ser esta a definição mais útil, não é no entanto a mais usualmente utilizada, nem a mais geralmente aplicável. Prefere-se frequentemente utilizar o conceito de tempo de retenção como medida da taxa de passagem. É o tempo que determinada fracção da digesta é retida no tubo digestivo ou num dos seus segmentos. A medida mais importante do tempo de retenção é o tempo de retenção médio, a média do tempo de retenção de todos os elementos da digesta sujeitos a estudo. Em condições de equilíbrio o tempo de retenção médio é igual ao recíproco da taxa de fluxo fraccional:

$$\begin{aligned} \text{Tempo de retenção médio} &= \frac{1}{\text{Taxa de fluxo fraccional}} \\ \text{(Tempo de renovação)} & \quad \text{(Taxa de passagem)} \\ \text{("Turnover time")} & \end{aligned}$$

$$= \frac{\text{Volume do conteúdo}}{\text{Taxa de fluxo fraccional}}$$

É o tempo necessário para que desapareça 63% do material do "pool". Representa-se usualmente por  $T$ . Alguns autores (Faichney, 1980b) consideram a taxa de desaparecimento fraccional que, como foi dito atrás, é a soma da taxa de fluxo (taxa de saída) e da taxa de degradação (ou de digestão):

$$\text{Taxa de desaparecimento} = \text{Taxa de digestão} + \text{Taxa de passagem}$$

Outra medida usualmente utilizada para caracterizar a taxa de passagem é o tempo de semi-vida ("half-time"): É o tempo necessário para a renovação ("turnover") de 50% do substrato.

Para os cálculos do volume do rumen, da cinética da saída das substâncias, e do tempo médio de permanência, utilizam-se marcadores indigestíveis e não absorvíveis capazes de se associarem íntimamente ao material em estudo.

## Definição matemática do tempo médio de renovação e da taxa de renovação

Um sistema contínuo, em equilíbrio ("steady-state") é descrito pelo volume  $V$  e pela taxa de alimentação ou de diluição. Em vez do volume pode-se usar  $X$  para representar a quantidade de um componente qualquer ("pool") no rumen. A taxa de alimentação (taxa de diluição; taxa de renovação; taxa de fluxo) pode ser expressa como a quantidade de material que entra no rumen por unidade de tempo, ou, mais utilmente:

$$\begin{array}{l} \text{Taxa de renovação} \\ \text{de qualquer com-} \\ \text{ponente no rumen} \end{array} = \frac{\text{Quantidade ingerida ou} \\ \text{administrada por unidade de tempo}}{\text{Quantidade presente no rumen}} \\ \text{(tamanho do "pool")}$$

Se o "pool", ou quantidade total presente, for representado pela unidade (1), a quantidade ingerida ou administrada por unidade de tempo pode ser expressa como uma fracção desse total. Por exemplo, se a digesta no rumen de um ovino representar 4 400g de MS, e a taxa de alimentação for  $240\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$ ,

$$\begin{array}{l} \text{Taxa de renovação} \\ \text{da MS no rumen} \end{array} = \frac{240\text{g}\cdot\text{h}^{-1}}{4\,400\text{g}} = \frac{240\text{g}}{4\,400\text{g}\cdot\text{h}} = \frac{1}{18,33\text{h}}$$

A taxa de renovação (quantidade ingerida por hora) da MS no rumen é  $\frac{1}{18,33}$  da presente no rumen. O recíproco desta fracção (18,33h) é o tempo de renovação (por vezes designado ciclo de renovação):

$$T = \frac{\text{Quantidade presente no rumen}}{\text{Quantidade ingerida ou adminis-} \\ \text{trada por unidade de tempo}} = \frac{4\,400\text{g}}{240\text{g}\cdot\text{h}^{-1}} = 18,33\text{h}$$

É o tempo requerido para a entrada (ou saída) de uma quantidade de MS (no presente exemplo) igual ao representado no rumen.

Se se adicionar uma dose única de um material inerte de referência (marcador) a um rumen de volume constante, com mixagem instantânea e contínua, a quantidade do marcador que abandona o rumen por passagem,

em qualquer instante, dependerá da quantidade presente nesse mesmo instante (concentração). Devido à mixagem do marcador com o conteúdo não marcado presente, e com o material não marcado ingerido ou administrado posteriormente, nem todo o marcador sai durante um ciclo ou tempo de renovação, embora, como é evidente, durante esse período de tempo o material total que abandona o rumen seja equivalente ao total que nele entra.

Se representarmos por  $X$  a fração da substância original no rumen ao tempo  $t$  (com a quantidade inicial =1, ou seja, a sua totalidade), a taxa de alteração na quantidade fraccional de marcador inicial ainda presente será

$$dx/dt = -Kt \quad (1)$$

em que a constante  $K$  é a taxa de renovação, de valor negativo porque a quantidade de  $x$  diminui.

A integração de Eq. 1 dá

$$\ln x = -Kt + C$$

No instante em que se adiciona o marcador,  $x=1$ ,  $t=0$  e  $C=0$ , e a equação integrada torna-se

$$\ln x = -Kt \quad (2)$$

ou

$$x = e^{-Kt} \quad (3)$$

A integração entre limites

$$\int_{x_1}^{x_2} \frac{dx}{x} = \int_{t_1}^{t_2} -Kdt$$

dá a equação

$$\ln x_2/x_1 = -K(t_2 - t_1)$$

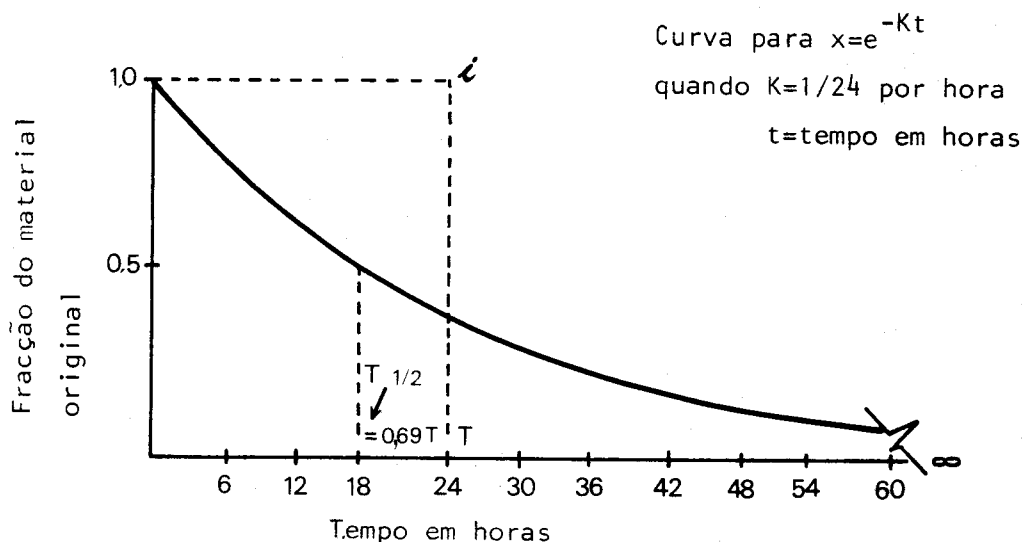
ou

$$2,3 \log x_1/x_2 = K(t_2 - t_1) \quad (4)$$

Quando tiver ocorrido um ciclo ou tempo de renovação, ou seja, quando tiver decorrido 18,33h no ovino exemplo,  $Kt$  igualará 1;  $\frac{1}{18,33}$  do alimento (MS) representado pela digesta ruminal total será ingerido a cada hora, e

o alimento consumido em 18,33 horas igualará a quantidade representada no rumen, ou seja, 1. Esta quantidade (em equilíbrio) ("steady-state") de um material representado no rumen, igual à quantidade que entra ou sai durante um ciclo, período ou tempo de renovação ("turnover time") é o "pool", designado usualmente por A. A fração, x, do marcador ainda presente no rumen após um ciclo de renovação será 0,37 da quantidade inicialmente adicionada: Da Eq. 2,  $\ln = -1$  ( $Kt=1$ );  $\log x = \frac{-1}{2,3} = -0,43478 = 9,56522 - 10$ , para o qual o antilogaritmo é 0,37. Isto significa que do material existente no rumen em qualquer momento, 0,37 ainda estará presente depois de ter decorrido um tempo ou ciclo de renovação (T). Este tempo T é o recíproco da taxa de renovação (K), como se disse previamente:  $K = \frac{1}{T}$ . Assim, e para o exemplo dado, para uma taxa de alimentação de 1,31 por dia, T seria 0,764 dias ou 18,33h.

Pode-se demonstrar matematicamente e graficamente que o tempo médio que as partículas da digesta permanecem no rumen é igual ao tempo de renovação ("turnover time"). Para tal reportemo-nos novamente à Eq. 2 que descreve a curva representada na figura seguinte.



Curva mostrando a diluição de uma dose única de marcador adicionada a um sistema contínuo em equilíbrio com um tempo de renovação ("turnover time") de 24 horas.

Quando T é o tempo médio que as partículas permanecem no rumen, a área do rectângulo 0 ; 1,0 ; i ; T iguala a área total entre a curva e os eixos dos x e dos t. A área sob a curva é igual a

$$\int_{t=0}^{t=\infty} x dt.$$

Uma vez que  $x = e^{-Kt}$  (Eq. 3),

$$\int_{t=0}^{t=\infty} e^{-Kt} dt = -\frac{1}{K} e^{-K\infty} + \frac{1}{K} e^0 = \frac{1}{K} \quad (5)$$

Se  $\frac{1}{K} = T$ , a área sob a curva é igual à área do rectângulo.

É óbvio que, para um longo período, o tempo médio no rumen deve igualar o tempo requerido para que entre uma quantidade de alimento equivalente. De outro modo a quantidade representada no rumen ("pool") alterar-se-ia.

Uma vez demonstrado que  $T = \frac{1}{-K}$ , outra forma de justificação do significado do tempo de renovação é como se segue: Dada a equação  $x = x_0 e^{-Kt}$ , e dado que, tal como foi definido,  $T = \frac{1}{-K}$ ,  $x = x_0 e^{-Kx(\frac{1}{-K})}$ , donde  $x = x_0 e^{-1}$ , e  $x = \frac{x_0}{e}$ . Como, por definição,  $x_0 = 1$  para o tempo T (tempo de renovação), tem-se  $x = \frac{1}{e} = 0,37$ . Ao fim do tempo T a quantidade x que permanece é igual a 0,37 da quantidade presente ao tempo  $t_0$ , ou seja 1 (a totalidade). Ao tempo T desapareceu 0,63 de 1 (da totalidade), ou seja, 63%.

Partindo da mesma equação  $x = x_0 e^{-Kt}$ , fácil é verificar que  $T_{1/2} = \frac{0,693}{-K}$ . Com efeito, o tempo de semi-vida ("Half-Time") é, por definição, o período de tempo que leva a renovar 50% da quantidade total presente ao tempo  $t = 0$ , ou seja, o tempo necessário para x igualar  $\frac{x_0}{2}$  (para que a concentração do marcador baixe metade, ou para que o  $\log_2$  da concentração baixe 1). Substituindo na equação, x por  $x_0/2$ :

$$x_0/2 = x_0 e^{-K T_{1/2}}.$$

Por transformação logarítmica,

$$\log (x_0/2) = \log x_0 - K T_{1/2} \quad \text{e} \quad \log x_0 - \log 2 = \log x_0 - K T_{1/2}$$

Simplificando ,

$$-\log 2 = - K T_{1/2} \quad \text{e} \quad T_{1/2} = \frac{\log 2}{K} = \frac{0,693}{K}$$

### Fórmulas de cálculo do fluxo da digesta

Em condições de equilíbrio ("steady-state"), em que teoricamente o volume do rumen ( ou qualquer outro compartimento em estudo) permanece constante, pode-se calcular a taxa de fluxo da fase líquida do rumen (F), o volume de distribuição do marcador da fase líquida (V) e o tempo médio de permanência do líquido no rumen (tempo de renovação) (T) administrando uma dose única de marcador e estudando a sua taxa de desaparecimento ao longo do tempo. Uma vez que após a administração do marcador a mistura não é instantânea,  $x_0$  pode ser calculado como sendo a intercepção da recta de regressão  $\ln x = \ln x_0 - Kt$ . Após obtenção do valor de  $-K$ , calcula-se o valor de  $T = \frac{1}{K}$ . O volume V do líquido ruminal é calculado a partir da diluição sofrida pelo marcador.

$$V \text{ (ml)} = \frac{\text{Quantidade de marcador administrado (g)}}{\text{Concentração do marcador ao tempo } t=0 \text{ (intercepção da recta } \ln x = \ln x_0 - Kt) \text{ (g.ml}^{-1}\text{)}}$$

Com infusão contínua do marcador pode-se calcular a taxa de fluxo de líquido do rumen para o omaso a partir da concentração do marcador no líquido que sai: Sendo  $Q_r$  a quantidade de marcador que sai do rumen (igual à quantidade  $Q_a$  que é administrada), se

$$C_a = \text{concentração do marcador na solução administrada (g.ml}^{-1}\text{);}$$

$$d_a = \text{débito da solução de marcador administrada (ml.h}^{-1}\text{);}$$

$$Q_a = C_a \times d_a$$

O fluxo da fase líquida ( $\text{ml.h}^{-1}$ ) é calculado a partir da concentração do marcador na fase líquida do rumen ( $C_r$ )



$$\text{Fluxo (ml.h}^{-1}\text{)} = \frac{C_a \text{ (g.ml}^{-1}\text{)} \times d_a \text{ (ml.h}^{-1}\text{)}}{C_r \text{ (g.ml}^{-1}\text{)}} .$$

$$F \text{ (ml.h}^{-1}\text{)} = \frac{Q_a \text{ (g.h}^{-1}\text{)}}{C_r \text{ (g.ml}^{-1}\text{)}}$$

Com os valores de  $-K$  e  $T_{1/2}$ , calculados a partir da cinética de desaparecimento do marcador do rumen, e o valor de  $F$  calculado durante o período de infusão contínua, pode-se calcular com maior precisão o valor de  $V$ :

$$V = \frac{F}{K} = T \times F \quad (T = \frac{1}{K} = \frac{V}{F})$$

A quantidade de marcador presente no rumen ("rumen marker pool")

$$P = Q_a \times T$$

e a fracção de  $P$  (do "pool") no rumen que é transferida para fora do órgão por unidade de tempo ( $\lambda$ ) (ou fracção do volume do rumen),

$$\lambda = \frac{Q_a}{T}$$

O volume de digesta (líquido+sólido) (em l) pode calcular-se:

$$\frac{\text{Volume do líquido} \times 100}{100 - \text{MS} (\%)}$$

O doseamento do  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ , marcador da fase sólida, permite calcular os fluxos ( $F$ ) de matéria seca do rumen, do mesmo modo que o Co-EDTA permite calcular o fluxo de líquido:

$$F_{\text{MS}} \text{ (g.h}^{-1}\text{)} = \frac{Q_a \text{ (g.h}^{-1}\text{)}}{C_{\text{Cr}_2\text{O}_3} \text{ (g.g}^{-1}\text{ de MS)}}$$

A renovação da matéria particulada no rumen é importante nos ruminantes porque a) a matéria particulada constitui a fonte de energia digestível para o crescimento microbiano e b) a renovação dos resíduos das partículas indigestíveis estabelece a ingestão de forragens menos digestíveis (Ellis, 1978). Contudo, dada a natureza exploratória dos presentes estudos, não se determinou aquele parâmetro para a fase particulada (partículas que não fluem com a fase líquida).

Os fluxos de líquidos e sólidos ao nível do duodeno são calcu-

lados a partir de equações idênticas às utilizadas para o rumen, mas considerando as concentrações dos marcadores nas fases líquida e sólida (obtidas por centrifugação ou filtração) da digesta duodenal.

Como se viu, é possível calcular a quantidade e composição da digesta no rumen e duodeno de ovinos alimentados continuamente ou frequentemente a intervalos fixos, se se utilizarem dois marcadores, um dos quais permaneça em solução enquanto o outro se associa íntimamente à matéria particulada. Este método dos dois marcadores pode ser utilizado em animais alimentados intermitentemente se as amostras colhidas forem representativas do ciclo alimentar total (Faichney, 1980a). No entanto este método pressupõe um comportamento ideal de ambos os marcadores. Faichney (1975) descreveu um outro método, designado de duplo marcador e que não exige um comportamento ideal dos marcadores. No entanto, o número de análises requerido é muito superior e para os presentes estudos achou-se preferível a utilização dos dois marcadores. Note-se que o método dos dois marcadores, tal como definido por Faichney (1975), embora requerendo um comportamento ideal para aqueles, considera uma correcção: se se supuser que a fase líquida (filtrado) contem toda a água numa amostra da digesta, então a fracção da amostra que é "filtrado" (fase sólida) (FF) é dada por

$$FF = \frac{(1-MS \text{ da digesta})}{(1-MS \text{ do filtrado})}$$

Nos cálculos subsequentes as concentrações dos marcadores são expressas sob a forma de fracção da quantidade do marcador infundido nas 24 h, ou por Kg de digesta ou filtrado; a concentração de MS como uma fracção da amostra fresca, e as concentrações de N como  $g.Kg^{-1}$  de digesta ou filtrado.

Como parte do Co-EDTA infundido se associa com a matéria seca da digesta (Faichney, 1975), a sua concentração na água do filtrado será menor que a sua concentração aparente na água da digesta. A relação des-

tas concentrações é a efectiva fracção de infusão para o Co-EDTA no filtrado e pode-se calcular assim:

$$\frac{(\text{Co-EDTA no filtrado})}{\text{Co-EDTA na digesta}} \times \text{FF}$$

A concentração do Co-EDTA no filtrado é corrigida dividindo pela fracção de infusão efectiva, e como o fluxo de filtrado corrigido é o recíproco de concentração corrigida de Co-EDTA no filtrado, o seu cálculo pode ser simplificado em

$$\text{Fluxo do filtrado} = \frac{\text{FF}}{\text{Co-EDTA na digesta}}$$

O fluxo de filtrado não corrigido é simplesmente o recíproco da concentração de Co-EDTA no filtrado. O fluxo de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  no filtrado é subtraído da unidade para dar a fracção de infusão efectiva para o  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  no filtrando (I). Assim

$$I = 1 - (\text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ no filtrado} \times \text{fluxo do filtrado})$$

e a concentração de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  no filtrando calcula-se:

$$\text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ no filtrando} = \frac{\text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ na digesta} - (\text{FF} \times \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ no filtrado})}{(1-\text{FF}) \times I}$$

então

$$\text{Fluxo do filtrando} = \frac{1}{\text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ no filtrando}}$$

e

$$\text{Fluxo da digesta} = \text{fluxo do filtrado} + \text{fluxo do filtrando.}$$

O fluxo de N pode então calcular-se:

$$\begin{aligned} \text{Fluxo de N} = & \text{N no filtrado} \times \text{fluxo de filtrado} + \\ & + \left\{ \frac{\text{N da digesta} - (\text{FF} \times \text{N do filtrado})}{1-\text{FF}} \right\} \times \text{fluxo do filtrando} \end{aligned}$$

Subsequentemente, o fluxo de qualquer outro constituinte da digesta pode ser calculado substituindo as suas concentrações pelas do N na última equação.

### Marcador único

$$\text{Fluxo da digesta (Kg)} = \frac{1}{\text{conc. de cada marcador na digesta (Em fracção da dose das 24 h) (Por Kg de digesta)}}$$

$$\text{Fluxo N} = \text{F. digesta} \times \text{conc. N na amostra de digesta}$$

Cálculo da proteína bacteriana e alimentar que flui ao nível do duodeno e modo de expressão da eficiência da síntese. Nos ruminantes consumindo alimentos normais o azoto não amoniacal (NNA) que flui para o intestino delgado consiste em proteína bruta microbiana (NX6,25) sintetizada ao nível do retículo-rumen, proteína alimentar que escapa à fermentação microbiana e NNA das células epiteliais descamadas e das secreções abomais (Mathers e Miller, 1980). A quantificação destes componentes e a determinação do modo como variam com diferentes alimentos e regimes alimentares é de importância central para recentes propostas para novos métodos de avaliação da contribuição proteica dos alimentos e de cálculo das necessidades proteicas alimentares (Journet e Verité, 1977; Roy et al., 1977; Satter e Roffler, 1977). Tanto a contribuição alimentar como microbiana podem ser determinadas na base do conhecimento do fluxo de NNA para o intestino delgado e da determinação da proporção de NNA microbiano no NNA total presente na digesta abomasal ou duodenal. A contribuição do N endógeno é avaliada na base do peso vivo (Phillipson, 1964) ou do nível de ingestão de MS (Hogan e Weston, 1967).

### Cálculo da degradação do azoto no rumen *in vivo*

Distinguem-se principalmente dois métodos para calcular a degradabilidade *in vivo* das proteínas no rumen (Stern e Satter, 1982): O método da regressão e o da diferença. Com o primeiro, a proporção de proteínas alimentares não degradadas no rumen é calculada a partir da relação entre o

fluxo de proteínas ao nível do duodeno e a quantidade de proteínas ingeridas: A proteína problema é adicionada a uma ração em quantidades crescentes, mantendo constante a ingestão de matéria seca. A contribuição da proteína microbiana para a digesta duodenal é considerada igual para todas as rações, o que requer que as rações sejam formuladas com iguais fermentescibilidades. Quando o fluxo duodenal de ácidos aminados (Y) é representado relativamente aos ácidos aminados ingeridos (x), o aumento no fluxo é atribuído à proteína problema. O coeficiente de regressão é representativo da proteína alimentar não degradada. *Hvelplund et al.*, (1976) sugeriram outro método baseado na técnica de regressão: As proporções de N alimentar não degradado e N microbiano que atingem o duodeno são calculadas a partir da relação entre a razão NNA duodenal/N ingerido (Y) e o teor em N do alimento (g N/Kg MS) (x). Utilizaram a equação  $Y = A + \frac{b}{x}$ , em que A= proporção de NNA que chega ao intestino, não degradado, e b= N microbiano sintetizado/Kg de MS ingerida.

Com o segundo método mede-se a quantidade de proteína ingerida e o fluxo de proteína total ao nível do duodeno. As proteínas de origem microbiana e endógena são calculadas, com base num marcador microbiano e no peso vivo, respectivamente, e as proteínas alimentares não degradadas no rumen são calculadas por diferença.

#### Marcadores utilizados no estudo da síntese microbiana no rúmen

A síntese proteica microbiana é determinada através da utilização de marcadores tais como ácidos nucleicos (*Mc Allan e Smith, 1969*), ácidos aminados [diaminopimélico (ADAP) (*Hutton et al.*, 1971); D-alanina (*Garret et al.*, 1982) ou ácido D-glutâmico (*Mc Millan, 1982*)] ou isótopos radiactivos que são incorporados pelas bactérias, marcando-as [ $^{35}\text{S}$  (*Walker e Nader, 1968*; *Mathers e Miller, 1980*),  $^{15}\text{N}$  (*Pilgrim et al.*, 1970;

Nolan et al., 1976) ou  $^{32}\text{P}$  (Van Nevel e Demeyer, 1977)]. Também se tem utilizado o ácido aminoetilfosfônico (AEP) como marcador dos protozoários (Abou Akkada et al., 1968), mas recentemente a sua validade foi posta em causa (Theurer, 1982).

A maioria das técnicas foram recentemente revistas por Stern e Hoover (1979), Theurer (1982), Buttery e Lewis (1982) e Tamminga (1983).

Diferentes autores compararam os diversos marcadores (Harmeyer et al., 1976; Ling e Buttery, 1978; Smith et al., 1978; Tamminga, 1978; Siddons et al., 1979; Harrison e Mc Allan, 1980; Theurer, 1982; Tamminga, 1983), tendo observado que os resultados diferem consoante o marcador utilizado.

Com excepção do ADAP, D-alanina e ácido D-glutâmico todos os marcadores sofrem o efeito das contribuições endógenas ao nível do intestino: o ARN devido às células de descamação; os isótopos radioactivos porque requerem períodos relativamente longos de infusão para atingirem estados de equilíbrio e o conteúdo intestinal atinge o seu máximo enriquecimento em radioactividade.

No pressuposto de que as bactérias colhidas do conteúdo ruminal são representativas dos microorganismos que atingem o abomaso e intestino delgado, a contribuição da proteína microbiana para o suprimento proteico total ao nível do intestino é usualmente medida como a "diluição" do marcador comparada com o teor em marcador nos microorganismos isolados do conteúdo ruminal. O teor em marcador das bactérias é variável, dependendo da hora de colheita após a alimentação (Dufva et al., 1982). A actividade específica do P-fosfato inorgânico do rumen, o precursor do P incorporado nas bactérias ruminais, também parece ser variável (Smith et al., 1978). Não existem informações relativas aos outros marcadores. Tal como referem Smith et al., (1978) e (Buttery e Lewis, 1982), continua por resolver o problema de se saber qual dos marcadores

é o mais preciso.

Os protozoários contribuem significativamente para a fermentação ruminal, particularmente da fibra (Williams, 1982; Hobson e Wallace, 1982; Marinho, 1983). No entanto estes microorganismos são sequestrados no rumen (Weller e Pilgrim, 1974; Harrison et al., 1979), principalmente os Holotricas (Marinho, 1983). Esta sequestração permite-lhes sobreviver no rumen, já que a sua taxa de renovação é muito menor que a da fase líquida (Leng et al., 1981) e a sua contribuição para o N duodenal total é muito menor do que seria de esperar pela biomassa normalmente presente no rumen. Mesmo assim são referidos valores por vezes elevados: 50% do N microbiano total (Kurilov et al., 1976) e 25% do N intestinal (Harrison et al., 1979) em ovinos, e 40% do azoto duodenal total em vacas leiteiras (Steinhour et al., 1982). Desta forma é grande a incerteza relativa ao cálculo, por diferença, da quantidade de proteína alimentar não degradada no retículo-rumen e os valores de degradação podem ser bastante maiores que os calculados.

O método da diferença, utilizado no presente estudo (como aliás qualquer outro) está longe de ser rigoroso, e é normalmente confrontado com coeficientes de variação da ordem dos 50 a 100% (Miller, 1978; Ørskov, 1980). O erro presente na determinação da contribuição microbiana é, por subtracção, transferido para a fracção (usualmente muito menor) da proteína alimentar não degradada no rumen. Por exemplo, se o conteúdo em azoto microbiano na digesta duodenal fôsse calculado em 70% ( $\pm 10\%$ ), e a contribuição endógena em 10%, então o conteúdo em proteína alimentar seria de 20% ( $\pm 10\%$ ), o que representaria um coeficiente de variação de 50%.

