

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E
QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS
FENÓLICOS EM FORRAGEIRAS**

FABÍOLA FONSECA LAGE

2009

FABÍOLA FONSECA LAGE

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E QUANTIFICAÇÃO DE
COMPOSTOS FENÓLICOS EM FORRAGEIRAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Química Ambiental, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora
Profa. Dra. Adelir Aparecida Saczk

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Lage, Fabíola Fonseca.

Caracterização química e quantificação de compostos fenólicos em
forrageiras / Fabíola Fonseca Lage. – Lavras : UFLA, 2009.
107 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.
Orientador: Adelir Aparecida Saczk.
Bibliografia.

1. Gramínea. 2. Leguminosas. 3. Consórcio. 4. Compostos
fenólicos. 5. CLAE. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.289

FABÍOLA FONSECA LAGE

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E QUANTIFICAÇÃO DE
COMPOSTOS FENÓLICOS EM FORRAGEIRAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Química Ambiental, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 29 de julho de 2009

Prof. Dr. Leonardo Luiz Okumura	UFV
Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso	UFLA

Profa. Dra. Adelir Aparecida Saczk
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

DEDICO

À Deus

Buscai em primeiro lugar o Reino de Deus e a sua justiça e todas as coisas vos serão dadas em acréscimo.

Mt 6,33

Obrigado Senhor, porque mesmo quando eu não fui fiel, tudo tendes me acrescentado.

À minha mãe

Que me ensinou a lutar pelo que acredito e a amar ao próximo. Sem a sua ajuda e compreensão eu nunca teria conseguido chegar até aqui. Obrigado pela dedicação, incentivo e principalmente por seu amor.

Às minhas irmãs e meus queridos sobrinhos

Flaviane e seus filhos Alencar Henrique e Clarissa, Flávia e Fernanda pelo incentivo, amizade e por serem a minha família tão especial e querida. Obrigado por todos os momentos felizes que vivemos juntas.

AGRADECIMENTOS

Triunfe em vossos corações a paz de Cristo, para a qual fostes chamados a fim de formar um único corpo. E sede agradecidos.

Cl. 3, 15

À Deus, por suas bênçãos.

À Nossa Senhora Aparecida, a quem este projeto foi consagrado, por sua proteção e intercessão.

À Profa. Adelir Aparecida Saczk, pela amizade, orientação, paciência e apoio.

Ao Prof. Dr. Antônio Ricardo Evangelista, pelos esclarecimentos e co-orientações.

À Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso, pela simpatia e disposição em ajudar.

Ao Prof. Dr. Augusto Ramalho de Moraes, pela análise estatística.

À Elisângela, Fernanda e principalmente Meryene, por sua boa vontade e ajuda. Sem vocês seria impossível concluir este projeto.

À Tina, Sandra, Cleusa e Sr. Miguel do Laboratório de Pesquisa Vegetal, no Departamento de Ciência dos Alimentos, por tudo que aprendi com vocês e pelos bons momentos que compartilhamos juntos.

À Xulita, Polyana, Estela e Milena, pela ajuda certa, na hora certa.

Às minhas tias Iára, Dalca e Magda por me apoiarem sempre que eu preciso.

Aos meus amigos na fé Fernanda, Vitor, Juliana, Edson e Rafael, por terem sido meu apoio nos momentos mais difíceis.

À minha amiga Jane Cherem, minha grande incentivadora.

Às amigas Elaine e Amélia, pela amizade sincera.

Ao CNPq, financiador deste projeto.

Ao pessoal do Departamento de Zootecnia, na pessoa de Márcio e Eliane.

Ao pessoal do laboratório de Análise Foliar do Departamento de Química.

Ao Centro de Análise de Prospecção Química e ao laboratório de Bioquímica do Departamento de Química.

Às demais pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

*Nada te perturbe,
Nada te amedrontes,
Tudo passa,
A paciência tudo alcança.
A quem tem Deus,
Nada falta,
Só Deus basta.
Santa Teresa D'ávila*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE GRÁFICOS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE SIGLAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Gramíneas do gênero <i>Cynodon</i>	3
2.2 Leguminosa do gênero <i>Stylosanthes</i>	5
2.3 Leguminosa do gênero <i>Arachis</i>	7
2.4 Uso de leguminosas em consórcio nas pastagens.....	10
2.5 Compostos fenólicos.....	11
2.5.1 Ácidos fenólicos.....	12
2.5.2 Taninos.....	14
2.5.2.1 Taninos hidrolisáveis.....	17
2.5.2.2 Taninos condensados.....	19
2.6 Quantificação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência.....	21
3 OBJETIVOS.....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 Local e instalação do experimento.....	26
4.2 Coleta e preparo das amostras.....	26
4.3 Análises laboratoriais.....	27
4.3.1 Determinação da porcentagem de matéria seca.....	27
4.3.2 Determinação dos teores de cálcio e fósforo.....	28

4.3.3 Determinação do teor de proteína bruta.....	29
4.3.4 Determinação do teor de fibra detergente neutro.....	30
4.3.5 Determinação do teor de fibra detergente ácido.....	31
4.3.6 Determinação do teor de lignina.....	32
4.3.7 Determinação do teor de polifenóis totais pelo método Folin - Denis.....	33
4.4 Extração dos compostos fenólicos nas forrageiras.....	33
4.5 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	34
4.5.1 Material.....	34
4.5.2 Reagentes e padrões.....	34
4.5.3 Estudo cromatográfico dos compostos fenólicos.....	34
4.6 Análise estatística.....	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1 Teor de matéria seca.....	37
5.2 Teor de fósforo.....	39
5.3 Teor de cálcio.....	42
5.4 Teor de proteína bruta (PB).....	45
5.5 Teor de fibra detergente neutro (FDN).....	47
5.6 Teor de fibra de detergente ácido (FDA).....	50
5.7 Teor de lignina.....	52
5.8 Teor de polifenóis totais.....	54
5.9 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	57
5.9.1 Quantificação dos compostos fenólicos.....	69
6 CONCLUSÕES.....	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
ANEXOS.....	94

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Capim Coastcross.....	3
FIGURA 2 Stylosanthes Campo Grande.....	6
FIGURA 3 Stylosanthes Mineirão.....	6
FIGURA 4 Amendoim Belmonte.....	8
FIGURA 5 Amendoim Amarillo.....	8
FIGURA 6 Estruturas químicas dos ácidos vanílico, gálico e elágico.....	13
FIGURA 7 Estruturas químicas dos ácidos p-cumárico, o-cumárico, caféico e ferúlico.....	14
FIGURA 8 Taninos hidrolisáveis (Lima et al, 2007).	17
FIGURA 9 A) Estrutura de pentagaloilglucopiranoose (galotanino); B) trigaloil-HHDP-glucopiranoose (elagitanino) (Salminen, 1999).....	18
FIGURA 10 Fórmulas estruturais: a) um flavonóide genérico; b) monômero flavonóide; c) procianidina (tanino condensado).....	20
FIGURA 11 Cromatograma referente à amostra de capim “Coastcross”: 1= ácido gálico, 2 = epicatequina, 3 = ácido caféico, 4 = vanilina, 5 = ácido p-cumárico, 6 = ácido ferúlico e 7 = ácido elágico.....	70
FIGURA 12 Cromatograma referente à amostra Stylosanthes Campo Grande: 1 = ácido gálico; 2 = galocatequina; 3 = epicatequina; 4 = ácido caféico; 5 = ácido p-cumárico; 6 = ácido ferúlico e 7 = ácido m-cumárico.....	70
FIGURA 13 Cromatograma referente à amostra de Sthylosanthes Mineirão: 1= ácido gálico, 2 = galocatequina, 3 = epicatequina, 4 = ácido caféico, 5 = ácido p-cumárico, 6 = ácido ferúlico, 7 = ácido m-cumárico e 8 = ácido elágico.....	71

FIGURA 14 Cromatograma referente à amostra de Amendoim Belmonte: 1 = ácido gálico; 2 = epicatequina; 3 = ácido caféico; 4 = ácido o-cumárico; 5 = ácido elágico.....	71
FIGURA 15 Cromatograma referente à amostra de Amendoim Amarello: 1 = epicatequina, 2 = ácido m-cumárico, 3 = ácido o-cumárico e 4 = ácido elágico.	72

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 Cromatograma da solução de ácidos fenólicos com detecção espectrofotométrica em 280 nm. Identificação dos picos.	58
GRÁFICO 2 Curva analítica obtida a partir das soluções de ácido gálico.	60
GRÁFICO 3 Curva analítica obtida a partir das soluções de ácido elágico.	61
GRÁFICO 4 Curva analítica obtida a partir das soluções de ácido ferúlico.	61
GRÁFICO 5 Curva analítica obtida a partir das soluções de ácido meta-cumárico.	62
GRÁFICO 6 Curva analítica obtida a partir das soluções de ácido orto-cumárico.	62
GRÁFICO 7 Curva analítica obtida a partir das soluções de ácido para-cumárico.	63
GRÁFICO 8 Curva analítica obtida a partir das soluções de ácido caféico.	63
GRÁFICO 9 Curva analítica obtida a partir das soluções de catequiza.	64
GRÁFICO 10 Curva analítica obtida a partir das soluções de epicatequina.	64
GRÁFICO 11 Curva analítica obtida a partir das soluções de galato de epigallocatequina.	65
GRÁFICO 12 Curva analítica obtida a partir das soluções de galocatequina. ...	65
GRÁFICO 13 Curva analítica obtida a partir das soluções de quercetina.	66
GRÁFICO 14 Curva analítica obtida a partir das soluções de vanilina.	66

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Composição do gradiente da fase móvel.....	35
TABELA 2 Teores de matéria seca (%) de gramínea “Coastcross” solteira e em consórcio.	37
TABELA 3 Teores de matéria seca (%) de leguminosas em consórcio com gramínea “Coastcross”.....	37
TABELA 4 Teores de fósforo (%) de gramínea “Coastcross” solteira e em consórcio, adubadas e não adubadas.....	39
TABELA 5 Teores de fósforo (%) de leguminosas em consórcio com gramínea “Coastcross” colhidas, adubadas e não adubadas.	40
TABELA 6 Teores de cálcio (%) de gramínea “Coastcross” solteira e em consórcio, colhidas em diferentes datas.	43
TABELA 7 Teores de cálcio (%) em leguminosas em consórcio com gramínea “Coastcross”, colhidas em diferentes datas.....	43
TABELA 8 Teores de PB (%) de gramínea “Coastcross” solteira e em consórcio adubadas e não adubadas, colhidas em diferentes datas.	45
TABELA 9 Teores de PB (%) de leguminosas em consórcio com gramínea “Coastcross” adubadas e não adubadas, colhidas em diferentes datas.	46
TABELA 10 Teores de FDN (%) de gramínea “Coastcross” solteira e em consórcio.....	48
TABELA 11 Teores de FDN (%) de leguminosas em consórcio com gramínea “Coastcross”.....	48
TABELA 12 Teores de FDA (%) de gramínea “Coastcross” solteira e em consórcio.....	50
TABELA 13 Teores de FDA (%) de leguminosas em consórcio com gramínea “Coastcross”.....	50

TABELA 14 Teores de lignina (%) de gramínea “Coastcross”, solteira e em consórcio.	52
TABELA 15 Teores de lignina (%) de leguminosas, em consórcio com gramínea “Coastcross”	53
TABELA 16 Teores de polifenóis (mg/100g de polifenóis na MS) de gramínea “Coastcross” solteira e consorciada, adubadas e não adubadas. ...	55
TABELA 17 Teores de polifenóis (mg/100g de polifenóis na MS) de leguminosas em consórcio com gramínea “Coastcross”, adubadas e não adubadas.	56
TABELA 18 Otimização dos parâmetros cromatográficos em diferentes proporções de metanol.	59
TABELA 19 Limites de detecção (LD), limites de quantificação (LQ) e linearidade dos compostos fenólicos analisados.	67
TABELA 20 Médias das áreas dos picos, para os compostos fenólicos obtidos de injeções consecutivas de três diferentes concentrações e os respectivos desvios padrões relativos (%RSD).	68
TABELA 21 Recuperação dos compostos fenólicos em amostras de forrageiras.	69
TABELA 22 Concentrações em µg/mg de MS de composto fenólicos em forrageiras adubadas.	73
TABELA 23 Concentrações em µg/mg de MS de composto fenólicos em forrageiras não adubadas.	74

LISTA DE SIGLAS

CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
PB	Proteína Bruta
DIVMS	Digestibilidade in vitro de Matéria Seca
FDA	Fibra de Detergente Ácido
FDN	Fibra de Detergente Neutro
CIAT	Centro Internacional de Agricultura Tropical
HHDP	(Hexa - hidroxidifenoila)
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
DMS	Dimetilsulfóxido
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
NNP	Nitrogênio Não Protéico
AA	Amendoim Amarello
AB	Amendoim Belmonte
SCG	Stylosanthes Campo Grande
SM	Stylosanthes Mineirão
MS	Matéria Seca

RESUMO

LAGE, Fabíola Fonseca. **Caracterização química e quantificação de compostos fenólicos em forrageira**. 2009. 107 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.¹

A caracterização química e a determinação dos compostos fenólicos presentes em forrageiras são de grande importância por permitirem um melhor uso dessas plantas na nutrição dos animais. Este estudo caracterizou química e bromatologicamente as forrageiras *Stylosanthes guianensis* cultivares Mineirão e Campo Grande, *Arachis pintoi* cultivares Amendoim Belmonte e Amendoim Amarillo, em consórcio com o capim “Coastcross”. Identificou e quantificou compostos fenólicos presentes nessas forrageiras usando a técnica cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplado a um detector de arranjo de diodos. As leguminosas cultivadas em consórcio obtiveram teores de matéria seca (MS), fibra em detergente neutro (FDA), fibra em detergente neutro (FDN) e lignina mais adequados para a nutrição animal e teores de fósforo, cálcio e proteína bruta (PB) mais elevados que a gramínea “Coastcross”. Apenas os teores de fósforo da gramínea “Coastcross” adubada apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) com o consórcio. Não foi observado aumento no teor de PB na gramínea consorciada devido ao curto período de condução deste experimento. A leguminosa consorciada que apresentou os melhores resultados para todos os parâmetros avaliados foi a Amendoim Amarillo. O consórcio não interferiu no teor de polifenóis das gramíneas e no geral esses teores foram mais altos para as leguminosas. Foram identificados e quantificados ácidos fenólicos (ácido ferúlico, ácidos p-cumárico, m-cumárico, o-cumárico), ácidos derivados da hidrólise de taninos hidrolisáveis (ácido gálico, ácido elágico e ácido caféico), monômeros de taninos condensados (catequina, epicatequina, galato de epigalocatequina, galocatequina), vanilina e quercetina utilizando a técnica CLAE. As concentrações de ácidos derivados da hidrólise taninos hidrolisáveis encontradas foram de 0,19 a 113,98 $\mu\text{g mg}^{-1}$ MS. As concentrações de monômeros de taninos condensados foram superiores ao considerado seguro para os ruminantes (0,72 a 126,8 $\mu\text{g mg}^{-1}$ MS), sendo necessário um estudo criterioso desses teores, quando for necessário estabelecer consórcio de pastagens entre a gramínea “Coastcross” e as leguminosas estudadas. As concentrações de ácidos fenólicos aumentaram nas forrageiras adubadas com o

¹ Comitê Orientador: Adelir Aparecida Saczk (Orientadora) e Antonio Ricardo Evangelista - UFLA.

avanço da idade das plantas e suas concentrações ficaram em torno de 0,74 a 27,49 $\mu\text{g mg}^{-1}$ MS.

Palavras chave: Gramíneas, leguminosas, consórcio, compostos fenólicos, CLAE.

ABSTRACT

LAGE, Fabíola Fonseca. **Chemical characterization and quantification of phenolic compounds in forage grasses**. 2009. 107 p. Dissertation (Master in Agrochemistry) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.²

The chemical characterization and determination of the phenolic compounds present in forage is of great importance as it allows for a better use of these plants in animal nutrition. This study characterized the chemical and bromatological composition of the forages *Stylosanthes guianensi*; Mineirão and Campo Grande cultivars, and *Arachis pintoi*; Amendoim Belmonte and Amendoim Amarello cultivars, in association with “Coastcross” grass. The phenolic compounds present in these forage crops were identified and quantified using the high-performance liquid chromatography technique (HPLC) coupled to a diode array detector. The legumes cultivated in association obtained more appropriate levels, for animal nutrition, of dry matter (DM), acid detergent fiber (ADF), neutral detergent fiber (NDF) and lignin and higher phosphorous, calcium and raw protein (RP) levels than “Coastcross” grass. Only the phosphorous levels of fertilized “Coastcross” grass presented significant difference ($P < 0.05$) from those in association. An increase was not observed in the level of RP in the associated grass due to the short duration period of this experiment. The legume, in association, which presented the best results for all of the appraised parameters was the Amendoim Amarello. The association did not interfere in the level of polyphenols of the grasses, and in general, these levels were higher for the legumes. The phenolic acids (ferulic acid, p-coumaric, m-coumaric, o-coumaric acids), acids derived from the hydrolysis of hydrolysable tannins (gallic acid, ellagic acid and caffeic acid), condensed tannin monomers (catechin, epicatechin, epigallocatechin-gallate, galocatechin), vanillin and quercetin were identified and quantified using the HPLC technique. The concentrations of acids derived from the hydrolysis of hydrolysable tannins found were from 0.19 to 113.98 $\mu\text{g mg}^{-1}$ MS. The concentrations of condensed tannin monomers were superior to those considered safe for ruminants (0.72 to 126.8 $\mu\text{g mg}^{-1}$ MS). A more in-depth study of these levels is necessary when the establishment of pastures associating “Coastcross” grass and the studied legumes becomes necessary. The concentrations of phenolic acids increased in the fertilized forage crops with the progress of the age of the plants. The concentrations were around 0.74 to 27.49 $\mu\text{g mg}^{-1}$ MS.

² Orientation committee: Adelir Aparecida Saczk (Advisor) e Antonio Ricardo Evangelista - UFLA.

Keywords: Grasses, legumes, association, phenolic compounds, HPLC.

1 INTRODUÇÃO

A utilização de pastagens com alto valor nutritivo é um dos fatores de maior importância para a redução de custos na pecuária. Na formação dessas pastagens um dos graves problemas verificados é a baixa fertilidade natural dos solos, fator limitante da produtividade e sustentabilidade das pastagens tropicais, tornando seu valor nutritivo baixo, principalmente na época da seca (Queiroz et al., 2002).

Pastagens de alto valor nutritivo podem ser obtidas com a introdução de forrageiras associadas a leguminosas. Tem-se um número relativamente alto de gramíneas e leguminosas com potencial forrageiro para formação de pastagens, mas o sucesso na utilização das espécies depende de conhecimentos que permitam desde a escolha da espécie mais apropriada às condições do solo e clima da região, até a adoção de práticas de manejo que garantam o seu desenvolvimento e a sua persistência, e maximizem a sua produtividade e seu valor nutritivo (Nozella, 2001).

As leguminosas possuem um bom potencial para serem empregadas na alimentação animal, podendo ser exploradas para pastejo direto ou, se conservadas, para fornecimento na forma de feno ou silagem. Apresentam a vantagem de serem, de modo geral, ricas em proteína, cálcio e magnésio e apresentarem menor diminuição em seu valor nutritivo com o avanço da idade, o que concorre para aumentar a produtividade e o valor nutritivo das pastagens (Souza et al., 2002).

As leguminosas são uma boa opção para o consórcio de pastagens com gramíneas. Verifica-se que, de uma maneira geral, a presença de leguminosa promove melhoria nos níveis de proteína bruta da gramínea acompanhante (Pereira, 2001). Além disso, como a leguminosa é fornecedora natural de

nitrogênio ela pode ser utilizada na pastagem para completar a demanda por esse elemento e ainda ser fonte de fósforo, potássio e micronutrientes.

A avaliação de compostos fenólicos presentes nas forrageiras pode auxiliar na escolha do melhor uso, bem como, um melhor entendimento dos efeitos positivos e/ou negativos desses compostos na nutrição dos animais. Algumas leguminosas possuem compostos fenólicos como taninos condensados e taninos hidrolisáveis em sua composição, que são de interesse devido a sua capacidade de complexar proteínas, vitaminas, íons metálicos e minerais. Fatores como condições do solo, clima, espécie e idade das plantas interferem no conteúdo de taninos nas plantas e estas variações tem sido o principal fator que as diferencia quanto à seletividade pelos animais. O efeito direto destes compostos pode interferir no consumo voluntário dos animais, na inibição da fermentação no rumem pela formação de complexos com as proteínas e fibras, tornando-as resistentes à digestão, ou indiretamente, pela ligação com enzimas digestivas, inibindo sua ação catlítica (Pereira, 2001; Godoy, 2007).

Vários métodos têm sido propostos para a quantificação de taninos e polifenóis em leguminosas forrageiras. O uso da técnica CLAE acoplada a vários detectores tem sido utilizado na elucidação da complexibilidade de taninos condensados e hidrolisáveis. Diante da necessidade de melhorar a qualidade nutricional das pastagens brasileiras, a utilização da CLAE para quantificação de compostos fenólicos e a caracterização química e bromatológica em forrageiras torna-se de grande interesse, por permitir um melhor entendimento de seus efeitos nutricionais sobre os ruminantes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Gramíneas do gênero *Cynodon*

O capim “Coastcross” é um híbrido estéril, obtido do cruzamento da cultivar Coastal (*Cynodon nlemfuensis* Vanderist) e o capim-bermuda [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.], de alta digestibilidade, pouco tolerante ao frio, proveniente do Quênia (Bogdan, 1977). Apresenta crescimento perene estolonífero, rizomatoso, com exigência em fertilidade do solo, tolerante à seca, frio e pisoteio, com multiplicação através de mudas por causa da pouca quantidade de sementes férteis, proporcionando rendimento de 15 a 18 t MS/ha/ano, com uma composição química média de 10 a 12% de proteína bruta (PB) e 55 a 60% de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (Dias & Nascimento Júnior, 1997). O capim “Coastcross” pode ser observado na Figura 1.



FIGURA 1 Capim Coastcross.

A composição química das gramíneas “Coastcross” e Tifton 85 foram estudadas por Reis et al. (2001). Os valores observados para matéria seca (MS),

proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), lignina, cálcio e fósforo para a gramínea “Coastcross” foram respectivamente de 33,22%, 8,59%, 86,51%, 47,81%, 8,23%, 0,40% e 0,30% e, para o Tifton 85 34,21%, 7,93%, 89,65%, 50,73%, 9,08%, 0,41% e 0,19%. Este estudo observou as gramíneas em diferentes idades de corte e os autores concluíram que o avanço da idade de 30 para 360 dias afetou a composição química das gramíneas, havendo, em geral, aumentos nos teores de MS, FDA, e lignina e um decréscimo para os demais nutrientes.

Primavesi et al. (2004), ao estudarem os efeitos da adubação nitrogenada na extração de nutrientes e a recuperação aparente de nitrogênio, em gramínea “Coastcross” concluíram que os teores de macro e micronutrientes na parte aérea das plantas da gramínea aumentaram, em geral, com as doses de nitrogênio aplicadas, com exceção do fósforo e do ferro.

A gramínea “Coastcross” também foi estudada por Rocha et al. (2001), juntamente com outras duas gramíneas do gênero *Cynodon* a Tifton 68 e a Tifton 85. Neste foram analisadas as diferenças dos teores de FDN e FDA das gramíneas quando submetidas a diferentes doses de nitrogênio. Os autores observaram que houve diferenças nos teores de FDN: 72,14% para a Tifton 68, 73,03% para a Tifton 85 e 75,16% para a “Coastcross”, e que os teores de FDA foram semelhantes, independente da dose de nitrogênio e da cultivar, sendo os valores de 40,38%, 40,68% e 39,49%, respectivamente.

Avella et al. (2008) determinaram o teor de fenóis totais e a atividade oxidante destes compostos oriundos de 14 forrageiras utilizadas para alimentação animal, dentre elas a forrageira bermuda. Para a determinação dos fenóis totais presentes nas plantas foi utilizado o método Folin Ciocalteu. A concentração de fenóis totais encontrada na amostra foi de $47,27 \pm 1,80$, expressa em mg de ácido fenólico por g de MS, e, a atividade antioxidante foi de $843,33 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os autores concluíram que houve relação entre os conteúdos

dos compostos e a atividade antioxidantes das plantas, pois no geral, plantas com maior teor de polifenóis apresentam maior atividade antioxidante. Esta maior atividade antioxidante ocorre porque os polifenóis funcionam com sequestrantes de radicais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. O teor de polifenóis e a atividade antioxidante encontrados na grama bermuda foram considerados altos, em relação às demais forrageiras.