Como foi dito anteriormente, os valores calculados da síntese microbiana dependem do marcador utilizado e da possibilidade de obtenção

de uma amostra de bactérias do rumen representativa da população que flui para o abomaso e duodeno. Mac Rae e Reeds (1980), citando trabalhos de Ling e Buttery (1978) e de Siddons et al., (1979) compararam medições do fluxo duodenal de N microbiano utilizando diferentes marcadores ( ADAP, ARN,  $^{35}\text{S}$  e  $^{15}\text{N}$  ). Verificaram grandes discrepâncias, variando os valores encontrados de 0,47 (ADAP) a 0,70 (ARN) para uma dieta à base de cevada e bagaço de soja, e de 0,45 ( $^{15}\text{N}$ ) a 0,93 (ARN) para outra à base de silagem. Com dietas à base de feno e silagem aqueles autores encontraram valores duas vezes superiores com o ARN e ADAP que com o  $^{35}\text{S}$  e  $^{15}\text{N}$ . Discrepâncias similares são referidas por Tamminga (1978), Ling e Buttery (1978), Harrison e Mc Allan (1980), Theurer (1982). Diferenças no conteúdo em células bacterianas e a sua lise e reciclagem no rumen também podem afectar a precisão do método. O teor em marcador das bactérias é variável consoante a hora de colheita após a alimentação (Dufva et al., 1982). No entanto, nas presentes condições experimentais (alimentação contínua e colheita de bactérias de uma amostra compósita de digesta ruminal obtida a diferentes horas do dia cobrindo todo o ciclo nictemeral) a concentração em D-alanina encontrada deverá ter sido bem representativa das bactérias que atingiram o duodeno. Além disso, a D-alanina (ao contrário do ácido diaminopimélico) está presente (tal como o ácido D-glutâmico) nos mucopeptídeos das paredes celulares tanto das bactérias Gram+ como das Gram- (Schliegfer e Kandler, 1972). No entanto, tal como acontece com o ADAP, o teor em D-alanina pode variar de estirpe para estirpe pelo que com este tipo de marcadores só é possível obter cálculos muito gerais.

O doseamento da D-alanina, realizado sobre as amostras compósitas de bactérias do retículo-rumen de cada carneiro em cada dieta e sobre as amostras compósitas das fases líquida e sólida das digestas duodenais, permitiu a quantificação da proporção de azoto microbiano total no



azoto não amoniacal na digesta duodenal. O teor em D-alanina é expresso em g/16g de N (ou 100g de PB, seja  $N \times 6,25$ ). Seja:

a = g de D-alanina/16g de azoto bacteriano;

b = g de D-alanina/16g de azoto total na digesta duodenal.

Partindo do pressuposto que a razão N:D-alanina nas bactérias livres do rumen (ou seja, 16:a) é idêntica à razão N:D-alanina nas bactérias que atingem o duodeno (ou seja, N bacteriano:b), a quantidade de azoto de origem bacteriana contida em 16g de azoto total no duodeno pode ser calculada:

$$N \text{ bacteriano duodenal} = \frac{16}{a} \times b$$

A proporção de NNA de origem microbiano na digesta duodenal será:

$$\frac{N \text{ total (bactérias)}}{D\text{-alanina (bactérias)}} \times \frac{D\text{-alanina (digesta duodenal)}}{NNA (digesta duodenal)}$$

Recorde-se que o azoto não amoniacal não microbiano, determinado ao nível do duodeno é composto por azoto alimentar não degradado no rumen+azoto endógeno+azoto dos protozoários e que esta soma sobrevaloriza o azoto alimentar não degradado, subvalorizando por consequência o valor da degradação do azoto alimentar no retículo-rumen.

### Modos de expressão da eficiência da síntese microbiana no rúmen

A síntese microbiana pode ser expressa em função da produção a) de ATP, b) de AGV, ou das quantidades de matéria orgânica a) aparentemente ou b) verdadeiramente digerida no rumen. Com efeito a digestão da MO determina uma produção de AGV e de ATP, sendo este utilizado na síntese microbiana. *Bauchop e Elsdén (1960)* estiveram na origem do conceito segundo o qual existe uma relação directa entre a síntese de ligações fosfato e o crescimento bacteriano ( $Y_{ATP}$ ). A anaerobiose limita severamente a produção de ATP. A partir de 1 mole de hexose as bactérias ruminais

não podem produzir senão 3,6 a 5,6 moles de ATP. Os valores médios de  $Y_{ATP}$  são da ordem de 10,5g (4,6 a 20,9g) variando conforme as condições culturais (Hungate, 1966). Os rendimentos máximos foram observados em culturas contínuas com elevadas taxas de renovação a que correspondem as menores necessidades de manutenção (Stouthamer e Bettenhausen, 1973).

A importância da consideração da eficiência da síntese microbiana pode ser exemplificada com o seguinte exemplo: Para  $Y_{ATP} = 14,5$ , uma vaca leiteira de elevada produção somente poderia fazer uso do NNP alimentar se a dieta contivesse proteína de degradabilidade excepcionalmente baixa; para  $Y_{ATP} = 20$ , então tal vaca poderia derivar virtualmente todas as suas necessidades do NNP alimentar. O  $Y_{ATP}$  usualmente observado *in vitro* é de 10,5 e o  $Y_{ATP}$  teórico = 25 (em rápido crescimento e poucas necessidades de manutenção).

A determinação do  $Y_{ATP}$  a partir dos valores de AGV produzidos é difícil num meio complexo como é o rumen. Assim prefere-se geralmente exprimir o rendimento microbiano em relação à MO aparentemente digerida no rumen e outros compartimentos gástricos (quer dizer, a MO aparentemente desaparecida mais a MO sintetizada pelos microorganismos), e foi esta a forma de expressão escolhida para os nossos resultados.

Os valores de eficiência da síntese microbiana encontrados por diversos autores têm sido largamente referenciados (Czerkawski, 1978; Smith, 1979; Theurer, 1979; Armstrong, 1980; Bergen et al., 1982; Tamminga, 1983), e variam com um grande número de factores, nomeadamente natureza da dieta, nível e frequência alimentar, os quais afectam parâmetros tais como pH, natureza das fermentações (tipo acetato, propionato ou butirato), tempo de renovação da digesta e dos microorganismos, etc.. Contudo, devido à complexidade e interacções entre os inúmeros factores, e para efeitos práticos, tem-se adoptado um valor único, médio, de 30g de

N microbiano produzido por Kg de MO aparentemente digerida antes dos intestinos (Jarrige, 1978; Vêritê et al., 1979; ARC, 1980), apesar dos valores usualmente observados sejam muito variáveis (9,6 a 33,2 g de N microbiano/Kg MO aparentemente digerida no rumen) (Smith, 1979). As maiores eficiências têm sido normalmente verificadas com dietas à base de forragens verdes (Mc Meniman et al., 1976).

#### Determinação da taxa de degradação do azoto no rúmen *in situ*

Técnica dos saquinhos. Para além da quantidade de azoto alimentar degradado no rumen é importante o conhecimento da taxa de degradação desse mesmo azoto. Este último parâmetro não pode ser medido no rumen *in vivo*, constituindo a técnica dos saquinhos o melhor meio da sua avaliação (Mehrez e Ørskov, 1977). Tal informação pode ser utilizada em tentativas para assegurar uma melhor sincronização entre libertação de energia e de N dos alimentos fermentados. A maior fraqueza do método assenta na dificuldade em calcular o tempo de permanência dos componentes alimentares no rumen. Contudo, a determinação da degradação do azoto alimentar por métodos *in vivo* não pode ser realizada em rotina e a técnica dos saquinhos tem sido objecto de larga aplicação nos últimos anos (Mehrez e Ørskov, 1977; Crawford et al., 1978; Ganév et al., 1979; Ørskov e Mc Donald, 1979; Mehrez et al., 1980; Ørskov et al., 1980; Lindberg, 1981 a,b; Loerch et al., 1983).

A utilização desta técnica pressupõe a fixação de vários critérios em relação ao material da membrana utilizada na confecção dos saquinhos, dimensão dos poros, relação MS do substrato a incubar: área do saquinho, forma e tempo de lavagem, etc. Ørskov et al., (1981) recomendaram

a obediência aos seguintes critérios:

- 1 -  $> 50\text{cm}^2$  de superfície de parede de saquinho/g de MS de amostra
- 2 - Dimensões dos poros do pano dos saquinhos (entre 30 - 100  $\mu\text{m}$ ), suficientemente grandes para evitarem acumulação de gás no interior dos saquinhos, mas suficientemente pequenos para se evitar ao máximo a perda de material particulado por lavagem.
- 3 - Fios atados aos saquinhos suficientemente longos (25cm para ovinos e 50cm para bovinos).
- 4 - Condições ruminais tais que os substratos alimentares, necessários para garantirem a actividade degradativa microbiana máxima, não sejam limitantes à degradação da amostra.

Por sua vez, *Smith* (*Smith, R.H.*, comunicação pessoal) recomenda:

- 1 - Saquinhos em tecido de malha (nylon) com poros de 40-50  $\mu\text{m}$ , e com 24X9-10 cm, cosidos com fio de nylon ou poliéster (pontos duplos e costura apertada) de forma a obter um tamanho efectivo de 17X9-10cm quando o tampo é atado. Os saquinhos podem ser reutilizados 2 a 3 vezes desde que não ocorra deterioração apreciável. (As deteriorações dos poros podem ser confirmadas por observação ao microscópio.

- 2 - As amostras dos alimentos deverão ser preparadas do seguinte modo:

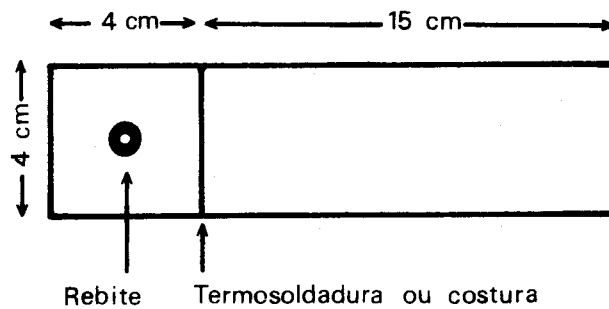
- a - Alimentos concentrados: Nenhum tratamento se todo o material passar através de crivo de 2,5 mm. Os materiais com partículas de maiores dimensões deverão ser moídos através de crivo de 2,5 mm. Não remover o material fino.

- b - Componentes fibrosos: Nenhum tratamento se as partículas tiverem comprimento inferior a 25-50 mm. Materiais mais longos devem ser cortados.

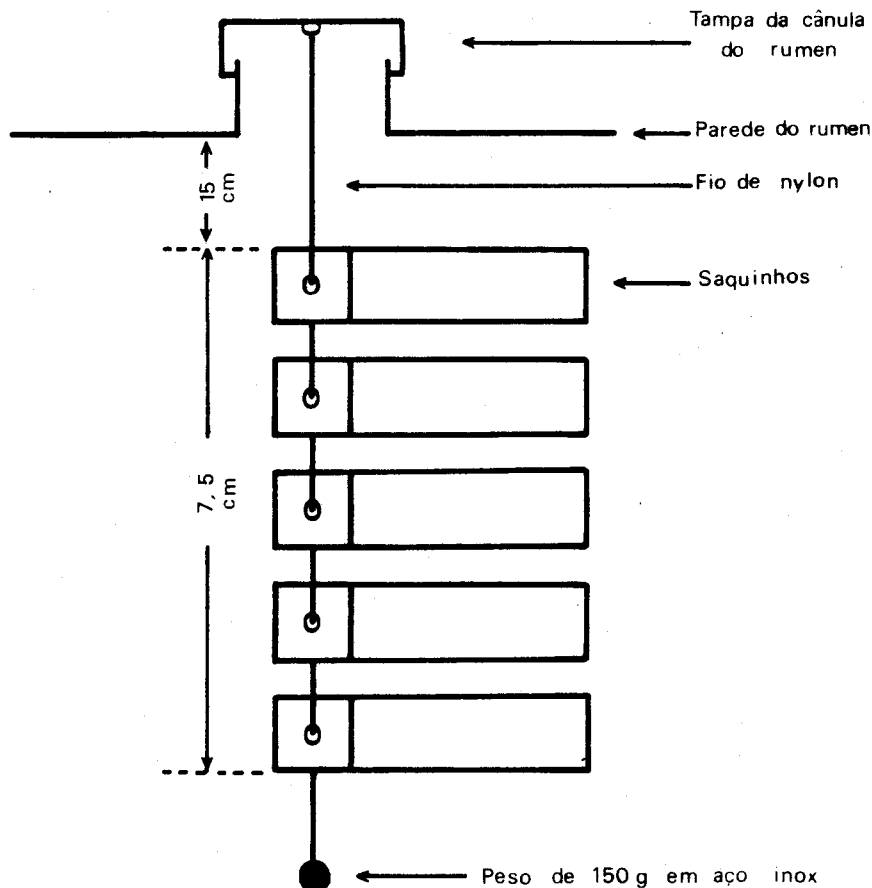
Para saquinhos com as dimensões indicadas a quantidade de material por saco deverá ser 5g (material seco ao ar) por saquinho.

3 - De cada saquinho deverá ser suspenso um peso de 150 g para evitar que flutue.

Autores Franceses (Gueneau e Bertrand, 1984) recomendam a utilização de um peso idêntico (150 g), mas para um conjunto de 4 saquinhos. Os saquinhos podem ser confeccionados da seguinte maneira: Cortar um retângulo de tecido com 20X16 cm; dobrá-lo em dois e soldar (ou coser) 2 bordos. Deixa-se um bordo do lado pequeno aberto. Realizar outra soldadura (ou cosedura) a cerca de 4 cm da extremidade pequena fechada. Coloca-se um rebite para permitir a fixação do saco (Gueneau e Bertrand, 1984):



A colocação dos saquinhos é realizada do seguinte modo:



Nos ensaios conduzidos no presente trabalho os saquinhos foram suspensos de fios individuais. Cada um destes saquinhos deverá conter aproximadamente 3 g de alimento a testar.

Após a lavagem dos saquinhos e resíduos não digeridos, os mesmos são usualmente colocados em solução de pepsina (1:10 000) a  $2\text{g.l}^{-1}$  em HCl 0,1N, durante 48 h. No presente trabalho, contudo não se procedeu à incubação com pepsina.

A degradação de um suplemento proteico, determinada a partir do desaparecimento do N do suplemento do interior de saquinhos de nylon e incubados no rumen *in situ*, pode ser descrita por uma equação exponencial com a fórmula

$$p = a + b(1 - e^{-ct}),$$

em que  $p$  é a degradação ao tempo " $t$ ",  $a$  é a interceptação da curva e representa a fracção azotada rapidamente solúvel,  $b$  representa a fracção azotada potencialmente degradável (função do tempo de permanência) e o  $c$  a taxa a que a fracção  $b$  é degradada. Por definição,  $100 - (a + b)$  é a fracção azotada totalmente indegradável no rumen. A determinação do valor  $p$  está dependente do tempo de permanência das partículas do alimento no rumen. Dada a grande variação que se pode encontrar nos valores de " $K$ " (entre 0,01 e 0,1) (Ørskov, 1980) não é aconselhável utilizar um tempo médio de incubação.

Se se conhecer a taxa fraccional de saída, do material em estudo, do rumen, a degradabilidade efectiva do N pode ser calculada pela equação:

$$p = a + \frac{bc}{c + K}$$

em que  $K$  é a taxa fraccional de saída do material proteico, por hora (Ørskov e Mc Donald, 1979). Em alguns casos a constante  $a$  é negativa, o que será indicativo da existência de uma fase latente inicial antes do início

do desaparecimento da proteína. Em tais condições a equação é modificada para (Ørskov *et al.*, 1981):

$$p = \frac{bc}{c+K} \left( \frac{a+b}{b} \right) \frac{c+K}{K}$$

Miller (1980) sugeriu outro tipo de cálculo que não é afectado pelo problema das fases latentes que podem ser observadas para certos alimentos, como o feno de luzerna:

$$p = a + (1-a) \left( \frac{K_d}{K_r + K_d} \right)$$

$K_d$  = taxa constante do desaparecimento do azoto dos saquinhos.

$K_r$  = Taxa constante de saída, da proteína não degradada, do rumen.

$a$  = Proporção de N desaparecido ao tempo  $t=0$   
(Supostamente solúvel e 100% degradado).

A diferença entre os dois modelos é, contudo, pequena e os cálculos finais da degradabilidade são usualmente similares. Ørskov considera uma fracção  $b$ , enquanto que Miller considera  $b = 1-a$ . Para além disso as equações são idênticas. O modelo de Miller parece não se ajustar adequadamente aos valores obtidos para além das 12 h de incubação. Contudo a maioria das proteínas degradam-se durante as primeiras 12 horas.

A taxa de saída, do rumen, da proteína não degradada pode ser medida por marcação do alimento com crómio de acordo com o método de Ganev *et al.*, (1979), utilizando técnicas desenvolvidas por Uden *et al.*, (1980). A proteína assim tratada é completamente indegradável no rumen, e o método pressupõe que a proteína marcada desaparece à mesma taxa que a não marcada.

Serrano (1985) reviu recentemente as bases teóricas em que assenta o método dos sacos *in situ* bem como os factores de variação que influenciam os resultados.

C 5.2. Ensaio conduzido para medir as taxas de recuperação de marcadores.

Dada a inexistência de tradição, no nosso País, na utilização de marcadores em estudos de digestão em ruminantes, foi iniciada no Departamento de Nutrição da Estação Zootécnica Nacional, sob a orientação do seu responsável, Dr. João Ramalho Ribeiro, uma linha de trabalho visando o estudo da adequação de alguns marcadores à investigação da cinética dos processos digestivos. Dadas as grandes exigências em meios técnicos e financeiros deste tipo de pesquisa optou-se por adequar os estudos aos objectivos mais globais daquele Departamento e não aos mais específicos dos da presente tese. Foi assim que o alimento base dos animais experimentais foi a silagem de milho e não a erva ou bolota. Os principais resultados, no entanto, podem-se considerar extrapoláveis para outras situações alimentares.

A utilização de marcadores para o estudo dos fluxos de solutos e material particulado ao nível do tubo digestivo foi recentemente revista por Kotb e Luckey (1972), Faichney (1975), Teeter (1981), Warner (1981) e Ellis et al., (1982).

Numa primeira fase seleccionaram-se a fibra tratada com cromo (fibra-Cr) como marcador da fase particulada da digesta e o PEG<sub>20.000</sub>, Cr-EDTA e Co-EDTA como marcadores da fase líquida, para um estudo do seu comportamento no rumen *in vitro*. Numa segunda fase estudaram-se os comportamentos *in vivo* da fibra-Cr, NDFI, ADFI, Cr-EDTA e Co-EDTA. O PEG<sub>20.000</sub> e o Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foram excluídos dos estudos *in vivo*. O primeiro porque não se pode aplicar a dietas que contenham taninos (precipita) e o segundo porque foi exhaustivamente estudado no passado por inúmeros autores.

Os lantanídeos foram excluídos destes estudos devido à onerosidade dos processos analíticos.



C 5.2.1. Preparação dos marcadores. Fibra-Cr. A sua preparação baseou-se na técnica de *Üden et al.*, (1980). Como fontes de fibra, para ser tratada com crômio, utilizaram-se a palha de trigo, a silagem de milho e o feno de festuca. Os materiais foram primeiro moídos grosseiramente e lavados em tabuleiro de rêde com duas camadas de gaze a fim de eliminar o material pulverento. Após secagem em estufa a  $65^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  foram extraídos durante 2 h com detergente comercial na proporção de 20 g de detergente para 50 g de "NDF" (préviamente determinado para aqueles materiais). Utilizou-se para o efeito uma panela de pressão e 2 l de água por cada 50 g de "NDF". Após filtração através de funil de Buchner com 2 camadas de gaze lavou-se o material extraído com água quente, transferiu-se para funil filtrante com placa de vidro sinterizado de porosidade G2 e lavou-se com acetona. Após secagem em estufa a  $65^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 24 h os resíduos extraídos foram tratados com 4 volumes de solução de dicromato de sódio ( $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ): A quantidade de crômio utilizada foi 14% do peso da fibra a tratar, e fibra e Cr foram mantidos em estufa a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 24 h, com os recipientes tapados com folha de alumínio. Seguidamente filtrou-se através de papel de filtro xaroposo, lavou-se exaustivamente, primeiro com água e depois com acetona. Depois de evaporar toda a acetona o material foi submetido durante 3 h à acção de uma solução de ácido ascórbico (ácido ascórbico:fibra = 1:2) a fim de reduzir o ião Cr hexavalente a trivalente. Após lavagem e secagem a  $65^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  o material foi conservado em recipientes hermêticamente fechados até utilização.

Cr-EDTA. A sua preparação baseou-se na técnica descrita por *Binnerts et al.*, (1968): Pesou-se para copo de 800 ml 14,2 g de triclorêto de crômio ( $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) e dissolveu-se em 200 ml de água destilada. Num copo de 500 ml dissolveu-se 20 g de ácido etilenodiaminotetracético, sal dissódico (TITRIPLEX III) em 300 ml de água destilada. Esta solução

foi adicionada à primeira. Seguidamente colocaram-se algumas pedras de fervura (siderite) no copo de 800 ml contendo o cloreto de crômio e EDTA e aqueceu-se o conjunto até início da fervura. O líquido ferveu brandamente, sob refluxo (vidro de relógio) durante 1 hora. Seguidamente neutralizou-se o pequeno excesso de EDTA, não complexado, com 4 ml de solução de clorêto de cálcio 1M. Finalmente ajustaram-se o pH e o volume final a 6,5 e a 1 l, respectivamente.

Co-EDTA. Este complexo foi preparado sob a forma do seu sal de sódio, conforme a técnica de *Uden et al.*, (1980), descrita em 5.2.4.

O PEG<sub>20.000</sub> foi dissolvido em água destilada em quantidades adequadas à concentração desejada.

C 5.2.2. Comportamento dos marcadores no rumen *in vitro*. Incubaram-se os marcadores com silagem de milho (*Tilley e Terry, 1963*), conforme o esquema seguinte:

Silagem de milho (0,5g MS)	Fibra-Cr (Fes tuca, 100mg)	Cr-EDTA (1ml; 2,9mg Cr.ml <sup>-1</sup> )	Co-EDTA (1ml; 2,5mg Co.ml <sup>-1</sup> )	PEG (1 ml; 4mg.ml <sup>-1</sup> )
X				
X	X			
X		X		
X	X	X		
X			X	
X				X

Ao fim de 48 h de incubação os tubos foram centrifugados a 5.000xg durante 30 minutos e os sobrenadantes recolhidos para balões aferidos de 500 ml. Os sedimentos foram resuspensos duas vezes com água bidestilada, recentrifugados, e os sobrenadantes adicionados aos primeiros. Os três sobrenadantes obtidos para cada tubo e reunidos no mesmo balão foram acertados a

500 ml com água bidestilada. Sobrenadantes e sedimentos foram analisados para Cr e Co, conforme referido em 5.2.7. e o PEG<sub>20.000</sub> pelo método de Smith, (1959), modificado como se segue: Prepararam-se 8 a 10 soluções para a curva padrão, por diluição de uma solução mais concentrada de PEG com volumes adequados de líquido ruminal centrifugado a 8.000xg. Alíquotas das amostras incubadas com o PEG foram diluídas de forma a que as concentrações se situassem entre 300 e 3.000  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  e centrifugadas a 8.000xg. A 300  $\mu\text{l}$  de cada solução padrão ou problema adicionou-se, por ordem, com mixagem entre cada adição: 2,1ml de  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a 1,2%; 300  $\mu\text{l}$  de  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ , 0,3N e 300  $\mu\text{l}$  de  $\text{Zn SO}_4$  a 5%. As soluções de  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  e  $\text{Zn SO}_4$  foram equilibradas por titulação do  $\text{Zn SO}_4$  com  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  de forma que o ponto de viragem da fenolftaleína fôsse atingido com volumes iguais de cada solução. A precipitação da proteína foi acelerada por centrifugação a 2.000xg. Transferiu-se para tubos de ensaio 1 ml de cada sobrenadante, e adicionou-se 1 ml de água destilada a cada. A intervalos de tempo adequados à realização de duas leituras sucessivas adicionou-se 2ml de ácido tricloro acético a 30%/clorêto de bário dihidratado a 5,9%. (A solução foi previamente filtrada através de cadinho de porosidade Go. A absorção a 360nm foi medida 40 minutos após a adição do reagente ácido. A curva padrão foi traçada por regressão dos valores de absorção das soluções padrão relativamente ao logaritmo natural das respectivas concentrações em PEG. As concentrações em PEG das amostras problema foram os antilogaritmos dos valores de X calculados a partir da curva padrão.

C 5.2.3. Comportamento *in vivo* dos marcadores. Numa primeira fase testou-se a recuperação da fibra-Cr em 2 ovinos e numa segunda fase as recuperações da fibra-Cr, Cr-EDTA e Co-EDTA em 3 ovinos. Em ambas as fases os animais foram alimentados *ad libitum* com silagem de milho.

Todos os marcadores foram introduzidos em dose única através de

fístula ruminal canulada: 20 g de fibra-Cr (silagem de milho), 100 ml de solução de Cr-EDTA contendo 2,6 mg de Cr.ml<sup>-1</sup> e 100 ml de Co-EDTA contendo 2,5 mg de Co.ml<sup>-1</sup>. 6 horas após a introdução dos marcadores iniciaram-se as colheitas fecais, de 2 em 2 horas na primeiro ensaio e de 4 em 4 horas no segundo ensaio.

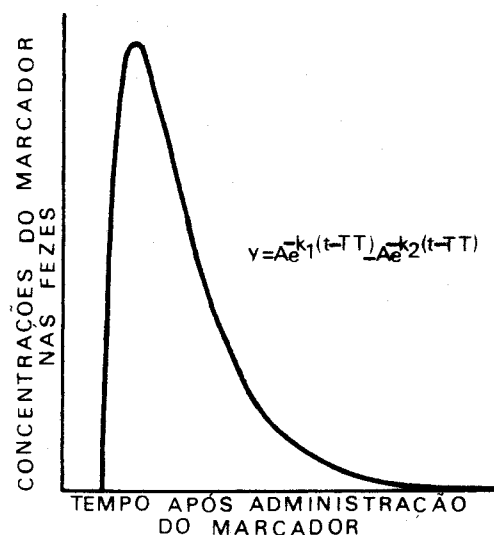
A taxa de recuperação dos marcadores (Co-EDTA e Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) no duodeno e nas fezes é a quantidade de marcador analisada na digesta duodenal e nas fezes colhidas, expressa em percentagem da quantidade de marcador administrada durante um determinado intervalo de tempo (24h). Alternativamente, e se as amostras de digesta duodenal e de fezes forem representativas, então a razão Co:Cr no duodeno deverá ser igual à razão Co:Cr administrados. Exprimindo as razões entre os marcadores no duodeno e nas fezes como percentagem da razão entre os marcadores infundidos obtém-se a percentagem de recuperação para ambos os sítios.

No caso da administração de dose única do marcador e subsequente análise da curva de excreção pelas fezes (por análise da concentração do cromo nas fezes colhidas a intervalos regulares durante um período prolongado-usualmente 10 dias-) a recuperação é determinada calculando a quantidade de cromo excretada (área sob a curva de excreção) e relacionando-a com a quantidade administrada.

Para o estudo da recuperação das NDFI e ADFI utilizou-se um ensaio de digestibilidade com 8 carneiros, alimentados ao nível de manutenção, 4 com feno de azevém e trevo violeta e 4 com o mesmo feno (40%) + cevada (60%) (Ribeiro, 1983-ESTAÇÃO ZOOTECNICA NACIONAL). As NDFI e ADFI foram determinadas submetendo 0,5 g de amostra (alimento ou fezes) à digestão *in vitro* (Tilley e Terry, 1963) durante um período de 96 h, seguida de extracção com detergentes, neutro ou ácido (Goering e Van Soest). As recupe-

rações foram calculadas a partir das quantidades ingeridas e excretadas durante um período de 6 dias. O Cr e Co-EDTA foram extraídos das fezes pela técnica de Üden et al., (1980) e analisados como descrito em 5.2.7.

As curvas de excreção fecal dos marcadores administrados em dose única têm a seguinte forma (Grofum e Phillips, 1973):

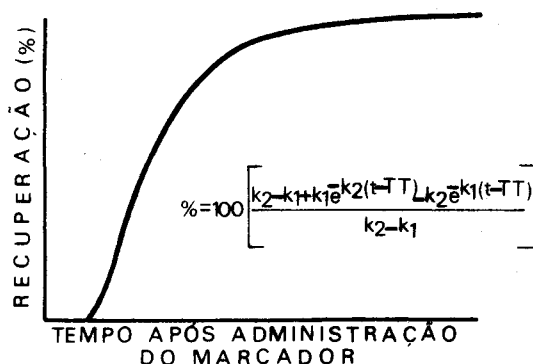


A equação da curva é similar à descrita por Blaxter et al., (1956).  $y$  e  $A$  representam as concentrações dos marcadores na MS fecal,  $k_1$  e  $k_2$  são constantes associadas à cinética do marcador no retículo-rumen e intestino grosso e  $t$  é o tempo de amostragem das fezes após a administração do marcador.  $TT$  é o tempo de trânsito do marcador através dos intestinos do ovino e é calculado pela equação:

$$TT = \frac{\ln A_2 - \ln A_1}{k_2 - k_1}$$

em que  $A_1$  e  $A_2$  são as intercepções das curvas que exprimem as concentrações do marcador na MS fecal. Grofum e Williams (1973) explicitaram a forma de realização dos diversos cálculos.

As curvas de percentagem acumulada de recuperação do marcador são descritas pela equação seguinte (Grofum e Phillips, 1973):



A equação resulta da integração da equação  $y = A_1 e^{-k_1(t-TT)} - A_2 e^{-k_2(t-TT)}$  entre os tempos TT e TF (tempo finito), multiplicando o resultado por 100, e dividindo o produto pelo integral para a área total sob a curva de concentrações para tempos compreendidos entre TT e  $\infty$ .

C 5.2.4.-Resultados. Nos quadros seguintes estão representados os principais resultados dos ensaios realizados. Para a recuperação *in vivo* dos marcadores administrados em dose única não se representam os valores encontrados para as diferentes variáveis utilizadas para os cálculos das recuperações. Tais dados resultaram de trabalhos de base desenvolvidos no Departamento de Nutrição da Estação Zootécnica Nacional, sob orientação do Doutor João Ramalho Ribeiro, e nos quais o autor se inseriu. Os resultados globais dos referidos trabalhos serão objecto de publicação num futuro próximo. Todo o trabalho, analítico e de cálculo, envolvido foi realizado pelo autor.

Quadro C 5.1. Digestibilidade *in vitro* e teor em Cr da fibra tratada com dicromato de sódio (n=4)

Material tratado	Digestibilidade		Teor em Cr	
	(%)	EPM	(% MS ± EPM)	
Palha de trigo	4,2	± 0,3	5,4	± 0,06
Silagem de milho	6,7	± 0,6	5,5	± 0,04
Feno de festuca	4,9	± 0,6	4,9	± 0,04

Quadro C 5.2. Recuperação dos marcadores incubados *in vitro* com silagem de milho (n=4)

Marcador	Recuperação (%)		EPM
Fibra-Cr	99,5	±	1,2
Cr-EDTA			
na presença de fibra-Cr	111,4	±	3,1
na ausência de fibra-Cr	109,0	±	2,6
Co-EDTA	104,7	±	1,9
PEG	98,7	±	2,0

Quadro C 5.3. Recuperação dos marcadores internos nas fezes.

Marcador	Recuperação (% $\pm$ s)	
	Dieta	
	Feno	Feno+Cevada
NDFI	83,5 $\pm$ 2,3	93,0 $\pm$ 3,9
ADFI	77,1 $\pm$ 2,7	90,6 $\pm$ 3,1

Quadro C 5.4. Recuperação da fibra-Cr, e dos Cr-EDTA e Co-EDTA nas fezes. a)

Marcador	Recuperação (%) <sup>b)</sup>				
	1º ensaio		2º ensaio		
	Ovino		Ovino		
	1	2	1	2	3
Fibra-Cr	96,3	95,8	94,7	96,7	95,9
Cr-EDTA	94,7	96,1	98,7	99,3	95,8
Co-EDTA	98,0	96,0	94,6	95,8	96,7

a) Tendo em conta os tempos de amostragem das fezes, após a administração dos marcadores, para os quais já se não detectaram quantidades mensuráveis.

b) Corrigida para as quantidades excretadas por via renal (Quadro A 5.5.).



Quadro C 5.5. Excreção urinária dos Cr-EDTA e Co-EDTA<sup>a)</sup>

Marcador	Excreção urinária (% do administrado)		
	Ovino		
	1	2	3
Cr-EDTA	2,7	3,7	3,0
Co-EDTA	4,6	5,5	4,6

a) Calculado com base nas quantidades de urinas emitidas durante 10 dias após a administração dos marcadores.

O comportamento *in vitro* dos marcadores foi o esperado. Os valores obtidos para o Cr-EDTA foram, contudo, ligeiramente elevados. Tal poderá ter sido resultante de contaminações, já que o material utilizado nas incubações era normalmente passado por mistura cromo-sulfúrica antes de descontaminação com HCl 1N.

As recuperações *in vivo* dos marcadores internos foram muito baixas. Tal poderá ter sido resultante quer de dificuldades analíticas, quer de solubilização parcial das entidades em estudo ao nível do tubo digestivo. A incerteza do seu comportamento desaconselhou-nos pois a sua utilização.

As recuperações *in vivo* verificadas para os marcadores externos foram satisfatórias e foram semelhantes às observadas por Üden et al., (1980). Elas foram de 100% ao fim de 10 dias para a Fibra-Cr, e de 5 dias para o Cr-EDTA e Co-EDTA. Tendo em conta os tempos de amostragem das fezes após a administração daqueles marcadores, para os quais já se não detectaram quantidades mensuráveis, as recuperações foram as indicadas no quadro A 5.4. As recuperações calculadas foram corrigidas para as quantidades excretadas por via renal (Quadro A 5.5.).

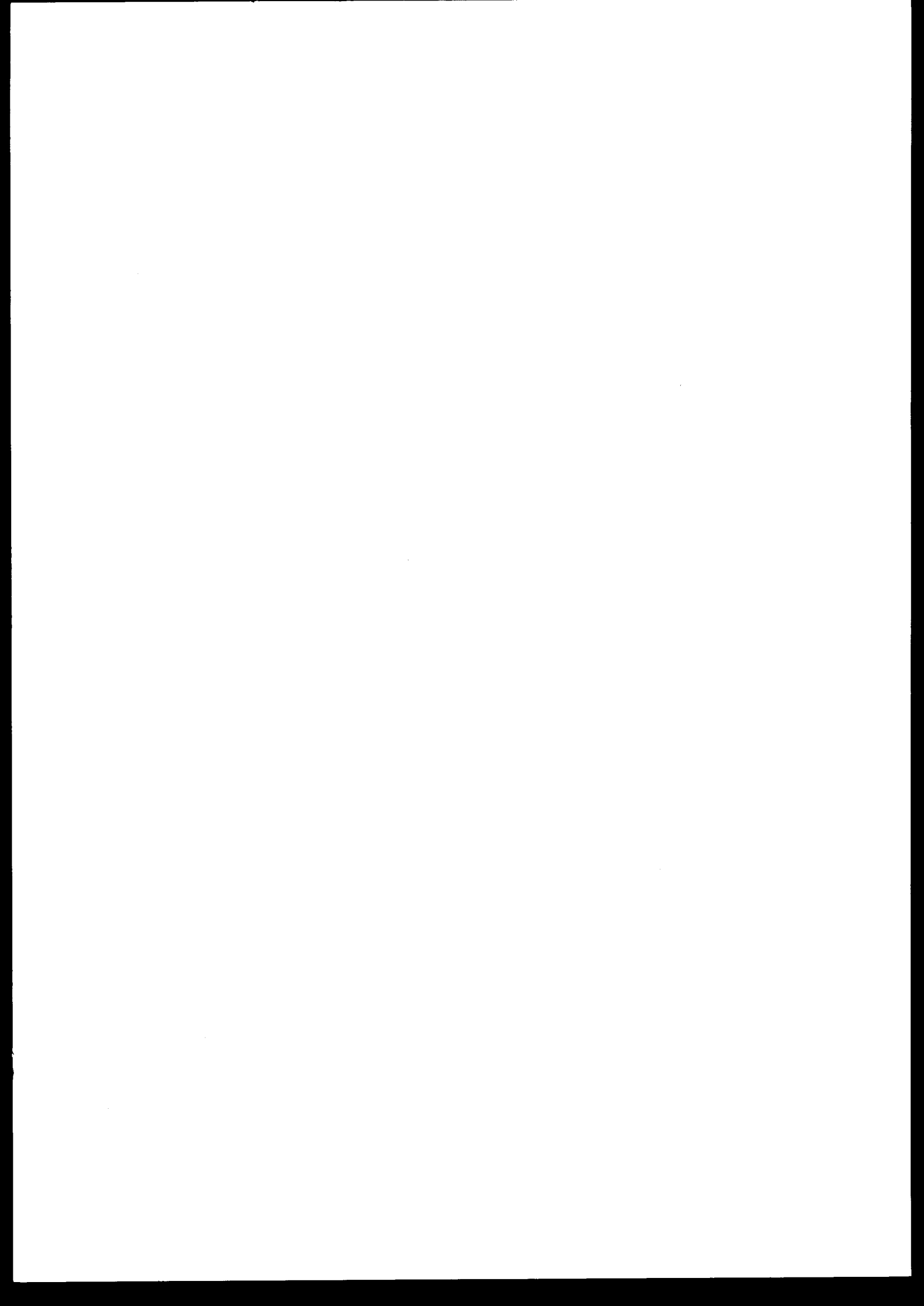
Os ovinos utilizados nos ensaios de recuperação dos marcadores

externos apresentaram fezes não moldadas nas primeiras 48 horas após a administração daqueles. Contudo, nenhum deles afectou a digestão no rumen *in vitro* quando se adicionaram a silagem de milho em concentrações idênticas às utilizadas *in vivo* (Serrano, 1985).

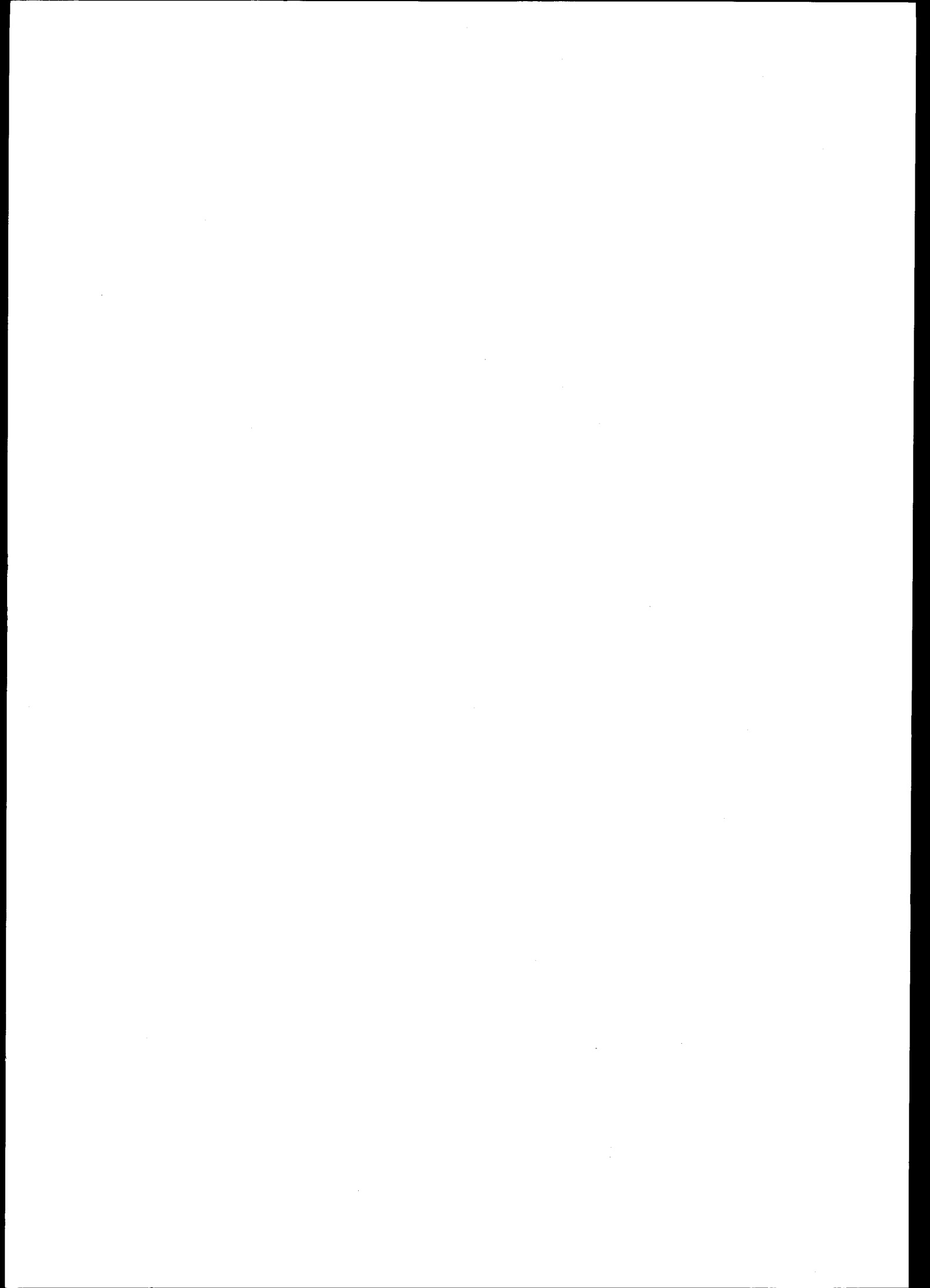
Apesar de a fibra mordantada com crômio ter exibido um excelente comportamento, tanto *in vitro* como *in vivo* (ao contrário do NDFI ou ADFI), receou-se que a sua utilização em administração contínua, misturada com o alimento, pudesse conduzir à rejeição do alimento marcado, devido à grande capacidade de selecção que os ovinos exibem em relação ao alimento, tornando impossível a quantificação das doses de crômio ingeridas diariamente. Por outro lado, a introdução no rumen da fibra marcada, através das fístulas canuladas, a intervalos frequentes e regulares (de 3 em 3 horas), não era exequível atendendo ao longo período de administração considerado. Assim, foi decidido, para os estudos descritos no capítulo V, utilizar  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  como marcador da fase particulada. Para o efeito tentou-se infundir o  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  mantido em suspensão na solução de Co-EDTA por agitação permanente, com o auxílio de uma bomba peristáltica e de um agitador magnético. Verificou-se, contudo, que o  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  se depositava sobre as paredes dos tubos condutores de tal forma que os mesmos acabavam por se obstruir parcialmente e o fluxo se tornava irregular. Não restou outra alternativa senão a administração do referido marcador com o alimento. A fim de prevenir perdas sobre o tapete do alimentador contínuo e comedouro o  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  foi administrado em "pellets" conforme descrito na página 226.

Apesar da recuperação do Cr-EDTA ter sido ligeiramente superior à do Co-EDTA optou-se pela utilização deste último já que a utilização de do Cr como marcador das duas fases da digesta (sólida e líquida) poderia criar dificuldades e incertezas na interpretação dos resultados.





**CONCLUSÕES FINAIS ;**  
**SUGESTÕES PARA PESQUISA FUTURA**



- 1- Os taninos, condensados e hidrolizáveis, exercem efeitos negativos sobre a ingestão e digestão das dietas que os contêm acima de valores de 0,8-1,2 % da matéria seca.
- 2- Os taninos hidrolizáveis exercem, peso/peso, efeitos nutricionalmente menos deletéreos que os condensados, mas são susceptíveis de exercerem acções tóxicas mais pronunciadas.
- 3- As técnicas usualmente utilizadas na análise de taninos em produtos são inespecíficas, mas as baseadas no princípio da precipitação das proteínas são fáceis de executar e os resultados têm maior significado nutricional.
- 4- Os taninos ligam-se mais fortemente às proteínas em zonas de pH próximas dos pontos isoelectricos daquelas. Contudo, os taninos condensados (alfarroba) precipitam mais proteína a pH francamente ácido que os hidrolizáveis (bolota).
- 5- Para um dado nível de tanino o aumento na quantidade de proteína em presença, acima de determinados valores, diminui a percentagem de proteína precipitada. A precipitação dos taninos é máxima quando a proteína se encontra em quantidades iguais a duplas das daqueles.
- 6- A ligação tanino-proteína é reversível, devido à natureza fundamentalmente hidrofóbica das ligações, e pode ser evitada por acção de certas substâncias como o PEG ou PVP, as quais são igualmente capazes de deslocarem os taninos de complexos pré-formados. Tais substâncias podem constituir valiosos auxiliares em estudos relativos à influência dos polifenóis taninos sobre a digestão e absorção.
- 7- Os taninos da bolota exercem um efeito depressivo maior sobre a digestão intestinal que sobre a gástrica *in vitro* da proteína, sendo tal efeito menos pronunciado que o exercido pelos taninos da alfarroba os quais exercem igualmente um efeito mais pronunciado sobre a fermentação no rumen *in vitro*. Tais constatações concordam com os resultados referidos em 4.
- 8- Em misturas alimentares contendo bolota ou alfarroba os taninos destes produtos exercem efeitos depressivos sobre a digestão *in vitro* das proteínas de intensidade proporcional à quantidade de produto incorporado.
- 9- Os taninos da bolota e da alfarroba exercem efeito depressivo sobre a fermentação da dieta pela microbiota do rumen quando aqueles produtos são incorporados aos níveis de 30-40% e de 20-30%, respectivamente.
- 10- O aumento no nível azotado da dieta alivia o efeito depressivo dos taninos sobre a fermentação da matéria orgânica e a degradação do azoto no rumen *in vitro*. O azoto proteico é contudo mais eficiente que o azoto não proteico. Este efeito pode ser parcialmente explicado pelo referido em 5.
- 11- A associação erva de Outono-bolota constitui, aos níveis de 50:50%, e apesar dos taninos veiculados por esta, uma associação nutricionalmente útil: quando a bolota é introduzida na dieta rica em azoto a menor degradabilidade do azoto da dieta e a aparente ausência de depressão na eficiência da síntese bacteriana no rumen determinam, apesar da depressão na digestibilidade aparente geral do azoto, uma maior proporção de NNA digerida nos intestinos. A ligeira depressão na digestão intestinal é largamente compensada pelo maior ganho de N entre a boca e o duodeno.  
Estes efeitos, atribuíveis aos taninos da bolota, poderão ser menos benéficos ou mesmo nocivos quando o nível azotado da dieta é baixo como acontece em Outonos secos.
- 12- As diversas técnicas adaptadas ou desenvolvidas nos presentes estudos revelaram-se adequadas aos objectivos dos trabalhos realizados.

- a- O estudo dos níveis de taninos em produtos e sub-produtos utilizáveis em alimentação humana e animal e sua variação de espécie para espécie vegetal (bolota, alfarroba, resíduo de uva, fava, ervilha, sorgo...);
- b- O estudo da influência dos polifenóis taninos de tais produtos, incorporados em variados níveis em dietas tipo para monogástricos e ruminantes, sobre a digestão gástrica e intestinal e a fermentação retículo-ruminal;
- c- O estudo da praticabilidade técnica e econômica de métodos de destaninização ou inativação dos taninos nos produtos ricos naqueles polifenóis;
- d- O estudo da potencialidade de proteínas de baixo valor biológico (mais baratas) serem tão eficazes como as de maior valor biológico (mais caras), para atenuarem o efeito depressivo que os taninos exercem sobre a digestão, principalmente das proteínas;
- e- A determinação dos níveis proteicos mais adequados à minimização do efeito depressivo de um dado nível de tanino

constituem áreas de pesquisa de índole aplicada que interessaria desenvolver no futuro, no âmbito da nutrição e alimentação.

- f- Para conclusão dos estudos iniciados com erva de Outono e bolota procurar-se-á quantificar o efeito que os taninos desta exercem sobre a utilização digestiva do azoto da dieta quando aquele fruto é utilizado com proporções variáveis de erva ou feno e de proteína suplementar.

Os estudos referidos em b) e) e f) deverão ser conduzidos primeiro em sistemas modelo *in vitro* a fim de restringir o número de combinações testáveis e só depois se deverão testar *in vivo* as que tiverem sido julgadas mais adaptadas em função dos resultados dos estudos *in vitro*. Em ambos os casos os efeitos dos taninos poderão ser estudados utilizando o princípio de que o PEG (ou a PVP) se liga mais fortemente aos taninos que as proteínas.

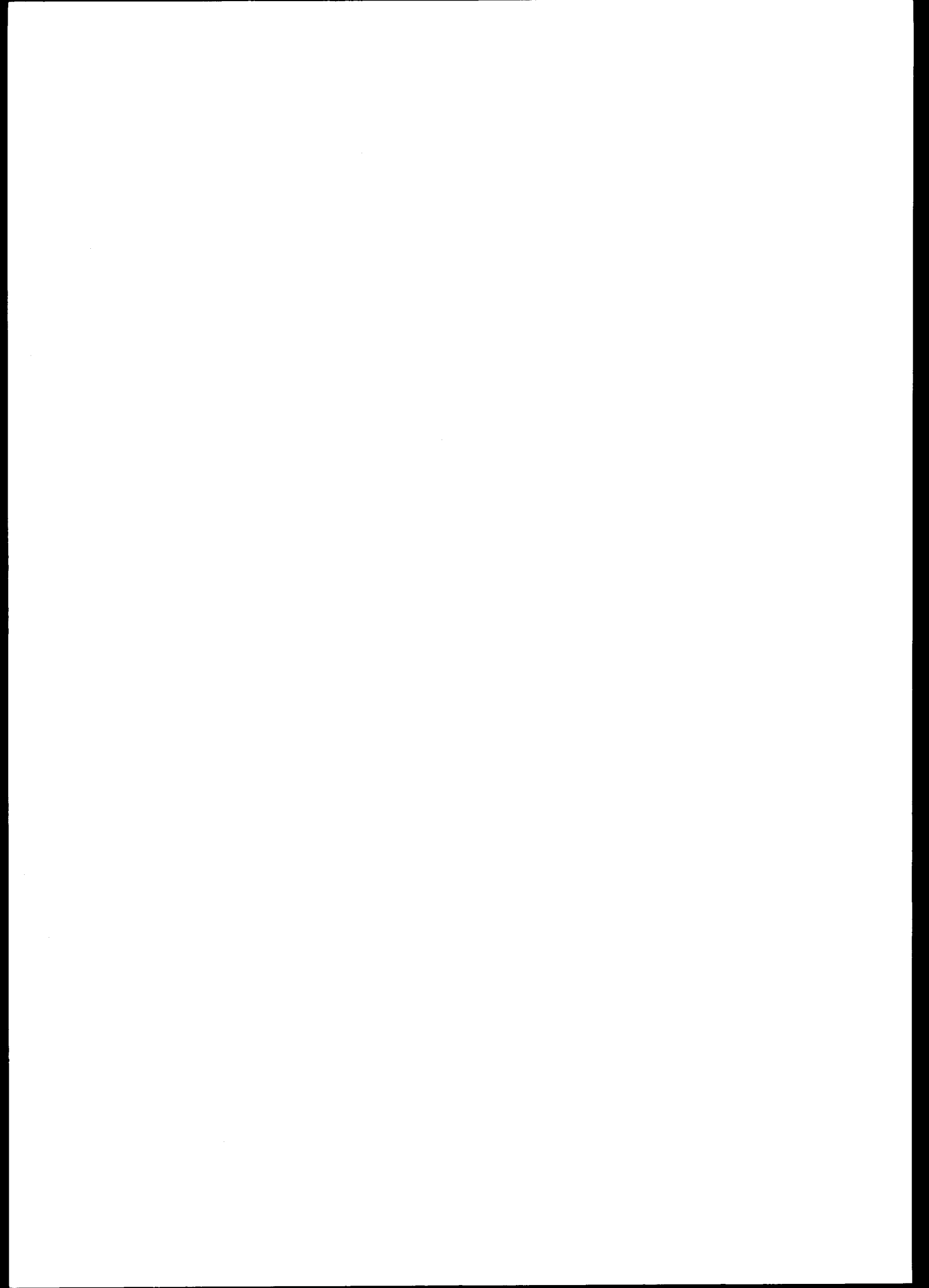
A medição das quantidades de gases produzidas no rumen *in vitro* constitui um método simples e sensível de aferir da actividade da microbiota do rumen e poderá ser utilizado vantajosamente, a par com outras medições, nos estudos referidos em b) e f).

Para os estudos da digestão gástrica e intestinal, a par dos métodos *in vitro* usuais sugere-se a possibilidade de utilização de um sistema *in vivo* idêntico ao de Sibbald para determinação da disponibilidade verdadeira dos ácidos aminados da dieta.

Para estudos da digestão parcial ao nível do retículo-rumen, e atendendo às incertezas resultantes das quantificações dos fluxos da digesta e da síntese proteica microbiana através da utilização de marcadores, pensa-se ser preferível sacrificar o estudo da síntese proteica microbiana e da degradação do azoto alimentar pelo método da diferença em favor de uma quantificação mais precisa da quantidade total de NNA que flui ao nível do duodeno através da utilização de cânulas duodenais de duplo circuito e do estudo da degradação do azoto ao nível do rumen pela técnica de Ørskov ou de Miller.