2.2 Leguminosa do gênero *Stylosanthes*

O gênero *Stylosanthes*, pertencente à família Fabaceae possui 44 espécies, das quais 25 ocorrem no Brasil, especialmente na região do Cerrado, sendo nativo da Américas do Sul e Central. Essa leguminosa é resistente ao pastejo pesado e ao estresse hídrico apresentando alto teor protéico, fácil propagação e manutenção (Lázaro, 2007).

A *Stylosanthes* (Figuras 2 e 3) é uma planta perene, de crescimento ereto e subereto, com potente sistema radicular, que apresenta capacidade de extrair fósforo mesmo em solos de baixo teor desse elemento (Ferreira & Costa, 1977). A maior parte das espécies de *Stylosanthes* ocorre como plantas colonizadoras ou invasoras em pastagens nativas, em solos ácidos e pobres em nutrientes o que a torna uma interessante alternativa para condições de estresse ambiental (Silva, 1998).

Segundo Barcelos et al. (2000) as sementes possuem um tegumento duro que dificulta a absorção de água durante o processo de germinação, sendo necessária a escarificação da semente para que se obtenha uma germinação rápida e uniforme. Os principais mecanismos de persistência de *Stylosanthes*, sob pastejo, são a ressemeadura natural e a sobrevivência das plantas. O primeiro é essencial para *S. macrocephala* e *S. capitata* e o segundo, para *S. guianensis* cv. Mineirão. Na região dos Cerrados, a maioria das variedades de

Stylosanthes é capaz de nodular livremente com estirpes nativas de *Rhizobium*, não sendo necessária a inoculação das sementes.



FIGURA 2 *Stylosanthes* Campo Grande.

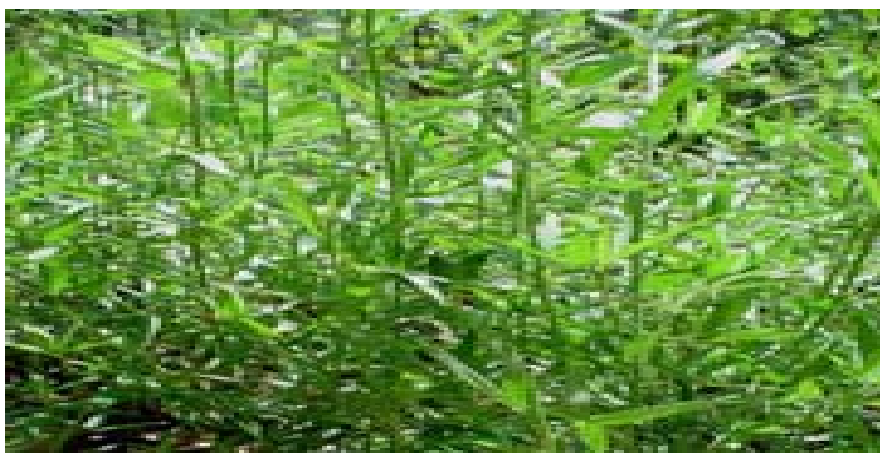


FIGURA 3 *Stylosanthes* Mineirão.

O consumo e a digestibilidade do feno de *Stylosanthes guianensis*, em estágio avançado de maturidade, foram estudados por Ladeira et al. (2001). Os teores de MS, PB, FDN e FDA encontrados pelos autores foram respectivamente

91,6%, 9,8%, 63,7% e 50,1% e a digestibilidade aparente ruminal para os mesmos parâmetros foi de 37,2%, 21,3%, 37,6% e 39,1%. Os autores concluíram que o feno do *Stylosanthes guianensis*, mesmo em estágio avançado de maturidade pode ser indicado para ruminantes, pois é capaz de atender às necessidades energéticas de manutenção, apesar de sua digestibilidade não ser elevada.

A caracterização química e a quantificação de taninos de *Stylosanthes guianensis* cultivares Mineirão e Campo Grande, foi feita por Godoy et al. (2007). Neste estudo utilizou-se o método Folin Cicolteau para determinar fenóis totais e o método butanol-ácido para determinar os taninos condensados nas amostras. Os teores de fenóis totais e taninos condensados para a cultivar Mineirão foram, 26,3 eq/g de ácido tânico por Kg⁻¹ MS e 25,6 eq/g de leucocianidina por Kg⁻¹ MS e para a cultivar Campo Grande 15,6 eq/g de ácido tânico por Kg⁻¹ MS e 3,6 eq/g de leucocianidina por Kg⁻¹ MS. O intervalo 30 – 40 eq/g de leucocianidina por Kg⁻¹ MS é considerado ideal para ingestão de taninos condensados pelos ruminantes. Assim, nenhuma das cultivares estudadas apresentou riscos para os animais, quando fornecida como única fonte de alimento.

2.3 Leguminosa do gênero *Arachis*

O gênero *Arachis* é originário da América do Sul e encontra-se distribuído ao leste dos Andes, entre os rios Amazonas e a Bacia do Prata. Entre as leguminosas do gênero *Arachis* citam-se algumas espécies forrageiras promissoras, tais como, *Arachis pintoii*, *Arachis repens* e *Arachis glabrata* (Miranda et al., 2003).

O amendoim forrageiro (CIAT 17434) do gênero *Arachis* é uma leguminosa herbácea perene, de hábito estolonífero, de crescimento rasteiro, altura de 20 a 40 cm e raiz pivotante, apresentando alta resistência à desfolha

pelo pastejo (Figuras 4 e 5). O florescimento é de quatro a cinco semanas após a emergência das plântulas. A produtividade de sementes é variável nas diferentes regiões e a sua formação ocorre abaixo do nível do solo, e a maioria solta-se das plantas dificultando a colheita (Alves et al., 2009).



FIGURA 4 Amendoim Belmonte.



FIGURA 5 Amendoim Amarillo.

Thomas et al. (1997), ao estudarem o *Arachis pintoi* CIAT 17434 em dois solos da Colômbia, usando a diluição isotópica do ^{15}N como forma de estimar as taxas de fixação de nitrogênio sob a forma de $\text{N}_{2(\text{g})}$ observaram que essa espécie pode fixar até 80% de suas demandas nutricionais de nitrogênio.

A forma de multiplicação em mudas é a que apresenta melhores resultados (pegamento) em relação às demais sementes e estolões. As cultivares mais conhecidas no Brasil são a Belmonte e a Amarillo e Alqueire-1, desenvolvida pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT, Colômbia (Lima et al., 2003). O primeiro acesso dessa espécie foi obtido por coleta realizada em 1954, em Belmonte, no estado da Bahia.

Os estudos agronômicos em sua maioria foram desenvolvidos com germoplasma do material original de *A. pintoi* distribuído pelo CIAT. Esse material identificado como CIAT 17434 ou BRA-013251, de grande potencial forrageiro, foi altamente difundido entre produtores da Austrália (Amarillo), Bolívia e Colômbia (cv. Mani Forragero), Costa Rica (Mani Mejorador), Honduras e México (Pico Bonito). A cultivar Porvenir (CIAT 18744) foi lançada na Costa Rica, em 1998 (Barcellos et al., 2000; Cook et al., 1990; Valls, 1992; Argel & Villarreal, 1998).

A concentração de taninos condensados em amostras de *Arachis Pintoi* foi determinada por Jackson & Barry (1996) utilizando os métodos butanol-ácido e vanilina. A concentração de taninos condensados encontrada pelo método butanol-ácido foi de $100,4 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$, sendo $71,8 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$ presentes no extrato, $25,1 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$, ligado a proteínas e $3,5 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$, ligado a fibras. A concentração encontrada pelo método da vanilina foi de $30,7 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$, comprovando a maior eficiência do método butanol-ácido na determinação de taninos condensados nessa leguminosa.

2.4 Uso de leguminosas em consórcio nas pastagens

No Brasil 88% da carne bovina produzida tem origem em rebanhos mantidos exclusivamente em pastos. Comparando-se com outros países exportadores de carne, essas pastagens apresentam baixos índices zootécnicos e de produtividade (Almeida et al., 2002).

Paciullo et al. (2003) avaliaram a massa de forragem e a composição botânica de pastagens de *Brachiaria decumbens* Stappf em monocultivo e em consórcio com *Stylosanthes guianensis* (Aubl) Sw. Var. *vulgaris* cv Mineirão em diferentes meses do ano. As análises da massa de forragem dessas pastagens mostraram que, para a *Brachiaria decumbens* não houve variação com o sistema de cultivo, a massa de forragem de leguminosa decresceu ao longo do ano e a pastagem em consórcio apresentou massa de forragem total maior que a do monocultivo. Os teores de PB e FDN de *Brachiaria decumbens* encontrados foram 7,6% e 65,8%, respectivamente, e de *Stylosanthes guianensis* foram 14,15% e 57,45%. Os autores concluíram que a leguminosa contribuiu no aumento da massa e no valor nutritivo da forragem disponível na pastagem consorciada.

O efeito da competição no crescimento da gramínea forrageira *Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzânia em consórcio com as leguminosas forrageiras *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão e *Neonotomia wighii* cv. comum (soja perene), nos sistemas de plantio solteiro e consórcio foi estudado por Rosa et al. (2007). No consórcio da gramínea Tanzânia com o *stylosanthes* a altura das plantas, a produção de MS, o índice de área foliar e a taxa de crescimento de cultura foram maiores que no plantio solteiro e no consórcio com soja perene. Os autores concluíram que o consórcio entre Tanzânia e *stylosanthes* foi favorável para a produção de MS e o crescimento dessa gramínea e que, no consórcio com soja perene ocorre a inibição mútua e no consórcio com *stylosanthes* ocorre compensação, ocorrendo duas formas de competição.

Dessa forma, o uso de espécies de gramíneas e leguminosas forrageiras adaptadas, com grande capacidade produtiva e nutricional, corretamente manejadas e adubadas, associadas ao melhoramento genético do rebanho, pode representar um grande salto na atividade pecuária, garantindo elevadas produções por unidade de área.

2.5 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários provenientes da via metabólica do ácido chiquímico a partir de carboidratos, ou pela via do acetato-polimalato que se inicia com acetil-coenzima A e malonil-coenzima A. A origem biogenética determina o padrão de substituição do composto fenólico resultante. Pela via do ácido chiquímico obtêm-se compostos com grupos hidroxila em posição orto, que se formam a partir do ácido cinâmico. Por outro lado, a via do acetato-polimalato origina compostos com grupos hidroxila dispostos em meta (Simões et al., 2007).

Os compostos fenólicos estão presentes nos vegetais de forma livre ou ligados a açúcares (glicosídios) e proteínas e englobam desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização (Soares, 2002). Atualmente, encontram-se mais de 4000 estruturas fenólicas conhecidas. A grande variedade desses compostos deve-se ao fato de estarem ligados com grupos hidroxilas, metoxilas e estarem conjugados com açúcares (Oliveira, 2005).

Em razão da grande diversidade de processos metabólicos na formação de substâncias fenólicas, é difícil estimar o teor quantitativo nos tecidos das plantas de um modo absoluto (Evaristo & Leitão, 2001). Normalmente, a cada espécie vegetal está associada uma determinada família de polifenóis como mais importante, cujos teores aumentam com a idade e variam com o desenvolvimento vegetativo das plantas. As substâncias fenólicas mais

encontradas em plantas são: ácidos fenólicos, flavonóides e taninos (Santos et al., 2001).

De acordo com Soares (2002) os ácidos fenólicos têm como característica o fato de terem um anel benzênico, um ou mais grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metoxila e outros substituintes na molécula. A determinação de ácidos fenólicos, presentes em amostras de forragens tropicais, pode oferecer informações importantes para a compreensão das limitações envolvidas na digestão ruminal da parede celular de tais espécies.

Os taninos são compostos fenólicos de alto peso molecular e conferem ao alimento a sensação de adstringência. São os polifenóis de maior importância em leguminosas, pois, além de possíveis efeitos sobre a disponibilidade de minerais, a sua importância nutricional parece estar associada à sua influência sobre a digestibilidade das proteínas (Mendonça et al., 2003).

2.5.1 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos pertencem a uma classe de metabólitos secundários, largamente distribuídos em plantas. Soares (2002) afirma que estes ácidos além de se apresentarem em sua forma natural também podem ligar-se entre si ou com outros compostos.

Os ácidos fenólicos são divididos em três grupos: o primeiro é composto pelos ácidos benzóicos, que possuem sete átomos de carbono (C6-C1) e são os ácidos mais simples encontrados na natureza. O segundo grupo é formado pelos ácidos cinâmicos, que possuem nove átomos de carbono (C6-C3), sendo sete os mais comumente encontrados no reino vegetal (ácidos cinâmico, *o*-cumárico, *p*-cumárico, *m*-cumárico, caféico, ferúlico e sinápico). Como terceiro grupo têm-se as cumarinas que são uma classe de metabólitos secundários derivados do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido *o*-cumárico.

Os ácidos vanilínico, gálico e elágico (Figura 6) derivados do ácido benzóico são importantes na nutrição de ruminantes. O ácido vanilínico é obtido após a hidrólise ácida de folhas de gimnospermas e angiospermas, possuindo estreita ligação com a composição da lignina. O ácido gálico é encontrado na natureza na forma de seu dímero de condensação, como ácido elágico, ambos são precursores de taninos hidrolisáveis, polifenóis que ocorrem em forrageiras (Simões et al., 2007).

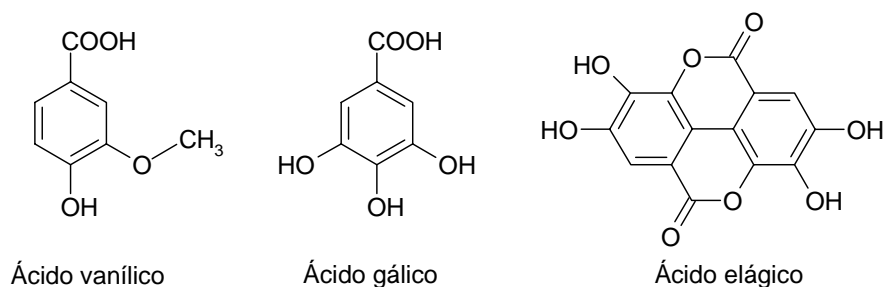


FIGURA 6 Estruturas químicas dos ácidos vanílico, gálico e elágico.

O ácido cinâmico apresenta entre seus ácidos derivados os ácidos p-cumárico, caféico e ferúlico (Figura 7). Esses ácidos estão diretamente envolvidos na associação da lignina com as hemicelulosaes (polioses) da parede celular. As principais formas de interação molecular estão bem estabelecidas e envolvem ligações éster e éter com os carboidratos e unidades condensadas da lignina. Dos componentes da parede celular, a lignina é considerada a que apresenta maior efeito negativo sobre a digestão ruminal (Deschamps & Ramos, 2002). Já o ácido o-cumárico (Figura 7) também derivado do ácido cinâmico tem distribuição restrita, mas é importante por originar facilmente, através da ciclização, a cumarina, que é um constituinte frequentemente responsável pelo odor nos vegetais (Simões et al., 2007).

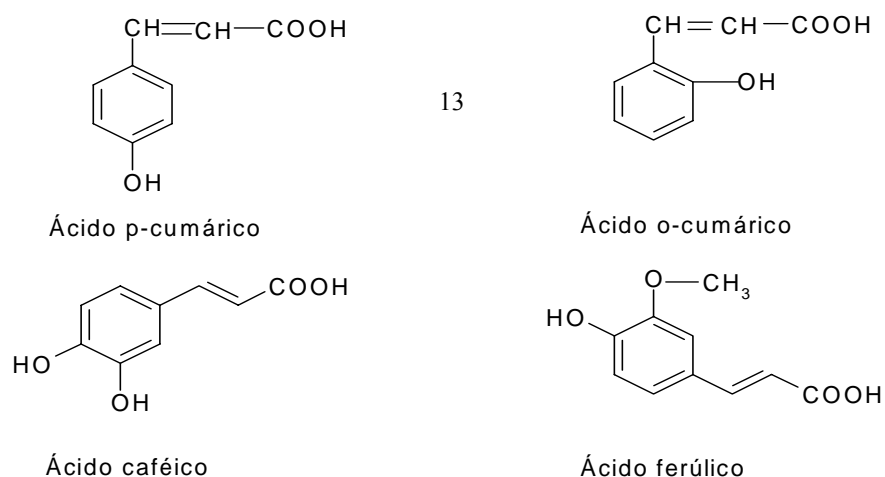


FIGURA 7 Estruturas químicas dos ácidos p-cumárico, o-cumárico, caféico e ferúlico.

Os ácidos fenólicos, principalmente os ácidos p-cumárico e ferúlico agem como suas unidades precursoras na formação da lignina nas plantas (Brito et al., 2003). Os compostos fenólicos derivados da lignina inibem a digestão da celulose e da hemicelulose e a quantidade de compostos fenólicos presentes nos diferentes tecidos das plantas tem sido relacionada com a digestibilidade (Akin, 1982). Assim, conhecer a concentração desses precursores da lignina é de relevante importância no estudo das plantas utilizadas como forragens para os ruminantes.

2.5.2 Taninos

Taninos vegetais são polifenóis naturais de considerável interesse devido a sua habilidade de ligar-se a proteínas e metais (Godoy, 2007). Podem ser classificados em taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os taninos hidrolisáveis, após hidrólise, produzem carboidratos e ácidos fenólicos como os ácidos gálico, caféico, elágico e tânico, já os taninos condensados são resistentes à hidrólise e são oligômeros dos grupos flavan-3-ols (catequina) ou flavan-3,4-

diols (leucoantocianidina) (Nozella, 2001; Silva & Silva, 1999). São responsáveis pela adstringência de muitos frutos e outros vegetais, sendo, também, potentes inibidores de enzimas (Simões et al., 2007).

Segundo Schofield et al. (2001) o termo tanino designa os metabólitos secundários de natureza polifenólica extraídos de plantas. Apresentam alto peso molecular, cerca de 500 a 3000 Dalton e contêm grupos hidroxila-fenólicos em quantidade suficiente para permitir a formação de ligações cruzadas estáveis com proteínas.

Na forma não oxidada, os taninos reagem com as proteínas através de ligações de hidrogênio formando complexos reversíveis, podendo ser solúveis ou insolúveis, dependendo da proporção tanino/proteína, do pH e da força iônica. Quando oxidados, os taninos transformam-se em quinonas, as quais formam ligações covalentes com alguns grupos funcionais das proteínas, principalmente os grupos sulfídricos da cisteína e ϵ -amino da lisina, formando complexos irreversíveis. Esses complexos ocorrem na planta quando seus tecidos são danificados, por auto-oxidação ou oxidação catalisada por enzimas (Simões et al., 2007; Sgarbieri, 1996).

A complexação entre taninos e proteínas é a base para suas propriedades na planta como fator de controle de insetos, fungos e bactérias e por sua capacidade de se combinarem com proteínas da pele animal inibindo a putrefação, processo conhecido como curtimento do couro (Simões et al., 2007; Nozella, 2001). A capacidade dos diversos taninos de se complexarem com proteínas varia conforme a sua estrutura química. O peso molecular e a flexibilidade da molécula são fatores importantes no processo de complexação. Fatores nas estruturas das proteínas tais como na conformação e tamanho do polímero também influenciam na afinidade dessas moléculas com taninos (Simões et al., 2007).

Beelen et al. (2006) afirmam que a maioria das associações tanino-proteína de interesse biológico ocorre por ligações de hidrogênio. Por causa dessas ligações, taninos solúveis podem apresentar efeitos positivos sobre a utilização digestiva e metabólica das proteínas em ruminantes, o que leva a uma diminuição da degradabilidade ruminal, aumentando a disponibilidade de proteína alimentar no duodeno. No entanto, esses efeitos também podem ser negativos, pois os taninos que permanecem livres inibem a fermentação no rúmem.

Conforme Nozella (2001) os taninos são amplamente distribuídos dentro do reino vegetal, sendo comuns tanto em espécies gimnospermas como angiospermas. Dentro das angiospermas são mais comuns em dicotiledôneas, que possuem famílias ricas em taninos como leguminosae (*Stylosanthes guianenses*), anacardiáceas (*Anacardium occidentale* – cajueiro), combretáceas (*Quisqualis indica* – jasmim da Índia), rizhoporaceae (*Bruguiera* – árvore de manguezal), mirtácea (*Psidium cuneatum* – araçá rasteiro), polinaceae (*Cedrus* – cedro).

Em leguminosas e cereais, os taninos receberam atenção por causa de seus efeitos adversos na cor, sabor e qualidade nutricional. Leguminosas que apresentam taninos condensados na fração da fibra alimentar podem ser consideradas indigeríveis ou pobremente digeríveis. Esse é um dos motivos de serem mencionados como limitantes do valor nutritivo dessas plantas (Silva & Silva, 1999; Desphande, 1990).

O fato de taninos formarem complexos com proteínas ao invés de carboidratos e outros polímeros pode explicar esses fatos. Os polifenóis ou taninos condensados são mencionados com frequência como maiores limitantes do valor nutritivo de leguminosas. Animais alimentados com dietas ricas em polifenóis indicam redução da ingestão de alimentos e baixo quociente de eficiência protéica (Silva & Silva, 1999).

2.5.2.1 Taninos hidrolisáveis

Os taninos hidrolisáveis (TH) são poliésteres derivados de açúcares unidos por ligações éster-carboxila, sendo prontamente hidrolisáveis em condições ácidas ou básicas. Sua unidade básica estrutural é um poliol, usualmente uma D-glucose com seus grupos hidroxilas esterificados pelo ácido gálico (galotaninos) ou pelo ácido hexadihidroxifênico (elagitaninos) (Nozella, 2001) (Figura 8).

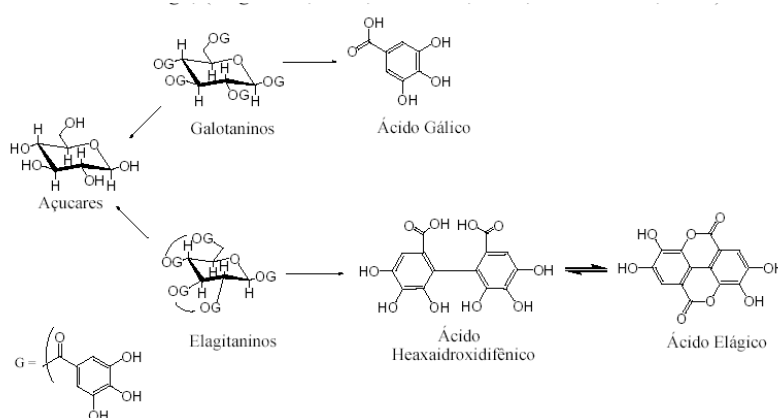


FIGURA 8 Taninos hidrolisáveis (Lima et al., 2007).

Esses ésteres variam sua forma, desde simples compostos como β -D-glucogalina a compostos com alto peso molecular. Quando o núcleo da glucose é esterificado com cinco ou menos grupos galoil, os compostos resultantes são definidos como precursores galotaninos. O galotanino é o hexagaloilglucopiranosose que é formado pela adição de uma unidade de galoil ao núcleo da pentagaloilglucopiranosose, através de ligação meta-depsídio (Salminen, 1999). A Figura 9A apresenta a estrutura química pentagaloilglucopiranos e 9B a estrutura química de trigaloil-HHDP-glucopiranosose.

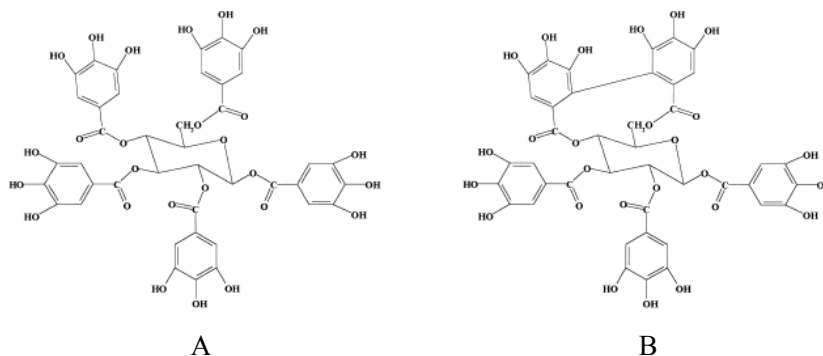


FIGURA 9 A) Estrutura de pentagaloilglucopiranosose (galotanino); B) trigaloil-HHDP-glucopiranosose (elagitanino) (Salminen, 1999).

Supõe-se que os elagitaninos sejam o resultado do acoplamento oxidativo C-C entre dois grupos galoil adjacentes de pentagaloilglucopiranosose para formar hexadihidróxidifenol (HHDP) assim como unidade de trigaloil-HHDP-glucopiranosose – Figura 2B (Salminen, 1999). Os elagitaninos isolados até o momento são monômeros, dímeros, trímeros e tetrâmeros.

Simões et al. (2007) comentam que taninos hidrolisáveis oligômeros são formados pela condensação de unidades monoméricas, usualmente elagitaninos, que se interconectam através de diferentes unidades ligantes como os grupos valoneoila (produto do acoplamento oxidativo entre o oxigênio do HHDP de um monômero e o carbono do ácido gálico de um outro monômero); deidrodigaloila (o acoplamento oxidativo é entre dois grupos de ácido gálico) e o grupo sanguisoboila (produto da condensação entre o éster HHDP e o ácido sanguinosórbico).

Taninos hidrolisáveis ocorrem em dicotiledôneas herbáceas e lenhosas, porém dentro de limites taxonômicos bem definidos (Simões et al., 2007). Além de sofrerem hidrólise por bases e ácidos também sofrem hidrólise pela ação de estereases e sua concentração nas plantas normalmente é baixa. São convertidos em compostos de baixo peso molecular pelo metabolismo microbiano e a digestão gástrica. Alguns desses metabólitos são tóxicos e estão associados a

hemorragias gastroentéricas e necrose do fígado e rins, principalmente em monogástricos (Beelen et al., 2006).

São, em geral, agentes biológicos mais potentes por unidade de massa que os taninos condensados e sua capacidade de precipitar proteínas é diretamente relacionada ao número de grupos galoil. São encontrados em folhas, frutas, vagens de monocotiledôneas e dicotiledônea (Nozella, 2001).

Taninos hidrolisáveis apresentam efeitos tóxicos quando ingeridos por animais. Os efeitos mais frequentes são as hemorragias gastrointestinais e necrose do fígado (Reed, 1995). Esse efeito tóxico é resultado de sua absorção pela corrente sanguínea e o transporte para o fígado dos produtos da sua degradação (Oliveira & Berchielli, 2007).

2.5.2.2 Taninos condensados

Os taninos condensados (TC), ou proantocianidinas, são constituídos por unidades de flavanóides, flavan-3,4-diol (leucoantocianidina) ou flavan-3-ols (catequina). As ligações que ocorrem entre essas unidades são geralmente entre os carbonos quatro de uma estrutura e oito da outra. Variações podem ocorrer por diferentes números de monômeros ligados, pela posição de ocorrência das ligações, pelo padrão de oxigenação dos anéis A e B e da unidade flavan-3-ol e pela estereoquímica dos substituintes do anel C. A Figura 3 apresenta a estrutura de um tanino condensado muito comum, a procianidina (Queiroz et al., 2002).

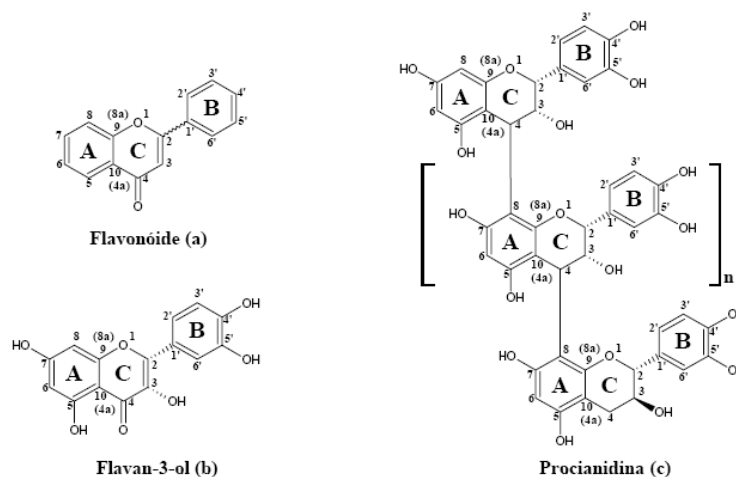


FIGURA 10 Fórmulas estruturais: a) um flavonóide genérico; b) monômero flavonóide; c) procianidina (tanino condensado).

As propriedades dos taninos condensados dependem de sua estrutura em termos de unidades monoméricas (grau de hidroxilação e estereoquímica 2,3 – *cis* ou 2,3 – *trans*), seu grau de polimerização e o tipo de ligação entre flavan-3-ols com uma considerável taxa de variação estrutural (Meagher et al., 2004).

A reatividade de proantocinidinas com moléculas de significância biológica tem importantes consequências nutricionais e fisiológicas. Seus múltiplos grupos hidroxilfenólicos ligam-se com proteínas, íons metálicos e com outras macromoléculas como polissacarídeos, para a formação de complexos (Schofield et al., 2001).

Os taninos condensados podem conter de duas a cinquenta unidades de flavanóides. Possuem estruturas complexas, são resistentes à hidrólise, mas podem ser solúveis em solventes orgânicos aquosos, dependendo de sua estrutura (Nozella, 2001). Como as ligações carbono-carbono dos taninos condensados não são susceptíveis de quebra de hidrólise esses taninos não são absorvidos pelo trato intestinal. Em forrageiras, se a concentração de taninos condensados for acima de 5% da MS na dieta dos ruminantes, esses compostos apresentam importante ação antinutricional. No entanto, quando em baixa

concentração esses polímeros possuem a capacidade de proteger a proteína ingerida de degradação ruminal (Beelen et al., 2006).

Segundo Beelen et al. (2006) a característica mais marcante dos taninos e que explica a maioria das suas propriedades biológicas e antinutricionais é a sua capacidade de formar complexos insolúveis com proteínas. As proteínas com forte afinidade pelos taninos são caracterizadas por apresentarem uma porção de prolina, uma relativa quantidade de aminoácidos de cadeia não polar, elevado peso molecular e estrutura terciária aberta.

Em geral, os taninos condensados ocorrem amplamente em gimnospermas e angiospermas e estão amplamente distribuídos em plantas lenhosas como a *Schinus lentiscifolus* March – aroeira-suja-campo (Simões et al., 2007). Estão presentes em maiores quantidades nos alimentos normalmente consumidos e constituem a segunda fonte de polifenóis do reino vegetal, perdendo apenas para a lignina. Além de serem potentes antioxidantes, possuem larga aplicação industrial na complexação com proteínas (Queiroz et al., 2002).

2.6 Quantificação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência

Para a determinação do teor de taninos em forrageiras, os métodos mais usados na literatura são os espectrofotométricos e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os métodos espectrofotométricos mais aplicados envolvem a complexação prévia dos taninos com substratos protéicos (pó-de-pele, caseína, albumina) ou poliméricos (PVPP) (Verza et al., 2007). A técnica CLAE inclui, além dos detectores convencionais, os detectores eletroquímico e fluorescência, e informações estruturais para identificação de taninos condensados oligômeros, podem ser obtidas usando espectrometria de massas (MS) (Schofield et al., 2001).

O isolamento dos ácidos fenólicos, sua presença e quantificação podem ser de grande valia quando correlacionados com a quantidade de fibra na dieta

animal. Para extração dos compostos fenólicos na forrageira, é utilizada solução de hidróxido de sódio em diferentes concentrações (Iiyama et al., 1990; Morrison et al., 1993; Morrison et al., 1998). Esse método é usado para diferenciar se os ácidos fenólicos estão ligados a outras moléculas na forma éster ou éter. Como exemplo, a extração em solução de NaOH em concentração de 1 a 2 mols L⁻¹ e temperatura de 20 °C, indica que os ácidos fenólicos estão ligados na forma éster. Se extraídos em condições mais severas (NaOH 4 mols L⁻¹, 170°C) solubilizam fenóis totais, sendo a diferença entre totais e éster a quantidade de fenóis ligados na forma éter.

Perón (2007) determinou a degradabilidade do feno da gramínea “Coastcross” em diferentes estágios de crescimento, e correlacionou essa degradabilidade com as concentrações dos ácidos fenólicos encontrados. Para a separação e identificação dos ácidos fenólicos (vanilina, caféico, p-cumárico, m-cumárico e o-cumárico), utilizou-se a técnica CLAE, com detecção UV-Vis. As amostras foram injetadas em uma coluna CLC-ODS (150 cm x 4,6 mm, 5 µm), marca Shimadzu; a fase móvel usada foi metanol 100% (solvente A) e solução de ácido acético 2% (solvente B) com sistema gradiente, fluxo de 1,1 mL min⁻¹ e o comprimento de onda fixado em 330 nm. Nesse estudo, verificou-se que o ácido p-cumárico, único ácido fenólico encontrado, diminuiu com o avanço da idade da gramínea “Coastcross” e não interferiu na degradabilidade do feno.

Deschamps & Ramos (2002), desenvolveram um método para determinação de ácidos fenólicos na parede celular de forragens, utilizando a técnica CLAE, com detecção UV-Visível. Bagaço de cana, capim-elefante e folhas de mandioca foram utilizados como amostras experimentais. O cromatograma dos padrões utilizados nesse método apresentou satisfatória separação dos compostos, em especial das formas isoméricas do ácido cumárico (orto, meta e para). A concentração dos ácidos fenólicos foi bastante distinta para o bagaço de cana, para o capim-elefante e para a folha de mandioca. A

concentração média de ácido ferúlico não foi muito diferente entre bagaço de cana (4,56 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de MS) e capim-elefante (3,96 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de MS). Entretanto, a concentração de ácido p-cumárico foi superior no bagaço de cana (18,98 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de MS) em relação ao capim-elefante (5,87 $\mu\text{g}/\text{mg}/\text{MS}$), sendo um indicativo da reduzida digestão que o bagaço apresenta.

Salminen et al. (1999) utilizaram a técnica CLAE acoplado ao espectrômetro de massas para identificar taninos hidrolisáveis, em folhas de videiro (*Betula pubescens*). Com o método, foram identificados 14 galotaninas e 20 elagitaninas diretamente de extrato de folha de videiro cru. Os autores verificaram as funções ecológicas das combinações de compostos fenólicos, especialmente seu papel na resistência de folhas de videiro.

Saito et al. (2006) desenvolveram um método para determinação de galato de epigalocatequina, epicatequina, catequina e cafina utilizando CLAE com detecção UV/Vis, em chá verde. As condições de otimização foram, fluxo 0,7 mL min^{-1} , coluna C_{18} LiChrosorb (12,5 cm x 4 mm i.d., 5 μm), fase isocrática contendo água/acetoneitrila/metanol/acetato de etila/ácido acético glacial (89/6/1/3/1 v/v) e o comprimento de onda fixado em 280 nm. Esse método apresentou linearidade no intervalo de 60 – 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e coeficiente de correlação linear próximo da unidade. Os teores de galato de epigalocatequina encontrados foram de 20,93% e de cafeína de 7,79%. Os autores verificaram que o método foi eficiente e rápido para a quantificação de galato de epigalocatequina, epicatequina e cafeína.

Queiroz et al. (2002) ao estudarem os taninos presentes na aroeira preta utilizaram a técnica CLAE, acoplada a um detector de fotodiodos. Foram identificados a fisetina, os ácidos gálico e elágico e concentrações menores de compostos característicos de flavona, flavonóis e elagitaninos. A quantidade de extrativos fenólicos encontrados pelos autores classifica essa madeira como rica

em metabólitos secundários que, provavelmente, são os principais responsáveis pela resistência natural da espécie à degradação química e biológica.

Evaristo & Leitão (2001) desenvolveram um método analítico para a determinação de compostos fenólicos em folhas de sobreiro (*Quercus súber* L), por essas substâncias desempenharem, nas plantas, papel importante nos mecanismos de resistência às doenças e pragas. Os constituintes da fração hidrolizada (ácido gálico, ácido elágico, catequina, epicatequina, ácido cafêico, ácido p-cumárico e ácido ferúlico) foram separados e identificados por CLAE com detector de fotodiodo, equipado com uma coluna de fase reversa. A otimização das condições de separação em sistema de gradiente foram obtidas pela aplicação de uma fase móvel compreendida por dois solventes: solução de ácido acético 2% (solvente A) e metanol 100% (solvente B) com fluxo de 1,0 mL min⁻¹ e o comprimento de onda fixado em 280 nm.

3 OBJETIVOS

- Caracterizar química e bromatologicamente as leguminosas *Stylosanthes* (cultivares Campo Grande e Mineirão) e *Arachis* (cultivares Amarelo e Belmonte), em consórcio com a gramínea “Coastcross”.
- Identificar e quantificar os compostos fenólicos (ácido gálico, ácido elágico, catequina, epicatequina, galato de epigallocatequina, galocatequina, vanilina, ácido ferúlico, ácidos p-cumárico, m-cumárico, o-cumárico, quercetina e ácido caféico) presentes nessas forrageiras utilizando cromatografia líquida de alta eficiência.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local e instalação do experimento

A produção da forragem das leguminosas *Stylosanthes guianenses* (estilosantes) cv Mineirão e Campo Grande e *Arachis pintoi* (amendoim forrageiro) cv Amarillo e Belmonte e da gramínea *Cynodon nlemfuensis x Cynodon dactylon (L.)Pers* (capim “Coastcross”) está em área do sítio Cata Vento, no município de Itutinga, região Sul do estado de Minas Gerais, em um sistema de consórcio, prevendo a participação de 30% da leguminosa no total da forragem produzida.

A cidade de Itutinga está localizada nas coordenadas 21°17'53,92'' de latitude Sul, 44°39'36,12'' de longitude Oeste de Greenwich, à altitude de 958,29 m (Google Earth). A estação climatológica mais próxima fica a, aproximadamente 60 Km de distância, no município de Lavras, região Sul de Minas, localizada nas coordenadas 21°14'44, 65'' de latitude Sul, 44°59'59, 20'' de longitude a Oeste de Greenwich, à altitude média de 910m. Segundo a classificação internacional de Köppen, o clima da região é do tipo Cwa, subtropical com verão quente e chuvoso e inverno frio e seco. A precipitação anual média é de 1493,2mm e com temperaturas máxima de 25°C e mínima de 14,6°C, em média. O esquema da área onde estão plantadas as forrageiras está apresentado no Anexo A.

4.2 Coleta e preparo das amostras

As amostragens do 1º corte foram realizadas em 21 de janeiro de 2008, do 2º corte em 16 de abril de 2008 e a do 3º em 03 de dezembro de 2008, seguindo a metodologia proposta por Aguiar & Amaral (2001). O corte foi feito quando as forrageiras alcançaram altura de pastejo, cerca de 0,30m, coletando três áreas de 0,25 m² por subparcela, direcionando o quadrado para cada linha de

forrageira na área útil. Após cada corte foi feita adubação corretiva, sendo utilizadas doses de 54Kg/ha de fósforo de P₂O₅ na forma de superfosfato simples e 40Kg de K₂O por hectare, através da formulação 8-28-16 + Zn.

As amostras coletadas de gramínea e leguminosas foram acondicionadas separadamente em sacos de papel, devidamente identificadas e colocadas em estufas de circulação forçada a 65°C por 48 horas, para secagem no Laboratório de Pesquisa Animal do Departamento de Zootecnia da UFLA. Posteriormente, as amostras foram moídas em moinhos do tipo Willey, com peneira de 1mm e armazenadas em potes plásticos.

4.3 Análises laboratoriais

4.3.1 Determinação da porcentagem de matéria seca

A porcentagem de matéria seca (MS) na forrageira foi determinada segundo a metodologia da Association Of Official Agricultural Chemists - AOAC (1995): após a coleta as amostras frescas foram pesadas, acondicionadas em sacos de papel, identificadas e colocadas em estufa ventilada a 65°C por 48h. Após esse período, as amostras foram novamente pesadas e o teor de MS na forrageira foi calculado pela fórmula:

$$\%MS = \frac{\text{massa da amostra após secagem} \times 100}{\text{massa da amostra verde}}$$

Para a determinação da MS a 105°C, pesou-se 2g de amostra, as quais foram levadas à estufa a 105°C permanecendo por 48h. O cálculo para a determinação de MS a 105°C foi realizado conforme a fórmula:

$$\% \text{ de MS definitiva} = \frac{\text{massa da amostra após 48h} \times 100}{\text{massa da amostra}}$$

% de MS na forrageira: %MS x %MS definitiva x 100.

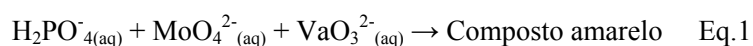
4.3.2 Determinação dos teores de cálcio e fósforo

A determinação dos teores de cálcio e fósforo foram realizadas no Laboratório de Análise Foliar do Departamento de Química da UFLA seguindo a metodologia proposta por Malavolta (1989).

Inicialmente foi feita uma digestão nitro-perclórica: 0,5g de material seco e moído foram transferidos para um tubo de digestão e adicionados 6 mL de uma mistura de HNO₃ e HClO₄ na proporção 2:1 (v/v). As amostras foram levadas para bloco digestor com temperatura inicial de 50°C, durante 15 minutos e a temperatura foi aumentada para 120°C, por 30 minutos. Ao final desse período aumentou-se a temperatura para 160°C até a saída total da matéria orgânica (fumus avermelhados) passando para 210°C, temperatura que se manteve constante até a saída de fumos brancos. Em seguida, o material foi resfriado e adicionou-se 10 mL de água destilada.

Para a determinação de cálcio foi utilizado a espectrofotometria de absorção atômica. Em um balão volumétrico de 100 mL pipetou-se 1 mL do extrato e adicionou-se 10 mL da solução de lantânio 5%. As leituras foram feitas em um espectrofotômetro de absorção atômica VARIAN, modelo SpectrAA.

Para a análise de fósforo, utilizou-se o método colorimétrico do metavanadato fósforo total. Esse método baseia-se na formação de um composto amarelo do sistema vanadomolibdofosfórico conforme a reação a seguir:



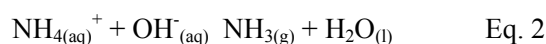
Para as análises 1 mL do extrato foi pipetado em um frasco e a seguir foram acrescentados 9 mL de água destilada. Em outros frascos foram colocadas

porções de 10 mL das soluções padrão de fosfato e 4 mL do reativo colorido. As leituras foram realizadas em um espectrofotômetro UV/Vis (Perkin Elmer, modelo Lambda 25) em comprimento de onda de 420 nm.

4.3.3 Determinação do teor de proteína bruta

As análises para a determinação de proteína bruta (PB) nas forrageiras foram feitas no Laboratório de Análise Foliar do Departamento de Química da UFLA e utilizou-se o método micro kjeldhal adaptado segundo metodologia de Vogel (1981) e AOAC (1995): 0,1g da forrageira foi pesada e transferida para tubos kjeldhal. Em seguida foram submetidas à digestão ácida, utilizando-se ácido sulfúrico concentrado (3 mL) e uma mistura catalítica de (CuSO₄:K₂SO₄) na proporção 1:2 em massa. Os tubos kjeldhal foram acoplados em bloco digestor e ligados a um sistema de sucção de gases para eliminar o vapor gerado internamente. Os tubos foram aquecidos, mantendo sua temperatura de 50°C por 30 minutos, elevando sua temperatura gradativamente, até que a solução no interior do balão se apresentasse livre de material a ser digerido, tornado-se clara e límpida (em tom azul-esverdeado).

Com os tubos kjeldhal frios, foram adicionados 20 mL de água destilada sob agitação e em seguida conectaram-se os tubos a um conjunto de destilação. A solução de NaOH 50% foi adicionada ao funil da aparelhagem e a torneira do funil foi aberta vagarosamente deixando a solução alcalina escorrer lentamente dentro do tubo, até o aparecimento de uma solução escura. Nesse processo, o sulfato de amônio resultante da digestão é aquecido com o NaOH, desprendendo amônia e a reação pode ser representada pela equação:



A amônia foi recolhida em um erlemeyer colocado à saída do condensador contendo 10 mL de solução de ácido bórico com solução indicadora (0,50g de vermelho de metila, 0,75g de verde de metila em 100 mL de álcool etílico), previamente padronizado. Procedeu-se à titulação da amostra utilizando-se HCl na concentração 0,07143 M até o aparecimento de uma cor vermelha.

O cálculo para determinação da porcentagem de proteína nas forrageiras foi realizado pela fórmula:

$$\%PB = \frac{V_{HCl} \times \text{Molaridade do HCl} \times 6,25 \times 14 \times 100 \times \text{Fator de correção}}{\text{Massa da amostra}}$$

4.3.4 Determinação do teor de fibra detergente neutro

As análises do teor de fibra detergente neutro (FDN) foram realizadas no Laboratório de Pesquisa Vegetal, do Departamento de Engenharia de Alimentos da UFLA. O método de determinação de FDN foi proposto por Silva (1981) modificado: 0,5g de amostra foi transferida para um tubo microkjedhal e a seguir foram acrescentados 2 mL de amilase termoestável para quebra do amido presente na amostra. A incubação das amostras ocorreu por um período de 60 minutos em banho-maria, a uma temperatura de 40°C. Após a incubação foram acrescentados 25 mL de solução detergente neutro, 0,5 mL de decaidronaftaleno (decalina) para evitar a formação de espuma e 0,5g de sulfito de sódio. Os tubos foram colocados em banho maria até a fervura das amostra e ao final deste período as amostras foram levadas a um tubo digestor por 60 minutos, a uma temperatura fixa de 120°C.

Após a digestão das amostras, foi realizada a filtração em cadinho de porcelana com uma fina camada de lã de vidro, pesado, por sucção a vácuo. Esta filtração foi realizada quando a amostra ainda estava quente. As amostras

foram lavadas duas vezes com água destilada fervente até que no tubo de digestão não houvesse mais fibra. Em seguida, foram lavadas duas vezes com 35 mL de acetona. As amostras filtradas foram levadas à estufa a 105°C onde permaneceram por 8 horas.

O cálculo da porcentagem de fibra solúvel em detergente neutro nas amostras foi feito da seguinte forma:

$$\%FDN = \frac{\text{massa do cadinho com amostra seca} - \text{massa do cadinho vazio} \times 100}{\text{massa da amostra}}$$

4.3.5 Determinação do teor de fibra detergente ácido

As análises do teor de fibra detergente ácido (FDA) foram feitas no Laboratório de Pesquisa Vegetal, do Departamento de Engenharia de Alimentos da UFLA. Essa determinação foi realizada segundo a metodologia modificada proposta por Silva (1981): 0,5 g de amostra seca e moída em moinho com peneira de 1 mm foram colocadas em tubos micro kjeldhal. Sobre essas amostras foram colocados 25 mL de solução detergente ácida e 0,5 mL de decaidronaftaleno para evitar a formação de espuma, em seguida os tubos foram colocados em banho-maria até a fervura da amostra. Após a fervura aguardou-se um período de 10 minutos. Ao final desse período as amostras foram levadas a um tubo digestor por 60 minutos, a uma temperatura fixa de 120°C.

A filtragem das amostras foi feita a vácuo em cadinho de vidro e imediatamente à digestão as amostras foram lavadas duas vezes com água destilada fervente até que, no tubo de digestão, não houvesse mais fibra. Em seguida, foram lavadas duas vezes com 35 mL de acetona. As amostras filtradas foram levadas à estufa, à 105°C onde permaneceram por 8 horas.

O cálculo da porcentagem de fibra solúvel em detergente ácido nas amostras foi realizado pela fórmula:

$$\%FDA = \frac{\text{massa do cadinho com amostra seca} - \text{massa do cadinho vazio} \times 100}{\text{massa da amostra}}$$

4.3.6 Determinação do teor de lignina

As análises de lignina foram feitas no Laboratório de Pesquisa Vegetal, do Departamento de Engenharia de Alimentos da UFLA. A determinação da lignina foi feita a partir da análise de FDA, pelo método Soest (1994) modificado. Os cadinhos, contendo a fibra resultante da determinação de FDA pesados, foram colocados em uma bandeja de alumínio, contendo uma camada de água de 2 a 3 cm de altura. Foram adicionados nesses cadinhos 30mL de solução de permanganato de potássio/solução tampão em uma proporção de 2:1 e deixados em repouso por 45 minutos. Em seguida foi feita a filtração a vácuo. Dentro de cada um dos cadinhos foi adicionado 30 mL de solução de desmineralização, deixado em repouso por 45 minutos até que a amostra apresentasse uma cor amarela clara. Após esse período, procedeu-se à filtração. Em seguida, a amostra foi lavada 2 vezes com 35 mL de etanol a 80% e succionada à vácuo até a completa secagem e após foi lavada duas vezes com 35 mL de acetona. As amostras foram levadas à estufa a 105°C, onde permaneceram por 8 horas.