## BIBLIOGRAFIA





- ABOU AKKADA, A.D.; MESSMER, D.A.; FINA, L.R.; BARTLEY, E.E., 1968. Distribution of 2-Amino-Ethylphosphonic Acid in Some Rumen Microorganisms. Journal of Dairy Science, 51, 78.
- ALLISON, M.J., 1970. Nitrogen Metabolism of Ruminant Microorganisms. In: Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant, 456. Eds: A.T. Phillipson et al., Oriel Press, Newcastle Upon Tyne.
- ALLISON, D.W.; OSBOURN, D.F., 1970. The Cellulose-Lignin Complex in Forages and its Relationship to Forage Nutritive Value. Journal of Agricultural Science (Camb.), 74, 23.
- ANNISON, E.F., 1975. Microbial Protein Synthesis in Relation to Amino - Acid Requirements. In: Tracers Studies on Non-Protein Nitrogen for Ruminants, 141. 2. IAEA, Vienna, Austria.
- AOAC, 1970. Official Methods of Analysis. (11th Ed.). Association of Official Agricultural Chemists, Washington, D.C.
- AOAC, 1975. Official Methods of Analysis. (12th Ed.). Association of Official Agricultural Chemists, Washington, D.C.
- ARC (Agricultural Research Council), 1980. The Nutrient Requirements of Ruminant Livestock. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal. Slough SL2 3BN England.
- ARMSTRONG, D.G., 1980. Net Efficiencies In Vivo of Microbial N Synthesis in Ruminant Livestock. In: Proc. of the 3rd EAAP - Symposium on Protein Metabolism and Nutrition, 400, Vol. II. Eds: Oslage H.J.; Rohr K.
- ARMSTRONG, D.G.; SAVAGE, G.P.; HARRISON, D.G., 1977. Digestion of Nitrogenous Substances Entering the Small Intestine With Particular Reference to Amino Acids in Ruminant Livestock. In: Protein Metabolism and Nutrition, 55. Ed: S. Tamminga, Centre for Agric. Publ. and Documentation, Wageningen, Holland.
- ARMSTRONG, G.S., 1976. Immobilization of Tannins: Characterization and Application. M.S. Thesis. Purdue University, West Lafayette, Indiana, USA.
- ARMSTRONG, W.D.; FEATHERSTON, W.R.; ROGLER, J.C., 1973. Influence of Methionine and Other Dietary Additions on the Performance of Chicks Fed Bird Resistant Sorghum Grain Diets. Poultry Science, 52, 1592.
- ARMSTRONG, W.D.; ROGLER, J.C.; FEATHERSTON, W.R., 1974a. Effect of Tannin Extraction on the Performance of Chicks Fed Bird Resistant Sorghum Grain Diets. Poultry Science, 53, 714.
- ARMSTRONG, W.D.; FEATHERSTON, W.R.; ROGLER, J.C., 1974b. Effects of Bird Resistant Sorghum Grain and Various Commercial Tannins on Chick Performance. Poultry Science, 53, 2137.
- ARMSTRONG, W.D.; ROGLER, J.C.; FEATHERSTON, W.R., 1974c. In Vitro Studies of the Protein Digestibility of Sorghum Grain. Poultry Science, 53, 2224.
- ARORA, S.K.; LUTHRA, V.P., 1974. The In Vitro Digestibility of Promising Indian Varieties of Sorghum and its Relation with Tannin Content. Indian Journal of Nutrition and Dietetics, 11, 233.
- ARORA, S.K.; LUTHRA, V.P.; DAS, B., 1975. Locational Variation in Chemical Composition and In Vitro Digestibility of Forage Sorghum. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 23, 543.
- AXTELL, J.D.; KIRLEIS, A.W.; HASSEN, M.M.; MASON, N.D'C.; MERTZ, E.T.; MUNCK, L., 1981. Digestibility of Sorghum Proteins. Proc. of the Nat. Acad. of Sci. (USA), 78, 1333.

- BARRY, T.N.; DUNCAN, S.J., 1984. The Role of Condensed Tannins in the Nutritional Value of *Lotus pedunculatus* for Sheep. 1. Voluntary Intake. British Journal of Nutrition, 51, 485.
- BARRY, T.N.; FORSS, D.A., 1983. The Condensed Tannin Content of Vegetative *Lotus pedunculatus*, its Regulation by Fertiliser Application, and Effect Upon Protein Solubility. Journal of the Science of Food and Agriculture, 34, 1047.
- BARRY, T.N.; MANLEY, T.R., 1984. The Role of Condensed Tannins in the Nutritional Value of *Lotus pedunculatus* for Sheep. 2. Quantitative Digestion of Carbohydrates and Proteins. British Journal of Nutrition, 51, 493.
- BASARABA, J., 1966. Effects of Vegetable Tannins on Glucose Oxidation by Various Microorganisms. Canadian Journal of Microbiology, 12, 787.
- BASARABA, J.; STARKEY, R.I., 1966. Effects of Plant Tannins on the Decomposition of Organic Substances. Soil Science, 101, 17.
- BATE-SMITH, E.C., 1973. Haemalysis of Tannins: The Concept of Relative Astringency. Phytochemistry, 12, 907.
- BATE-SMITH, E.C., 1975. Phytochemistry of Proanthocyanidins. Phytochemistry, 14, 1107.
- BATE-SMITH, E.C., 1977. Astringent Tannins of ACER SPECIES. Phytochemistry, 16, 1426.
- BATE-SMITH, E.C., 1981. Phytochemistry, 20, 211.
- BATE-SMITH, E.C.; LERNER, N.H., 1954. Leucoanthocyanins. (2) Systematic Distribution of Leuco-Anthocyanins in Leaves. Biochemical Journal, 58, 126.
- BATZER, H.; WEISSENBERGER, G., 1951. Leather and Tanning Agents. III. Tanning Experiment with Poyamides. Theory of Tanning. Makromol. Chem., 7, 320.
- BAUCHOP, T., 1979 a. The Rumen Anaerobic Fungi: Colonizers of Plant Fibre. Annales de Recherches Vétérinaires, 10, 246.
- BAUCHOP, T., 1979 b. Rumen Anaerobic Fungi of Cattle and Sheep. Applied and Environmental Microbiology, 38, 148.
- BAUCHOP, T.; ELSDEN, S.R., 1960. The Growth of Microorganisms in Relation to their Energy Supply. Journal of General Microbiology, 23, 457.
- BEGOVIĆ, S.; DUZIĆ, E., 1977. Isolating Tannase from the Mucosa of Rumen of Cattle and Comparison of Activity. Nutrition Abstracts and Reviews Series B, 1979 (3273).
- BEGOVIĆ, S.; DUZIĆ, E.; ALMASA, S.; TAFRO, A., 1979. Variations in Tannase Activity in the Rumen Contents and Rumen Mucosa of Goats Given Oak Leaves and During Intraruminal Application of 3 to 10 % Tannic Acid. Nutrition Abstracts and Reviews, Series B, 1981 (3953).
- BELL, T.A.; ETCHELLS, J.L.; SMART, W.W.G., 1965. Pectinase and Cellulase Enzyme Inhibitor from *Sericea* and Certain Other Plants. Botanical Gazette (Chicago), 126, 40.
- BEN-GHEDALIA, D.; TAGARI, H., 1977. Digestive and Ruminant Metabolism of Sheep Fed Sorghum (*S. vulgare*) and Maize (*Z. mais*) Silages. Nutrition Reports International, 16, 657.
- BEN-GHEDALIA, D.; TAGARI, H.; BONDI, L., 1974. Protein Digestion in the Intestine of Sheep. British Journal of Nutrition, 31, 125.

- BEN-GHEDALIA, D.; McMENIMAN, N.P.; ARMSTRONG, D.G., 1978. The Effects of Partially Replacing Urea Nitrogen with Protein N on N Capture in the Rumen of Sheep Fed a Purified Diet. British Journal of Nutrition, 39, 37.
- BENOIT, R.E.; STARKEY, R.L., 1968a. Inhibition of Decomposition of Cellulose and Some Other Carbohydrates by Tannin. Soil Science, 105, 291.
- BENOIT, R.E.; STARKEY, R.L., 1968b. Enzyme Inactivation as a Factor in the Inhibition of Decomposition of Organic Matter by Tannins. Soil Science, 105, 203.
- BERGEN, W.G.; BATES, D.B.; JOHNSON, D.E.; WALLER, J.C.; BLACK, J.R., 1982. Ruminant Microbial Protein Synthesis and Efficiency. In: Protein Requirements for Cattle. Proc. Intern. Symp., Oklahoma State Univ., USA, 99. Ed: F.N. Owens, Stillwater.
- BHANDARI, D.S.; GOVIL, H.N., 1978. Evaluation of Podder Tree Leaves for Sheep and Goat in Semi-Arid Area of Rajasthan. Journal of Nuclear Agriculture and Biology, 7, 110.
- BHATIA, S.K.; PRADHAN, K.; SINGH, R., 1980. Ammonia Anabolizing Enzymes in Cattle and Buffalo Fed Varied Nonprotein Nitrogen and Carbohydrates. Journal of Dairy Science, 63, 1104.
- BINNERTS, W.T.; VAN'T KLOOSTER, A.Th.; FRENS, A.M., 1968. Soluble Chromium Indicator Measured by Atomic Absorption in Digestion Experiments. The Veterinary Record, 82, 470.
- BLACKBURN, T.H.; HOBSON, P.N., 1960. Proteolysis in the Sheep Rumen by Whole and Fractionated Rumen Contents. Journal of General Microbiology, 22, 272.
- BLANCO, M.M.; MACARRO, J.B.A., 1965. Utilización de Harina de Bellota (*Quercus ilex*) en la Ración de Pollos para Carne. Revista de Nutrición Animal, III, 258.
- BLAXTER, R.L.; GRAHAM, N.McC; WAINMAN, F.W., 1956. Some Observations on the Digestibility of Food by Sheep, and on Related Problems. British Journal of Nutrition, 10, 69.
- BOND, D.A., 1976. In Vitro Digestibility of the Testa in Tannin-Free Field Beans (*Vicia faba* L.). Journal of Agricultural Science (Camb.), 86, 561.
- BOOTH, A.N.; ROBBINS, J.J.; DE EDS, F., 1961. Effect of Dietary Gallic Acid and Pyrogallol on Choline Requirements of Rats. Journal of Nutrition, 75, 104.
- BOOTH, A.N.; MORSE, M.S.; ROBBINS, D.J.; EMERSON, O.H.; JONES, F.T.; DE EDS, F., 1959. The Metabolic Fate of Gallic Acid and Related Compounds. Journal of Biological Chemistry, 234, 3014.
- BOZA, J.; FONOLLÀ, J.; VARELA, G., 1966. Digestibilidad y Valor Nutritivo de la Harina de Bellota Desecada y Entera en Ovidos. Avances en Alimentación y Mejora Animal, 7, 512.
- BRESSANI, R.; ELIAS, L.G., 1980. In: Proceedings of the Symposium on Polyphenols in Cereals and Legumes. St. Louis, 61. Ed: Int. Res. Cent., Ottawa, Ontario, IDRC-145 e.
- BROADHURST, R.B.; JONES, W.T., 1978. Analysis of Condensed Tannins Using Acidified Vanillin. Journal of the Science of Food and Agriculture, 29, 788.
- BRODERICK, G.A.; BALTHROP, J.E. (Jr.), 1979. Chemical Inhibition of Amino Acid Deamination by Ruminant Microbes In Vitro. Journal of Animal Science, 49, 1101.

- BROSTER, W.H.; SMITH, T.; BROSTER, V.J.; SIVITER, J.W., 1978. Experiments on the Nutrition of the Dairy Heifer. X. Effect on Nitrogen Utilization for Growth of Chemical and Physical Treatment of the Principal Sources of Protein in the Diet. Journal of Agricultural Science (Camb.), 90, 299.
- BUCKLEY, K.E.; DEVLIN, T.J.; MARQUARDT, R.R., 1983. Factors Affecting In Vitro Rumen Digestion of Faba Bean Cultivars (*Vicia faba* L.). Canadian Journal of Animal Science, 63, 89.
- BUDINI, R.; TONELLI, D.; GIROTTI, S., 1980. Analysis of Total Phenols Using the Prussian Blue Method. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 28, 1236.
- BULLARD, R.W.; ELIAS, D.J., 1980. In: Proceedings of the Symposium on Polyphenols in Cereals and Legumes, St. Louis, 43. Ed: Int. Res. Cent., Ottawa, Ontario, IDRC-145 e.
- BULLARD, R.W.; JOHN, O.V.; STEPHEN, R.K., 1981. Polyphenolic Changes in Ripening Bird-Resistant Sorghums. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 29, 973.
- BURNS, R.E., 1963. Methods of Tannin Analysis for Forage Crop Evaluation. Univ. of Georgia, Agr. Exp. Sta. Tech. Bull. N.S. 32, 14.
- BURNS, R.E., 1966. Tannin in *Sesicercia lespedeza*. Univ. of Georgia, Agr. Exp. Sta. Bull, N.S. 164, June 1966.
- BURNS, R.E., 1971. Method for Estimation of Tannin in Grain Sorghum. Agronomy Journal, 63, 511.
- BURNS, J.C.; COPE, W.A., 1974. Nutritive Value of Crownvetch forage as Influenced by Structural Constituents and Phenolic and Tannin Compounds. Agronomy Journal, 66, 195.
- BURNS, J.C.; COPE, W.A., 1976. Estimating the Nutritive Value of Forages Containing Tannin and Phenols by Chemical and Bioassay Methods. Agronomy Journal, 68, 72.
- BURNS, R.E.; HENSON, P.R.; CUMMINS, D.G., 1967. Tannin Content of Crownvetch (*Coronilla varia* L.) Herbage. Agronomy Journal, 59, 284.
- BUTLER, L.G.J., 1982. Relative Degree of Polymerization of Sorghum Tannin During Seed Development and Maturation. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 30, 1090.
- BUTTERY, P.J., 1976. In: Principles of Cattle Production, 145. Eds: H. Swan and W.H. Broster, London, Butterworths.
- BUTTERY, P.J., 1977. Aspects of the Biochemistry of Rumen Fermentation and their Implication in Ruminant Productivity. In: Recent Advances in Animal Nutrition-1977, 8 (Eds: W. Haresign; D. Lewis) London, Butterworths.
- BUTTERY, P.J.; LEWIS, D., 1976. Nitrogen Metabolism in the Ruminant. In: Nuclear Techniques in Animal Production and Health, 271. IAEA, Vienna, Austria.
- BUTTERY, P.J.; LEWIS, D., 1982. Nitrogen Metabolism in the Rumen. In: Forage Protein in Ruminant Animal Production. Eds: D.J. Thompson; D.E. Beever; R.G. Gunn, BSAP Occasional Publ. no 6, 1.
- CAFANTARIS; B., 1981. Einfluß Von 3 Antibiotika Auf Die Mikrobielle Gärung im Pansensaft In Vitro. Dissertation, Hoheheim.

- CALDERON, P.; Van BUREN, J.P.; ROBISON, W.B., 1968. Factors Influencing the Formation of Precipitates and Hazes by Gelatin and Condensed and Hydrolyzable Tannins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 16, 479.
- CALIXTO, F.S.; CANELLAS, J., 1982. Components of Nutritional Interest in Carob Pods (*Ceratonia siliqua*). Journal of the Science of Food and Agriculture, 33, 1319.
- CAMPABADAL, C.M.; WALLACE, H.D.; COMBS, G.E.; HAMMELL, D.L., 1976. Influence of Different Additives on Performance of Young Pigs Fed Bird Resistant Sorghum Grain Diets. Research Report n<sup>o</sup>.AL-1976-10, Florida Experimental Station. USA.
- CANNON, C.B., 1955. The Interactions and Structure of the -CO.NH - Group in Amides and Polyamides. Mikrochimica Acta, 555.
- CARVALHO, J.S., 1979. perspectivas de Industrialização da Bolota. Perspectivas de Racionalização do Aproveitamento das Bolotas de *Q. ilex* e *Q. suber*. Conferência.
- CATYD, 1979. Cria, Alimentación Animal, Transformación Industrial y Derivados, S.A. Apartado 1.016 - Sevilla, Espanha.
- CHALUPA, W., 1975. Rumen Bypass and Protection of Proteins and Amino Acids. Journal of Dairy Science, 58, 1198.
- CHALUPA, W.; CLARK, J.; OPLIGER, P.; LAVKER, R., 1970. Ammonia Metabolism in Rumen Bacteria and Mucosa from Sheep Fed Soy Protein or Urea. Journal of Nutrition, 100, 161.
- CHAN, B.G.; WAISS, A.C. (Jr.); LUKEFAKR, M., 1978. Condensed Tannin, an Antibiotic Chemical from *Gossypium hirsutum*. Journal of Insect Physiology, 24, 113.
- CHANG, S.I.; FULLER, H.L., 1964. Effect of Tannin Content of Grain Sorghum on their Feeding Value for Growing Chicks. Poultry Science, 43, 30.
- CHAVAN, J.K.; KADAM, S.S.; GHONSIKAR, C.P.; SALUNKHE, D.K., 1979. Removal of Tannins and Improvement of In Vitro Protein Digestibility of Sorghum Seeds by Soaking in Alkali. Journal of Food Science, 44, 1319.
- CHENG, K.J.; JONES, G.A.; SIMPSON, F.J.; BRYANT, M.P., 1969. Isolation and Identification of Rumen Bacteria Capable of Anaerobic Rutin Degradation. Canadian Journal of Microbiology, 15, 1365.
- CHENG, K.J.; KRISHNAMOORTHY, H.G.; JONES, G.A.; SIMPSON, F.J., 1971. Identification of Products Produced by the Anaerobic Degradation of Naringin by *Butyrivibrio* sp. C3. Canadian Journal of Microbiology, 17, 129.
- CHIBBER, B.A.K.; MERTZ, E.T.; AXTELL, J.D., 1978. Effects of Dehulling on Tannin Content, Protein Distribution and Quality of High and Low Tannin Sorghum. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 26, 679.
- CHIBBER, B.A.K.; MERTZ, E.T.; AXTELL, J.D., 1980. In Vitro Digestibility of High-Tannin Sorghum at Different Stages of Dehulling. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 28, 160.
- CHURCH, D.C., 1979. Digestive Physiology and Nutrition of Ruminants. Vol. 1. O & B Books, Corvallis, Oregon.
- CLARK, R.T.J.; REID, C.S.W., 1974. Foamy Bloat of Cattle: A Review. Journal of Dairy Science, 57, 153.
- CLARK, J.L.; HEMBRY, F.G.; THOMPSON, G.B.; PRESTON, R.L., 1973. Ration Effect on Polyethylene Glycol as a Marker. Journal of Dairy Science, 55, 1160.

- CLARKE, E.M.W.; ELLINGER, G.M.; PHILLIPSON, A.T., 1966. The Influence of Diet on the Nitrogenous Components Passing to the Duodenum and Through the Lower Ileum of Sheep. Proceedings of the Royal Society of London, Series B, 166, 63.
- C.O.C.S.A., 1967. Avenida de Baviera, 6, Madrid 2, Espanha.
- COMBS, G.E.; WALLACE, H.D., 1976. Grain Sorghum in Starter and Grower Diets. Research Report n°AL - 1976-3, Florida Agricultural Experimental Station, USA.
- CONNOR, J.K.; HURWOOD, I.S.; BURTON, H.W.; FUELLING, D.E., 1969. Some Nutritional Aspects of Feeding Sorghum Grain of High Tannin Content to Growing Chickens. Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry, 9, 497.
- COPE, W.A.; BURNS, J.C., 1971. Relationship Between Tannin Levels and Nutritive Value of Sericea. Crop Science, 11, 231.
- COPE, W.A.; BELL, T.A.; SMART, W.W.G. (Jr.), 1971. Seasonal Changes in an Enzyme Inhibitor and Tannin Content in Sericea lespedeza. Crop Science, 11, 893.
- CORBETT, J.L.; PICKERING, F.S., 1981. Predicting Crude Protein Supply to the Intestines of Grazing Sheep. In: Recent Advances in Animal Nutrition in Australia, 12 A. Ed: D.J. Farrell.
- CORBETT, J.L.; FURNIVAL, E.P.; INSKIP, M.W.; PICKERING, F.S., 1982. Protein Digestion in Grazing Sheep. In: Forage Protein in Ruminant Animal Production. Occasional Publication n° 6- British Society of Animal Production, 1982. Eds: D.J. Thomson, D.E. Beever, R.G. Gunn.
- CRAWFORD, R.J. (Jr.); HOOVER, W.H.; SNIFFEN, C.J.; CROOKER, B.A., 1978. Degradation of Feedstuff Nitrogen in the Rumen vs Nitrogen in Three Solvents. Journal of Animal Science, 46, 1768.
- CUESTA, M.P.; MARTINEZ, M.C.; SERRANO, J.T., 1969. La Harina de Bellota Desgrasada en Alimentación Animal. III. Investigación del Valor Nutritivo de Harina de Bellota Desgrasada, con Adición de Grasa, en la Especie Porcina. Archivos de Zootecnia, 18, 37.
- CUESTA, M.P.; SERRANO, J.T.; MARTINEZ, M.C., 1970. Valor Nutritivo de la Harina de Bellota Desgrasada en Galinas Ponedoras. Congreso Mundial de Avicultura, 1970, 917.
- CUESTA, M.P.; RUIZ, D.A.; MARTINEZ, M.C.; SERRANO, J.T., 1966. La Harina de Bellota Desengrasada en la Alimentación Animal. I. Investigación del Valor Nutritivo de la Harina de Bellota Desengrasada en Pollos de Carne. Congreso Mundial de Alimentación Animal, 1966, 489.
- CZERKWSKI, J.W., 1978. Reassessment of Efficiency of Synthesis of Microbial Matter in the Rumen. Journal of Dairy Science, 61, 1261.
- CZERKWSKI, J.W.; BRECKENRIDGE, G., 1969a. The Fermentation of Sugar-Beet Pulp and Sucrose in an Artificial Rumen, and the Effect of Linseed Oil Fatty Acids on the Fermentation. British Journal of Nutrition, 23, 51.
- CZERKAWSKI, J.W.; BRECKENRIDGE, G., 1969b. Distribution of PEG in Suspensions of Food Particles, Especially Sugar Beet Pulp and Dried Grass Pellets. British Journal of Nutrition, 23, 559.
- DAIBER, K.H., 1975. Enzyme Inhibition by Polyphenols of Sorghum Grain and Malt. Journal of the Science of Food and Agriculture, 26, 1399.

- DAMRON, B. L.; PRINE, G. M.; HARMS, R. H., 1968. Evaluation of Various Bird-Resistant and Non-Resistant Varieties of Grain Sorghum for Use in Broiler Diets. Poultry Science, 47, 1648.
- DAVIS, A. B.; HOSENEY, R. C., 1979. Grain Sorghum Condensed Tannins. I. Isolation Estimation and Selective Adsorption by Starch. Cereal Chemistry, 5, 310.
- De JUANA, A., 1953. El Cerdo de Tipo Iberico en la Provincia de Badajoz. Archivos de Zootecnia, 2, 18.
- DELORT-LAVAL, J.; VIROBEN, G., 1969. Taux et Disponibilité de la Lysine et de la Tyrosine dans les Protéines Protégées par Certaines Substances Tannantes (Formaldéhyde, Extrait Tannant de Chataignier) Contre la Désamination en Milieu de Rumen. Comptes Rendus des Séances de l'Académie d'Agriculture de France, 269, 1558.
- DELORT-LAVAL, J.; LEROY, F.; ZELTER, S. R., 1972. Protection des Protéines Alimentaires Contre la Désamination Bactérienne au Niveau du Rumen. Annales de Biologie Animale, Biochimie et Biophysique, 12, 179.
- DIAGAYETE, M., 1981. Landwirtschaftliche Forschung, 37, 416.
- DONNELLY, E. D., 1954. Some Factors that Affect Palatability in *Sericea lespedeza*, *L. cuneata*. Agronomy Journal, 46, 96.
- DONNELLY, E. D.; ANTHONY, W. B., 1969. Relationship of Tannin, Dry Matter Digestibility and Crude Protein in *Sericea lespedeza*. Crop Science, 9, 361.
- DONNELLY, E. D.; ANTHONY, W. B., 1970. Effect of Genotype and Tannin on Dry Matter Digestibility in *Sericea lespedeza*. Crop Science, 10, 200.
- DONNELLY, E. D.; ANTHONY, W. B., 1973. Relationship of *Sericea lespedeza* Leaf and Stem Tannin to Forage Quality. Agronomy Journal, 65, 993.
- DONNELLY, E. D.; ANTHONY, W. B.; LANGFORD, J. W., 1971. Nutritive Relationships in Low- and High-Tannin *Sericea lespedeza* Under Grazing. Agronomy Journal, 63, 749.
- DREYER, J. J.; NIEKERK, P. J. Van, 1974. Growth-Suppressing and Related Effects on Rats of Unextracted and Ethanol-Extracted Grains of Certain Sorghum Cultivars. South African Journal of Nutrition, 10, 89.
- DRIEDGER, A.; HATFIELD, E. E., 1972. Influence of Tannins on the Nutritive Value of Soybean Meal for Ruminants. Journal of Animal Science, 34, 465.
- DUFVA, G. S.; BARTLEY, E. E.; ARAMBEL, M. J.; GALITZER, S. J.; DAYTON, A. D., 1982. Content of 2-Aminoethylphosphonic Acid in Feeds, Bacteria and Protozoa and its Role as a Rumen Marker. Journal of Animal Science, 54, 837.
- DURKES, A. B., 1971. The Nature of Tannin in Rape Seed Meal (*Brassica campestris*). Phytochemistry, 10, 1583.
- EARP, C. F.; AKINGBALA, J. O.; RING, S. H.; ROONEY, L. W., 1981. Evaluation of Several Methods to Determine Tannins in Sorghums with Varying Kernel Characteristics. Cereal Chemistry, 58, 234.
- EGGUM, B. O.; CHRISTENSEN, K. D., 1975. In: Breeding for Seed Protein Improvement Using Nuclear Techniques, 135. IAEA, Vienna, Austria.
- EL-DIN, M. Z.; EL-SHAZLY, K., 1969. Evaluation of Method of Measuring Fermentation Rates and Net Growth of Rumen Microorganisms. Applied Microbiology, 17, 801.
- EL-SHAZLY, K.; HUNGATE, R. E., 1965. Fermentation Capacity as a Measure of Net Growth of Rumen Microorganisms. Applied Microbiology, 13, 62.