O cálculo da porcentagem de lignina nas amostras foi realizado pela fórmula:

$$\%Lignina = \frac{\text{massa do cadinho com a fibra FDA} - \text{massa do cadinho vazio} \times 100}{\text{massa da amostra}}$$

4.3.7 Determinação do teor de polifenóis totais pelo método Folin - Denis

A determinação do teor de fenóis totais nas forrageiras foi feita pelo método Folin-Denis proposto pela AOAC (1995). Esse método baseia-se na redução em meio alcalino de fosfomolibdato–fosfotungstato pelos fenóis a molibdênio de coloração azul.

Para a extração dos polifenóis: 1g da amostra foi transferida para um erlenmeyer de 250 mL e acrescentado 50 mL de solução de metanol a 50%. As amostras foram aquecidas a 80°C e após 15 minutos foram filtradas em papel de filtro. Retiraram-se 10 µL dessa solução que foram colocados em tubos de ensaio e foram acrescentados aos 1,69 mL de água, 100 µL do reagente Folin-Denis com 200 µL de solução saturada de carbonato de sódio (Na₂CO₃) e agitados em agitador do tipo vórtex. As amostras apresentaram uma coloração azul característica da reação. As leituras foram feitas em espectrofotômetro FENTO, modelo 700S, a 760 nm, no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Química da UFLA. Para a determinação de polifenóis foi realizada uma curva analítica de solução padrão.

4.4 Extração dos compostos fenólicos nas forrageiras

As extrações dos compostos fenólicos nas forrageiras foram feitas no Centro de Análise e Prospecção Química (CAPQ/UFLA) empregando o método de Terril et al. (1990) modificado: 1g de amostra seca e moída foram transferidas para tubos de centrífuga rosqueados e foram acrescentou-se 10 mL de solução de acetona/água (70:30 v/v) . As amostras foram submetidas a um agitador orbital a 100 rpm por 30 min, à temperatura ambiente. Após essa agitação as amostras foram transferidas para centrífuga e agitadas por 15 min, a 1500g.

O extrato obtido foi filtrado em lã de vidro e transferido para um funil de decantação, lavado com éter de petróleo a um volume três vezes maior que o da

amostra, para retirar as gorduras. O extrato foi recolhido em vidros de cor âmbar, envoltos em papel alumínio para evitar a degradação dos taninos e conservados a, aproximadamente, 4°C.

4.5 Cromatografia líquida de alta eficiência

4.5.1 Material

Foram analisados ácidos fenólicos e taninos em amostras de *Stylosanthes guianensis*, cultivares Mineirão e Campo Grande e *Arachis Pinto*, cultivares Belmonte e Amarillo e gramínea “Coastcross” de três cortes diferentes e de épocas diferentes.

4.5.2 Reagentes e padrões

Os padrões dos ácidos fenólicos utilizados foram: ácido caféico, para-cumárico, ácido gálico e ácido elágico (Sigma), ácido ferúlico (Aldrich) e ácidos meta e orto-cumárico (Fluka). Para os taninos foram utilizados os padrões: galocatequina, galato de epigalocatequina, catequina e epicatequina (Sigma-Aldrich) e para os flavonóides utilizou-se a quercetina (Sigma-Aldrich) e a vanilina (Sigma). A água ultrapura utilizada no preparo da fase móvel foi obtida a partir da purificação no sistema Milli-Q (Millipore). Para a solubilização dos padrões foram utilizados os solventes dimetilsulfóxido (Merck) e metanol grau HPLC (Merck).

4.5.3 Estudo cromatográfico dos compostos fenólicos

As análises cromatográficas foram feitas no CAPQ/UFLA. O equipamento utilizado foi UFLC Shimadzu modelo LC20-AD, equipado com uma bomba binária de alta pressão modelo LC-20AD, injetor automático com autoamostrador modelo SIL-M20A, forno modelo CTO-20AC e detector com arranjo de diodos (DAD), modelo SPD-M20A, sendo que a melhor resposta foi

obtida no comprimento de onda de 280 nm. As amostras e os padrões foram injetados em uma coluna Shim-pack C₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm - Shimadzu), conectada a uma pré-coluna (5,0 cm x 4,0 mm, 5 µm – Shimadzu).

A fase móvel utilizada foi composta pelas soluções: ácido acético 2% (A) e metanol:água:ácido acético (65:33:2 v/v/v) (B). As análises foram realizadas com tempo total de 60 minutos, à uma temperatura de 15°C, em um sistema do tipo gradiente (Tabela 1). O fluxo utilizado em todas as análises foi de 1,25 mL min⁻¹ e a injeção 20 µL.

TABELA 1 Composição do gradiente da fase móvel.

Tempo (min)	Solvente A (% v/v)	Solvente B (% v/v)
0:01	100	0
25:00	60	40
43:00	55	60
50:00	0	100
60:00	100	0

Solvente A: ácido acético 2%

Solvente B: metanol:água:ácido acético (65:33:2 v/v/v)

As amostras e os padrões foram filtrados em uma membrana de nylon de 0,45 µm (Millipore ®) e diretamente injetados no sistema cromatográfico. A adição de padrões às amostras também foi usada como parâmetro de identificação. A quantificação foi realizada utilizando a padronização externa com concentrações de soluções padrão estoque: ácido gálico (2,94 mg mL⁻¹), galocatequina (1,63 mg mL⁻¹), epigalocatequina (1,63 mg mL⁻¹), catequina (1,72 mg mL⁻¹), epicatequina (1,72 mg mL⁻¹), ácido cafêico (2,77 mg mL⁻¹), vanilina (3,29 mg mL⁻¹), os ácido p-cumárico, m-cumárico e o-cumárico (3,05 mg mL⁻¹), ácido ferúlico (2,57 mg mL⁻¹), ácido elágico (1,65 mg mL⁻¹) e quercetina (1,48 mg mL⁻¹). Cada solução foi injetada três vezes no sistema CLAE, com a finalidade de se obter a média das concentrações e dos tempos de retenção.

4.6 Análise estatística

Para a análise estatística da caracterização química e bromatológica das forragens foi feito delineamento experimental em blocos ao acaso, em esquema de parcelas subdivididas, com quatro repetições, sendo dispostas nas parcelas as cultivares das leguminosas e nas subparcelas os intervalos de corte.

Para a análise estatística da quantificação dos compostos fenólicos por CLAE foi considerado que os tratamentos foram dispostos num esquema fatorial 2x5x3, sendo dois tipos de adubação, cinco tipos de forrageiras e três cortes.

Todas as análises estatísticas dos dados compreenderam a análise de variância pelo pacote R Development Core Team (R Foundation for statistical computing), versão 2.7.0 e quando houve efeito significativo dos tratamentos, as médias foram distribuídas pelo teste de Tuckey, ao nível de 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teor de matéria seca

Os resultados encontrados nas Tabelas 2 e 3 indicam que houve efeito significativo ($P < 0,05$) para interação entre as épocas de corte e as cultivares estudadas. O intervalo entre o 1º e o 2º cortes das forragens foi de aproximadamente três meses (21/01/2008 a 16/04/2008) e entre o 2º e o 3º cortes foi de, aproximadamente, oito meses (16/04/2008 a 03/12/2008).

TABELA 2 Teores de matéria seca (%) de gramínea “Coastcross” solteira e em consórcio.

Gramíneas	Cortes		
	1º	2º	3º
Gramínea solteira	50,06 a A	49,93 a A	50,50 cd A
Gramínea + Stylosanthes Campo Grande	42,86 abcd B	47,08 a AB	53,72 bcd A
Gramínea + Stylosanthes Mineirão	34,30 cd B	46,24 a A	51,39 cd A
Gramínea + Amendoim Belmonte	44,92 abc A	49,52 a A	47,22 d A
Gramínea + Amendoim Amarillo	47,45 ab A	42,96 a A	50,53 cd A

Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem, pelo teste de Tuckey ($P < 0,05$), entre os cortes.

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem, pelo teste de Tuckey ($P < 0,05$), dentro dos cortes.

TABELA 3 Teores de matéria seca (%) de leguminosas em consórcio com gramínea “Coastcross”.

Forrageiras	Cortes		
	1º	2º	3º
Stylosanthes Campo Grande	40,86 abcd B	37,71 ab B	62,18 abc A
Stylosanthes Mineirão	29,99 d B	37,08 b B	62,63 abc A
Amendoim Belmonte	34,84 bcd B	29,22 b B	66,90 a A
Amendoim Amarillo	37,47 abcd B	37,02 b B	65,47 ab A

Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem, pelo teste de Tuckey ($P < 0,05$) entre os cortes.

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem, pelo teste de Tuckey ($P < 0,05$) dentro dos cortes.

Nas Tabelas 2 e 3, observam-se teores de MS mais elevados para a gramínea solteira e em consórcio no 1º e 2º cortes em relação às leguminosas, e uma inversão no 3º corte onde os teores mais elevados foram para as leguminosas. A cultivar Amendoim Belmonte foi a que apresentou o teor mais elevado (66,90%).

Cortes em gramíneas ou leguminosas, que estão em estágios mais avançados de crescimento, proporcionam forragens com altos teores de MS; provavelmente isso deve-se ao acúmulo de matéria seca e acúmulo de tecidos mortos ao longo do tempo. Como o intervalo no 3º corte foi maior, o tempo foi um fator determinante para esse aumento. Outro fator é que as leguminosas estavam em maior atividade vegetativa que a gramínea no 3º corte, que pode explicar o aumento na matéria seca dessas forrageiras.

O consórcio de pastagens mostra-se vantajoso em relação à proteção do solo e à adubação verde, devido à fixação e reciclagem de nitrogênio, promovidas pela leguminosa. A superioridade dos pastos em consórcio sobre aqueles com a mesma gramínea em monocultivo em relação à proteína bruta disponível e a produção de forragem tem sido observada em vários trabalhos (Pereira et al., 1992; Euclides et al., 1998). No entanto, pouco se encontra na literatura sobre a interferência do consórcio de pastagens no teor de MS das forragens. A maioria dos trabalhos é relacionada à produção de matéria seca na forragem. A influência do consórcio sobre o teor de matéria seca na forrageira foi analisada neste estudo e observou-se que o consórcio não aumentou significativamente o teor de MS na gramínea demonstrando que a leguminosa não interferiu no desenvolvimento da gramínea, durante o experimento.

Peron (2007), ao analisar o teor de MS em capim “Coastcross” solteiro na forma de feno com a forrageira cortada aos 20, 40, 60 e 80 dias de crescimento no verão encontrou resultados diferenciados deste trabalho. Em seus estudos, o teor de MS da gramínea diminuiu linearmente com o avanço da idade

da forrageira. A diminuição dos teores foi pequena e o autor concluiu que está relacionada com a maior perda de folhas no processo de confecção dos fardos e com a perda umidade da forragem em idade mais nova.

Este experimento foi realizado para as gramíneas e forrageiras em canteiros adubados e não adubados. Estatisticamente, o efeito da adubação não foi significativo. No Anexo D, encontra-se a Tabela 1C com a análise estatística para esse parâmetro.

5.2 Teor de fósforo

Analisando os cortes das gramíneas e forrageiras adubadas, observa-se nas Tabelas 4 e 5, um decréscimo nos teores de fósforo no 3º corte, com exceção da forrageira Amendoim Amarello que manteve os valores constantes. Estatisticamente, esse decréscimo não apresentou diferenças significativas, o que indica que as gramíneas e forrageiras estudadas fornecem esse nutriente para o gado de forma constante, durante todo o ano.

As gramíneas apresentaram nos canteiros adubados e não adubados um acréscimo nos teores de fósforo nos 1º e 2º cortes. Estatisticamente, foi observado acréscimo somente nas gramíneas não adubadas. Nas leguminosas, a diminuição nos teores de fósforo ocorreu para a Stylosanthes Campo Grande e a Amendoim Belmonte, em canteiros adubados e Stylosantes Mineirão e Amendoim Amarello, para canteiros não adubados. A cultivar que apresentou os teores de fósforo mais elevados em todos os cortes foi a Amendoim Amarello.

TABELA 4 Teores de fósforo (%) de gramínea “Coastcross” solteira e em consórcio, adubadas e não adubadas.

Gramíneas	1º corte		2º corte		3º corte	
	Adubadas	Não adubados	Adubadas	Não adubados	Adubadas	Não adubados
Gramínea solteira	0,132 bc A	0,103 bc A	0,155 ab A	0,120 abc B	0,108 bA	0,103 ba A

Continua...

TABELA 4 Continuação.

Gramíneas	1º corte		2º corte		3º corte	
	Adubadas	Não adubados	Adubadas	Não adubados	Adubadas	Não adubados
Gramínea + Stylosanthes Campo Grande	0,145 abc A	0,090 bc B	0,148 ab A	0,103 c B	0,100 b A	0,080 b A
Gramínea + Stylosanthes Mineirão	0,170 abc A	0,100 bc B	0,170 ab A	0,103 c B	0,105 b A	0,093 b A
Gramínea + Amendoim Belmonte	0,123 c A	0,106 bc A	0,143 b A	0,110 bc B	0,097 b A	0,080 b A
Gramínea + Amendoim Amarillo	0,150 abc A	0,095 bc B	0,160 ab A	0,127 abc A	0,105 b A	0,080 b A

Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem, pelo teste de Tuckey, em nível de 5% de probabilidade e comparam as adubações em cada corte.

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem, pelo teste de Tuckey, em nível de 5% de probabilidade e comparam as forrageiras entre os cortes.

TABELA 5 Teores de fósforo (%) de leguminosas em consórcio com gramínea “Coastcross” colhidas, adubadas e não adubadas.

Forrageiras	1º corte		2º corte		3º corte	
	Adubadas	Não adubados	Adubadas	Não adubados	Adubadas	Não adubados
Stylosanthes Campo Grande	0,140 bc A	0,073 c B	0,135 b A	0,167 a A	0,100 b A	0,100 b A
Stylosanthes Mineirão	0,165 abc A	0,123 bc B	0,180 ab A	0,117 abc B	0,100 b A	0,100 b A
Amendoim Belmonte	0,187 ab A	0,143 ab A	0,163 ab A	0,143 abc A	0,133 b A	0,100 b B
Amendoim Amarillo	0,200 a A	0,193 a A	0,203 a A	0,163 ab B	0,200 a A	0,200 a A

Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem, pelo teste de Tuckey, em nível de 5% de probabilidade e comparam as adubações em cada corte.

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem, pelo teste de Tuckey, em nível de 5% de probabilidade e comparam as forrageiras entre os cortes.

A média geral dos teores de fósforo encontrados para a gramínea “Coastcross” foi de 0,11%, para as leguminosas Stylosanthes Mineirão, Stylosanthes Campo Grande e Amendoim Belmonte 0,13% e para a Amendoim

Amarillo 0,19% (Anexo D, Tabela 2D). Segundo National Research Council – NRC (1996) as exigências de fósforo para bovinos de 400Kg de peso vivo, com ganho de 0,5Kg/dia é de 0,12% e com ganho de peso de 1Kg/dia é de 0,15%. Sendo assim, as forrageiras estudadas atendem às necessidades diárias nutricionais dos ruminantes em relação ao fósforo.

Com relação à adubação, a cultivar Amendoim Amarillo adubada apresentou o maior teor de fósforo (2º corte) e o menor foi para a cultivar *Stylosanthes* Campo Grande não adubada (1º corte). Assim, houve diferença significativa com relação à adubação sendo que, no geral, as cultivares adubadas apresentaram teores superiores aos das cultivares não adubadas.

Segundo Eira (1992) leguminosas em pastagens consorciadas facilitam a mobilização do fósforo através da acidificação do solo na região da rizosfera, melhorando a eficiência de seu aproveitamento para as gramíneas. Em consórcios, também ocorre a maior competição da gramínea por luz e nutrientes e há uma menor absorção de água e nutrientes pela leguminosa que se torna menos competitiva. Esses fatores podem ocasionar aumentos nas concentrações de fósforo na gramínea forrageira (Mesquita et al., 2002).

Relacionando cada corte das gramíneas adubadas, solteira e em consórcio (Tabela 4), observa-se que no 1º e 2º cortes, a gramínea consorciada com a Amendoim Belmonte apresentou teor de fósforo menor em relação à gramínea solteira, já as gramíneas consorciadas com a *Stylosanthes* Mineirão e Amendoim Amarillo apresentaram maiores teores de fósforo em relação à gramínea solteira. Para o 3º corte, esse acréscimo não foi observado para as gramíneas consorciadas e isso se deve, ao fato desse corte ter sido ao final da época de seca, anterior às chuvas de dezembro.

Coates et al. (1990) ao analisar o efeito do fósforo na composição botânica, rendimento e qualidade das forrageiras *Stylosanthes hamata*, *Stylosanthes scabra* e *Macroptilium atropurpureum* concluiu que as

concentrações de fósforo em forrageiras declinam com o avanço da maturidade das plantas.

Castro et al. (1999) estudando a época de corte, composição-químico bromatológica e digestibilidade da matéria seca da grama estrela Florico observaram que os teores de fósforo decresceram em função da idade de crescimento, sendo que os valores máximos foram aos 20 dias após o corte de rebaixamento, decrescendo a partir dessa idade. Esses autores atribuíram à queda no teor de fósforo ao aumento na idade das plantas, à diluição na matéria seca produzida e acumulada e ao fato de, com o avanço na idade das plantas, ocorrerem alterações na relação haste/folha, morte de folhas senescentes, diversidade no padrão de absorção dos elementos durante o ciclo da cultura e sua redistribuição entre os vários órgãos da planta.

O acréscimo no teor de fósforo, em gramíneas consorciadas, foi observado apenas nas cultivares adubadas, indicando que a adubação interferiu na disponibilidade do nutriente para as plantas.

5.3 Teor de cálcio

A análise do teor de cálcio nas cultivares indicou que houve efeito significativo ($P < 0,05$) para interação entre as épocas de corte e as cultivares estudadas (Tabela 6 e 7). Este experimento foi realizado para as gramíneas e forrageiras em canteiros adubados e não adubados. Estatisticamente, o efeito da adubação não foi significativo. No Anexo C encontra-se a Tabela 2C com a análise estatística para esse parâmetro.

O cálcio é um dos minerais mais importantes na produção dos ruminantes, pois esse mineral desempenha inúmeras funções básicas relacionadas à integridade do esqueleto, à manutenção da permeabilidade normal das células e à regulação da excitabilidade neuromuscular. Algumas forrageiras, por possuírem elevado teor de cálcio em sua composição, podem funcionar

como fonte desse mineral, desde que sua disponibilidade seja conhecida (Vitti et al., 2006).

Observa-se pelos dados da Tabela 6 que não houve diferença significativa nos teores de cálcio entre as épocas de corte para as gramíneas, com exceção da gramínea em consórcio com Amendoim Amarillo que aumentou os valores no 2º corte. As leguminosas apresentaram um decréscimo nesses teores com o avanço da idade da planta, porém a cultivar Amendoim Belmonte apresentou um acréscimo no teor de fósforo no 2º corte (Tabela 7).

TABELA 6 Teores de cálcio (%) de gramínea “Coastcross” solteira e em consórcio, colhidas em diferentes datas.

Gramínea	Cortes		
	1º Corte	2º Corte	3º Corte
Gramínea solteira	0,346 c A	0,497 b A	0,331 c A
Gramínea + Stylosanthes Campo Grande	0,361 c A	0,590 b A	0,357 c A
Gramínea + Stylosanthes Mineirão	0,414 c A	0,528 b A	0,308 c A
Gramínea + Amendoim Belmonte	0,340 c A	0,485 b A	0,270 c A
Gramínea + Amendoim Amarillo	0,322 c B	0,822 b A	0,320 c B

Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem, pelo teste de Tuckey (P<0,05), entre os cortes.

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem, pelo teste de Tuckey (P<0,05), dentro dos cortes.

TABELA 7 Teores de cálcio (%) em leguminosas em consórcio com gramínea “Coastcross”, colhidas em diferentes datas.

Forrageiras	Cortes		
	1º Corte	2º Corte	3º Corte
Stylosanthes Campo Grande	1,283 b AB	1,533 a A	1,171 b B
Stylosanthes Mineirão	1,460 b AB	1,574 a A	1,240 b B
Amendoim Belmonte	1,252 b B	1,615 a A	1,217 b B
Amendoim Amarillo	2,106 a A	1,793 a B	1,783 a B

Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem, pelo teste de Tuckey (P<0,05), entre os cortes.

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem, pelo teste de Tuckey (P<0,05), dentro dos cortes.

O decréscimo no teor de cálcio no decorrer dos cortes observado para as leguminosas, provavelmente deve-se ao efeito da diluição desse elemento na matéria seca, à morte de folhas velhas e ao aumento na relação haste/folha. O teor de minerais nas plantas é determinado por seu potencial de absorção do nutriente, que é geneticamente fixado e inerente a cada espécie, e pela disponibilidade de nutrientes no meio (Martin & Matocha, 1973). A interação entre o teor de minerais e o crescimento da planta determina a sua composição química (Mengel & Kirkby, 1987). Esses fatores podem ter sido determinantes para o aumento do teor de cálcio na leguminosa Amendoim Amarello, no 2º corte.

A média geral dos teores de cálcio encontrados para a gramínea “Coastcross” foi de 0,42%, para as leguminosas Stylosanthes Campo Grande, Stylosanthes Mineirão e Amendoim Belmonte, 1,35%, e para a leguminosa Amendoim Amarello, 1,89% (Anexo D, Tabela 2C). Segundo National Research Council - NRC (1996) as exigências de cálcio para novilhos com 450 Kg de peso vivo, com ganho de peso de 0,5Kg/dia é de 0,19% e com ganho de peso de 1,0 Kg/dia é de 0,27%. Dessa forma, as forrageiras estudadas atendem às necessidades nutricionais diárias dos ruminantes em relação ao cálcio.

Não houve diferença significativa nos níveis de cálcio entre a gramínea solteira e a gramínea em consórcio, o que pode indicar que o consórcio não alterou a disponibilidade desse nutriente para as plantas. Malavolta & Paulino (1991) observaram que a absorção de cálcio pelas plantas está bastante associada à capacidade de troca de cátions das raízes. Em plantas que apresentam a capacidade de troca de cátions inicial elevada, o aumento de cálcio é desprezível. Leguminosas apresentam raízes com maior capacidade de troca de cátions e uma afinidade por cátions bivalentes maior que as gramíneas (Mascarenhas, 1977; Santos et al., 2002). Esses fatores podem ter sido

determinantes para a não interferência do consórcio nos teores de cálcio das gramíneas estudadas.

5.4 Teor de proteína bruta (PB)

Ao analisar os cortes das gramíneas adubadas e não adubadas (Tabela 8), observa-se aumento significativo nos teores de proteína bruta (PB) para as gramíneas adubadas, solteira e em consórcio com *Stylosanthes Mineirão*. Para as leguminosas adubadas e não adubadas (Tabela 9), observa-se um acréscimo nos teores de PB com o avanço da idade da planta, porém esse acréscimo não foi estatisticamente significativo.

TABELA 8 Teores de PB (%) de gramínea “Coastcross” solteira e em consórcio adubadas e não adubadas, colhidas em diferentes datas.

Gramínea	1º corte		2º corte		3º corte	
	Adubadas	Não adubados	Adubadas	Não adubados	Adubadas	Não adubados
Gramínea solteira	4,85 c B	6,23 cde A	4,63 c A	4,68 b A	5,42 c A	5,57 c A
Gramínea + Stylosanthes Campo Grande	5,20 c A	4,48 e A	5,33 c A	5,02 b A	5,90 c A	5,48 c A
Gramínea + Stylosanthes Mineirão	5,46 c B	7,93 abc A	4,69 c A	4,80 b A	5,83 c A	5,74 c A
Gramínea + Amendoim Belmonte	4,40 c A	4,30 e A	4,34 c A	4,68 c A	5,90 c A	5,14 c A
Gramínea + Amendoim Amarillo	4,73 c A	5,36 de A	4,66 c A	4,68 c A	5,90 c A	5,64 c A

Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem, pelo teste de Tuckey, em nível de 5% de probabilidade e comparam as adubações em cada corte.

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem, pelo teste de Tuckey, em nível de 5% de probabilidade e comparam as forrageiras entre os cortes.

TABELA 9 Teores de PB (%) de leguminosas em consórcio com gramínea “Coastcross” adubadas e não adubadas, colhidas em diferentes datas.

Forrageiras	1º corte		2º corte		3º corte	
	Adubadas	Não adubados	Adubadas	Não adubados	Adubadas	Não adubados
Stylosanthes Campo Grande	8,30 b A	7,12 bcd A	9,46 b A	8,71 a A	9,70 b A	10,05 b A
Stylosanthes Mineirão	10,34 ab A	8,87 ab A	12,12 a A	10,65 a A	9,11 b A	10,35 b A
Amendoim Belmonte	8,58 b A	8,20 abc A	10,17 ab A	10,43 a A	14,66 a A	12,73 a B
Amendoim Amarelo	11,90 a A	9,96 a B	11,60 ab A	10,65 a A	13,04 a A	14,26 a A

Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem, pelo teste de Tuckey, em nível de 5% de probabilidade e comparam as adubações em cada corte.

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem, pelo teste de Tuckey, em nível de 5% de probabilidade e comparam as forrageiras entre os cortes.

Com o avanço no estágio de desenvolvimento as forrageiras apresentam menores teores de PB. No entanto, esse decréscimo foi observado apenas para a cultivar Amendoim Belmonte. Segundo Soest (1994), a composição química das forrageiras depende de aspectos da natureza genética e ambiental e a distribuição dos diversos componentes químicos nas plantas variam nos diferentes tecidos e órgãos, em razão de especificidade da organização física das células vegetais. As folhas das plantas apresentam teores de PB superiores ao colmo. Os cortes desse experimento foram feitos quando as forrageiras estavam bem desenvolvidas, com a ocorrência de muitas folhas. Esses fatos podem ter sido determinantes para que não ocorresse o decréscimo no teor de PB nas cultivares estudadas.

Segundo Minson (1984) o nível mínimo de proteína nas forrageiras, para que ocorra adequada fermentação ruminal, deve ser de 7%. Todas as leguminosas estudadas apresentaram teores de PB superiores a 7%, mas observa-se que as gramíneas, solteira e em consórcio não satisfazem a essa exigência (Anexo D, Tabela 4D).

A superioridade do teor de PB das leguminosas em relação à gramínea em consórcios de pastagens também foi observada por Moreira et al. (2005) ao avaliarem a produtividade e a composição bromatológica do capim braquiária e do capim Jaraguá em consórcios com *Stylosanthes*, introduzidos em pastagens degradadas de capim gordura. Essa superioridade ocorre porque, em geral, as leguminosas apresentam menor queda da qualidade com a maturidade fisiológica e têm boa capacidade de absorção de água mesmo em condições climáticas adversas (Andrade, 1982).

Não houve diferença significativa ($P < 0,05$) no teor de PB entre a gramínea solteira e a em consórcio com as leguminosas. A transferência de nitrogênio da leguminosa para a gramínea se faz por decomposição de raízes, nódulos, folhas e ramos, lixiviação de nitrogênio das folhas e excrementos de animais em pastejo (Benedetti, 2005). Essa transferência não foi observada nas forrageiras estudadas provavelmente devido ao fato de o período de observação ter sido curto para observar os efeitos da leguminosa sobre os teores de PB da gramínea.

5.5 Teor de fibra detergente neutro (FDN)

Analisando os dados das Tabelas 10 e 11, observa-se que os teores FDN em leguminosas mostraram-se inferiores ao teor encontrado na gramínea solteira ou em consórcio no 1º e no 2º cortes e aumentaram no decorrer dos cortes. Esse acréscimo também foi observado para a gramínea em consórcio com *Stylosanthes* Campo Grande e Mineirão. A gramínea “Coastcross” não apresentou diferença significativa em seus teores dentro dos cortes com o consórcio, o que pode indicar que a presença da leguminosa não interfere na produção de carboidratos estruturais nas gramíneas.

TABELA 10 Teores de FDN (%) de gramínea “Coastcross” solteira e em consórcio.

Gramínea	Cortes		
	1º Corte	2º Corte	3º Corte
Gramínea solteira	50,06 a A	49,93 a A	50,50 cd A
Gramínea + Stylosanthes Campo Grande	42,86 abcd B	47,08 a AB	53,72 bcd A
Gramínea + Stylosanthes Mineirão	34,30 cd B	46,24 a A	51,39 cd A
Gramínea + Amendoim Belmonte	44,92 abc A	49,52 a A	47,22 d A
Gramínea + Amendoim Amarillo	47,45 ab A	42,96 a A	50,53 cd A

Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem, pelo teste de Tuckey ($P < 0,05$), entre os cortes.

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem, pelo teste de Tuckey ($P < 0,05$), dentro dos cortes.

TABELA 11 Teores de FDN (%) de leguminosas em consórcio com gramínea “Coastcross”.

Forrageiras	Cortes		
	1º Corte	2º Corte	3º Corte
Stylosanthes Campo Grande	40,86 abcd B	37,71 ab B	62,18 abc A
Stylosanthes Mineirão	29,99 d B	37,08 b B	62,63 abc A
Amendoim Belmonte	34,84 bcd B	29,22 b B	66,90 a A
Amendoim Amarillo	37,47 abcd B	37,02 b B	65,47 ab A

Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem, pelo teste de Tuckey ($P < 0,05$), entre os cortes.

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem, pelo teste de Tuckey ($P < 0,05$), dentro dos cortes.

Essas observações devem-se a quantidade de carboidratos estruturais mais elevados em gramíneas que em leguminosas e por verificar-se um aumento nos teores desses carboidratos com o avançar da maturidade das plantas, principalmente em gramíneas. Carboidratos estruturais constituem a parede celular das plantas, são responsáveis pela manutenção da sua estrutura e são os principais componentes da FDN. Gramíneas forrageiras tropicais pertencem ao grupo C4. Plantas desse grupo formam, como primeiro produto da fotossíntese, o ácido oxalacético (4C), possuem um grupo de células que envolvem o conjunto dos terminais dos feixes vasculares da planta chamada estrutura Kranz.

Devido às reações metabólicas que lhe conferem maior eficiência fotossintética essas plantas elaboram maior quantidade de carboidratos estruturais em relação às leguminosas (Reis & Rodrigues, 1993; Bianchini et al., 2007; Gonzales et al., 1988).

Dietas que apresentam altos teores de FDN induzem o animal a consumir mais para atender ao requerimento de energia. Isso ocorre porque o alto teor de fibras diminui o consumo de nutrientes digeríveis (Maynard & Loosli, 1974). Dessa forma, os teores de FDN encontrados no 1º e no 2º cortes, para as leguminosas, estão mais adequados para a digestão de ruminantes.

O teor médio de FDN determinado para a leguminosa Amendoim Amarillo e para a gramínea “Coastcross” solteira foram, respectivamente, 54,03% e 73,02%. Os teores médios encontrados para FDN, em todas as forrageiras, encontram-se no Anexo D, na Tabela 5D. Esses valores são muito próximos aos encontrados por Paris et al. (2008), ao estudarem os teores de PB, FDN e a produção dos componentes estruturais da “Coastcross” – 1 e da planta inteira de *Arachis Pintoi*, em diferentes estratos de pastagens consorciadas, com e sem adubação nitrogenada. Esses autores encontraram valor médio de FDN de 52,8% para a cultivar *Arachis Pintoi* e os teores encontrados para a cultivar “Coastcross” – 1 foram de 68% para lâminas foliares verdes e 74,6% para bainha e colmo verde. Os resultados encontrados evidenciam a leguminosa *Arachis Pintoi* como boa fonte alimentar para ruminantes.

Este experimento foi realizado para as gramíneas e forrageiras, em canteiros adubados e não adubados. Estatisticamente, o efeito da adubação não foi significativo. No Anexo C, encontra-se a Tabela 3C com a análise estatística para esse parâmetro.

5.6 Teor de fibra de detergente ácido (FDA)

A análise do teor de fibra de detergente ácido (FDA) nas cultivares indicou que houve efeito significativo ($P < 0,05$) para interação entre as épocas de corte e as cultivares estudadas (Tabelas 12 e 13). Este experimento foi realizado para as gramíneas e forrageiras em canteiros adubados e não adubados. Estatisticamente, o efeito da adubação não foi significativo. No Anexo D, encontra-se a Tabela 4C, com a análise estatística para este parâmetro.

TABELA 12 Teores de FDA (%) de gramínea “Coastcross” solteira e em consórcio.

Gramínea	Cortes		
	1º Corte	2º Corte	3º Corte
Gramínea solteira	37,85 ab B	41,89 ab A	42,77 abcd A
Gramínea + Stylosanthes Campo Grande	38,94 ab A	42,39 ab A	42,37 bcd A
Gramínea + Stylosanthes Mineirão	42,40 a A	42,82 ab A	43,20 abc A
Gramínea + Amendoim Belmonte	36,86 b B	41,45 ab A	41,08 bcd A
Gramínea + Amendoim Amarillo	37,44 ab B	41,63 ab A	42,25 bcd A

Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem, pelo teste de Tuckey ($P < 0,05$), entre os cortes.

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem, pelo teste de Tuckey ($P < 0,05$), dentro dos cortes.

TABELA 13 Teores de FDA (%) de leguminosas em consórcio com gramínea “Coastcross”.

Forrageiras	Cortes		
	1º Corte	2º Corte	3º Corte
Stylosanthes Campo Grande	40,80 ab B	44,27 a B	47,92 a A
Stylosanthes Mineirão	39,91 ab B	41,29 abc B	45,91 ab A
Amendoim Belmonte	38,15 ab A	37,86 bc A	40,45 cd A
Amendoim Amarillo	30,64 c B	36,09 c A	37,59 d A

Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem, pelo teste de Tuckey ($P < 0,05$) entre os cortes.

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem, pelo teste de Tuckey ($P < 0,05$) dentro dos cortes.

Relacionando as épocas de corte verifica-se que, em todos os cortes, os maiores teores de FDA encontrados foram para a gramínea em consórcio com *Stylosanthes* Mineirão.

Houve um acréscimo estatisticamente significativo nos teores de FDA com o avanço da idade da planta para a gramínea solteira e em consórcio com as cultivares Amendoim Belmonte e Amendoim Amarillo e para as leguminosas *Stylosanthes* Campo Grande, Mineirão e Amendoim Amarillo. As demais forrageiras também apresentaram acréscimo em seus teores, porém não foi estatisticamente significativo. O teor de FDA na gramínea em consórcio não diferiu significativamente da gramínea solteira, o que pode indicar que o consórcio não interferiu na produção de fibra da gramínea.

Em seus estudos sobre a determinação e efeito da concentração de ácidos fenólicos na degradabilidade do capim “Coastcross”, Peron (2007) encontrou resultados semelhantes, observando um pequeno aumento no teor de FDA com efeito linear ascendente significativo ($P < 0,01$), com o avanço da idade da forrageira. O autor concluiu que esse aumento é consequência do aumento da relação caule/folha que ocorre com o avanço da idade das plantas.

O aumento do teor de FDA das forrageiras no decorrer dos cortes não é interessante, pois indica uma redução nos teores de conteúdo celular e acréscimo nos teores de fibra o que provoca a diminuição do valor nutritivo das forragens, uma vez que as frações solúveis são inversamente proporcionais às frações fibrosas quando se aumenta a idade das plantas (Queiroz Filho et al., 2000). Dessa forma, dentre as leguminosas, a que se apresenta mais interessante para a nutrição animal é a cultivar Amendoim Belmonte que não apresentou diferença significativa ($P < 0,05$), pelo teste de Tuckey, em seus teores de FDA em relação aos três cortes. É importante citar que os valores ideais de FDA na dieta dos ruminantes depende da análise do zootecnista responsável, que observa fatores

como a raça do animal, se esse animal é para pecuária de corte ou leiteira, peso esperado, etc.

5.7 Teor de lignina

A análise do teor de lignina nas cultivares indicou que houve efeito significativo ($P < 0,05$) para interação entre as épocas de corte e as cultivares estudadas (Tabelas 14 e 15). Este experimento foi realizado para as gramíneas e forrageiras, em canteiros adubados e não adubados. Estatisticamente, o efeito da adubação não foi significativo. No Anexo D, encontra-se a Tabela com a análise estatística para esse parâmetro.

Houve um acréscimo no teor de lignina com a maturidade da planta para as gramíneas, solteira e consorciada, porém observa-se um decréscimo no teor de lignina para todas as gramíneas consorciadas no 2º corte. Esses efeitos não foram estatisticamente significativos entre as gramíneas (Tabela 14).

TABELA 14 Teores de lignina (%) de gramínea “Coastcross”, solteira e em consórcio.

Gramínea	Cortes		
	1º Corte	2º Corte	3º Corte
Gramínea solteira	10,56 a A	10,65 a A	11,97 bc A
Gramínea + Stylosanthes Campo Grande	11,19 a A	10,24 a A	10,93 c A
Gramínea + Stylosanthes Mineirão	10,60 a A	10,33 a A	12,32 bc A
Gramínea + Amendoim Belmonte	11,14 a A	9,92 a A	11,28 bc A
Gramínea + Amendoim Amarillo	12,25 a A	10,27 a A	12,28 bc A

Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem, pelo teste de Tuckey ($P < 0,05$), entre os cortes.

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem, pelo teste de Tuckey ($P < 0,05$), dentro dos cortes.

Os teores de lignina não diferiram estatisticamente para as leguminosas, com exceção da Amendoim Amarillo que apresentou os maiores teores (Tabela 15). As leguminosas apresentaram o mesmo comportamento que as gramíneas

em consórcio, uma diminuição nos teores no 2º corte e a *Stylosanthes Campo Grande* apresentou diminuição dos teores, ao longo dos cortes.

TABELA 15 Teores de lignina (%) de leguminosas, em consórcio com gramínea “Coastcross”.

Forrageiras	Cortes		
	1º Corte	2º Corte	3º Corte
Stylosanthes Campo Grande	11,85 a A	11,37 a A	11,31 bc A
Stylosanthes Mineirão	13,81 a A	12,89 a A	15,17 ab A
Amendoim Belmonte	13,94 a A	12,51 a A	14,12 abc A
Amendoim Amarillo	12,26 a B	13,33 a B	16,96 a A

Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem, pelo teste de Tuckey ($P < 0,05$), entre os cortes.

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem, pelo teste de Tuckey ($P < 0,05$), dentro dos cortes.

A lignina é o componente da parede celular que apresenta efeito negativo sobre a digestão ruminal (Deschamps, 1999). Assim, teores mais altos de lignina em forrageiras são indicativos de menor digestibilidade. Observou-se que os teores de lignina nas leguminosas são maiores que os das gramíneas, portanto, as leguminosas devem apresentar uma menor digestibilidade em relação à gramínea.

Carnevalli et al. (2001) ao avaliarem o desempenho de ovinos e as respostas de pastagens da gramínea “Coastcross”, com diferentes alturas, em regime de lotação contínua obtiveram resultados diferentes dos encontrados neste trabalho. Em seus estudos, os teores de lignina variaram ao longo do ano, sendo observada grande redução nos valores encontrados na primavera (6% a 7%) e no verão (3% a 4%). No entanto, as diferenças podem ter ocorrido porque os cortes não foram feitos observando as estações do ano e sim a altura dos canteiros e no estudo de Carnevalli et al. (2001), as análises foram realizadas da planta inteira, incluindo o caule, com alto teor de lignina. Esse fato pode ter elevado os teores de lignina encontrados na gramínea “Coastcross”.

Os teores de lignina mantiveram-se constantes ao longo dos cortes para todas as cultivares, com exceção da cultivar Amendoim Amarello, cujos teores foram menores no primeiro e aumentaram significativamente no terceiro corte. Teores mais altos de lignina em forrageiras são indicativos de menor digestibilidade, sendo assim a cultivar Amendoim Amarello deve ser a cultivar com menor digestibilidade entre todas as estudadas.

5.8 Teor de polifenóis totais

Houve efeito significativo ($P < 0,05$) para a interação entre épocas de corte, cultivares estudadas e adubação. Os resultados observados encontram-se nas Tabelas 16 e 17.

Na Tabela 16, observa-se que o teor de polifenóis diminuiu para todas as gramíneas no decorrer dos cortes nos canteiros adubados. Nos canteiros não adubados, verifica-se um aumento dos teores apenas no 2º corte. O teor de polifenóis da gramínea solteira não diferiu, estatisticamente, do teor de polifenóis da gramínea em consórcio com todas as leguminosas, o que pode indicar que a presença das leguminosas nos canteiros não interfere na produção de polifenóis pela gramínea.

Em relação às leguminosas adubadas (Tabela 17), esses teores diminuíram com a maturidade da planta para as cultivares *Stylosanthes Mineirão* e Amendoim Amarello e tiveram acréscimo para as leguminosas *Stylosanthes Campo Grande* e Amendoim Belmonte. Em canteiros não adubados, a leguminosa *Stylosanthes Mineirão* apresentou um acréscimo em seus teores de polifenóis no decorrer dos cortes, as leguminosas *Stylosanthes Campo Grande* e Amendoim Belmonte apresentaram esses acréscimos no 2º corte, e na Amendoim Belmonte houve um decréscimo nesse corte.

Analisando por corte, verifica-se que o menor teor de polifenóis encontrado foi para a gramínea solteira não adubada no 3º corte, e o maior foi para a leguminosa *Stylosanthes Mineirão* adubada no 1º corte.

Os teores de compostos fenólicos em *Stylosanthes Campo Grande*, *Mineirão* e *Arachis Pinto* foram quantificados por Godoy et al. (2007) ao investigarem a composição química, a cinética de fermentação e o efeito dos taninos na síntese de proteína microbiana. Os valores encontrados em equivalente grama de ácido tânico para *Stylosanthes Campo Grande* e *Mineirão* foram 15,6 eq-g e 26,3eq-g, respectivamente. O menor valor encontrado ($P < 0,05$) foi para o amendoim forrageiro 11,1 eq-g.

TABELA 16 Teores de polifenóis (mg/100g de polifenóis na MS) de gramínea “Coastcross” solteira e consorciada, adubadas e não adubadas.

	1º corte		2º corte		3º corte	
	Adubadas	Não adubadas	Adubadas	Não adubadas	Adubadas	Não adubadas
Gramíneas						
Gramínea solteira	578,1 e A	511,0 c A	440,3 c B	629,3 d A	321,8 c A	364,7 d A
Gramínea + Stylosanthes Campo Grande	568,6 e A	537,4 c A	444,8 c B	625,2 d A	360,7 c A	366,1 d A
Gramínea + Stylosanthes Mineirão	554,6 e A	509,7 c A	420,1 c B	577,2 d A	360,0 c A	378,8 d A
Gramínea + Amendoim Belmonte	527,7 e A	519,1 c A	442,6 c B	683,2 d A	357,2 c A	361,6 d A
Gramínea + Amendoim Amarillo	587,3 e A	513,5 c A	420,7 c B	626,8 d A	357,4 c A	367,4 d A

Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem, pelo teste de Tuckey, em nível de 5% de probabilidade e comparam as adubações em cada corte.

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem, pelo teste de Tuckey, em nível de 5% de probabilidade e comparam as forrageiras entre os cortes.

TABELA 17 Teores de polifenóis (mg/100g de polifenóis na MS) de leguminosas em consórcio com gramínea “Coastcross”, adubadas e não adubadas.

Forrageiras	1º corte		2º corte		3º corte	
	Adubadas	Não adubados	Adubadas	Não adubados	Adubadas	Não adubados
Stylosanthes Campo Grande	1830,1 d B	1944,0 b A	2414,0 b B	2967,7 a A	2731,2 a A	2122,1 c B
Stylosanthes Mineirão	4244,9 a A	2058,0 b B	2648,0 a A	2011,0 c B	2708,7 b A	3157,8 a A
Amendoim Belmonte	2189,3 c A	2043,7 b B	2338,2 b A	2326,3 b A	2380,7 b A	2204,2 c B
Amendoim Amarillo	2837,8 b B	3033,9 a A	2412,2 b A	2411,1 b A	2315,2 b B	2826,1 b A
Stylosanthes Campo Grande	1830,1 d B	1944,0 b A	2414,0 b B	2967,7 a A	2731,2 a A	2122,1 c B

Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem, pelo teste de Tuckey, em nível de 5% de probabilidade e comparam as adubações em cada corte.

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem, pelo teste de Tuckey, em nível de 5% de probabilidade e comparam as forrageiras entre os cortes.

Polifenóis livres estão envolvidos nas ligações da lignina com os carboidratos da parede celular e essa associação reduz a digestibilidade. Compostos fenólicos derivados da lignina inibem a digestão de celulose e hemicelulose por culturas puras ou mistas de microorganismos ruminais (Akin & Benner, 1988). A gramínea “Coastcross” solteira e em consórcio, em canteiros adubados e não adubados apresentou decréscimo em seus teores de polifenóis. Essas observações podem indicar que a digestibilidade da gramínea está se modificando com o avanço da idade das plantas.

Uma das principais estratégias de sobrevivência empregada pelas plantas é a sintetização de compostos como cutina, lignina, fenóis, terpenóides e alcalóides para conferir-lhes resistência ao vento, doenças, desfolhação. Essas substâncias geralmente fazem parte da estrutura da planta e são de baixo valor nutritivo (Carvalho & Pires, 2008). A quantidade dos compostos fenólicos

presentes nos diferentes tecidos das plantas tem sido relacionada com a digestibilidade (Akin et al., 1990).

Os teores de polifenóis das cultivares *Stylosanthes* Campo Grande e Amendoim Amarello adubadas e *Stylosanthes* Mineirão não adubada aumentaram no decorrer dos cortes. Essas leguminosas podem estar desenvolvendo estratégias de sobrevivência mais acentuadas ao longo do ano que as demais forrageiras e o acréscimo no teor de polifenóis dessas forrageiras pode interferir em sua digestibilidade e em seu valor nutritivo para os animais.

5.9 Cromatografia líquida de alta eficiência

Neste estudo foram determinados 13 compostos fenólicos em amostras de *Stylosanthes guianensis* cultivares Campo Grande e Mineirão, *Arachis pintoi* cultivares Belmonte e Amarello e *Cynodon dactylon* (L.) Pers (capim “Coastcross”).

A Gráfico 1 ilustra o cromatograma com detecção espectrofotométrica em 280 nm obtido após injeção de 20 µL de solução padrão dos compostos fenólicos em uma concentração de 5×10^{-6} mol L⁻¹, em uma coluna Shim-pack VP – ODS (250 mm x 4,6 mm, 5µm – Shimadzu) conectada a uma pré-coluna Shim-pack VP – ODS (5,0 cm x 4,0 mm, 5µm – Shimadzu). O fluxo empregado foi de 1,25 mL min⁻¹ à uma temperatura de 15°C, utilizando-se gradiente de eluição e a fase móvel composta pelas soluções: ácido acético 2% (A) e metanol:água:ácido acético (65:33:2 v/v/v) (B), conforme descrito na seção 4.4.3.

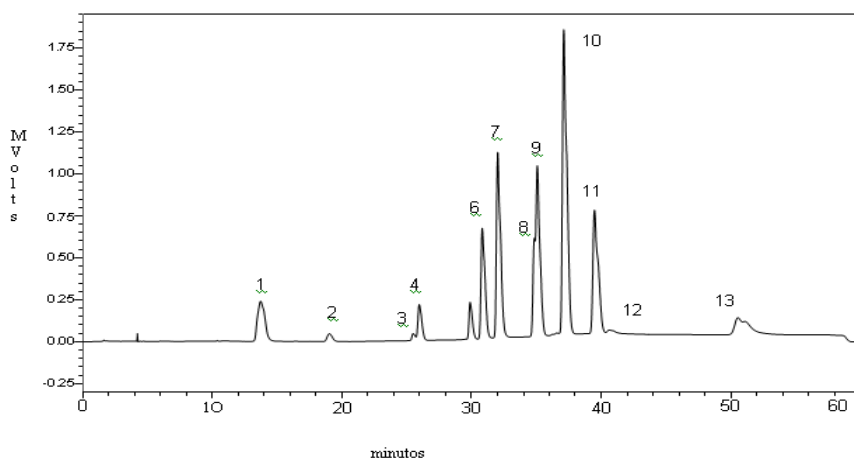


GRÁFICO 1 Cromatograma da solução de ácidos fenólicos com detecção espectrofotométrica em 280 nm. Identificação dos picos: 1 = Gálico; 2 = Galocatequina; 3 = Galato de epigalocatequina; 4 = Catequina; 5 = Epicatequina; 6 = ácido caféico; 7 = vanilina; 8 = ácido p-cumárico; 9 = ácido ferúlico; 10 = ácido m-cumárico; 11 = ácido o-cumárico; 12 = Elágico e 13 = Quercetina.