- EL-SHAZLY, K.; NAGA, M.M.A.; ABAZA, M.A.; ABOU AKKADA, A.R., 1969. The Use of the *In Vitro* Fermentation technique to Estimate the Digestible Energy Content of Some Egyptian Forages. III. The Effect of Periodical Renewal of Medium on Volatile Fatty Acid Production and Cellulose Digestion *In Vitro* as Criteria of Energy Content. Journal of Agricultural Science (Camb.), 73, 431.
- ELY, D.G.; LITTLE, C.O.; WOOLFOLK, P.G.; MITCHELL, G.E. (Jr.), 1967. Estimation of Extent of Conversion of Dietary Zein to Microbial Protein in the Rumen of Lambs. Journal of Nutrition, 91, 314.
- ELKIN, R.G.; FEATHERSTON, W.R.; ROGLER, J.C., 1978. Investigations of Leg Abnormalities in Chicks Consuming High Tannin Sorghum Grain Diets. Poultry Science, 57, 757.
- ELLIS, W.C., 1978. Determinants of Grazed Forage Intake and Digestibility. Journal of Dairy Science, 61, 1828.
- ELLIS, W.C.; LASCANO, C.; TEETER, R.; OWENS, F.N., 1982. Soluble and Particulate Flow Markers. In: Protein Requirements for Cattle. Symposium, 37. Ed: F.N. Owens. Oklahoma State University, Stillwater.
- ERFLE, J.D.; SAUER, F.D.; MAHADEVAN, S., 1977. Effect of Ammonia Concentration on Activity of Enzymes of Ammonia Assimilation and on Synthesis of Amino Acids by Mixed Rumen Bacteria in Continuous Culture. Journal of Dairy Science, 60, 1064.
- ESKIN, N.A.M.; HOEHN, E.; FRENKE, C., 1978. A Simple and Rapid Quantitative Method for Total Phenols. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 26, 973.
- EVANS, W.C., 1977. Biochemistry of the Bacterial Catabolism of Aromatic Compounds in Anaerobic Environments. Nature, 270, 17.
- EZN, 1956. Composição Química e Valor Nutritivo de Algumas Forragens Nacionais. Estação Zootécnica Nacional, Fonte Boa, Portugal.
- FAHEY, G.C. (Jr.); JUNG, H.G., 1983. Lignin as a Marker in Digestion Studies: A Review. Journal of Animal Science, 57, 220.
- FAICHNEY, G.J., 1975. The Use of Markers to Partition Digestion within the Gastrointestinal Tract of Ruminants. In: Digestion and Metabolism in the Ruminant, 277. Eds: I.C. McDonald and A.C.I. Warner. The University of New England Publishing Unit, Armidale, Australia.
- FAICHNEY, G.J., 1980a. The Use of Markers to Measure Digesta Flow from the Stomach of Sheep Fed Once Daily. Journal of Agricultural Science, 94, 313.
- FAICHNEY, G.J., 1980b. Measurement in Sheep of The Quantity and Composition of Rumen Digesta and of the Fractional Outflow Rates of Digesta Constituents. Australian Journal of Agricultural Research, 31, 1129.
- FEATHERSTON, W.R.; ROGLER, J.C., 1975. Influence of Tannins on the Utilization of Sorghum Grain by Rats and Chicks. Nutrition Reports International, 11, 491.
- FEENEY, P.P., 1968. Seasonal Changes in the Tannin Content of Oak Leaves. Phytochemistry, 7, 871.
- FEENEY, P.P., 1969. Inhibitory Effect of Oak Leaf Tannins on the Hydrolysis of Proteins by Trypsin. Phytochemistry, 8, 2119.
- FEENEY, P.P., 1976. In: Recent Advances in Phytochemistry, 10, 1.

- FERGUSON, K.A.; JEMSLEY, J.A.; REIS, P.J., 1967. Nutrition and Wool Growth ; The Effects of Protecting Dietary Protein from Microbial Degradation in the Rumen. Australian Journal of Biological Sciences, 30, 215.
- FERREIRA, M.S.V., 1984. Estudo In Vivo da Digestibilidade da Bolota. Relatório de Estágio. Universidade de Évora.
- FERREIRA, M.F.; CASTRO, L.V., 1966. A farinha de Bolota na Alimentação das Aves em Crescimento. Boletim da Direcção Geral dos Serviços Pecuários, 1966.
- FOO, L.Y.; JONES, W.T.; PORTER, L.J.; WILLIAMS, V.M., 1982. Proanthocyanidin Polymers of Fodder Legumes. Phytochemistry, 21, 933.
- FORD, J.E.; HEWITT, D., 1979. Protein Quality in Cereals and Pulses. 3. Bioassays with Rats and Chickens on Sorghum (*Sorghum vulgare Pers.*), Barley and Field Beans (*Vicia faba L.*). Influence of Polyethylene Glycol on Digestibility on the Protein in High-Tannin Grain. British Journal of Nutrition, 42, 325.
- FORSBERG, C.W., 1978. Some Effects of Arsenic on the Rumen Microflora; an In Vitro Study. Canadian Journal of Microbiology, 24, 36.
- FULLER, H.L.; CHANG, S.I.; POTTER, D.K., 1967. Detoxification of Dietary Tannic Acid by Chicks. Journal of Nutrition, 91, 177.
- FULLER, H.L.; POTTER, D.K.; BROWN, A.R., 1966. The Feeding Value of Grain Sorghums in Relation to their Tannin Content. Georgia Agriculture Experimental Station Bulletin, NS, 176, 14.
- GANDHI, V.M.; CHERIAN, K.M.; MULKY, M.J.; MELON, K.K.G., 1975. Utilization of Non-Traditional Indigenous Oil Seed Meal. 2. Studies With Detoxified Sal Seed Meal. Journal of Oil Technologists Association of India, 7, 44.
- GANEV, G.; ØRSKOV, E.R.; SMART, R., 1979. The Effect of Roughage or Concentrate Feeding and Rumen Retention Time on Total Degradation of Protein in the Rumen. Journal of Agricultural Science, Camb., 93, 651.
- GARNER, R.J.W.; HURWOOD, I.S., 1976. Australian Veterinary Journal, 52, 194.
- GARRET, J.E.; GOODRICH, R.D.; MEISKE, J.C., 1982. Measurement of Bacterial Nitrogen Using D-Alanine. In: Protein Requirements for Cattle. Symposium. Ed: F.N. Owens, Oklahoma State Univ., Stillwater, Oklahoma, USA.
- GENEST, C., 1982. Mise au Point d'une Méthode d'Estimation in vitro de la Degradabilité des Protéines dans le Rumen, et sa Relation Avec la Détermination in vivo du Flux d'Azote Alimentaire à l'Entrée de l'Intestin Grêle. Thèse Docteur-Ingénieur, Université de Clermont 2 France.
- GILL, S.S.; CONRAD, H.R.; HIBBS, J.W., 1969. Relative Rate of in vitro Cellulose Disappearance as Possible Estimator of Digestible Dry Matter Intake. Journal of Dairy Science, 52, 1687.
- GLICK, Z., 1981. Modes of Action of Gallic Acid in Suppressing Food Intake of Rats. Journal of Nutrition, 111, 1910.
- GLICK, Z.; JOSLYN, M.A., 1970a. Food Intake Depression and Other Metabolic Effects of Tannic Acid in the Rat. Journal of Nutrition, 100, 509.
- GLICK, Z.; JOSLYN, M.A., 1970b. Effect of Tannic Acid and Related Compounds on the Absorption and Utilization of Proteins in the Rat. Journal of Nutrition, 100, 516.

- GLORIES, Y., 1974. Recherches sur la Structure et les Propriétés des Composés Phenoliques Polymerisés des Vins Rouges. II-Précipitation et Ex - traction en Presence de sels Minéraux. Action des Protéines. Con - naissance de la Vigne et du Vin, 8, 375.
- GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J., 1970. Forage Fiber Analysis. USDA Agriculture Handbook n°379.
- GOERING, H. K.; WALDO, D. R., 1974. Processing Effects on Protein Utilization by Ruminants. Proceedings of the Cornell Nutrition Conference for Fe - ed Manufacturers, 1974, 25.
- GOLDSTEIN, J. L.; SWAIN, T., 1963. Changes in the Tannins in Ripening Fruit. Phy - tochemistry, 2, 371.
- GOLDSTEIN, J. L.; SWAIN, T., 1965. The Inhibition of Enzymes by Tannins. Phytoche - mistry, 4, 185.
- GOTO, T.; MOSHINO, T.; OHLA, M., 1976. Stabilization Effect of Neutral Salts on Anthocyanins: Flavylum Salts, Anhydrobases and Genuine Anthocya - nins. Agricultural and Biological Chemistry, 40, 1593.
- GRANT, W. D., 1976. Microbial Degradation of Condensed Tannin. Science, 193, 1137.
- GREEN, V. E. (Jr.), 1974. Yield and Digestibility of Bird Resistant and Non-Re - sistant Grain Sorghum. Soil Crop Science, Soc. Fla. Proc., 33, 13.
- GREIFE, H. A.; ROOKE, J. A.; ARMSTRONG, D. G., 1985. The Digestion by Cattle of Si - lage-Containing Diets Fed at Two Dry Matter Intakes. 2. The Diges - tion of Total Amino Acids and of D-Alanine and D-Glutamic Acid . British Journal of Nutrition, 54, 483.
- GRIFFITHS, D. W., 1979. The Inhibition of Digestive Enzymes by Extracts of Fi - eld Bean (*Vicia faba*). Journal of the Science of Food and Agri - culture, 30, 458.
- GRIFFITHS, D. W., 1981. The Polyphenolic Content and Enzyme Inhibitory Activi - ty of Testas from Bean (*Vicia faba*) and Pea (*Pisum spp.*) Varieties. Journal of the Science of Food and Agriculture, 32, 797.
- GRIFFITHS, D. W.; JONES, D. I. H., 1977. Cellulase Inhibition by Tannins in the Testa of Field Beans (*Vicia faba*). Journal of the Science of Food and Agriculture, 28, 983.
- GRIFFITHS, D. W.; MOSELEY, G., 1980. The Effect of Diets Containing Field Beans of High or Low Polyphenolic Content on the Activity of Digestive Enzymes in the Intestines of Rats. Journal of the Science of Food and Agriculture, 31, 255.
- GROVUM, W. L.; PHILLIPS, G. D., 1973. Rate of Passage of Digesta in Sheep. 5\* .The - oretical Considerations Based on a Physical Model and Computer Simulation. British Journal of Nutrition, 30, 377.
- GROVUM, W. L.; WILLIAMS, V. J., 1973. Rate of Passage of Digesta in Sheep. 4\* .Pas - sage of Marker Through the Alimentary Tract and the Biological Relevance of Rate-Constants Derived from the Changes in Concen - tration of Marker in Faeces. British Journal of Nutrition, 30, 313.
- GUENEAU, S.; BERTRAND, D., 1984. Evaluation de la Digestibilité de la Matière Sèche d'Aliments Cellulosiques du Ruminant par la Méthode des Sacs Nylon. Cahier des Techniques de l'INRA. Bulletin de Liaison Interne n°4, 33. INRA, Rue de Grenelle, 149 75 341, Paris 7ème.
- GUILLAUME, J.; BELLEC, R., 1977. Use of Field Beans (*Vicia faba* L.) in Diets for Laying Hens. British Poultry Science, 18, 573.

- GUPTA, R. E.; HASLAM, E., 1978. Plant Proanthocyanidins. Part 5. Sorghum Polyphenols. Journal of the Chemistry Society, Prekin Trans., 1, 892.
- GUPTA, R. K.; HASLAM, E., 1980. Proceedings of the Symposium on Polyphenols in Cereals and Legumes, 15. 36th Annual Institute of Food Technologists Meeting, Saint Louis, 1979. Int. Res. Cent.: Ottawa, Ontario, 1980 IDRC 145 e.
- GUPTA, D. W.; GUPTA, B. N.; SAHRA, R. C.; BHANDARI, A. B.; MATHUR, H. L., 1977. Indian Veterinary Journal, 54, 463.
- GUSTAVSON, K. H., 1954. Interaction of Vegetable Tannins with Polyamides as Proof of the Dominant Function of the Peptide Bond of Collagen for its Binding of Tannins. Journal of Polymer Science, 12, 317.
- GUSTAVSON, K. H., 1956. The Chemistry of Tanning Processes, 403. Academic Press, New York.
- HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G., 1978. Protein Precipitation Method for the Quantitative Determination of Tannins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 26, 809.
- HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G., 1980a. Determination of Protein in Tannin-Protein Precipitates. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 28, 944.
- HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G., 1980b. Condensed Tannin Purification and Characterization of Tannin-Associated Proteins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 28, 947.
- HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G., 1981. The Specificity of Proanthocyanidin-Protein Interactions. Journal of Biological Chemistry, 256, 4494.
- HALL, C. B., 1966. Inhibition of Tomato Pectinesterase by Tannic Acid. Nature, 212, 717.
- HALLORAN, H. R.; MAUNDER, A. B., 1971. Nutritional Evaluation with Bird-Resistant and Yellow Endosperm Sorghums. Poultry Science, 50, 1582.
- HAMMEL, D. L.; JOHNSON, J. T., 1976. Performance of Growing-Finishing Swine Fed Florida Grown Bird Resistant Grain Sorghum and Non Bird Resistant Grain Sorghum. LIVE OAK ARC RES. REPT. NOSW:1976-2. Agr. Res. Center, Live Oak, Florida, USA.
- HARBORNE, J. B., 1976. In: Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, Vol 1, 734. Ed: T. W. Goldwin. Academic Press, New York, 1976.
- HARBORNE, J. B., 1979. Flavonoid Pigments. In: Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites, 169. Eds: G. A. Rosenthal and D. H. Janzen. Academic Press, New York.
- HARMEYER, H.; HOLLER, H.; MARTENS, H., 1976. Estimate of Microbial Protein Synthesis *in vitro* by the Simultaneous Use of Three Different Isotopic Markers. In: Tracer Studies on Non-Protein Nitrogen for Ruminants III. IAEA, Vienna, 69.
- HARRIS, H. B., 1969. Annual Corn and Sorghum Research Conference Proceedings, 24th, 111. Chicago, 1969.
- HARRIS, H. B.; BURNS, R. E., 1970. Influence of Tannin Content on Preharvest Seed Germination in Sorghum. Agronomy Journal, 62, 835.
- HARRIS, H. B.; CUMMINS, D. G.; BURNS, R. E., 1970. Tannin Content and Digestibility of Sorghum Grain as Influenced by Bagging. Agronomy Journal, 62, 633.
- HARRISON, D. G.; BEEVER, D. E.; OSBOURN, D. F., 1979. The Contribution of Protozoa to the Protein Entering the Duodenum of Sheep. British Journal of Nutrition, 41, 521.

- HARRISON, D.G.; McALLAN, A.B., 1980. Factors Affecting Microbial Growth Yields in the Reticulo-Rumen. In: Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants. Eds: V. Ruckebusch and P. Thivend, 205. MTP Press Ltd., Lancaster.
- HARTLEY, R.D.; JONES, E.C.; WOOD, T.M., 1973. Comparison of Cell Walls of *Lolium multiflorum* with Cotton Cellulose in Relation to their Digestion with Enzymes Associated with Cellulolysis. Phytochemistry, 12, 763.
- HARTLEY, R.D.; JONES, E.C.; WOOD, T.M., 1976. Carbohydrates and Carbohydrate Esters of Ferulic Acid Released from Cell Walls of *Lolium multiflorum* by Treatment with Cellulolytic Enzymes. Phytochemistry, 15, 305.
- HASLAM, E., 1966. Chemistry of the Vegetable Tannins. Academic Press, New York.
- HASLAM, E., 1974. Polyphenol-Protein Interactions. Biochemical Journal, 139, 285.
- HASLAM, E., 1977. Review: Symmetry and Promiscuity in Procyanidin Biochemistry. Phytochemistry, 16, 1625.
- HASLAM, E., 1979. In: Recent Advances in Phytochemistry, 12, 475.
- HASLAM, E., 1980. Vegetable Tannins. Department of Chemistry, Sheffield University, Sheffield S3 7HF, United Kingdom.
- HASLAM, E., 1981. The Biochemistry of Plants. Academic Press, New York, Vol. 1, 527.
- HASLAM, E.; OPIE, C.T.; PORTER, L.T., 1977. Procyanidin Metabolism: A Hypothesis. Phytochemistry, 16, 99.
- HENIS, V.; TAGARI, H.; VOLCANI, R., 1964. Effect of Water Extracts of Carob Pods, Tannic Acid and their Derivatives on the Morphology and Growth of Microorganisms. Applied Microbiology, 12, 204.
- HICKS, C.R., 1982. Fundamental Concepts in the Design of Experiments. 3rd ed. College Publishing.
- HIBBERD, C.A.; WAGNER, D.G.; SCHEMM, R.L.; MITCHELL, E.D. (Jr.); HINTZ, R.L.; WEIBEL, D.E., 1982. Nutritive Characteristics of Different Varieties of Sorghum and Corn Grains. Journal of Animal Science, 55, 665.
- HILLIER, J.C.; MARTIN, J.J.; WALLER, G.R., 1959. The Relative Value of Six Varieties of Milo for Growing and Finishing Swine. Oklahoma Agricultural Exper. Station Misc. Public. MP-55, 1959.
- HOBSON, P.N., 1969. Discussion, 348. In: Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant. Proc. 3rd Intern. Symp., Camb., UK.
- HOBSON, P.N., 1970. Some Field Experiments on the Rumen Functions of Red Deer, Hill Sheep and Reindeer. Deer, 2, 450.
- HOBSON, P.N.; WALLACE, R.J., 1982. Microbial Ecology and Activities in the Rumen: Part I and Part II. CRC Critical Reviews in Microbiology, April, 165 and May, 253.
- HOFF, J.E.; SINGLETON, K.I., 1977. A Method for Determination of Tannins in Foods by Means of Immobilized Protein. Journal of Food Science, 42, 1566.
- HOGAN, J.P.; WESTON, R.H., 1967. The Digestion of Chopped and Ground Roughages by Sheep. II. The Digestion of Nitrogen and Some Carbohydrate Fractions in the Stomach and Intestines. Australian Journal of Agricultural Research, 18, 803.

- HOGAN, J. P.; WESTON, R. H., 1981. *Laboratory Methods for Protein Evaluation*. In: *Forage Evaluation: Concepts and Techniques*. Eds: J. L. Wheeler and Mochrie, 75. CSIRO and American Forage and Grassland Council, Melb.
- HUME, I. D.; MOIR, R. J.; SOMERS, M., 1970. *Synthesis of Microbial Protein in the Rumen*. *Australian Journal of Agricultural Research*, 21, 283.
- HUMPHRIES, C., 1980. *Trypsin Inhibitors in Leaf Protein Concentrate*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 31, 1225.
- HUNGATE, R. E., 1966. *The Rumen and its Microbes*. Academic Press, New York.
- HUNGATE, R. E., 1975. *The Rumen Microbial Ecosystem*. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 6, 39.
- HUTTON, K.; BAILEY, F. J.; ANNISON, E. F., 1971. *Measurement of Bacterial Nitrogen Entering the Duodenum of the Ruminant Using Diaminopimelic Acid as a Marker*. *British Journal of Nutrition*, 25, 165.
- HVELPLUND, T.; MOLLER, P. D.; MADSEN, J.; HESSELHOLT, M., 1976. *Flow of Digesta Through the Gastro-Intestinal Tract in the Bovine with Special Reference to Nitrogen*. *Rev. Vet. Agr. Univ. Yearbook*, Copenhagen, 173.
- INRA, 1978. *Alimentation des Ruminants*. Ed: INRA Publications, Route de Saint - Cyr, 78000, France.
- JAGADALE, H. N.; DESAI, H. B.; SHUKLA, P. C., 1976. *Study on Effect of Feeding Deoiled Sal Seed Meal at Different Levels to Kankrej Cows on Milk Composition*. *Gujarat Agricultural University Research Journal*, 1, 125.
- JAMBUNATHAN, R.; MERTZ, E. T., 1973. *Relationship Between Tannin Levels, Rat Growth and Diets of Proteins in Sorghum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 21, 692.
- JARRIGE, R. (Ed.), 1978. *Alimentation des Ruminants*. Versailles, France. INRA, 597.
- JAYASURIA, M. C. N.; WIJEYATUNGE, C.; PERERA, H. G. D., 1982. *Rumen and Post-Rumen Fermentation of Spent Tea Leaf Protein and Other Protein Sources Studied by the Nylon Bag Method*. *Animal Feed Science and Technology*, 7, 221.
- JILG, T., 1982. *Untersuchungen Zum Proteinabbau im Künstlichen Pansen Unter Berücksichtigung der Pepsin-HCl-Löslichkeit*. Diplomarbeit, Univer. Hohenheim, Inst. F. Tierernährung, W. Germany.
- JOHNSON, D. E.; BERGEN, W. G., 1982. *Fraction of Organic Matter Digestion Occurring in the Rumen: A Partial Literature Summary*. In: *Protein Requirements for Cattle, Symp.*, 113. Ed: F. N. Owens, Oklahoma State University, Stillwater, Oklahoma 74078, USA.
- JOHN, W.; LANCASHIRE, J. A., 1981. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*, 42, 152.
- JOKL, L.; CARLSON, R., 1982. *First International Conference on Leaf Protein Research*, Aurangabad, India, 1982.
- JONES, E. T.; MANGAN, J. L., 1977. *Complexes of the Condensed Tannins of Sanfoin (Onobrychis viciifolia Scop.) with Fraction I Leaf Protein and with Submaxillary Mucoprotein and Reversal by Polyethylene Glycol and pH*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28, 126.
- JONES, W. T.; LYTTLETON, J. W.; CLARKE, R. T. J., 1970. *Bloat in Cattle. 33. The Soluble Proteins of Legume Forages in New Zealand, and their Relationship to Bloat*. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 13, 149.
- JONES, W. T.; BROADHURST, R. B.; LYTTLETON, J. W., 1976. *The Condensed Tannins of Pasture Legume Species*. *Phytochemistry*, 15, 1407.

- JOSLYN, M. A.; GLICK, Z., 1969. Comparative Effects of Gallotannic Acid and Related Phenolics on the Growth of Rats. Journal of Nutrition, 98, 119.
- JOSLYN, M. A.; NISHIRA, H.; ITO, S., 1968. Leucoanthocyanins and Related Phenolic Compounds of Carob Pods (*Ceratonia siliqua*). Journal of the Science of Food and Agriculture, 19, 543.
- JOURNET, M.; VERITÉ, R., 1977. Levels of Energy and Nitrogen Intake in Relation to Animal Protein Production During Lactation. In: Proceedings of the 2nd Int. Symp. Prot. Metab. and Nutr. Ed: S. Tamminga. Center for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, Netherlands.
- JUNG, H. J. G.; FAHEY, G. O. C. (Jr.), 1981. Effect of Phenolic Compounds Removal on *in vitro* Forage Digestibility. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 29, 817.
- JUNG, H. G.; FAHEY, G. O. C. (Jr.), 1983. Nutritional Implications of Phenolic Monomers and Lignin: A Review. Journal of Animal Science, 57, 206.
- KANG-MEZNARICH, J. H.; BRÖDERICK, G. A., 1981. Effects of Incremental Urea Supplementation on Ruminal Ammonia Concentration and Bacterial Protein Formation. Journal of Animal Science, 51, 422.
- KAPEL, M.; KARUNANITHY, R., 1974. The Determination of Tannins with Cerium (IV) Sulphate. Analyst, 99, 661.
- KAY, R. N. B., 1969. Effects of Tannic Acid on the Solubility of PEG. Proceedings of the Nutrition Society, 28, 22A.
- KEELER, R. F.; VAN KAMPEN, K. R.; JAMES, L. F. (Eds), 1978. Effect of Poisonous Plant on Livestock. Academic Press, New York, 640.
- KENDALL, W. A., 1966. Factors Affecting Foams with Forage Legumes. Crop Science, 6, 487.
- KHAYAMBASHI, H.; LYMAN, R. L., 1966. Growth Depression and Pancreatic and Intestinal Changes in Rats Force-Fed Amino Acid Diets Containing Soybean Trypsin Inhibitor. Journal of Nutrition, 89, 455.
- KING, H. G. C.; WHITE, T., 1956. In: The Chemistry of Vegetable Tannins, Symp. Society of Leather Trades Chemists, Croydon, 31.
- KONDOS, A. C.; FOALE, M. A., 1983. Comparison of the Nutritional Value of Low and Medium Tannin Sorghum Grains for Pigs. Animal Feed Science and Technology, 8, 85.
- KOTB, A. R.; LUCKEY, T. D., 1972. Markers in Nutrition. Nutr. Abstr. Rev., 42, 813.
- KRATZER, F. H.; SINGLETON, V. L.; KADIRVEL, R.; RAYUDU, G. V. N., 1975. Characterization and Growth-Depressing Activity for Chickens of Several Natural Phenolic Materials. Poultry Science, 54, 2124.
- KRISHNAMOOTY, H. G.; CHENG, K. J.; JONES, G. A.; SIMPSON, F. J.; WATKIN, J. E., 1970. Identification of Products Produced by the Anaerobic Degradation of Rutin and Related Flavonoids by *Butyrivibrio* Sp. C3. Canadian Journal of Microbiology, 16, 759.
- KUMAR, R., 1980. Tannin Composition of Sal (*Shorea robusta*) Seeds. Journal of Food Science and Technology, India, 17, 144.
- KUMAR, R.; SINGH, M., 1984. Tannins: Their Adverse Role in Ruminant Nutrition. A Review. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 32, 447.
- KURILOV, N. V.; SEVASTIANOVA, M. A.; KORSHUNOV, V. M.; MYSNIK, N. D.; PODSHIBYAKIN, A. E., 1976. Livestock Production Science, 3, 57.

- LEHNINGER, A. L., 1970. *Biochemistry*. 2nd Edit. Worth Publishers, Inc. 444 Park Avenue South, New York, 10016.
- LENG, R. A.; GILL, M.; KEMPTON, T. J.; ROWE, J. B.; NOLAN, J. V.; STACHIW, S. J.; PRESTON, T. R., 1981. Kinetics of Large Ciliate Protozoa in the Rumen of Cattle Given Sugar Cane Diets. British Journal of Nutrition, 46, 371.
- LEROY, F.; ZELTER, S. Z.; FRANÇOIS, A. C., 1964. Protection des Proteines Alimentaires Contre la Désamination Bactérienne au Niveaux du Rumen. Études en Rumen Artificiel. Comptes Rendues de la Academie des Sciences de France, 259, 1592.
- LEWIS, J. A.; STARKEY, R. L., 1968. Vegetable Tannins, their Decomposition and Effects on Decomposition of Some Organic Compounds. Soil Science, 106, 241.
- LEWIS, J. A.; STARKEY, R. L., 1969. Decomposition of Plant Tannins by Some Soil Microorganisms. Soil Science, 107, 235.
- LINDBERG, J. E., 1981a. The Effect of Sample Size and Sample Structure on the Degradation of Dry Matter, Nitrogen and Cell Walls in Nylon Bags. Swedish Journal of Agricultural Research, 11, 71.
- LINDBERG, J. E., 1981b. The Effect of Basal Diet on the Ruminal Degradation of Dry Matter, Nitrogenous Compounds and Cell Walls in Nylon Bags. Swedish Journal of Agricultural Research, 11, 159.
- LING, J. R.; BUTTERY, P. J., 1978. The Simultaneous Use of Ribonucleic Acid, <sup>35</sup>S, 2,6-Diaminopimelic Acid and 2-Aminoethyl-Phosphonic Acid as Markers of Microbial Nitrogen Entering the Duodenum of Sheep. British Journal of Nutrition, 39, 165.
- LINDSAY, D. B.; ARMSTRONG, D. G., 1982. Post-Ruminal Digestion and the Utilization of Nitrogen. In: Forage Protein in Ruminant Animal Production, 13. Occasional Publication No 6, British Society of Animal Production. Eds: D. J. Thomson; D. E. Beever and R. G. Gunn.
- LINDGREN, E., 1975. The Nutritive Value of Peas and Field Beans for Hens. Swedish Journal of Agricultural Research, 5, 159.
- LOERCH, S. C.; BERGER, L. L.; GIANOLA, D.; FAHEY G. C. (Jr), 1983. Effects of Dietary Protein Source and Energy Level on In Situ Nitrogen Disappearance of Various Protein Sources. Journal of Animal Science, 56, 206.
- LOHAN, O. P.; LALL, D.; PAL, R. N.; NEGI, S. S., 1979. Dairy Industry Conference, Hyderabad, India, Feb., 1979.
- LOHAN, O. P.; LALL, D.; PAL, R. N.; NEGI, S. S., 1980. Note on Tannins in Tree Poddars. Indian Journal of Animal Sciences, 50, 881.
- LOHAN, O. P.; LALL, D.; MAKKAR, P. S.; NEGI, S. S., 1981. Inhibition of Rumen Urease Activity by Tannins in Oak Leaves. Indian Journal of Animal Science, 51, 279.
- LOOMIS, W. D., 1969. Removal of Phenolic Compounds During the Isolation of Plant Enzymes. In: Methods in Enzymology, Vol. 13, 555. Ed: J. M. Lowenstein, Academic Press, New York.
- LOUCA, A.; PAPAS, A., 1973. The Effect of Different Proportions of Carob Pod Meal in the Diet on the Performance of Calves and Goats. Animal Production, 17, 146.
- LOOMIS, W. D.; BATAILE, J., 1966. Plant Phenolic Compounds and the Isolation of Plant Enzymes. Phytochemistry, 5, 423.