Zacaroni (2009) desenvolveu um método analítico para caracterização e quantificação de compostos fenólicos e cumarinas, em aguardentes de cana envelhecidas em barris de diferentes espécies de madeira, utilizando como fase móvel solução de ácido acético 2% (A) e 70% metanol e ácido acético 2% (B). Com base nesse trabalho, iniciaram-se os estudos utilizando diferentes proporções da fase móvel para uma melhor separação dos compostos fenólicos. A escolha da melhor proporção foi feita levando-se em consideração os parâmetros cromatográficos, tempo de retenção (t_r), fator de retenção (k') e resolução (R). Os valores encontrados estão representados na Tabela 18.

TABELA 18 Otimização dos parâmetros cromatográficos em diferentes proporções de metanol.

Picos	Metanol 80%			Metanol 70%			Metanol 65%			Metanol 50%		
	tr'	k'	R	tr'	k'	R	tr'	k'	R	tr'	k'	R
1	11,7	6,86		12,3	7,24		13,7	7,81		14,2	8,11	
2	21,3	9,17	0,93	19,9	10,0	8,01	18,9	10,9	6,02	28,0	12,8	19,0
3	21,6	9,78	1,03	22,8	11,6	13,2	25,2	11,7	10,2	28,2	13,2	2,63
4	23,0	10,5	1,68	24,3	12,3	0,86	25,7	12,9	1,20	42,1	20,0	6,71
5	23,7	10,9	0,73	24,2	13,2	7,67	29,5	13,9	7,36	42,2	20,1	0,17
6	24,1	11,1	0,29	25,1	14,9	2,59	30,5	15,3	1,80	42,6	20,8	0,73
7	24,9	11,4	0,60	26,2	15,7	2,77	31,7	16,5	1,99	45,2	21,6	1,18
8	25,9	11,9	0,51	28,0	16,4	1,14	34,4	16,8	2,79	47,4	22,7	1,12
9	26,3	12,2	0,15	28,1	16,9	0,09	34,7	17,2	0,20	48,2	23,1	0,36
10	27,7	12,8	0,55	29,3	17,3	0,64	36,7	17,5	1,29	49,8	23,9	0,68
11	28,4	13,2	0,50	30,6	18,0	3,22	39,0	18,3	3,13	50,7	24,4	0,53
12	29,6	13,8	0,86	31,0	18,3	0,54	40,1	18,7	1,33	52,2	25,1	0,88
13	32,8	15,4	2,30	34,6	18,9	4,82	50,0	19,2	8,86	57,3	27,7	2,33

Observou-se que, para a eluição com 80% e com 50% de metanol a resolução para a maioria dos compostos fenólicos ficou abaixo de 1,5, o que indica separação parcial dos picos, acarretando uma determinação da área dos picos inexata e uma análise quantitativa errônea. As eluições com 70% e 65% de metanol apresentaram parâmetros parecidos e observou-se que a resolução dos picos 3, 4, 8, 9, 10 e 12 para ambas as eluições ficou abaixo de 1,5. No entanto, na eluição com 70% de metanol os valores entre os picos foram inferiores aos valores encontrados na eluição para 65%, sendo mais próximos a 1,5. Observa-se também que os picos 7 e 10 apresentaram ótima resolução para a eluição a 65%, com resultados bem melhores que para a eluição a 70%. Os fatores de retenção obtidos nessa eluição encontram-se dentro da faixa de 0,5 a 20, demonstrando a força eluente adequada da fase móvel.

Segundo Harris (2001), mudanças de solventes alteram a viscosidade e o poder eluente da fase móvel. Assim, foram realizados alguns testes com o solvente acetonitrila como um dos constituintes da fase móvel, no entanto, houve diminuição dos valores de resolução na maioria dos picos comprometendo a separação dos compostos fenólicos. Dessa forma, utilizou-se a

eluição com metanol a 65% nas análises cromatográficas uma vez que essa apresentou melhor separação entre os compostos analisados.

Para a quantificação dos compostos fenólicos, utilizou-se o método de padronização externa. As curvas analíticas das soluções padrões (Gráfico 1 a 13) foram obtidas através de diluições das soluções concentradas de $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, obtendo-se valores em um intervalo de concentração de 3×10^{-7} a $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

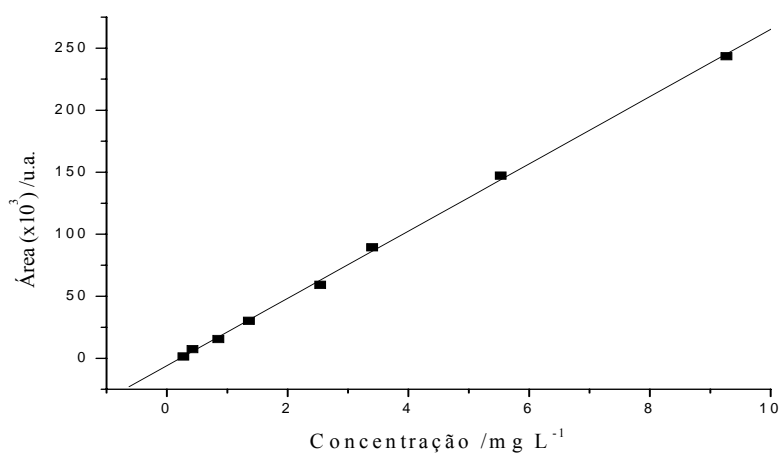


GRÁFICO 2 Curva analítica obtida a partir das soluções de ácido gálico.

Equação da reta: $y = -5898,66 + 27102,64x$.

Coefficiente de correlação linear = 0,9995

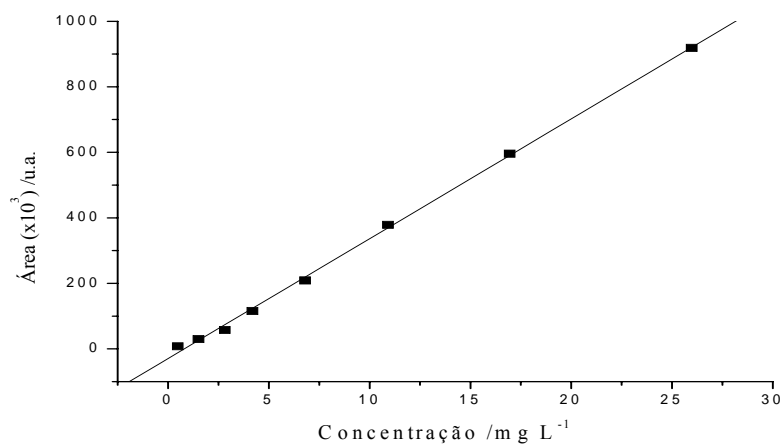


GRÁFICO 3 Curva analítica obtida a partir das soluções de ácido elágico
 Equação da reta: $y = -29225,81 + 36559,71x$
 Coeficiente de correlação linear = 0,9994

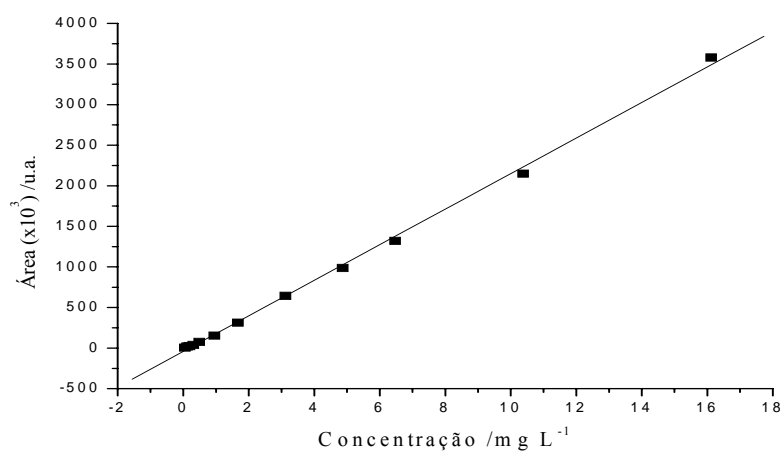


GRÁFICO 4 Curva analítica obtida a partir das soluções de ácido ferúlico
 Equação da reta: $y = -40744,15 + 219048,45x$
 Coeficiente de correlação linear = 0,9991

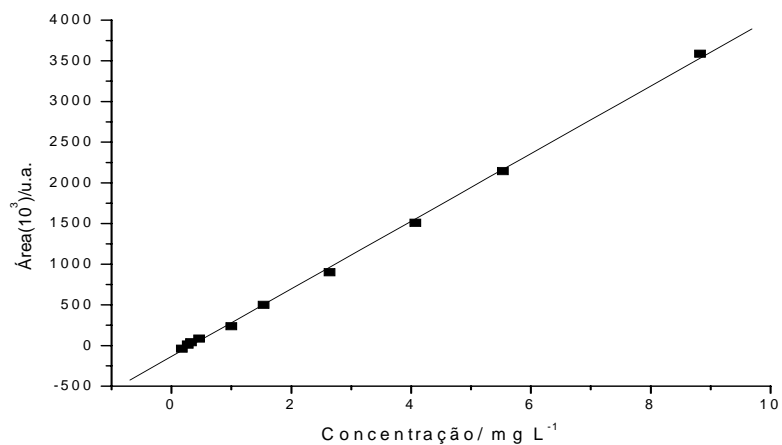


GRÁFICO 5 Curva analítica obtida a partir das soluções de ácido meta-cumárico

Equação da reta: $y = -139606,67 + 415600,59x$

Coefficiente de correlação linear = 0,9991

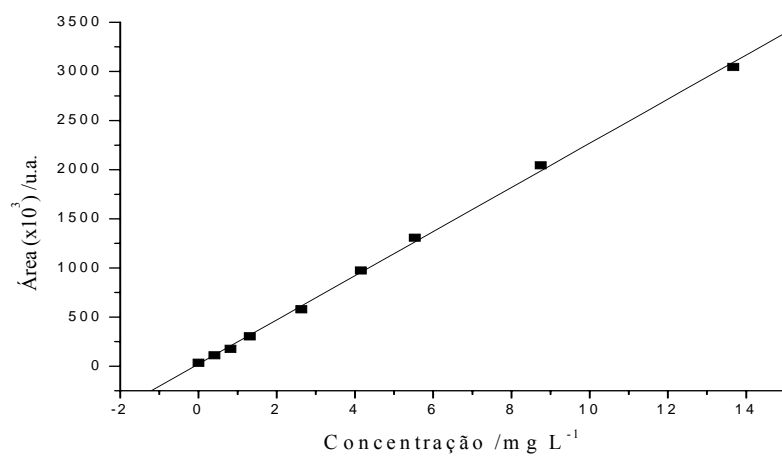


GRÁFICO 6 Curva analítica obtida a partir das soluções de ácido orto-cumárico

Equação da reta: $y = 22484,41 + 224614,45x$

Coefficiente de correlação linear = 0,9994

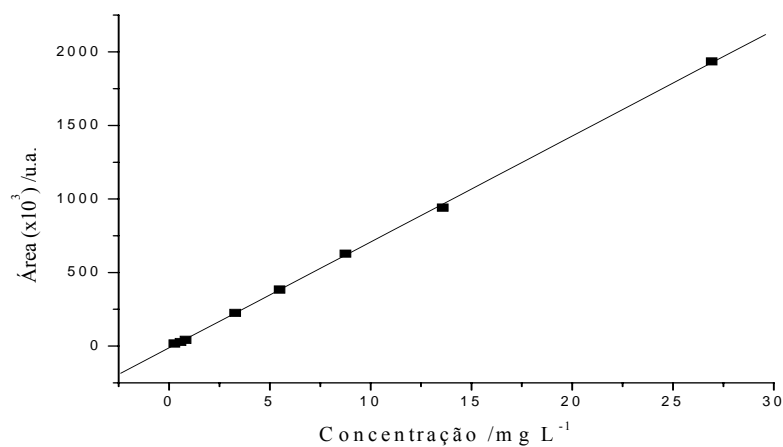


GRÁFICO 7 Curva analítica obtida a partir das soluções de ácido para-cumárico
 Equação da reta: $y = -12019,34 + 71995,03x$
 Coeficiente de correlação linear = 0,9998

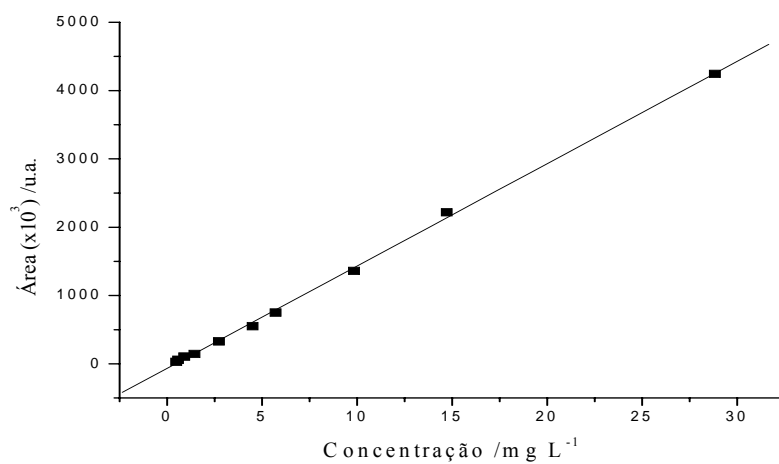


GRÁFICO 8 Curva analítica obtida a partir das soluções de ácido caféico
 Equação da reta: $y = -65593,05 + 149762,57x$
 Coeficiente de correlação linear = 0,9995

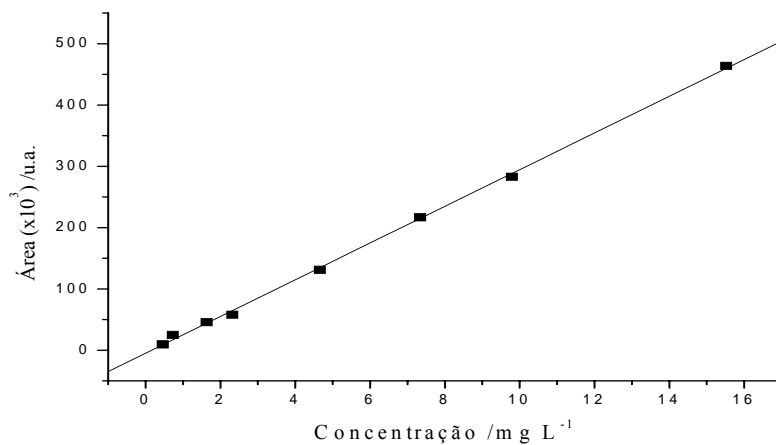


GRÁFICO 9 Curva analítica obtida a partir das soluções de catequina
 Equação da reta: $y = -4846,18 + 29944,23x$
 Coeficiente de correlação linear = 0,9995

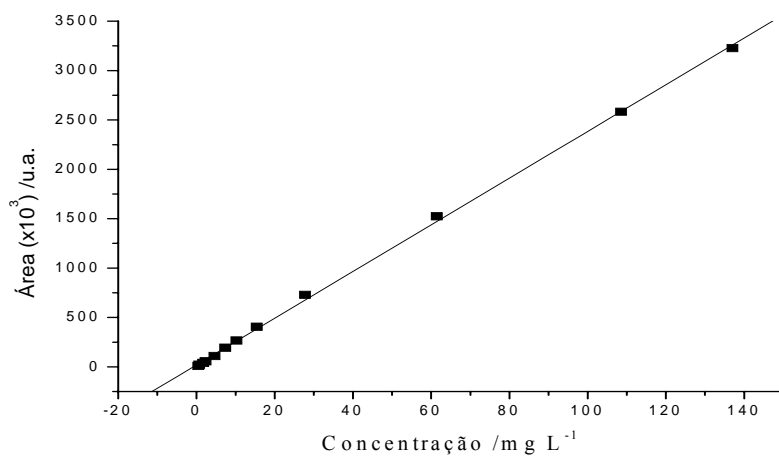


GRÁFICO 10 Curva analítica obtida a partir das soluções de epicatequina
 Equação da reta: $y = 19924,68 + 23638,63x$
 Coeficiente de correlação linear = 0,9997

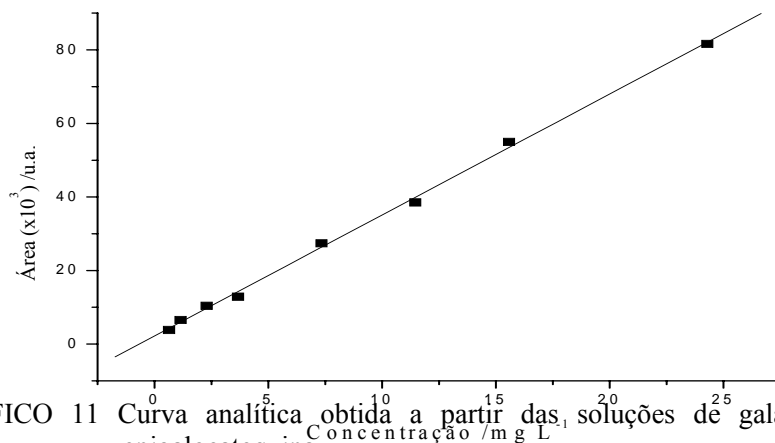


GRÁFICO 11 Curva analítica obtida a partir das soluções de galato de epigalocatequina
 Equação da reta: $y = 2202,21 + 3289,93x$
 Coeficiente de correlação linear = 0,9992

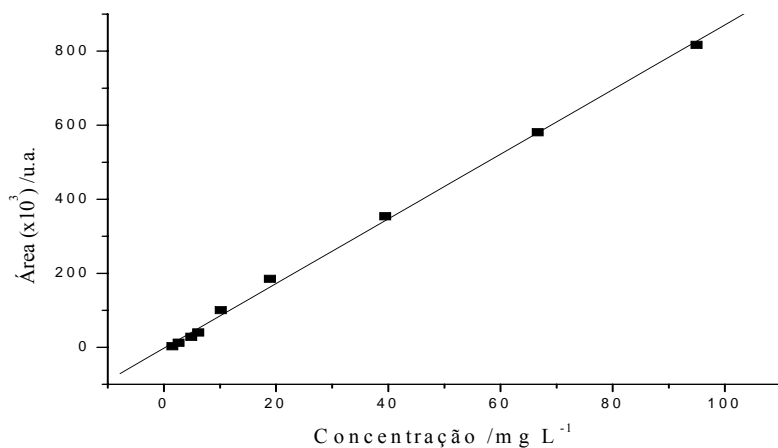


GRÁFICO 12 Curva analítica obtida a partir das soluções de galocatequina
 Equação da reta: $y = -2388,24 + 8732,46x$
 Coeficiente de correlação linear = 0,9990

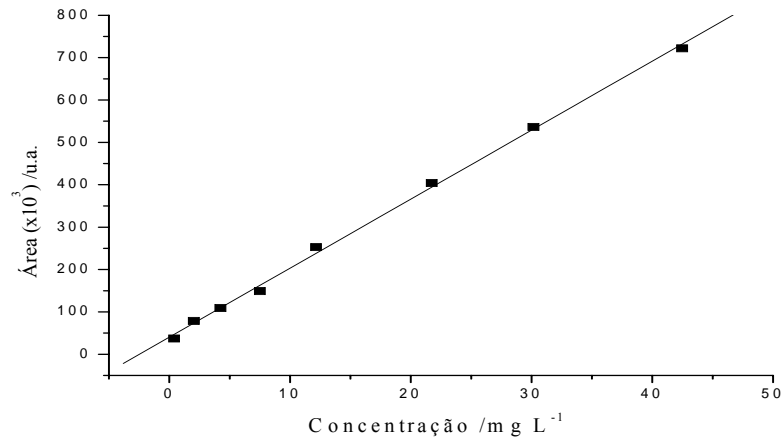


GRÁFICO 13 Curva analítica obtida a partir das soluções de quercetina
Equação da reta: $y = 40450,13 + 16281,02x$
Coeficiente de correlação linear = 0,9991

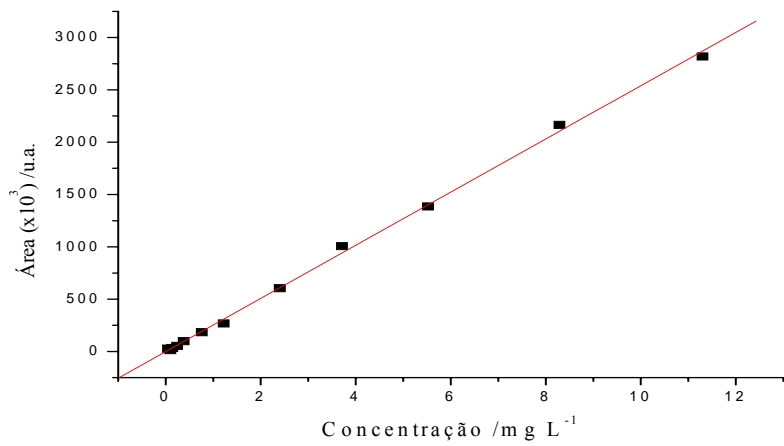


GRÁFICO 13 Curva analítica obtida a partir das soluções de vanilina
Equação da reta: $y = -703,36 + 254010,86x$
Coeficiente de correlação linear = 0,9994

As equações das curvas analíticas foram calculadas pelo método dos mínimos quadrados, medindo-se a resposta do detector (área) em função da concentração, após a injeção em triplicata das soluções contendo todos os padrões. Observam-se coeficientes de correlação superiores a 0,999, o que indica forte correlação linear entre as concentrações das substâncias e as áreas dos picos.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) obtidos estão demonstrados na Tabela 19. De acordo com os resultados apresentados, pode-se observar que o intervalo medido foi de 0,05 a 42,48 mg L⁻¹. O limite de detecção foi definido como a concentração cuja resposta foi três vezes a relação sinal/ruído e o limite de quantificação a relação sinal-ruído 10:1 (Snyder et al., 1997; Aquino et al., 2006). Os limites de detecção e quantificação encontrados para os compostos fenólicos variaram de 0,02 a 0,8 mg L⁻¹ e 0,07 a 2,30 mg L⁻¹, respectivamente.

TABELA 19 Limites de detecção (LD), limites de quantificação (LQ) e linearidade dos compostos fenólicos analisados.

Compostos fenólicos	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)	Linearidade (mg L ⁻¹)
Ácido gálico	0,10	0,30	0,27 – 9,27
Galocatequina	0,80	2,30	1,53 – 39,47
Galato de Epigalocatequina	0,18	0,80	0,64 – 24,29
Catequina	0,09	0,17	0,46 – 15,52
Epicatequina	0,09	0,70	0,46 – 37,03
Ácido cafeico	0,05	0,84	0,48 – 28,83
Vanilina	0,02	0,07	0,05 – 11,3
Ácido para-cumárico	0,05	0,54	0,26 – 26,92
Ácido ferúlico	0,02	0,08	0,05 – 16,17
Ácido meta-cumárico	0,02	0,15	0,08 – 18,82
Ácido orto-cumárico	0,02	0,17	0,07 – 13,67
Ácido elágico	0,27	0,54	0,48 – 25,98
Quercetina	0,20	0,80	0,40 – 42,48

A precisão do método analítico foi avaliada por meio dos testes de repetibilidade que representa a concordância entre os resultados de medições

sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, em um curto intervalo de tempo (Snyder, 1997; Ribani et al., 2004). O estudo da precisão foi realizado por 3 injeções consecutivas de três soluções-padrão na concentração $5,33 \times 10^{-5}$, 2×10^{-5} e 5×10^{-6} mol L⁻¹ para cada analito (Tabela 20).

TABELA 20 Médias das áreas dos picos, para os compostos fenólicos obtidos de injeções consecutivas de três diferentes concentrações e os respectivos desvios padrões relativos (%RSD).

Compostos	5,33x10 ⁻⁵ M	RSD%	2x10 ⁻⁵ M	RSD%	5x10 ⁻⁶ M	RSD%
Ácido gálico	946467	0,04	199262	0,05	47837,48	0,82
Galocatequina	129279	0,02	33838	0,02	6684	0,001
Galato de Epigalocatequina	74585,67	0,07	26269	0,05	10399	0,003
Catequina	447432	0,06	129572	0,17	54740	0,006
Epicatequina	401512	0,02	112521	0,21	48691	0,005
Ácido caféico	1417559	0,08	295734	0,12	104512	0,004
Vanilina	2425673	0,62	616706	0,21	184130	0,002
Ácido p-cumárico	624866	0,62	225749	1,05	41606	0,004
Ácido ferúlico	2255055	6,83	527420	1,10	137213	0,003
Ácido m-cumárico	4269505	0,71	613759	1,25	210593	0,002
Ácido o-cumárico	2077039	3,96	635367	1,10	171605	0,003
Ácido elágico	645703	0,58	255267	1,10	60265	0,003
Quercetina	376594	0,69	102890	1,18	11635	0,006

A recuperação do método também foi avaliada nas amostras. A concentração dos compostos fenólicos foi calculada pelo aumento da área dos picos, obtida pela adição de uma quantidade conhecida do padrão e a porcentagem de recuperação calculada pela fórmula abaixo. Os resultados estão apresentados na Tabela 21.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{concentração medida}}{\text{concentração esperada}} \times 100$$

TABELA 21 Recuperação dos compostos fenólicos em amostras de forrageiras.

Compostos fenólicos	Amostra (mg L ⁻¹)	Adicionado (mg L ⁻¹)	Encontrado (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)
Ácido gálico	0,011	0,85	0,84	98,82
Galocatequina	0,150	2,29	2,24	97,82
Epigalocatequina	NQ	1,45	1,45	100
Catequina	0,243	1,45	1,60	92,34
Epicatequina	0,056	0,90	0,93	93,33
Ácido cafeico	0,093	0,76	0,84	98,53
Vanilina	0,162	0,82	0,93	95,41
Ácido p-cumárico	0,015	0,97	0,91	93,81
Ácido ferúlico	0,023	0,82	0,83	97,22
Ácido m-cumárico	0,021	0,82	0,80	97,56
Ácido o-cumárico	0,069	1,51	1,50	99,34
Ácido elágico	NQ	1,69	1,69	100
Quercetina	NQ	1,53	1,53	100

NQ = Não quantificado

Observa-se que o intervalo da recuperação foi de 93,81% a 113,41% para os compostos analisados. Esses resultados são satisfatórios, uma vez que intervalos aceitáveis estão entre 70 e 120% para resíduos, com precisão de até $\pm 20\%$ ou dependendo da complexibilidade analítica e da amostra de 50 a 120%, com precisão de $\pm 15\%$ (Collins & Braga, 1990).

5.9.1 Quantificação dos compostos fenólicos

Nas Figuras de 18 a 22, observam-se os perfis cromatográficos encontrados em amostras de capim Coastrcross solteiro e as leguminosas Stylosanthes Campo Grande, Stylosnthes Mineirão, Amendoim Amarello e Amendoim Belmonte, oriundas de consórcio com “Coastrcross” adubadas.

Os cálculos utilizados para determinar as concentrações dos compostos fenólicos nas forrageiras estão descritos no Anexo D. Compostos fenólicos que ocorreram nos três cortes foram estatisticamente avaliados pelo teste de Tuckey ($P < 0,05$).

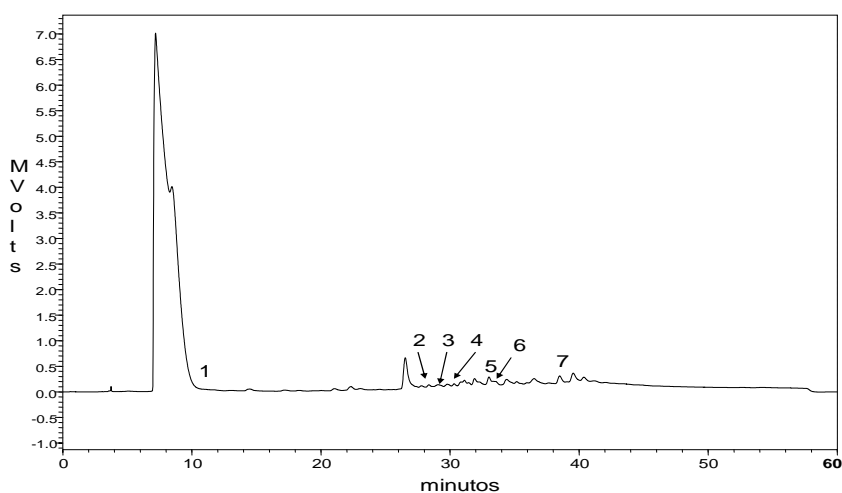


FIGURA 11 Cromatograma referente à amostra de capim “Coastcross”: 1= ácido gálico, 2 = epicatequina, 3 = ácido caféico, 4 = vanilina, 5 = ácido p-cumárico, 6 = ácido ferúlico e 7 = ácido elágico.

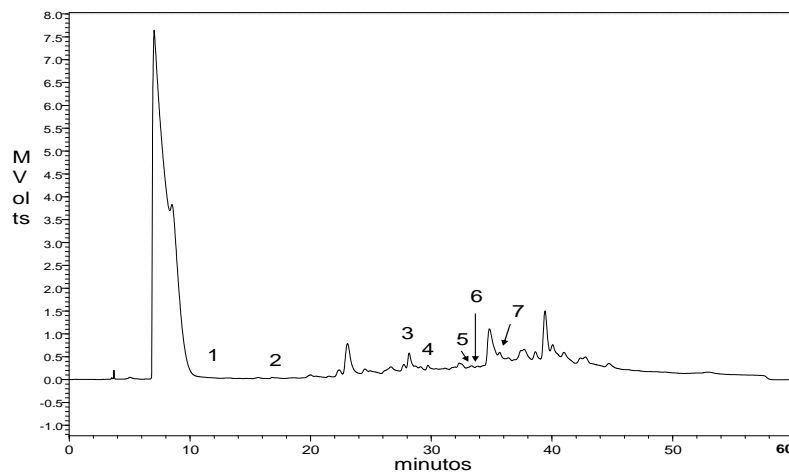


FIGURA 12 Cromatograma referente à amostra Stylosanthes Campo Grande: 1 = ácido gálico; 2 = galocatequina; 3 = epicatequina; 4 = ácido caféico; 5 = ácido p-cumárico; 6 = ácido ferúlico e 7 = ácido m-cumárico.

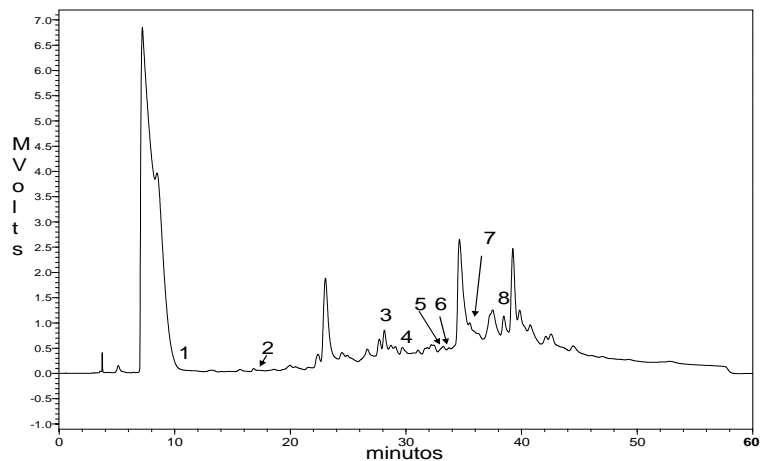


FIGURA 13 Cromatograma referente à amostra de *Sthylosanthes* Mineirão: 1= ácido gálico, 2 = galocatequina, 3 = epicatequina, 4 = ácido cafêico, 5 = ácido p-cumárico, 6 = ácido ferúlico, 7 = ácido m-cumárico e 8 = ácido elágico.

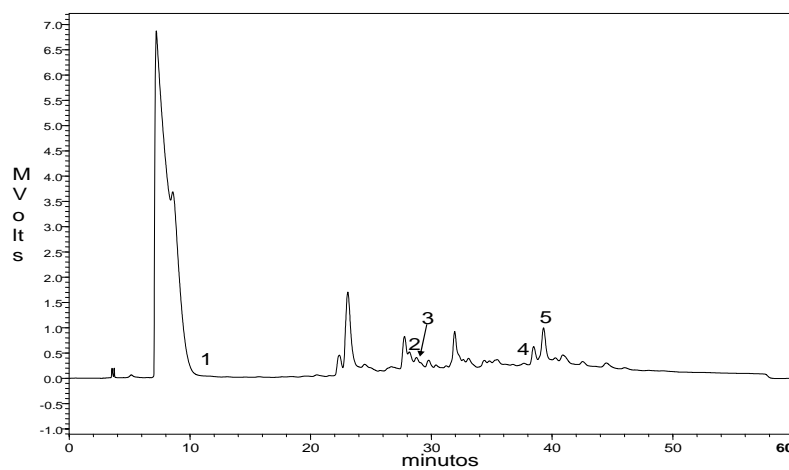


FIGURA 14 Cromatograma referente à amostra de Amendoim Belmonte: 1 = ácido gálico; 2 = epicatequina; 3 = ácido cafêico; 4 = ácido o-cumárico; 5 = ácido elágico.

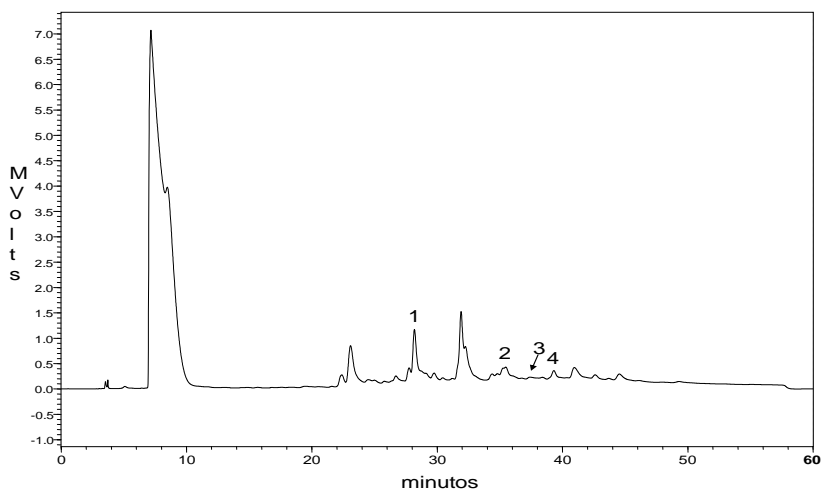


FIGURA 15 Cromatograma referente à amostra de Amendoim Amarelo: 1 = epicatequina, 2 = ácido m-cumárico, 3 = ácido o-cumárico e 4 = ácido elágico

Os picos que ocorrem nas Figuras 18 a 22 foram confirmados como sendo dos compostos em análise, pela adição de um padrão conhecido nas amostras

As concentrações dos compostos fenólicos e taninos encontrados na gramínea “Coastcross” e nas leguminosas consorciadas estão apresentadas nas Tabelas 22 e 23.

TABELA 22 Concentrações em µg/mg de MS de composto fenólicos em forrageiras adubadas.

COMPOSTOS FENÓLICOS	FORRAGEIRAS ADUBADAS														
	GRAMÍNEA COASTCROSS			STYLOSANTHES CAMPO GRANDE			STYLOSANTHES MINEIRÃO			AMENDOIM BELMONE			AMENDOIM AMARILLO		
	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º
Ácido elágico	6,08 A	3,41 B	1,31 C	59,17			51,65B	113,98A	38,82C						
Ácido gálico	1,50 A	0,35 B			0,45 A	0,19 B		0,24			0,45 A	0,21 B			0,27
Galocatequina				6,39			0,72 C	8,98 A	0,88 B						
Galato de epigalocatequina			17,75												
Catequina	4,09 A		1,65 B						18,27			18,21			
Epicatequina	31,92A	5,82 B	23,11A		17,59B	37,64A	19,51B	33,41A	30,11A	14,70B	17,60B	29,24A	70,06B	126,8A	
Ácido caféico		2,28 B	7,61 A			1,42		1,63		4,71 B	3,17 C	11,30A			2,71
Vanilina		0,61		1,13 B	3,64 A		0,35 B		3,17 A	5,53 A	3,54 B				1,13
Ácido p-cumárico		1,92 B	5,72 A	1,34 C	6,65 A	3,97 B	2,92 A	27,49A			6,35 A	18,64B			
Ácido ferúlico		1,03 B	2,60 A	0,74 B		1,03 A	0,84 A	0,70 B				2,77			
Ácido m-cumárico			1,07		0,95 B	1,71 A		2,47		0,89 B		1,82 A	0,68 B		2,35 A
Ácido o-cumárico					1,91		5,01			6,26 A		1,56 B	0,84 B		0,96 A
Quercetina				8,40											60,72

Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem, pelo teste de Tuckey (P<0,05), entre os cortes.

TABELA 23 Concentrações em µg/mg de MS de composto fenólicos em forrageiras não adubadas.

COMPOSTOS FENÓLICOS	FORRAGEIRAS ADUBADAS														
	GRAMÍNEA COASTCROSS			STYLOSANTHES CAMPO GRANDE			STYLOSANTHES MINEIRÃO			AMENDOIM BELMONE			AMENDOIM AMARILLO		
	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º
Ácido elágico			4,30						36,73			46,55			
Ácido gálico										0,46 A		0,18 B		0,20 B	0,33 A
Galocatequina							3,54 B	3,68 A							
Galato de epigalocatequina			14,98												
Catequina	0,58 B	2,87 A			27,27										
Epicatequina	2,96		22,69A			10,40B		13,12 B	13,60B		19,21B	28,38A			
Ácido caféico		5,27 A	2,51 B			4,78 A	2,52 A	1,08 C	1,86 B	4,54 A	3,19 C	3,44 B	5,67 A		3,52 B
Vanilina	2,64 A	1,05 B					0,40 B	0,16 C	1,14 A	0,79 A		0,85 A	14,05A	1,04 C	1,69 B
Ácido p-cumárico	17,04A	6,14 B					3,83 A	2,53 B	2,82 B		4,33 A	4,48 A			
Ácido ferúlico		2,75	1,30				0,80 A	0,59 B					6,74 A		2,91 B
Ácido m-cumárico	1,71		1,13				1,28 B	0,85 C	1,86 A	0,40 C	1,31 A	0,66 B			
Ácido o-cumárico	3,67 A	0,42 B								1,00 B		1,51 A			
Quercetina										3,78			15,58B	29,03A	27,29A

Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem, pelo teste de Tuckey ($P < 0,05$), entre os cortes.

A ocorrência de ácidos gálico, caféico e elágico nas amostras da gramínea “Coastcross” podem indicar a presença de taninos hidrolisáveis nessa forrageira. Na Tabela 22, verifica-se que as concentrações dos ácidos elágico e gálico diminuíram com a maturidade da planta para a gramínea “Coastcross” adubada. Conforme Ossipov et al. (1997), a concentração máxima de galotaninos ocorre em plantas jovens. A diminuição nas concentrações dos ácidos gálico e elágico pode ser interessante quando se estabelece o consórcio de pastagens da gramínea com as leguminosas estudadas. Em consórcio, o animal ingere ácidos gálico e elágico provenientes de ambas as forrageiras e a diminuição da concentração ao longo do tempo na gramínea, provavelmente, acarretará uma menor concentração de taninos hidrolisáveis, que podem ser tóxicos aos ruminantes.

O ácido caféico na gramínea “Coastcross” adubada apresentou comportamento inverso aos dos ácidos, sua concentração aumentou com a maturidade da planta. A adubação pode ter interferido no aumento da concentração de ácido caféico na gramínea, a concentração desse ácido diminuiu no decorrer dos cortes em canteiros não adubados e aumentou em canteiros adubados.

A adubação pode estar inteferindo na formação dos ácidos gálico, caféico e elágico, pois esses ocorreram apenas na leguminosa adubada. Os teores de ácido elágico aumentaram com a maturidade das plantas. O teor de ácido caféico ocorreu apenas em leguminosas não adubadas e diminuiu no decorrer dos cortes, o que pode indicar que há um decréscimo nesses teores quando a leguminosa cresce de forma natural, nas pastagens.

Os ácidos gálico, elágico e caféico também ocorreram na leguminosa *Stylosanthes Mineirão* e as concentrações mais elevadas de ácido gálico e elágico foram para o 2º corte, quando as forrageiras estavam adubadas. A ocorrência de ácido caféico predominou na cultivar não adubada e os teores

diminuíram com a maturidade da planta. Segundo Monteiro et al. (2005) os taninos são metabólitos secundários de defesa das plantas têm a função de inibir herbívoros e combinados a proteínas de tecidos de folhas, frutos e sementes resistem fortemente à putrefação. Esses fatores pode ter sido determinantes para a maior ocorrência dos taninos hidrolisáveis no 2º corte, durante o período de seca, que pode ter acarretado estresse na planta.

Na leguminosa Amendoim Belmonte (Tabela 22), observa-se que a adubação interferiu na concentração do ácido caféico. Houve uma diminuição da concentração na cultivar não adubada e aumento na cultivar adubada. Não foi observada interferência da adubação nas concentrações de ácido gálico, pois houve uma diminuição nas concentrações, tanto em cultivares adubadas quanto em não adubadas. O ácido elágico foi detectado apenas no 3º corte não adubado.

A ocorrência de ácido caféico na leguminosa Amendoim Amarillo nos canteiros adubados foi observada apenas no 3º corte e ao longo dos cortes, a cultivar não adubada ocorreu diminuição da concentração. O ácido gálico também ocorreu apenas no 3º corte adubado e houve um acréscimo em sua concentração nos canteiros não adubados. Não foi detectado o ácido elágico na leguminosa Amendoim Amarillo (Tabela 22)

A quantidade e o tipo de tanino nas plantas varia dependendo da espécie vegetal, podendo ocorrer diferenças genéticas dentro da mesma espécie (Maass et al., 1996). Essa variação também ocorre em relação à cultivar, o tecido, o estágio de desenvolvimento e as condições ambientais em que se encontram as plantas. Esses fatores podem ter sido determinantes para a diferença do comportamento do ácido gálico ao longo dos cortes observados para as cultivares de amendoim forrageiro.

Reed (1995) observa que os taninos hidrolisáveis podem ter efeitos tóxicos aos animais sendo os mais comuns, as hemorragias gastrointestinais e a necrose do fígado. O efeito tóxico é resultado de sua absorção pela corrente

sanguínea e o transporte para o fígado dos produtos da sua degradação (Oliveira & Berchielli, 2007). No entanto, em baixas concentrações podem estar associados a efeitos benéficos ao metabolismo dos animais (Min et al., 2003). Assim, as baixas concentrações de taninos encontradas neste estudo podem ser um fator positivo para o uso de *Stylosanthes* Campo Grande como forragem para os animais.

A galocatequina, o galato de epigalocatequina, a catequina e a epicatequina são monômeros de taninos condensados e sua ocorrência nas amostras pode indicar a presença desses taninos na forrageira. Taninos condensados possuem efeitos antinutricionais relacionados à sua ação sobre a ingestão de matéria seca, a capacidade de combinar-se a proteínas, polímeros e minerais, diminuindo a sua digestibilidade das plantas (Oliveira & Berchielli, 2007).

A concentração de epicatequina aumentou com o avanço da idade em cultivares adubadas, para todas as leguminosas. Esse comportamento pode indicar um padrão constante de ocorrência desse composto em leguminosas. Em cultivares não adubadas esses teores diminuíram para a *Stylosanthes* Campo Grande e não apresentaram diferença significativa para a *Stylosanthes* Mineirão (Tabela 23). A adstringência é uma característica de taninos condensados e em razão da ocorrência desses taninos nas forrageiras pode haver uma diminuição na aceitabilidade pelos ruminantes. Segundo Reed (1995) essa adstringência é causada pela formação de complexos entre os taninos e as glicoproteínas salivares e com o aumento da salivação, diminui a aceitabilidade da forrageira pelo animal.

A concentração de galocatequina aumentou no decorrer dos cortes para a cultivar não adubada de *Stylosanthes* Mineirão e ocorreu apenas no 1º corte para a cultivar *Stylosanthes* Campo Grande, adubada. Não foi observada ocorrência de galocatequina em gramínea “Coastcross”.

A epigalocatequina e a catequina ocorreram no 3º corte adubado de *Stylosanthes* Mineirão. Em *Stylosanthes* Campo Grande não foi detectada a epigalocatequina, e a catequina foi detectada no 2º corte não adubado. Na cultivar Amendoim Amarillo adubada foi detectada apenas a epicatequina, e na leguminosa Amendoim Belmonte, observou-se a ocorrência de epicatequina, epigalocatequina e catequina. O galato de epigalocatequina ocorreu apenas no 3º corte, para cultivares adubadas e não adubadas.

Dentre todas as leguminosas estudadas a que apresentou a menor ocorrência de monômeros de taninos condensados foi a Amendoim Amarillo seguida da Amendoim Belmonte. Essas observações podem indicar que cultivares de amendoim forrageiro apresentam pequena quantidade de taninos condensados.

Na gramínea solteira, houve aumento da concentração de catequina em canteiros não adubados e a diminuição, com o avanço da idade, em canteiros adubados. As concentrações de epicatequina também diminuiram no 2º corte em canteiros adubados e sua ocorrência deu-se apenas no 2º corte em canteiros não adubados.

Quando ingeridos em alta quantidade, acima de 5% da matéria seca, os taninos condensados têm uma influência negativa na digestibilidade da matéria seca, redução no consumo, perdas de proteínas endógenas e inibem fortemente as enzimas digestivas, em ensaios *in vitro*. No entanto, as concentrações de 3 a 4% da matéria seca protegem a proteína alimentar contra a degradação ruminal, diminuem o desperdício de amônia, aumentam a absorção de aminoácidos no intestino delgado e previnem o timpanismo (Getachew et al., 2000).

A cultivar *Stylosanthes* Campo Grande apresentou uma concentração total de taninos condensados de 12% da MS; a cultivar *Stylosanthes* Mineirão 14,58% da MS, a cultivar Amendoim Belmonte 12,73% da MS e a gramínea “Coastcross” 10,62%. Não foram detectados monômeros de taninos

condensados em Amendoim Amarello. Os valores encontrados podem indicar fatores antinutricionais dos taninos condensados nessas forrageiras. O consórcio entre gramínea e leguminosa pode aumentar ainda mais esses valores, sendo necessário um estudo muito criterioso para o estabelecimento do mesmo em relação aos taninos condensados quando for necessário implantá-lo.

A presença de ácidos fenólicos está restrita à parede celular das forrageiras e a digestibilidade tem sido relacionada com a quantidade presente nos diferentes tecidos (Deschamps & Ramos, 2002; Akin et al., 1990).

A concentração do ácido m-cumárico e da vanilina aumentou no decorrer dos cortes para as cultivares *Stylosanthes* Campo Grande e Mineirão. A condensação dos ácidos fenólicos leva à formação de lignina. A deposição de lignina aumenta com a maturação fisiológica e diminui a digestibilidade das plantas pelos animais (Deschamps, 1999). Esses fatores podem ter levado ao aumento nos teores desses ácidos no decorrer dos cortes.

O ácido o-cumárico ocorreu nas leguminosas *Stylosanthes* Campo Grande e Mineirão adubadas. A concentração do ácido p-cumárico diminuiu nas cultivares não adubadas de *Stylosanthes* Mineirão, no entanto, manteve-se constante para as cultivares adubadas. A concentração desse ácido aumentou no 2º corte para a leguminosa *Stylosanthes* Campo Grande adubada no 2º corte. Como parte de sua estratégia de sobrevivência, as plantas sintetizam compostos como lignina, fenóis, cutina para lhe conferir resistência ao vento, desfolhação e doenças (Carvalho & Pires, 2008). Esse acréscimo pode ter ocorrido por esse recorte ter sido realizado em época de seca na região e esse aumento pode ter sido decorrente de estratégias de sobrevivência da planta, em situação de estresse hídrico. A concentração do ácido ferúlico aumentou na leguminosa *Stylosanthes* Campo Grande adubada e diminuiu na *Stylosanthes* Mineirão com a maturidade das plantas. As diferenças existentes entre as espécies podem ter sido determinante para este comportamento inverso.

Observou-se que a concentração de ácido m-cumárico aumentou no decorrer dos cortes para as duas cultivares de amendoim forrageiro adubadas. Não foi detectado ácido m-cumárico na Amendoim Amarillo não adubada, e na Amendoim Belmonte não adubada, sua concentração aumentou no 2º corte. Os demais ácidos tiveram comportamento bem diverso nas duas leguminosas.

A concentração de vanilina e ácido p-cumárico não apresentaram diferença significativa para as amostras de Amendoim Belmonte adubadas e diminuíram para as amostras não adubadas. Nas amostras de Amendoim Amarillo não houve a presença de ácido p-cumárico e a vanilina diminuiu com a maturidade da planta.