- LOOMIS, W.D., 1974. Overcoming Problems of Phenolics and Quinones in the Isolation of Plant Enzymes and Organelles. In: Methods in Enzymology, Vol. 31, 528. Ed: J.M. Lowenstein, Academic Press, New York.
- LOZANO, R.F.; CASTRO, A.G.G.; BERROCAL, J.R.; LUCENA, E.P.; BLANCO, M.M., 1983. Valoración de Frutos de *Quercus ilex* L. en Función de la Concentración de Taninos. Archivos de Zootecnia, 32, 3.
- LUQUE, J.A.; MURILLO, A., 1971. Sobre el Valor Biológico de la Proteína de Algunos Subproductos de Origen Vegetal. Revista de Nutrición Animal, 9, 145.
- LYFORD, S.J.; SMART, W.W.G. (Jr); BELL, T.A., 1967. Inhibition of Rumen Cellulose Digestion by Extracts of *Sericea lespedeza*. Journal of Animal Science, 26, 632.
- MA, Y.; BLISS, F.A., 1978. Tannin Content and Inheritance in Common Bean. Crop Science, 18, 201.
- MACARRO, J.B.A., 1964. Ceba de Cerdos Ibéricos en "Montanera". Archivos de Zootecnia, 13, 230.
- MACARRO, J.B.A., 1973. Ceba de Cerdo Ibérico. VI. Ganancia en Peso Vivo en Régimen de Montanera con Suplementación Proteica. Archivos de Zootecnia, 22, 227.
- MACARRO, J.B.A., 1976. Ceba de Cerdo Iberico. VII. Ganancia en Peso Vivo en Régimen de Pastoreo (Montanera) Suplementado con Harina de Soja. Control del Depósito de Grasa Dorsal. Archivos de Zootecnia, 26, 97.
- MAC RAE, J.C., 1976. Utilization of Protein of Green Forage by Ruminants at Pasture. In: From Plant to Animal Protein. Eds: T.M. Sutherland et al, 93. University of New England, Armidale, Australia.
- MAC RAE, J.C.; REEDS, P.J., 1980. Prediction of Protein Deposition in Ruminants. In: Protein Deposition in Animals. Eds: P.J. Buttery and D.B. Lindsay, 225. Butterworths, London.
- MAC RAE, J.C.; ULYATT, M.J., 1974. Quantitative Digestion of Fresh Herbage by Sheep. 2. The Sites of Digestion of Some Nitrogenous Constituents. Journal of Agricultural Science, Camb., 82, 309.
- MAC RAE, J.C.; SMITH, J.S.; DEWER, P.J.S.; BREWER, A.C.; BROWN, D.S.; WALKER, A., 1985. The Efficiency of Utilization of Metabolizable Energy and Apparent Absorption of Amino Acids in Sheep Given Spring- and Autumn-Harvested Dried Grass. British Journal of Nutrition, 54, 197.
- MAHADEVAN, A.; MUTHUKUMAR, G., 1980. Aquatic Microbiology with Reference to Tannin Degradation. Hidrobiologia, 72, 73.
- MAHADEVAN, S.; ERFLE, J.D.; SAUER, F.D., 1979. A Colorimetric Method for the Determination of Proteolytic Degradation of Feed Proteins by Rumen Microorganisms. Journal of Animal Science, 48, 947.
- MAHADEVAN, S.; ERFLE, J.; SAUER, F., 1980. Degradation of Soluble and Insoluble Protein by *Bacteroides amylophilus* Protease and by Rumen Microorganisms. Journal of Animal Science, 50, 723.
- MANGAN, J.L., 1982. The Nitrogenous Constituents of Fresh Forages. In: Forage Protein in Ruminant Animal Production, 25. Occasional Publication Nº6, British Society of Animal Production. Eds: D.J. Thomson; D.E. Beaver and R.G. Gunn.
- MARIGO, G., 1973. Sur Une Méthode de Fractionnement et d'Estimation des Composés Phénoliques Chez les Végétaux. Analisis, 2, 106.

- MARINHO, A. A. M., 1983. Revisão: Ciliados do Rumen-sua Dinâmica e Importância no Metabolismo Digestivo dos Ruminantes. Mimeografado, Universidade de Évora, 1983.
- MARINHO, A. A. M., 1984. Influência dos Taninos no Comportamento dos Microorganismos e suas Implicações nas Transformações Microbianas no Trato Gastrointestinal dos Ruminantes. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, 79, Jan./Mar., 5.
- MARQUARDT, R. M.; WARD, A. T.; CAMPBELL, L. C.; CANSFIELD, P. E., 1977. Purification, Identification and Characterization of a Growth Inhibitor in Faba Beans (*Vicia faba* L. var. minor). Journal of Nutrition, 107, 1313.
- MARSHALL, D. R.; BROUË, P.; MUNDAY, J., 1979. Tannins in Pasture Legumes. Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry, 19, 192.
- MARTIN-TANGUY, J.; VERMOREL, M.; LENOBLE, M.; MARTIN, C., 1976. Les Tannins des Grains de Sorgho. Importance dans l'Utilization Digestive de l'Azote Chez le Rat en Croissance. Annales de Biologie Animale, Biochimie et Biophysique, 16, 879.
- MARTIN-TANGUY, J.; GUILLAUME, J.; KOSSA, J., 1977. Condensed Tannins in Horse Bean Seeds: Chemical Structure and Apparent Effects on Poultry. Journal of the Science of Food and Agriculture, 28, 757.
- MATTHES, K., 1981. Abbau von Geschütztem und Ungeschütztem Protein im Künstlichen Pansen-Untersuchung an Handelsüblichen Futtermitteln. Diplomarbeit, Univ. Hohenheim, Inst. F. Tierernährung, W. Germany.
- MATHERS, J. C.; MILLER, E. L., 1980. A Simple Procedure Using  $^{35}\text{S}$  Incorporation for the Measurement of Microbial and Undegraded Food Protein in Ruminant Digesta. British Journal of Nutrition, 43, 503.
- MAXSON, E. D.; ROONEY, L. W., 1972. Evaluation of Methods for Tannin Analysis in Sorghum Grain. Cereal Chemistry, 49, 719.
- MAXSON, E. D.; ROONEY, L. W.; LEWIS, R. W.; CLARK, L. E.; JOHNSON, J. W., 1973a. The Relationship Between Tannin Content, Enzyme Inhibition, Rat Performance and Characteristics of Sorghum Grain. Nutrition Reports International, 8, 145.
- MAXSON, W. E.; SHIRLEY, R. L.; BERTRAND, J. E.; PALME, A. Z., 1973b. Energy Values of Corn, Bird-Resistant and Non-Bird-Resistant Sorghum Grain in Rations Fed to Steers. Journal of Animal Science, 37, 1451.
- Mc ALLAN, A. B.; SMITH, R. H., 1969. Nucleic Acid Metabolism in the Ruminant. Determination of Nucleic Acids in Digesta. British Journal of Nutrition, 23, 671.
- MCDONALD, I. W., 1954. The Extent of Conversion of Food Proteins to Microbial Protein in the Rumen of the Sheep. Biochemical Journal, 56, 120.
- MCGINTY, D. D., 1968. Factors Affecting the Digestibility of Varieties of Sorghum Grain by Cattle. Ph.D. Thesis. Texas A. & M. University, College Station, Texas.
- MCGINTY, D. D., 1969. Variation in Digestibility of Sorghum Varieties. Procee. 6th Bien. Int. Grain Sorghum Res. and Utiliz. Conf., Amarillo, Texas.
- MCLEOD, M. N., 1974. Plant Tannins-Their Role in Forage Quality. Review. Nutrition Abstracts and Reviews-Series B, 44, 11, 83.
- MCMENIMAN, N. P.; BEN-GHEDALIA, D.; ARMSTRONG, D. G., 1976. Nitrogen-Energy Interactions in Rumen Fermentation. In: Protein Metabolism and Nutrition, 217. Eds: D. J. A. Cole; K. N. Boorman; P. J. Buttery; D. Lewis; R. J. Neale and H. Swan.

- MC MILLAN, L., 1982. *D-Amino-Acids in the Ruminant Digestive Tract*. Ph.D. Thesis University of Newcastle Upon Tyne, U.K.
- MEHREZ, A. Z.; ØRSKOV, E. R., 1977. A Study of the Artificial Fibre Bag Technique for Determining the Digestibility of Feeds in the Rumen. Journal of Agricultural Science, Camb., 88, 645.
- MEHREZ, A. Z.; ØRSKOV, E. R.; McDONALD, I., 1977. Rates of Rumen Fermentation in Relation to Ammonia Concentration. British Journal of Nutrition, 38, 437.
- MEHREZ, A. Z.; ØRSKOV, E. R.; OPSTREDT, J., 1980. Processing Factors Affecting Degradability of Fishmeal in the Rumen. Journal of Animal Science, 50, 737.
- MENKE, K. H.; RAAB, L.; SALEWSKI, A.; STEINGASS, H.; FRITZ, D.; SCHNEIDER, W., 1979. The Estimation of the Digestibility and Metabolizable Energy Content of Ruminant Feeding Stuffs from the Gas Production When they are Incubated With Rumen Liquor *in vitro*. Journal of Agricultural Science, Camb., 93, 217.
- MERTENS, D. R.; ELY, L. D., 1979. A Dynamic Model of Fiber Digestion and Passage in the Ruminant for Evaluating Forage Quality. Journal of Animal Science, 49, 1085.
- MILLER, E. L., 1973. Evaluation of Foods as Sources of Nitrogen and Amino Acids. Proc. Nutr. Soc., 32, 79.
- MILLER, E. L., 1978. Research Into the End-Products of Digestion in Relation to the Proposed Agricultural Research Council Protein System. In: Ruminant Digestion and Feed Evaluation. Eds: D. F. Osbourn; D. E. Beever; D. J. Thomson, Agricultural Research Council, London.
- MILLER, E. L., 1982. The Nitrogen Needs of Ruminants. In: Forage Protein in Ruminant Animal Production. Occasional Publ. No 6 - British Soc. of Animal Production, 79. Eds: D. J. Thomson; D. E. Beever and R. G. Gunn.
- MILLER, E. L., 1980. Specific Problems of N Metabolism in Ruminants. In: Proc. of the 3rd EAAP-Symposium on Protein Metabolism and Nutrition, 52. Braunschweig, F.R. Germany.
- MILLER, E. L., 1982. The Nitrogen Needs of Ruminants. In: Forage Protein in Ruminant Animal Production. Occasional Publ. No 6 - British Soc. of Animal Production, 79. Eds: D. J. Thomson; D. E. Beever and R. G. Gunn.
- MILIĆ, B. L., 1972a. Lucerne Tannins. I. Content and Composition During Growth. Journal of the Science of Food and Agriculture, 23, 1151.
- MILIĆ, B. L., 1972b. Lucerne Tannins: II. Isolation of Tannins from Lucerne, their Nature and Influence on the Digestive Enzymes *in vitro*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 23, 1157.
- MILIĆ, B. L.; STOJANOVIĆ, S.; VUCUREVIĆ, N., 1972. Lucerne Tannins. 2. Isolation of Tannins from Lucerne, Their Nature and Influence on the Digestive Enzymes *in vitro*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 23, 1157.
- MITJAVILA, S.; CARRERA, G.; DERACHE, R., 1971. Effect of Tannic Acid on Growth, Body Composition and Biological Value of Foods in the Rat. Annales de la Nutrition et de l'Alimentation, 25, 297.
- MITJAVILA, M. T.; MITJAVILA, B.; DERACHE, R., 1974. Augmentation de la Quantité d'Azote Fecal Metabolique Chez le Rat a la Suite de l'Ingestion de l'Acide Tannique. Annales de la Nutrition et de l'Alimentation, 28, 189.

- MITJAVILA, S.; LACOMBE, C.; CARRERA, G.; DERACHE, R., 1977. Tannic Acid and Oxidized Tannic Acid on the Functional State of Rat Intestinal Epithelium. Journal of Nutrition, 107, 2113.
- MORRISON, F.B., 1956. Feeds and Feeding. 22nd Ed., Morrison Publ. Co., Clinton, IA.
- MUINDI, P.J.; THOMKE, S., 1981. The Nutritive Value for Rats of High- and Low-Tannin Sorghums Treated With Magadi Soda. Journal of the Science of Food and Agriculture, 32, 139.
- MUINDI, P.J.; THOMKE, S.; EKMAN, R., 1981. Effect of Mogadi Soda Treatment on Tannin Content and *in vitro* Nutritive Value of Grain Sorghums. Journal of the Science of Food and Agriculture, 32, 25.
- NACHTOMI, E.; ALUMOT, E., 1963. Tannins and Polyphenols in Carob Pods (*Ceratonia siliqua*). Journal of the Science of Food and Agriculture, 14, 464.
- NAPHADE, M.S.; TRIPATHI, M., 1978. Evaluation of Four Cereal Grains for Chicks, Grower and Layer Performance. Indian Journal of Animal Science, 44, 998.
- NASER, J.A.; COETZER, J.A.W.; BOOMKER, J.; CABLE, H., 1982. South Africa Veterinary Association, 53, 151.
- NELSON, T.S.; STEPHENSON, E.L.; BURGOS, A.; FLOYD, J.; YORK, J.O., 1975. Effect of Tannin Content and Dry Matter Digestion on Energy Utilization and Average Amino Acid Availability of Hybrid Sorghum Grains. Poultry Science, 54, 1620.
- NEGI, S.S., 1982. Tannins in Sal Seed (*Shorea robusta*) and Sal Seed Meal Limit Their Utilization as Livestock Feeds. Animal Feed Science and Technology, 7, 161.
- NIKOLIC, J.A.; JOVANOVIC, M.; FILIPOVIC, R., 1975. Microbial Protein Synthesis by Bovine Rumen Content in Relation to Concentration. In: Tracer Studies on Non-Protein Nitrogen for Ruminants, 43. IAEA, Vienna, Austria.
- NISHIMUTA, J.F.; ELY, D.G.; BOLING, J.A., 1973. Nitrogen Metabolism in Lambs Fed Soybean Meal Treated with Heat, Formalin and Tannic Acid. Journal of Nutrition, 103, 49.
- NISHIMUTA, J.F.; ELY, D.G.; BOLING, J.A., 1974. Ruminal Bypass of Dietary Soybean Protein Treated with Heat, Formalin and Tannic Acid. Journal of Animal Science, 39, 952.
- NOLAN, J.V., 1975. Quantitative Models of Nitrogen Metabolism in Sheep. In: Digestion and Metabolism in the Ruminant. Eds: I.W. McDonald and A.C.I. Warner, University of New England, Armidale.
- NOLAN, J.V.; NORTON, B.W.; LENG, R.A., 1976. Further Studies of the Dynamics of Nitrogen Metabolism in Sheep. British Journal of Nutrition, 35, 127.
- NUGENT, J.H.A.; MANGAN, J.L., 1981. Characteristics of the Rumen Proteolysis of Fraction 1 (18S) Leaf Protein from Lucerne (*Medicago sativa* L.). British Journal of Nutrition, 46, 39.
- OH, H.I., 1978. Physicochemical and Nutritional Aspects of Tannin-Protein Interactions. PH.D. Thesis, Purdue University, USA.
- OH, H.I.; HOFF, J.E.; ARMSTRONG, G.S.; HALL, L.A., 1979. Hydrophobic Interactions in Tannin-Protein Complexes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 28, 394.
- O'HARA, M.; OHKI, K., 1973. Studies on the Mode of Gas Production in an Artificial Rumen and its Application to the Evaluation of Feedstuffs. III. The Mode of Volatile Fatty Acid Production and its Relation to the Gas Production Rate. Japanese Journal of Zootechnical Science, 44, 432.

- O'HARA, M.; SUGIASHI, T., 1972. Studies on the Mode of Gas Production in an Artificial Rumen and its Application to the Evaluation of Feedstuffs. I. Gas Production Patterns and their Specificity by Substrate. Japanese Journal of Zootechnical Science, 43, 567.
- O'HARA, M.; SUGIASHI, T., 1973. Studies on the Mode of Gas Production in an Artificial Rumen and its Application to the Evaluation of Feedstuffs. II. Gas Production Patterns by Carbohydrates. Japanese Journal of Zootechnical Science, 44, 159.
- O'HARA, M.; HOZUMI, S.; OHKI, K., 1974. Studies on the Mode of Gas Production in an Artificial Rumen and its Application to the Evaluation of Feedstuffs. IV. On the Role of Bicarbonate Buffer for Gas Production. Japanese Journal of Zootechnical Science, 45, 1.
- OKORIE, A. U.; BUTTERY, P. J.; LEWIS, D., 1977. Ammonia Concentration and Protein Synthesis in the Rumen. Proc. Nutr. Soc., 36, 38A.
- ORPIN, C. G., 1977a. The Occurrence of Chitin in the Cell Walls of the Rumen Organisms *Neocallimastix frontalis*, *Piromonas communis* and *Sphaeromonas communis*. Journal of General Microbiology, 99, 215.
- ORPIN, C. G., 1977b. On the Induction of Zoosporogenesis in the Rumen Phycomycetes *Neocallimastix frontalis*, *Piromonas communis* and *Sphaeromonas communis*. Journal of General Microbiology, 101, 181.
- ORTEGA, M. E.; STERN, M. D.; SATTER, L. D., 1979. The Effect of Rumen Ammonia Concentration on Dry Matter Disappearance *in situ*. Journal of Dairy Science, 62, (Suppl. 1), 76, (Abstr.).
- ØRSKOV, E. R., 1980. In: Proceedings of the 3rd EAAP-Symposium on Protein Metabolism and Nutrition, Vol. III, 52. European Association for Animal Production Publication n°27. Eds: H. J. Oslage and K. Rohr.
- ØRSKOV, E. R.; Mc DONALD, I., 1979. The Estimation of Protein Degradability in the Rumen from Incubation Measurements Weighted According to Rate of Passage. Journal of Agricultural Science, Camb., 92, 499.
- ØRSKOV, E. R.; HOVELL, F. D. DeB.; MOULD, F., 1980. Use of the Nylon Bag Technique for the Evaluation of Feedstuffs. Tropical Animal Production, 5, 195.
- ØRSKOV, E. R.; HUGHES-JONES, M.; Mc DONALD, I., 1981. Degradability of Protein Supplements and Utilization of Undegraded Protein by High-Producing Dairy Cows. In: Recent Developments in Ruminant Nutrition, 17. Eds: W. Haresign and D. J. A. Cole. Butterworths, 1981.
- OSBOURN, D. R.; TERRY, R. A.; CAMMELL, S. B.; OUTEN, G. E., 1971. The Effects of Leuco-Anthocyanins in Sanfoin on the Availability of Protein to Sheep and Upon the Determination of Acid Detergent Fiber and Lignin Fractions. Proc. Nutr. Soc., 30, 13A.
- OSWALT, D. L., 1973. Nutritional Quality of Sorghum Bicolor (L.) Moench as Estimated by Polyphenols, Crude Protein, Amino Acid Composition and Rat Performance. PH.D. Thesis. Purdue University, USA.
- PAINE, C. A.; CRAWSHAW, R.; BARBER, W. P., 1982. A Complete Exchange Method for the *in sacco* Estimation of Rumen Degradability on a Routine Basis. In: Forage Protein in Animal Production. Occasional Publication N°6 - British Society of Animal Production, 117. Eds: D. J. Thomson; D. E. Beaver and R. G. Gunn.
- PAL, R. N.; PACHAURI, V. C.; NEGI, S. S., 1972. Comparative Nutritive Value of Maize and Oak Kernels *Vis-a-Vis* Maize for Cattle. Indian Journal of Animal Sciences, 42, 341.

- PANDA, B.; JAYARAMAN, M.; RAMAMURTHY, N.S.; NAIR, R.B., 1969. Processing and Utilization of Sal Seed (*Shorea robusta*) as a Source of Energy in Poultry Feeds. Indian Veterinary Journal, 49, 957.
- PATEL, B.M.; SHUKLA, P.G.; TALAPADA, P.M., 1972. Indian Veterinary Journal, 49, 822.
- PERI, C.; POMPEI, C., 1971. Estimation of Different Phenolic Groups in Vegetable Extracts. Phytochemistry, 10, 2187.
- PIENAAR, J.P.; RENTON, K.A., 1980. The Effect of Formalin Treatment on the Nutritive Value of Sorghum Grain with a High Tannin Content. South African Journal of Animal Science, 10, 27.
- PHILLIPSON, A.T., 1964. The Digestion and Absorption of Nitrogenous Compounds in the Ruminant. In: Mammalian Protein Metabolism, Vol 1, 71. Eds: H.N. Munro and J.B. Allison. Academic Press, New York.
- PILGRIM, A.F.; GRAY, F.V.; WELLER, R.A.; BELLING, C.B., 1970. Synthesis of Microbial Protein from Ammonia in the Sheep's Rumen and the Proportion of Dietary Nitrogen Converted Into Microbial Nitrogen. British Journal of Nutrition, 24, 589.
- PIRIE, N.W., 1971. Leaf Protein: Its Agronomy, Preparation, Quality and Use. IBP (International Biological Programme) Handbook No 20. Publ: Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh, 1979.
- POTTER, D.K.; FULLER, H.L., 1968. Metabolic Fate of Dietary Tannins in Chickens. Journal of Nutrition, 96, 187.
- POTTER, D.K.; FULLER, H.L.; BLOCKSHEAR, C.D., 1967. Effect of Tannic Acid on Egg Production and Egg Yolk Mottling. Poultry Science, 46, 1307.
- PRICE, M.L.; BUTLER, L.G., 1977. Rapid Visual Estimation and Spectrophotometric Determination of Tannin Content of Sorghum Grain. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 25, 1268.
- PRICE, M.L.; BUTLER, L.G., 1980. Tannins and Nutrition. Station Bulletin n°272. Department of Biochemistry, Agricultural Experiment Station, Purdue University, West Lafayette, Indiana, USA.
- PRICE, L.; VAN SCOYOC, S.; BUTLER, L.G., 1978a. A Critical Evaluation of the Vanillin Reaction as an Assay for Tannin in Sorghum Grain. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 26, 1214.
- PRICE, M.L.; BUTLER, L.G.; FEATHERSTON, W.R.; ROGLER, J.C., 1978b. Detoxification of High Tannin Sorghum Grain. Nutrition Reports International, 17, 229.
- PRICE, M.L.; BUTLER, L.G.; ROGLER, J.C.; FEATHERSTON, W.R., 1979a. Overcoming the Nutritionally Harmful Effects of Tannin in Sorghum Grain by Inexpensive Chemical Treatments. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 27, 441.
- PRICE, M.L.; STROMBERG, A.M.; BUTLER, L.G., 1979b. Tannin Content as a Function of Grain Maturity and Drying Conditions in Several Varieties of Sorghum Bicolor (L.) Moench. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 27, 1270.
- PRICE, M.L.; HAGERMAN, A.E.; BUTLER, L.G., 1980. Tannin in Sorghum Grain: Effect of Cooking on Chemical Assays and on Antinutritional Properties in Rats. Nutrition Reports International, 21, 761.
- PRIDHAM, J.B., 1960. Plant Phenolic Group. Symposium, Bristol, 1959. Symposium Publications Division, Pergamon Press, Inc., New York.
- PROUD, 1972. A Study of the Digestion of Nitrogen in the Adult Sheep. Ph. D. Thesis, University of Newcastle-Upon-Tyne, U.K.

- PURSER, D. B.; BUECHLER, S. M., 1966. Amino Acid Composition of Rumen Organisms. Journal of Dairy Science, 49, 81.
- QUESNEL, V. C., 1968. Fractionation and Properties of the Polymeric Leuco-cyanidin of the Seeds of *Theobroma cacao*. Phytochemistry, 7, 1583.
- RAAB, L., 1980. Untersuchungen Über Den Proteinabbau Und Die Protein-Synthese Im Künstlichen Pansen. PH.D. Thesis, University of Hohenheim.
- RAAB, L.; CAFANTARIS, B.; JILG, T.; MENKE, K. H., 1983. Rumen Protein Degradation and Biosynthesis. 1. A New Method for Determination of Protein Degradation in Rumen Fluid *in vitro*. British Journal of Nutrition, 50, 569.
- RAI, S. N.; SHUKLA, P. C., 1977. Influence of Feeding Deoiled Sal-Seed-Meal with Urea and Molasses on Digestibility and Balances of Nitrogen, Phosphorus and Calcium in Lactating Cows. Indian Journal of Animal Sciences, 47, 111.
- RAMACHANDRA, G.; VIRUPAKSHA, T. K.; SHADAKSHARASWAMY, M., 1977. Relationship Between Tannin Levels and *in vitro* Protein Digestibility in Finger Millet (*Eleusine coracana* Gertn.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 25, 1101.
- RAYUDU, G. V. N.; KADIRVEL, R.; VOHRA, P. V.; KRATZER, F. H., 1970a. Toxicity of Tannic Acid and its Metabolites for Chickens. Poultry Science, 49, 957.
- RAYUDU, G. V. N.; KADIRVEL, R.; VOHRA, P.; KRATZER, F. H., 1970b. Effect of Various Agents in Alleviating the Toxicity of Tannic Acid for Chickens. Poultry Science, 49, 1323.
- REED, R. J.; Mc DOWELL, R. E.; VAN SOEST, P. J.; HOWARTH, P. J., 1982. Condensed Tannins: A Factor Limiting the Use of Cassava Forage. Journal of the Science of Food and Agriculture, 33, 213.
- REICHERT, R. D.; FLEMING, S. E.; SCHWAB, D. J., 1980. Tannin Deactivation and Nutritional Improvement of Sorghum by Anaerobic Storage of H<sub>2</sub>O-, HCl-, or NaOH-treated Grain. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 28, 824.
- REID, C. S. W.; ULYATT, M. J.; WILSON, J. M., 1974. Plant Tannins, Bloat and Nutritive Value. Proc. New Zeal. Soc. Anim. Prod., 34, 82.
- RIBEIRO, J. M. C. R., 1979. Digestion and Metabolism of Diets by Sheep. PH.D. Thesis, University of Aberdeen, England.
- RIBEIRO, J. M. C. R.; MAC RAE, J. C.; WEBSTER, A. J. F., 1981. Proc. Nutr. Soc., 40, 12A.
- RINGROSE, R. C.; MORGAN, C. L., 1970. The Nutritive Value of Lespedeza for Poultry Feeding. South Carolina Agriculture Experimental Station Annual Report, 53, 91.
- RIORDAN, J. F.; VALLEE, B. L., 1972. Diazonium Salts as Specific Reagents and Probes of Protein Conformation. In: Methods in Enzymology, 25(B), 521.
- ROBB, J., 1976. In: Feed Energy Resources for Livestock. Eds: J. Swain and D. Lewis. Butterworth, London, 13.
- ROBINSON, T., 1979. Plant Science Letters, 15, 211.
- ROFFLER, R. E.; SATTER, L. D., 1975. Relationship Between Ruminal Ammonia and Non Protein Nitrogen Utilization by Ruminants. 2. Application of Published Evidence to the Development of a Theoretical Model for Predicting Non Protein Nitrogen Utilization. Journal of Dairy Science, 58, 1889.

- ROMERO, J.; RYAN, D.S., 1978. Susceptibility of the Major Storage Proteins of the Bean, *Phaseolus vulgaris* L, to *in vitro* Enzymatic Hydrolysis. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 26, 784.
- RONNEMKAMP, R., 1977. The Effect of Tannins on Nutritional Quality of Dry Beans (*Phaseolus vulgaris*). PH.D. Thesis, Purdue University, USA.
- ROSTAGNO, H.S.; FEATHERSTON, W.R.; ROGLER, C., 1973. Studies on the Nutritional Value of Sorghum Grains with Varying Tannin Contents for Chicks. I. Growth Studies. Poultry Science, 52, 765.
- ROY, J.H.B.; BALCH, C.C.; MILLER, E.L.; ØRSKOV, E.R.; SMITH, R.H., 1977. Calculation of the N-Requirement for Ruminants from Nitrogen Metabolism Studies. In: Protein Metabolism and Nutrition, 126. Proc. 2nd Int. Sympos. PUDOC Cvn Agric. Publ. Doc., Wageningen, Holland.
- SABA, W.J.; HALE, W.H.; THEURER, B., 1972. *In vitro* Rumen Fermentation Studies with a Bird Resistant Sorghum Grain. Journal of Animal Science, 35, 1076.
- SADANANDAN, K.P.; ARORA, S.P., 1975. Proceedings of the Symposium on the Use of Radiation and Radio Isotopes in Studies of Animal Production. IV RI, Izatnagar, India.
- SADANANDAN, K.P.; ARORA, S.P., 1976. Influence of Added Tannic Acid on Growth and *in vitro* <sup>32</sup>P-Phosphate Utilization by Rumen Microbes. Indian Journal of Animal Sciences, 46, 593.
- SADANANDAN, K.P.; ARORA, S.P., 1978. Influence of Tannins on Rumen Metabolism. Journal of Nuclear Agriculture and Biology, 7, 118.
- SADANANDAN, K.P.; ARORA, S.P., 1979. Influence of Tannins on Microbial Rumen Fermentation Pattern. Journal of Nuclear Agriculture and Biology, 8, 1.
- SANDUSKY, G.E.; FOSNAUGH, C.J.; SMITH, J.B.; MOHAN, R., 1977. Oak Poisoning of Cattle in Ohio. Journal of the American Veterinary Medical Association, 171, 627.
- SARKAR, S.K.; HOWARTH, R.E., 1976. Specificity of the Vanillin Test for Flavonols. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 24, 317.
- SATTER, L.D., 1982. The Metabolizable Protein System Keyed to Ruminant Ammonia Concentration-The Wisconsin System. In: Protein Requirements of Cattle: Symposium, 245. Oklahoma State Univ., Misc. Proc. 109.
- SATTER, L.D.; ROFFLER, R.E., 1977. In: Protein Metabolism and Nutrition, 133. Ed: S. Tamminga, Wageningen, Centre for Agricultural Publishing and Documentation.
- SATTER, L.D.; SLYTER, L.L., 1974. Effect of Ammonia Concentration on Rumen Microbial Protein Production *in vitro*. British Journal of Nutrition, 32, 199.
- SAVON, L.; BLANCA, S.; MICHELENA, J., 1973. Some Observations on Tannic Acid Treatment of Protein in High Molasses/Urea Diets. Cuban Journal of Agricultural Science, 7, 51.
- SCHAEFER, D.M.; DAVIS, C.L.; BRYANT, M.P., 1980. Ammonia Saturation Constants for Predominant Species of Rumen Bacteria. Journal of Dairy Science, 63, 1248.
- SCHAFFERT, R.S.; OSWALT, D.L.; AXTELL, J.A., 1974. Effect of Supplemental Protein on the Nutritive Value of High and Low Tannin Sorghum Bicolor (L) Moench Grain for the Growing Rat. Journal of Animal Science, 39, 500



- SCHANDERL, S.H., 1970. In: *Methods in Food Analysis*, 2nd edit. Ed: M.A. Joslyn, Academic Press, London, 701.
- SCHLIEFER, K.G.; KANDLER, O., 1972. *Bacteriological Reviews*, 36, 407.
- SHÖNER, F.J., 1981. Schätzung des Energetischen Futterwertes von Molchleisungsfuttern (Ergänzungsfutter für Milchkühe) Unter Besonderer Berücksichtigung des Hohenheimer Futterwerttestes. *Dissertation, Bonn*.
- SCHULTZ, J.C.; BALDWIN, I.T., 1982. *Science (Washington, D.C.)*, 217, 149
- SCHULTZ, J.C.; BALDWIN, I.T.; NOTHNAGLE, P.J., 1981. Hemoglobin as a Binding Substrate in the Quantitative Analysis of Plant Tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29, 823.
- SEHGAL, J.P., 1981. Annual Report CSWRI, Avikanagar (India), 87.
- SELL, D.R.; ROGLER, J.C., 1983. Effect of Sorghum Grain Tannins and Dietary Protein on the Activity of Liver UDP-Glucuronyltransferase. *Proc. of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 174, 93.
- SELL, D.R.; ROGLER, J.C.; FEATHERSTON, W.R., 1983. The Effect of Sorghum Tannin and Protein Level on the Performance of Laying Hens Maintained in Two Temperature Environments. *Poultry Science*, 62, 2420.
- SELL, D.R.; ROGLER, J.C., 1984. The Effect of Sorghum Tannin and Methionine Level on the Performance of Laying Hens Maintained in Two Temperature Environments. *Poultry Science*, 63, 109.
- SERRANO, J.M.E., 1985. Degradabilidade Ruminal da Proteína dos Resíduos Ensilados de Tomate, Pimento e Cerveja em Mistura com Silagem de Milho. Aplicação de Métodos *in vitro*, *in situ* e *in vivo*. Tese de Doutoramento, Estação Zootécnica Nacional, Fonte Boa, Santarém, Portugal.
- SHARMA, K.; WAH, C.S.; JACKSON, M.G., 1977. Studies of various Chemical Treatment of Various Chemical Treatment of Sal-Seed Meal to Remove or Inactivate Tannins. *Indian Journal of Animal Sciences*, 47, 8.
- SHARMA, C.P.; KANSHALL, G.P.; SAREEN, V.K.; SINGH, S.; BATHIA, I.S., 1981. *In vitro* Metabolism of Flavonoids by Whole Rumen Contents and its Fractions. *Zentralbl Veterinaermed Reihe A*, 28, 27.
- SIDDONS, R.C.; BEEVER, D.E.; NOLAN, J.V.; McALLAN, A.B.; MAC RAE, J.C., 1979. Estimation of Microbial Protein in Duodenal Digesta. *Annales de Recherches Veterinaires*, 10, 286.
- SILANO, V., 1977. Factors Affecting Digestibility and Availability of Proteins in Cereals in Nutritional Evaluation of Cereal Mutants. *Proc. Advisory Group Meeting in Vienna, 1976, IAWA, Vienna, 1977*.
- SIMPSON, F.J.; JONES, G.A.; WOLIN, E.A., 1969. Anaerobic Degradation of Some Bioflavonoids by Microflora of the Rumen. *Canadian Journal of Microbiology*, 15, 972.
- SINGH, M., 1977. Effect of Pipal Leaves Tannin and Tannic Acid on Volatile Fatty Acids (VFA) Production in Goat's Rumen. *Indian Veterinary Journal*, 54, 553.
- SINGH, M., 1978. Effect of Salseed Tannin and Tannic Acid on Volatile Fatty Acids Production in Goat's Rumen. *Indian Veterinary Journal*, 55, 45.
- SINGH, K.; ARORA, S.P., 1978. Studies on Detanning and Determining the Nutritive Value of Alkali-Treated Salseed-Meal (*Shorea robusta*). *Indian Journal of Animal Sciences*, 48, 84.
- SINGH, K.; ARORA, S.P., 1980. Proceedings All India Sympos. (UNDP/ICAR), 1979.

- SINGLETON, V. L., 1967. Adsorption of Natural Phenols from Beer and Wine. MBAA Technical. Quart., 4, 245.
- SINGLETON, V. L., 1981. In: Advances in Food Research, 27, 149.
- SINGLETON, V. L.; KRATZER, F. H., 1969. Toxicity and Related Physiological Activity of Phenolic Substances of Plant Origin. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 17, 497.
- SINGLETON, V. L.; KRATZER, F. H., 1973. Plant Phenolics. In: Toxicants Occurring Naturally in Foods. 2nd Edit., National Academy of Science, Washington, D. C., USA.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. (Jr.), 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. American Journal of Enology and Viticulture, 16, 144.
- SINHA, R. P.; NATH, K., 1982. Note on the Chemical Inactivation of Tannins of Deoiled Salseed-Meal. Indian Journal of Animal Sciences, 52, 1087.
- SINHA, R. P.; NATH, K., 1982. Effect of Urea Supplementation on Nutritive Value of Deoiled Sal-Seed-Meal in Cattle. Indian Journal of Animal Sciences, 52, 1165.
- SMART, W. W. G., (Jr.); BELL, T. A.; STANLEY, N. W.; COPE, W. A., 1961. Inhibition of Rumen Cellulase by an Extract from Sericea Forage. Journal of Dairy Science, 44, 1945.
- SMITH, R. H., 1959. The Development and Function of the Rumen in Milk-Fed Calves. Journal of Agriculture Science, 52, 72.
- SMITH, D. G., 1974. Inhibition of Swarming in *Proteus* spp. by Tannic Acid. Journal of Applied Bacteriology, 38, 29.
- SMITH, R. H., 1979. Synthesis of Microbial Nitrogen Compounds in the Rumen and their Subsequent Digestion. Journal of Animal Science, 49, 1604.
- SMITH, R. H.; MCALLAN, A. B.; HEWITT, D.; LEWIS, P. E., 1978. Estimation of Amounts of Microbial and Dietary Nitrogen Compounds Entering the Duodenum of Cattle. Journal of Agricultural Science, Camb., 90, 557.
- SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G., 1971. Méthodes Statistiques. 6ème Ed. Traduite par Boele, H. et Camhaji, E., Assoc. Coord. Techn. Agric., Paris.
- SOSULSKI, F., 1979. Organoleptic and Nutritional Effects of Phenolic Compounds on Oilseed Protein Products: A Review. The Journal of the American Oil Chemists' Society, 56, 711.
- STANIER, R. Y.; ADELBERG, E. A.; INGRAHAM, J. L., 1977. General Microbiology, 4th Ed. The Mac Millan Press Ltd., London.
- STEINGASS, H., 1983. Bestimmung des Energetischen Futterwertes Von Wirtschaftseigenen Futtermitteln Aus der Gasbildung bei der Pansen-fermentation *in vitro*. Dissertation, zur Erlangung des Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften Vorgelegt der Fakultät IV-Agrarwissenschaften II der Universität Hohenheim.
- STEINHOOR, W. D.; STOKES, M. R.; CLARK, J. H.; ROGERS, J. A.; DAVIS, C. L.; NELSON, D. R., 1982. Microbial Nitrogen Flow to the Small Intestine of Ruminants. In: Protein Requirements. British Journal of Nutrition, 48, 417.
- STEPHENSON, E. L.; YORK, J. D.; BRAGG, D. B., 1967. A Comparison of the Nutritive Value of Different Milo Hybrids for Chicks. Poultry Science, 46, 1323.
- STEPHENSON, E. L.; YORK, J. D.; BRAGG, D. B., 1968. Comparative Feeding Values of Brown and Yellow Grain Sorghum. Feedstuffs, 40, 112.

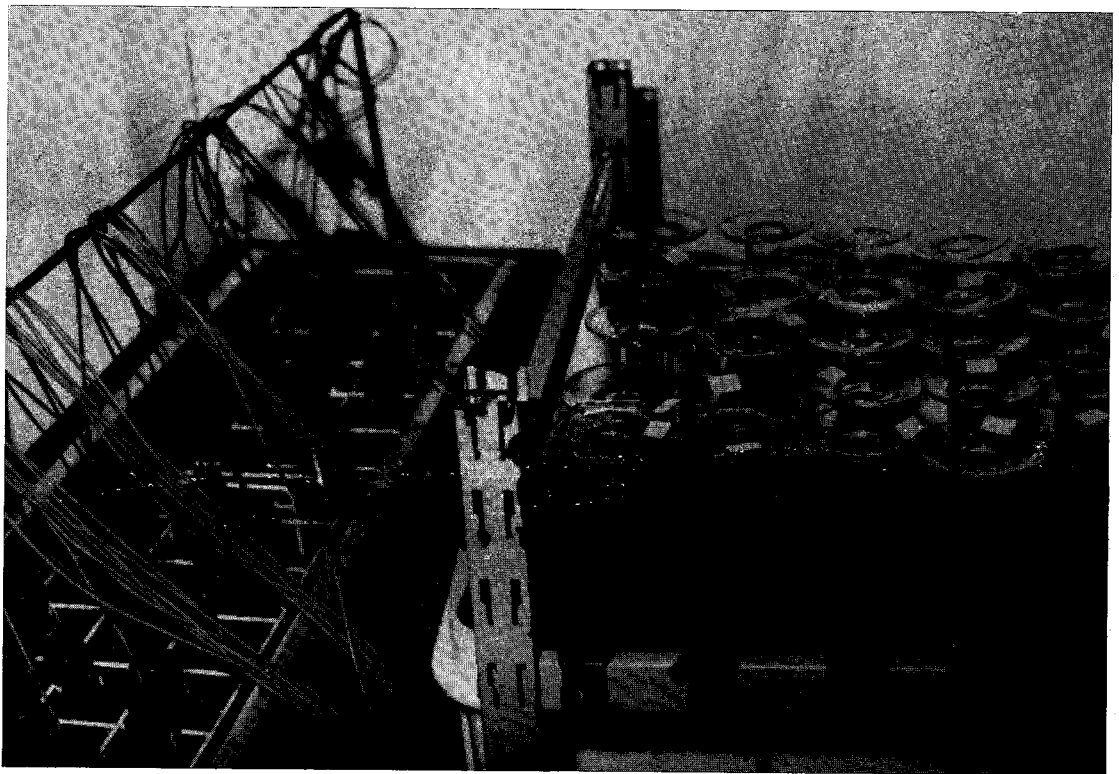
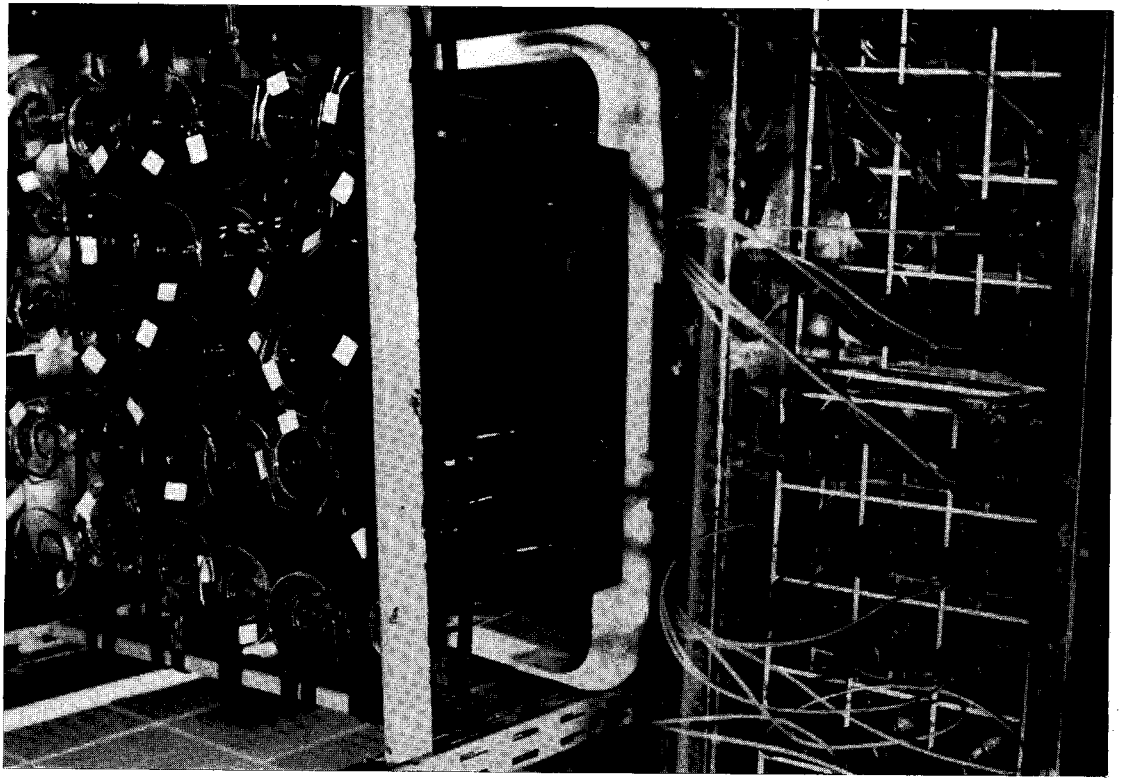
- STEPHENSON, E. L.; YORK, J. D.; BRAGG, D. S.; IVY, C. A., 1971. The Amino Acid Content and Availability of Different Strains of Grain Sorghum to the Chick. Poultry Science, 50, 581.
- STERN, M. D.; HOOVER, W. H., 1979. Methods for Determining and Factors Affecting Rumen Microbial Protein Synthesis: A Review. Journal of Animal Science, 49, 1590.
- STERN, M. D.; SATTER, L. D., 1982. In vitro Estimation of Protein Degradability in the Rumen. In: Protein Requirements for Cattle: Symposium. Oklahoma State University, MP-109. Ed: F. N. Owens, Okl. State Univ., 74078.
- STEVENSON, A. E.; LANGEN, H., 1960. Measurement of Feed-Intake by Grazing Cattle and Sheep. VII. Modified Wet Digestion Method for Determination of Chromic Oxide in Faeces. New Zealand Journal of Agricultural Research, 3, 314.
- STOUTHAMER, A. H.; BETTENHAUSEN, C., 1973. Utilization of Energy for Growth and Maintenance in Continuous and Batch Cultures of Microorganisms. Biochimica et Biophysica Acta, 301, 53.
- STRUMEYER, D. J.; MALIN, M. J., 1975. Condensed Tannins in Grain Sorghum: Isolation, Fractionation, and Characterization. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 23, 909.
- SWAIN, T., 1965. In: Plant Biochemistry. Eds: J. Bonner and J. E. Varner. Academic Press, New York.
- SWAIN, T., 1977. Secondary Compounds as Protective Agents. In: Annual Review of Plant Physiology, 28, 479.
- SWAIN, T., 1979. Tannins and Lignins. In: Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites, 657. Eds: G. A. Rosenthal and D. H. Janzen. Academic Press, New York.
- SWAIN, T.; GOLDSTEIN, J. L., 1964. In: Methods in Polyphenol Chemistry, 131. Ed: J. B. Pridham. Pergamon Press, Oxford, U.K.
- SWAIN, T.; HILLIS, W. E., 1959. The Phenolic Constituents of *Prunus Domestica*. I. The Quantitative Analysis of Phenolic Constituents. Journal of the Science of Food and Agriculture, 10, 63.
- SWAIN, T.; HARBORNE, J. B.; SUMERE, C. F. Van (Ed.), 1979. Biochemistry of Plant Phenolics. Plenum Press, New York, USA.
- TAGARI, H.; HENIS, V.; MUSHA, T.; VOLCANI, R., 1965. Effect of Carob Pod Extracts on Cellulolysis, Deamination and Protein Biosynthesis in an Artificial Rumen. Applied Microbiology, 13, 437.
- TAMIR, M.; ALUMOT, E., 1969. Inhibition of Enzymes by Condensed Tannins from Green and Ripe Carobs. Journal of the Science of Food and Agriculture, 20, 199.
- TAMIR, M.; ALUMOT, E., 1970. Carob Tannins-Growth Depression and Levels of Insoluble Nitrogen in the Digestive Tract of Rats. Journal of Nutrition, 100, 573.
- TAMIR, M.; NACHTOMI, E.; ALUMOT, E., 1971. Degradation of Tannins from Carob Pods (*Ceratonia siliqua*) by Thioglycolic Acid. Phytochemistry, 10, 2769.
- TAMMINGA, S., 1978. Measurement of Microbial Protein Synthesis in the Rumen. In: Rumen Fermentation and Feed Evaluation, 51. Eds: D. F. Osbourn; D. E. Beever; D. J. Thomson. Agricultural Research Council, London.
- TAMMINGA, S., 1979. Protein Degradation in the Forestomachs of Ruminants. Journal of Animal Science, 49, 1615.

- TAMMINGA, S., 1983. Recent Advances in Our Knowledge on Protein Digestion and Absorption in Ruminants. In: Métabolisme et Nutrition Azotés, Vol. 1, 263. 4ème Sympos. Intern. European Assoc. Anim. Prod. INRA, Institut National de la Recherche Agronomique, 149, rue Grenelle, Paris.
- TAYLOR, B. F.; CAMPBELL, W. L.; CHINYOY, I., 1970. Anaerobic Degradation of the Benzene Nucleus by a Facultative Anaerobic Microorganism. Journal of Bacteriology, 102, 430.
- TEETER, R. G., 1981. Indigestible Markers: Methodology and Application in Ruminant Nutrition. PH.D. Thesis, Oklahoma State University, USA.
- THEURER, C. B., 1979. Microbial Protein Synthesis as Influenced by Diet. In: Regulation of Acid-Base Balance, 97. Eds: W. H. Hale and P. Meinhardt. Church and Dwight Co., Piscataway, NJ, USA.
- THEURER, C. B., 1982. Microbial Protein Estimation Using DAP, AEP and Other Amino Acids as Markers. In: Protein Requirements of Cattle: Sympos., 10. Ed: F. N. Owens, Oklahoma State University, Stillwater, USA.
- THOMSON, D. J., 1982. The Nitrogen Supplied by and the Supplementation of Fresh or Grazed Forage. In: Forage Protein in Ruminant Animal Production, 53. Occasional Publication n°6-British Society of Animal Production. Eds: D. J. Thomson; D. E. Beever and R. G. Gunn.
- THRASHER, D. M.; ICAZA, E. A.; LADD, W.; BAGLEY, C. P.; TIPTON, K. W., 1975. Bird Resistant Milo for Pigs. Louisiana Agriculture, 19, 10.
- TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A., 1963. A Two Stage Technique for the *in vitro* Digestion of Forage Crops. Journal of the British Grassland Soc., 18, 104.
- TORRENT, J. A.; VARELA, G.; BOZA, J., 1961. Digestibilidad y Valor Nutritivo de la Bellota en Cerdos y Estudio de la Capacidad de Asentamiento en encinares. Bolet. Servicio Plagas Forestales, 4, 5.
- TOYAMA, N.; KAMIYAMA, S., 1972. Solubilization of Enzyme-Tannic Acid Complexes. Chemical Abstracts, 1972, 60039 u.
- TRIPATHI, A. K., 1978. Indian Journal of Animal Sciences, 48, 65.
- TSAI, C. G.; JONES, G. A., 1975. Isolation and Identification of Rumen Bacteria Capable of Anaerobic Phloroglucinol Degradation. Canadian Journal of Microbiology, 21, 794.
- UDEN, P.; COLUCCI, P. E.; VAN SOEST, P. J., 1980. Investigation of Chromium, Cerium and Cobalt as Markers in Digesta Rate Passage Studies. Journal of the Science of Food and Agriculture, 31, 625.
- UDEN, P.; PARRA, R.; VAN SOEST, P. J., 1974. Factors Influencing the Reliability of the Nylon Bag Technique. Journal of Dairy Science, 57, 622.
- ULYATT, M. J.; EGAN, A. R., 1979. Quantitative Digestion of Fresh Herbage by Sheep. V. The Digestion of Four Herbages and Prediction of Rates of Digestion. Journal of Agricultural Science, Camb., 92, 605.
- ULYATT, M. J.; MAC RAE, J. C., 1974. Quantitative Digestion of Fresh Herbage by Sheep. I. The Sites of Digestion of Organic Matter, Energy, Readily Fermentable Carbohydrate, Structural Carbohydrate and Lipid. Journal of Agricultural Science, Camb., 82, 295.
- ULYATT, M. J.; MAC RAE, J. C.; CLARKE, R. T. J.; PEARCE, P. D., 1975. Quantitative Digestion of Fresh Herbage by Sheep. 4. Protein Synthesis in the Stomach. Journal of Agricultural Science, Camb., 84, 453.

- VAN BUREN, J. P.; ROBINSON, W. B., 1969. Formation of Complexes Between Protein and Tannic Acid. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 17, 772.
- VAN HOVEN, W., 1984. Tannins and Digestibility in Greater Kudu. Canadian Journal of Animal Science, 64 (Suppl.), 177.
- VAN NEVEL, C. J.; DEMEYER, D. I., 1977. Determination of Rumen Microbial Growth *in vitro* from <sup>32</sup>P-Labelled Phosphate Incorporation. British Journal of Nutrition, 38, 101.
- VAN SOEST, P. J., 1980. The Limitations of Ruminants. Proc. of the Cornell Nutrition Conference, 78. Cornell University, USA.
- VAN SOEST, P. J., 1982. Nutritional Ecology of the Ruminant. O & B Books, Corvallis, Oregon, USA.
- VAN SUMERE, C. F.; ALBRECHT, J.; DEDONDER, A.; De POOTER, H.; PE, I., 1975. Plant Proteins and Phenolics. In: The Chemistry and Biochemistry of Plant Proteins. Eds: J. B. Harborne; C. F. Van Sumere. Academic Press, New York.
- VARELA, G.; FÓNOLLA, J.; RUANO, J., 1965. Influencia del Maiz Sobre el Valor Nutritivo y la Digestibilidad de la Bellota en Cerdos. Avances en Alimentación Animal, 6, 221.
- VERITE, R.; JOURNET, M., 1978. In: Alimentation des Ruminants. Ed: INRA Publications. (Route de SaintCyr), 78000 Versailles.
- VERITE, R.; JOURNET, M.; Jarrige, R., 1979. A New System for the Protein Feeding of Ruminants: The PDI System. Livestock Production Science, 6, 349.
- VIJIAN, V. K.; KATIVAR, R. C., 1973. Types of Tannins in Deoiled Salseed-Meal and Oak-Kernel and Their Metabolic Behaviour in Sheep. Indian Journal of Animal Sciences, 43, 398.
- VOHRA, P.; KRATZER, F. H.; JOSLYN, M. A., 1966. The Growth Depressing and Toxic Effects of Tannins to Chicks. Poultry Science, 45, 135.
- WAH, C. S.; SHARMA, K.; JACKSON, M. G., 1977. Studies of Various Chemical Treatments of Sal-Seed-Meal to Remove or Inactivate Tannins. Indian Journal of Animal Sciences, 47, 8.
- WALKER, D. J.; NADER, C. J., 1968. Method for Measuring Microbial Growth in Rumen Content. Applied Microbiology, 16, 1124.
- WALTER, W. M. (Jr.); PURCELL, A. E., 1979. Evaluation of Several Methods for Analysis of Sweet Potato Phenolics. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 27, 942.
- WARNER, A. C. I., 1981. Rate of Passage of Digesta Through the Gut of Mammals and Birds. Nutr. Abstr. Rev., Series B, 51, 789.
- WARNER, A. C. I.; STACY, B. D., 1968. The Fate of Water in the Rumen. 1. A Critical Appraisal of the Use of Soluble Markers. British Journal of Nutrition, 22, 369.
- WATERMAN, P. G.; MBI, C. N.; MC KEY, D. B.; GARTHAN, J. S., 1980. African Rain-Forest Vegetation and Rumen Microbes: Phenolic Compounds and Nutrients as Correlates of Digestibility. Oecologia (Berl.), 47, 22.
- WATSON, T. G., 1975. Inhibition of Microbial Fermentations by Sorghum Grain and Malt. Journal of Applied Bacteriology, 38, 133.
- WEBER, C. W., 1969. Grain Sorghum for Poultry. Proc. of the 13th Annual Poultry Industry Day, University of Arizona, Tucson, USA.

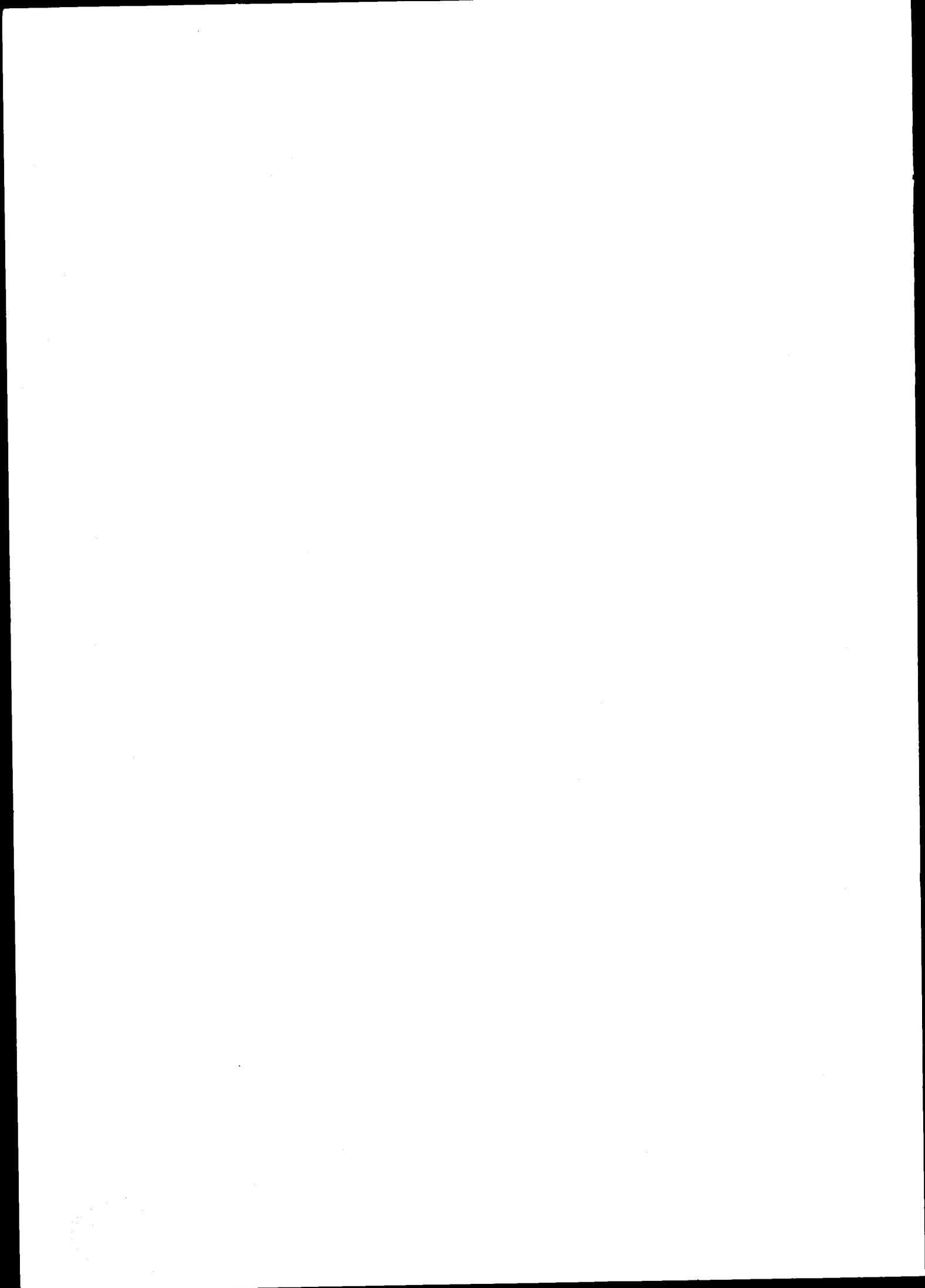
- WELLER, R. A.; PILGRIM, A. F., 1974. Passage of Protozoa and Volatile Fatty Acids from the Rumen of the Sheep and from a Continuous *in vitro* Fermentation. British Journal of Nutrition, 32, 341.
- WESTON, R. H.; HOGAN, J. P., 1967. The Digestion of Chopped and Ground Roughages by Sheep. I. The Movement of Digesta Through the Stomach. Australian Journal of Agricultural Research, 18, 789.
- WESTON, R. H.; HOGAN, J. P., 1968. The Digestion of Pasture Plants by Sheep. II. The Digestion of Ryegrass at Different Stages of Maturity. Australian Journal of Agricultural Research, 19, 963.
- WILKINS, H. L.; BATES, R. P.; HEMSON, P. R.; LONDHAL, L. L.; DAVIS, R. E., 1953. Agronomy Journal, 45, 335.
- WILLIAMS, A. H., 1963. In: *The Enzyme Chemistry of Phenolic Compounds*. Ed: J. B. Pri-dham, Pergamon, Oxford and Mac Millan, New York.
- WILLIAMS, A. G., 1982. In: *Report of the Hannah Research Institute*, 1982, 93.
- WOLTER, R., 1974. La Toxicité des Glands. Revue de Médecine Vétérinaire (Toulo-use), 125, 1481.
- ZELTER, S. Z.; LEROY, F., 1966. Schutz der Nahrungsproteine Gegen Microbielle De-saminierung im Pansen. Z. Tierphysiol., Tierernähr. u. Futtermittelkde, 22, 39.
- ZELTER, S. Z.; LEROY, F.; TISSIER, J. P., 1970. Protection des Protéines Alimentaires Contre la Désamination Bactérienne Dans le Rumen. I. Études *in vitro* : Comportement en Milieu de Rumen de Quelques Protéines Tannées A-vec du Tannin de Châtaignier ou Certaines Aldéhydes. Annales de Bi-ologie Animale, Biochimie et Biophysique, 10, 111.
- ZINN, R. A.; OWENS, F. N., 1983. Influence of Feed Intake Level on Site of Digesti-on in Steers Fed a High Concentrate Diet. Journal of Animal Scien-ce, 56, 471.
- ZANOBINI, A.; VANNI, P.; FIRENZUOLLI, A. M., 1967. Effect of Tween 80 on Protein - Tannic Acid Complex. Experientia, 23, 1015.
- ZORITA, E.; ARIAS, S. R., 1965. La Harina de Bellota en la Alimentación de los Pol-los de Carne. Revista de Nutrición Animal, 3, 105.

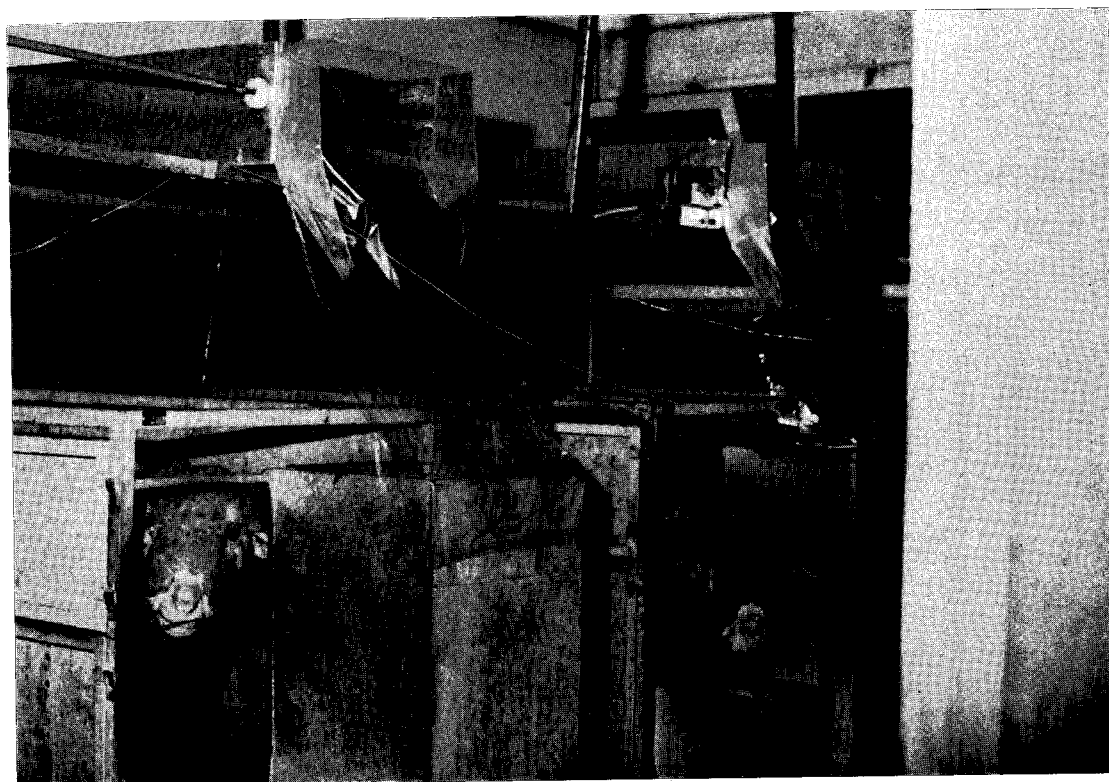




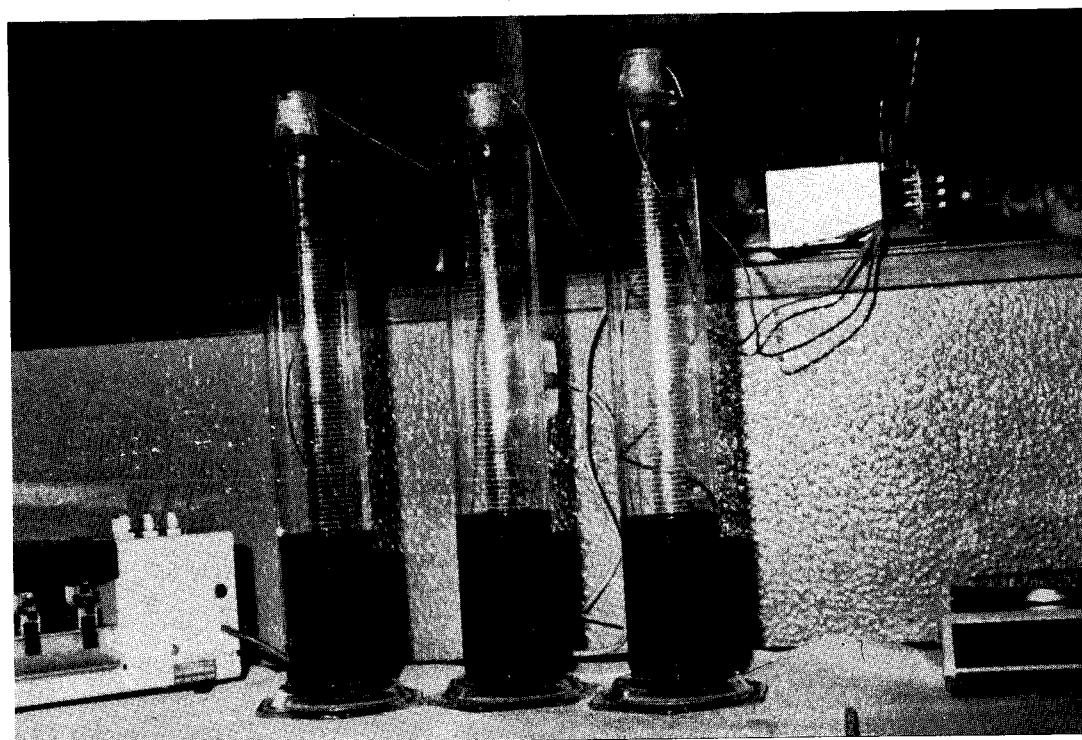
Aparelhos de incubação e colheita de gás utilizados em estudos no rumen "in vitro"



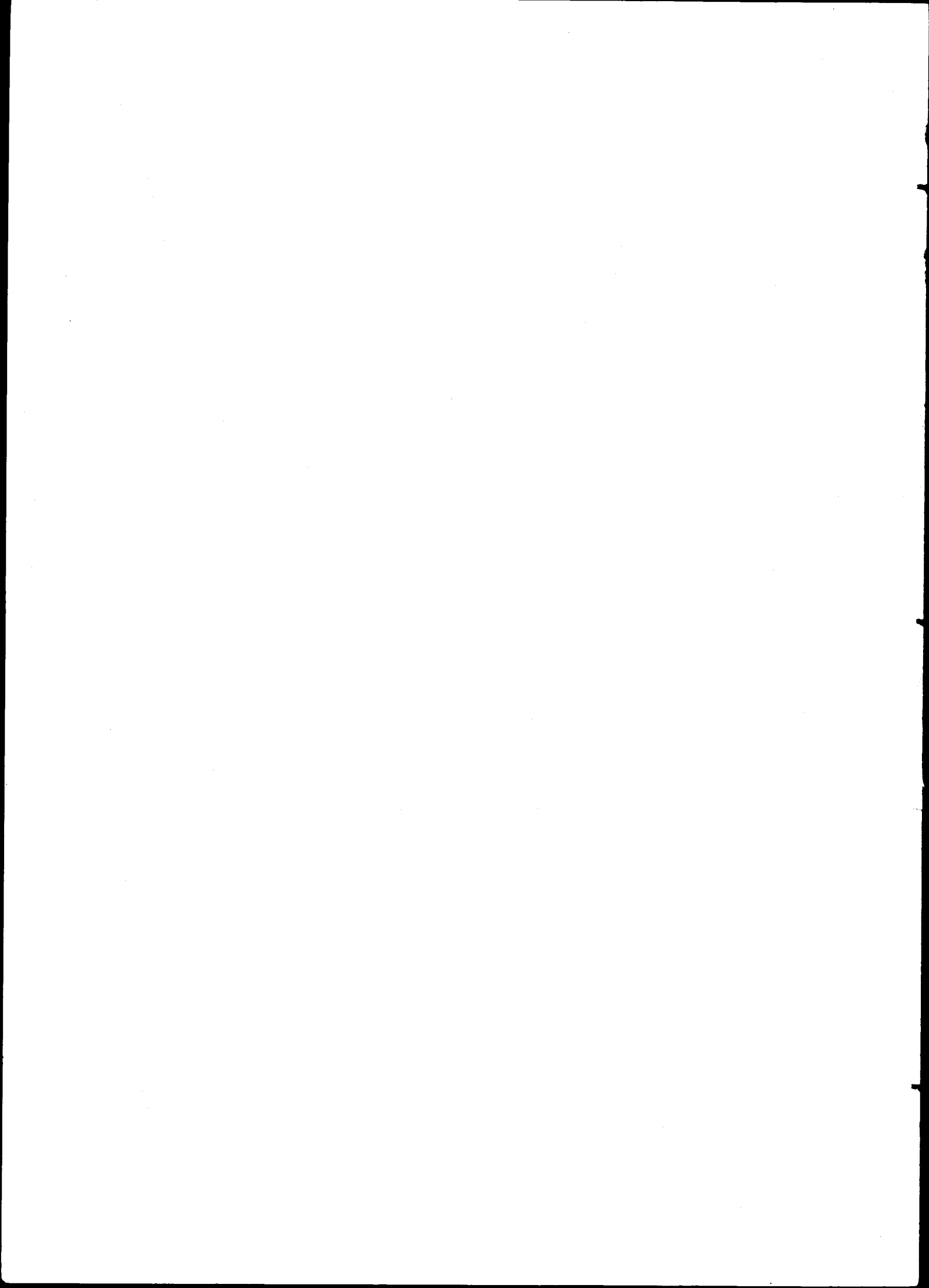


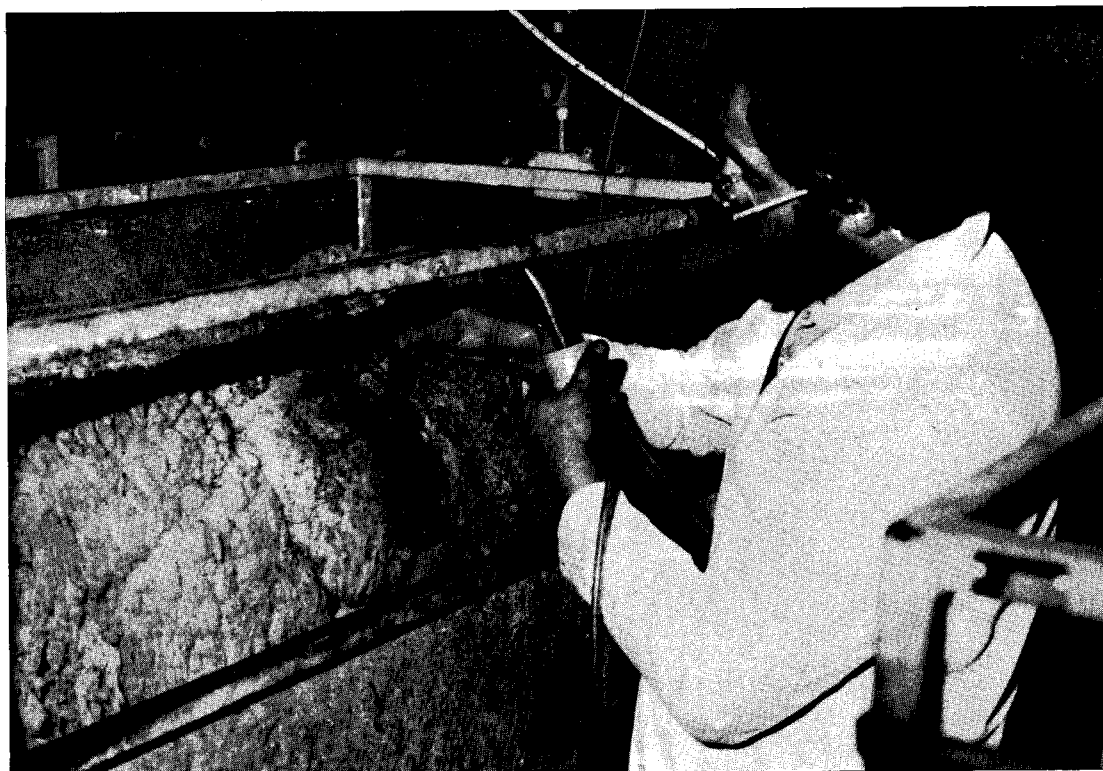


Aspecto geral da sala onde decorreu o ensaio descrito no Cap.V, observando-se os alimentadores contínuos

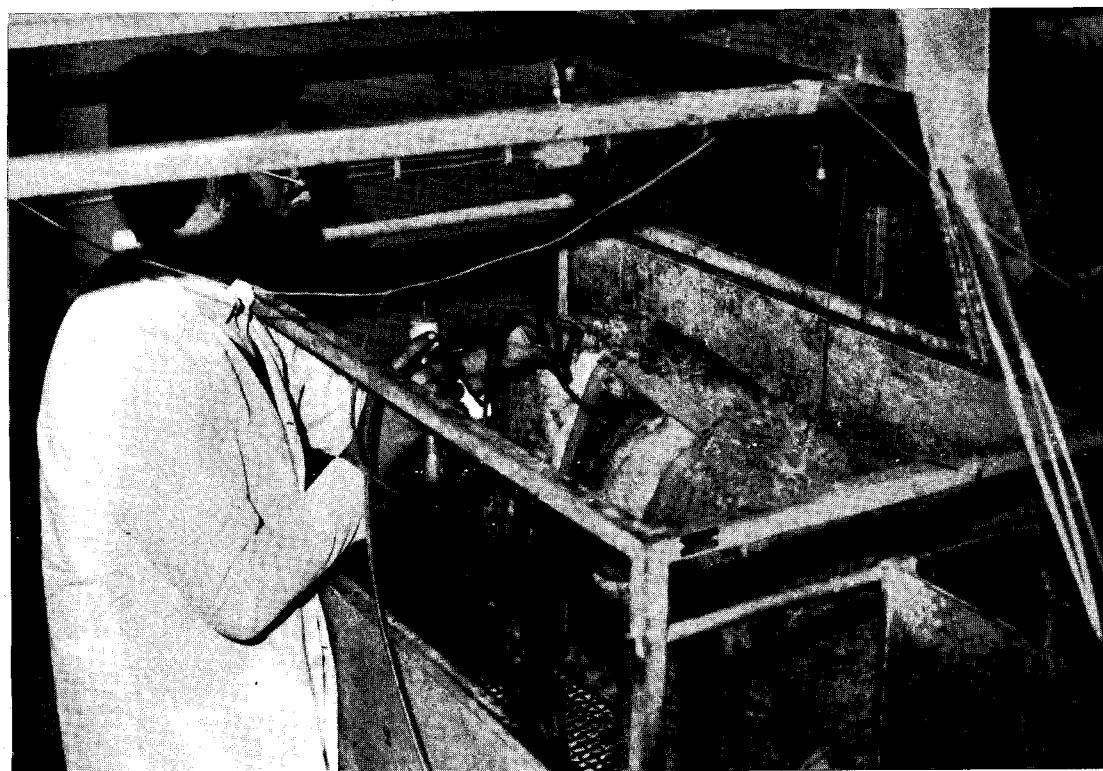


Equipamento para infusão contínua do marcador da fase líquida da digesta

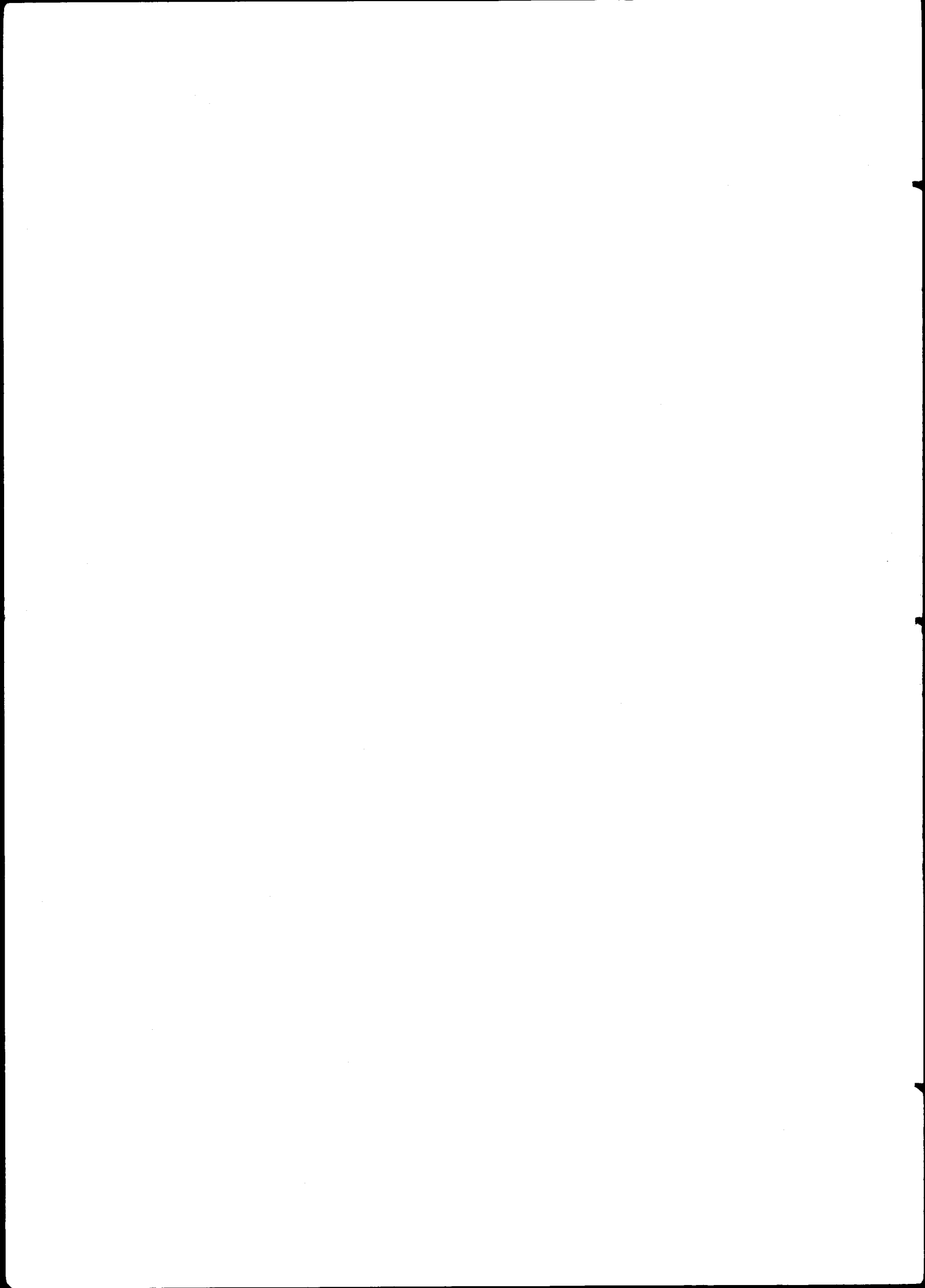




Colheita da digesta ruminal



Colheita da digesta duodenal



Composição e impressão:

Serviços de reprografia

Universidade de Évora

Núcleo da Mitra

Tiragem: 65 exemplares

Évora - 1986

21