O ácido ferúlico foi detectado no 3º corte da Amendoim Belmonte adubada e não foi detectado nas cultivares adubadas de Amendoim Amarillo, diminuindo no decorrer dos cortes quando essa cultivar estava não adubada. O ácido o-cumárico não foi detectado em amostras de Amendoim Amarillo não adubadas, no entanto, sua concentração aumentou com a maturidade da planta em amostras adubadas, para a leguminosa Amendoim Belmonte.

Deschamps & Ramos (2002) quantificaram ácidos fenólicos na parede celular de bagaço de cana, capim-elefante e folhas de mandioca utilizados como forragens, utilizando CLAE com detecção UV/Vis. Esses autores também observaram que a concentração de ácidos fenólicos foi bastante distinta entre os materiais estudados.

As análises com a gramínea “Coastcross” indicaram que a concentração dos ácidos fenólicos diminuiu para as cultivares não adubadas e aumentaram para as cultivares adubadas. Essas observações podem indicar uma interferência da adubação na concentração desses ácidos na planta e uma consequente alteração na digestibilidade da planta, já que os ácidos fenólicos são precursores do complexo da lignina, nas plantas.

A degradabilidade do feno de capim-”Coastcross” em diferentes estágios de crescimento e sua correlação com as concentrações dos ácidos fenólicos foi estudada por Peron (2007). A quantificação dos ácidos fenólicos foi realizada utilizando a técnica CLAE e observou-se que a concentração do ácido p-cumárico diminuiu linear e significativamente ($P < 0,01$), com o avanço da idade da forragem. O autor creditou esse comportamento, possivelmente, ao aumento do teor de fibra, que ocorre com o avanço da idade da planta, e a consequente diminuição da solubilidade do ácido fenólico nos extratores. O teor de ácido p-cumárico não interferiu na degradabilidade do feno neste estudo.

6 CONCLUSÕES

As leguminosas cultivadas em consórcio obtiveram teores de MS mais adequados para a nutrição animal e teores de fósforo, cálcio e PB mais elevados que a gramínea “Coastcross”.

O consórcio afetou apenas os teores de fósforo na gramínea “Coastcross”.

Não observou-se transferência de nitrogênio da leguminosa para a gramínea, provavelmente devido ao curto tempo de condução desse experimento.

As concentrações de taninos hidrolisáveis encontradas foram baixas e as de taninos condensados foram superiores ao considerado seguro para os ruminantes, tornando-se necessário um estudo criterioso desses teores quando for estabelecer consórcio de pastagens entre a gramínea “Coastcross” e as leguminosas estudadas.

No geral, as concentrações de ácidos fenólicos aumentaram nas forrageiras adubadas com o avanço da idade das plantas, provavelmente pela maior deposição de lignina nas plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, A. P. A.; AMARAL, G. C. Metodologias de medição da pastagem para cálculo da taxa de lotação. In: ENCONTRO TERRA NOVA DE PECUÁRIA, 4., 2001, São José do Rio Preto. **Anais...** São José do Rio Preto: Terra Nova, 2001. p. 15-30.
- AKIN, D. E. Forage cell wall degradation and p-coumaric, ferulic, and sinapic acids. **Agronomy Journal**, Madison, v. 74, p. 424-428, 1982.
- AKIN, D. E.; BENNER, B. Degradation of polysaccharides and lignin by ruminal bacteria and fungi. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 54, p. 1117-1125, 1988.
- AKIN, D. E.; GOTTFRED, N. A.; HARTLEY, R. D.; FULCHER, R. G.; RIGSBY, L. L. Microspectrophotometry of phenolic compounds in bermudagrass cell wall in relation to rumen microbial digestion. **Crop Science**, Madison, v. 30, p. 396-401, 1990.
- ALMEIDA, R. G.; NASCIMENTO JÚNIOR, D.; EUCLIDES, V. P. B.; MACEDO, M. C. M.; REGAZZI, A. J.; BRÂNCIO, P. A.; FONSECA, D. M. da; OLIVEIRA, M. P. Produção animal em pastos consorciados sob três taxas de lotação no Cerrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 31, n. 2, p. 852-857, abr. 2002.
- ALVES, S. J.; MORAES, A. de; CANTO, M.W. do; SANDINI, I. **Espécies forrageiras recomendadas para produção animal**: importância econômica das espécies forrageiras na produção animal. Disponível em: <<http://www.fundepecpr.org.br/tev/palestras10.doc>>. Acesso em 18 jan. 2009.
- ANDRADE, I. F. Produção e composição química de leguminosas forrageiras cultivadas no cerrado de Sete Lagoas. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 11, n. 2, p. 341-359, 1982.
- AQUINO, F. W. B.; NASCIMENTO, R. F.; RODRIGUES, S.; CASEMIRO, A. R. S. Determinação de marcadores de envelhecimento em cachaças. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 145-149, 2006.

ARGEL, P. J.; VILARREAL, C. M. **Nuevo mani forragero perenne**: arachis pintoi Krapovickas y Gregory: cultivar porvenir: CIAT 18744: leguminosa herbácea para alimentación animal, el mejoramiento del paisaje. Costa Rica: MAG/CIAT, 1998. 32 p. (Boletim técnico).

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the AOAC**. 16. ed. Arlington: AOAC International, 1995. v. 1.

AVELLA, D. M. G.; GARCIA, C. A. O.; CISNEROS, A. M. Medición de fenoles y actividad antioxidante em mazelas usadas para alimentación animal. In.: SIMPÓSIO DE METROLOGIA, 1., 2008, Santiago de Querétaro. **Anais...** México: Centro Nacional de Metrologia, 2008. p. 1-5.

BARCELLOS, A. O.; ANDRADE, R. P.; KARIA, C. T.; VILELA, L. Potencial e uso de leguminosas forrageiras dos gêneros *Stylosanthes*, *Arachis* e *Leucaena*. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 17., 2000, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2000. p. 297-357.

BEELEN, P. M. G.; BERCHIELLI, T. T.; BEELEN, A. N. M. Influence of condensed tannins from Brazilian semi-arid legumes on ruminal degradability, microbial colonization and enzymatic activity in Saanen goats. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 61, n. 1, p. 35-44, Jan. 2006.

BENEDETTI, E. **Leguminosas na produção de ruminantes nos trópicos**. Uberlândia: UFU, 2005. 118 p.

BIANCHINI, W.; RODRIGUES, E.; JORGE, A. M.; ANDRIGUETO, C. Importância da fibra na nutrição de bovinos. **Revista Eletrônica de Veterinária**, Málaga, v. 8, n. 12, p. 1695-7504, dic. 2007.

BOGDAN, A. V. **Tropical pasture and fodder plants**. New York: Longman, 1997. 465 p.

BRITO, C. J. F. A. de; RODELLA, R. A.; DESCHAMPS, F. C. Perfil químico da parede celular e suas implicações na digestibilidade de *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria humidicola*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 32, n. 6, p. 1835-1844, 2003.

CARNEVALLI, R. A.; SILVA, S. C.; CARVALHO, C. A. B.; SBRISSIA, A. F.; FAGUNDES, J. L.; PINTO, L. F. M.; PEDREIRA, C. G. S. Desempenho de ovinos e respostas de pastagens de "Coastcross" submetidas a regimes de desfolha sob lotação contínua. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 6, p. 919-927, 2001.

CARVALHO, G. G. P.; PIRES, A. J. V. Forage plants tissue organization and its implications in ruminant. **Archivos de Zootecnia**, Cordoba, v. 57, p 13-28, 2008.

CASTRO, F. G. F.; HADDAD, C. M.; VIEIRA, A. C.; VENDRAMINI, J. M. B.; HEISECKE, O. R. P. Época de corte, produção, composição químico-bromatológica e digestibilidade da matéria seca da grama estrela Florico. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, n. 4, p. 1185-1191, 1999.

CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. **Pastures for the tropical lowlands: CIATs contribution**. Cali, 1992. 238 p.

COATES, D. B.; KERRIDGE, P. C.; MILLER, C. P.; WINTER, W. H. Phosphorus and beef production in northern Australia 7: the effect of phosphorus on the botanical composition, yield and quality of grass-legume pastures and their relationships with animal production. **Tropical Grasslands**, Brisbane, v. 24, p. 209-220, 1990.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. **Introdução a métodos cromatográficos**. 4. ed. Campinas: UNICAMP, 1990. 279 p.

COOK, B. G.; WILLIAMS, R. J.; WILSON, G. P. Register of Australian herbage planta cultivars. *Arachis pintoi* Krap. Nom. nud. (Pinto Peanut) cv. Amarillo. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v. 30, n. 3, p. 445-446, 1990.

DESCHAMPS, F. C. Implicações do período de crescimento na composição química e digestão dos tecidos de cultivares de capim elefante. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 28, n. 6, p. 1178-1189, 1999.

DESCHAMPS, F. C.; RAMOS, L. P. Método para a determinação de ácidos fenólicos na parede celular de forragens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 31, n. 4, p. 1634-1639, 2002.

DESHPANDE, S. S.; DAMODARAN, S. Food legumes: chemistry and technology. **Advances in Cereal Science and Technology**, Saint Paul, v. 10, p. 147-241, 1990.

DIAS, H. L. C.; NASCIMENTO JÚNIOR, D. **Valor nutritivo das pastagens tropicais**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 112 p.

EIRA, A. F. Solubilização microbiana de fosfatos. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do solo**. Campinas: SBCS, 1992. p. 243-256.

EUCLIDES, V. P. B.; MACEDO, M. C. M.; OLIVEIRA, M. P. Produção de bovinos em pastagens de *Brachiaria* spp. consorciadas com *Calopogonium mucunoides* nos cerrados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 27, n. 2, p. 238-245, 1998.

EVARISTO, I. M.; LEITÃO, M. C. Identificação de quantificação por DAD-HPLC, da fração fenólica de *Quercus súber* L. **Silva Lusitana**, Lisboa, v. 9, n. 2, p. 135-141, 2001.

FERREIRA, M. B.; COSTA, N. M. S. **Novas espécies do gênero Stylosanthes para Minas Gerais**. Porto Alegre: Sociedade Botânica do Brasil, 1977. v. 28, 42 p.

GETACGEW, G.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Effect of polyethylene glycol on *in vitro* degradability of nitrogen and microbial protein synthesis from tannin-rich browse and herbaceous legumes. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 84, p. 73-83, 2000.

GODOY, P. B. de. **Aspectos nutricionais de compostos fenólicos em ovinos alimentados com leguminosas forrageiras**. 2007. 89 p. Tese (Doutorado em Ciências de Energia Nuclear na Agricultura) - Universidade de São Paulo, Piracicaba.

GONZALES, D. A.; BRANCO, D.; CAMPOS, L. Valor nutritivo das plantas forrageiras tropicais. **Pasturas Tropicales**, Cali, v. 10, n. 3, p. 9-14, 1988.

GOOGLE EARTH. Disponível em: <<http://earth.google.com.br/>>. Acesso em: 09 fev. 2009.

HARRIS, D. **Análise química quantitativa**. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001. 862 p.

IYAMA, K.; LAM, T. B. T.; STONE, B. A. Phenolic acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat internodes. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 29, p. 733-737, 1990.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 25 jan. 2009.

JACKSON, F. S.; BARRY, T. N. The extractable and bound condensed tannin content of leaves from tropical tree, shrub and forage legumes. **Journal of Science, Food and Agriculture**, New York, v. 71, n. 1, p. 103-110, 1996.

LADEIRA, M. M.; RODRIGUEZ, N. M.; GONÇALVES, L. C.; BORGES, I.; BENEDETTI, E.; TEIXEIRA, E. A.; LARA, L. B. Consumo e digestibilidades aparentes total e parciais do feno de *Stylosanthes guianensis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, n. 2, p. 1-7, abr. 2001.

LÁZARO, C. C. M. **Efeito do sombreamento em variedades de *Stylosanthes guianenses***. 2007. 52 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

LIMA, J. A. de L.; PINTO, J. C.; EVANGELISTA, A. R.; VALADARES, R. A. V. S. **Amendoim forrageiro (*Arachis pintoi* Krapov. & Gregory)**. Lavras: UFLA, 2003. 18 p. (Boletim técnico).

LIMA, S. R.; OLIVEIRA, G. S.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; CHANG, R. Estudo dos constituintes macromoleculares, extrativos voláteis e compostos fenólicos da madeira de candeia – *Moquinia polymorpha* (LESS.) DC. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 17, n. 2, p. 145-155, 2007.

MAASS, B. L.; LASCANO, C. E.; CÁRDENAS, E. A. La leguminosa arbustiva Valornutritivo y aceptabilidad en el piedemonte amazónico, Cquetá, Colômbia. **Pasturas Tropicale**, Cali, v. 18, p.10-16, 1996.

MALAVOLTA, E.; PAULINO, V. T. Nutrição mineral e adubação do gênero *Brachiaria*. In: ENCONTRO PARA DISCUSSÃO SOBRE CAPINS DO GÊNERO BRACHIARIA, 2., 1991, Nova Odessa. **Anais...** Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 1991. p. 45-136.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1989. 201 p.

MARTIN, W. E.; MATOCHA, J. E. Plant analysis as an aid in the fertilization of forage crops. In: WALSH, L. M.; BEATON, J. D. (Ed.). **Soil testing and plant analysis**. Madison: Soil Science Society of America, 1973. p. 393-426.

MASCARENHAS, H. A. A. **Cálcio, enxofre e ferro no solo e na planta**. Campinas: Fundação Cargill, 1977. 95 p.

MAYNARD, L. A.; LOOSLI, J. K. **Animal nutrition**. 2. ed. Rio de Janeiro: Livraria Freitas Bastos, 1974.

MEAGHER, L. P.; LANE, G.; SIVAKUMARAN, S.; TAVENDALE, M. H.; FRASER, K. Characterization of condensed tannins from *Lotus* species by thiolytic degradation on electrospray mass spectrometry. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 117, p. 151-163, 2004.

MENDONÇA, C. V. C. E.; ABREU, C. M. P. de; CORRÊA, A. D.; SANTOS, C. D. dos; MORAIS, A. R. de. Quantificação de polifenóis e digestibilidade protéica de família de feijoeiro comum. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 4, p. 858-864, 2003. Edição especial.

MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. **Principles of plants nutrition**. 4. ed. Bern: International Potash Institute, 1987. 687 p.

MESQUITA, E. E.; FONSECA, D. M.; NASCIMENTO JÚNIOR, D. do; PEREIRA, O. G.; PINTO, J. C. Efeitos de métodos de estabelecimento de braquiária e estilosantes e de doses de calcário, fósforo e gesso sobre alguns componentes nutricionais da forragem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 31, n. 6, p. 2186-2196, 2002.

MIN, B. R.; BARRY, T. N.; ATTWOOD, G. T.; MCNABB, W. C. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 106, p. 3-19, 2003.

MINSON, D. J. Effects of chemical and physical composition of herbaje eaten upon intake. In: HACKER, J. B. (Ed.). **Nutritional limits to animal production from pasture**. Farnham Royal: CAB, 1984. p. 167-182.

MIRANDA, C. H. B.; VIEIRA, A.; CADISCH, G. Determinação da fixação biológica de nitrogênio no amendoim forrageiro (*Arachis spp.*) por intermedio da abundancia natural de ¹⁵N. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 32, p. 1859-1865, 2003.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MOREIRA, L. M.; FONSECA, D. M.; VÍTOR, C. M. T.; ASSIS, A. J.; NASCIMENTO JÚNIOR, D.; RIBEIRO JÚNIOR, J. I.; OBEID, J. A. Renovação de pastagem degradada de capim gordura com a introdução de forrageiras tropicais adubadas com nitrogênio ou em consórcios. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 34, n. 2, p. 442-453, 2005.

MORRISON, T. A.; JUNG, H. G.; BUXTON, D. R.; HATFIELD, R. D. Cell wall composition of maize internode of varying maturity. **Crop Science**, Madison, v. 38, p. 455-460, 1998.

MORRISON, W. H.; AKIN, D. E.; HIMMELSBACH, D. S.; GAMBLE, G. R. Investigation of the éster and ether-linked phenolic constituents of cell wall types of normal and brown midrib pearl millet using chemical isolation, microspectrophotometry and ¹³C-NMR spectroscopy. **Journal of Science, Food and Agriculture**, New York, v. 63, p. 329-337, 1993.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of beef cattle**. 7. ed. Washington: National Academy of Sciences, 1996. 234 p.

NOZELLA, E. F. **Determinação de taninos em plantas com potencial forrageiro para ruminantes**. 2001. 58 p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Energia Nuclear na Agricultura) - Universidade de São Paulo, Piracicaba.

OLIVEIRA, M. A. **Extração de polifenóis da semente de cacau (*Theobroma Cacao*)**. 2005. 72 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

OLIVEIRA, S. G.; BERCHIELLI, T. T. Potencialidades da utilização de taninos na conservação de forragens e nutrição de ruminantes- revisão. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 12, n. 1, p. 1-9, 2007.

OSSIPOV, V.; LOPONEN, J.; OSSIPOVA, S.; HAUKIOJA, E.; PIHLAJA, K. Gallotannins of birch *betula pubescens* leaves: HPLC separation and quantification. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 25, n. 6, p. 493-504, 1997.

PACIULLO, D. S. C.; AROEIRA, L. J. M.; ALVIM, M. J.; CARVALHO, M. M. Características produtivas e qualitativas de pastagem de braquiária em monocultivo e consorciada com estilosantes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 3, p. 421-426, 2003.

PARIS, W.; CECATO, U.; SANTOS, G. T.; BARBEIRO, L.; AVANZZO, L.; LIMÃO, V. Produção e qualidade de massa de forragem nos estratos da cultivar coastcross - 1 consorciada com *Arachis Pinto* com e sem adubação nitrogenada. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringá, v. 30, n. 2, p. 135-143, 2008.

PEREIRA, J. M. Produção e persistência de leguminosas em pastagens tropicais. In: SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGENS, 2., 2001, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2001. p. 111-141.

PEREIRA, J. M.; NASCIMENTO JÚNIOR, D.; SANTANA, J. R. CANTARUTTI, R. B.; LEÃO, M. I. Teor de proteína bruta e digestibilidade *in vitro* da matéria seca da forragem disponível e da dieta selecionada por bovinos em pastagem de *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweickt, em monocultivo ou consorciado com leguminosas, submetida a diferentes taxas de lotação. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 21, n. 1, p. 104-117, 1992.

PERON, A. J. **Métodos de determinação e efeito da concentração de ácidos fenólicos na degradabilidade de capim-coastcross**. 2007. 71 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PRIMAVESI, A. C.; PRIMAVESI, O.; CORRÊA, L. A.; CANTARELLA, H.; SILVA, A. G.; FREITAS, A. R.; VIVALDI, L. J. Adubação nitrogenada em campim coastcross: efeitos na extração de nutrientes e recuperação aparente do nitrogênio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 33, n. 1, p. 68-78, 2004.

QUEIROZ, C. R. A. A.; MORAIS, S. A. L. de; NASCIMENTO, E. A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 26, n. 4, p. 485-492, 2002.

QUEIROZ FILHO, J. L.; SILVA, D. S.; NASCIMENTO, I. S. Produção de matéria seca e qualidade do capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) cultivar roxo em diferentes idades de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 29, n. 1, p. 69-74, 2000.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2009. Versão 2.7.0 Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 15 jan. 2009.

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

REIS, R. A.; RODRIGUES, L. R. A. **Valor nutritivo de plantas forrageiras**. Jaboticabal: UNESP, 1993. 26 p.

REIS, S. T.; TEIXEIRA, J. T.; EVANGELISTA, A. R. Composição química do coastcross (*Cynodon dactylon* x *Cynodon nlenfuensis*) e tifton 85 (*Cynodon spp*). In: REUNIÃO DA ASSOCIAÇÃO LATINO AMERICANA DE PRODUÇÃO ANIMAL, 17., 2001, Ciudad de la Habana. **Anais...** Ciudad de la Habana: Associação Latino Americana de Produção Animal, 2001. Não paginado.

RIBANI, M.; BOTOLLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROCHA, G. P.; EVANGELISTA, A. R.; PAIVA, P. C. A.; FREITAS, R. T. F.; SOUZA, A. F.; GARCIA, R. Digestibilidade e fração fibrosa de três gramíneas do gênero *Cynodon*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 2, p. 396-407, 2001.

ROSA, S. R. A.; CASTRO, T. A. P.; OLIVEIRA, I. P. Análise de crescimento em capim Tanzânia nos sistemas de plantio solteiro e consórcio com leguminosas. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 8, n. 2, p. 251-260, abr./jun. 2007.

SAITO, S. T.; WELZEL, A.; SUYENAGA, E. S.; BUENO, F. A method for epigallocatechin galatte (EGCG), epicatechin (EC), catechin (C) and caffeine (CAF) in green tea using HPLC. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 394-400, 2006.

SALMINEN, F. P.; OSSIPOV, V.; LOPONEN, J.; HAUKIOJA, E.; PIHLAJA, K. Characterisation of hydrolysable tannins from leaves of *Betula pubescens* by high-performance liquid chromatography mass spectrometry. **Journal of Chromatography - A**, Amsterdam, v. 864, p. 283-291, 1999.

SANTOS, I. P. A.; PINTO, J. C.; SIQUEIRA, J. O.; MORAIS, A. R.; SANTOS, C. L. Influência do fósforo, micorriza e nitrogênio no conteúdo de minerais de *Brachiaria brizantha* e *Arachis pintoi* consorciados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 31, n. 2, p. 605-616, 2002.

SANTOS, M. A. T.; NEPOMUCENO, I. A. S.; ABREU, C. M. P. de; CARVALHO, V. D. de. Teores de polifenóis de caule e folha e quatro cultivares de abacaxizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 23, n. 2, p. 274-276, 2001.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 91, p. 21-40, 2001.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos**: propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Varela, 1996. 180 p.

SILVA, C. L. S. P. **Avaliação fisiológica da tolerância ao alumínio e utilização de marcadores moleculares em *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw.** 1998. 109 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SILVA, D. J. **Análise de alimentos**. Viçosa: UFV, 1981. 166 p.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. **Revista Nutrição**, Campinas, v. 12, p. 5-19, 1999.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; EDSMANN, E.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROCICK, P. R. **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2007. 1104 p.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2. ed. New York: J. Wiley, 1997. p. 694-697. 765 p.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p.71-81, 2002.

SOEST, P.J. van (Ed.). **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca: Cornell University, 1994. 476 p.

SOUZA, S. O.; SANTANA, J; SHIMOYA, A. Comportamento de gramíneas forrageiras tropicais isoladas em associação com leguminosas na região norte fluminense. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, p. 1554-1561, 2002. Edição especial.

TERRIL, T. H.; WINDHAM, W. R.; EVANS, J. J.; HOVELAND, C. S. Condensed tannin concentration in *Sericea Lespedeza* as influenced by preservation method. **Crop Science**, Madison, v. 30, p. 219-224, 1990.

THOMAS, R. J.; ASAKAWA, N. M.; RONDON, M. A. Nitrogen fixation by three tropical forage legumes in an acidsoil savanna of Colombia. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 29, n. 5/6, p. 801-808, 1997.

VALLS, J. F. M. Origem do germoplasma de *Arachis pintoii* disponível no Brasil. In: RED INTERNACIONAL DE EVALUACION DE PASTOS TROPICALES, 1., 1992, Brasília. Reunión Sabanas. **Anais...** Cali: Embrapa, 1992. p.81-96.

VERZA, S. G.; KREINECKER, M. T.; REIS, V. HENRIQUES A. T.; ORTEGA, G. G. Avaliação das variáveis analíticas do método de folin-ciocalteu para determinação do teor de taninos totais utilizando como modelo o extrato aquoso de folhas de *Psidium guajava* L. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 815-820, 2007.

VITTI, D. M. S. S.; ROQUE, A. P.; DIAS, R. S.; LOPES, J. B.; BUENO, I. C. S.; BUENO, M. S.; NOZELLA, E. F. Metabolismo de calico em ovinos em crescimento sob suplementação com diferentes fontes de cálcio: aplicação e comparação de dois modelos matemáticos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 35, n. 6, p. 2487-2495, 2006.

VOGEL, A. I. **Química analítica qualitativa**. 5. ed. São Paulo: Mestre Jou, 1981. 665 p.

ZACARONI, L. M. **Compostos fenólicos e cumarinas**: certificação de um método analítico para a caracterização e quantificação em aguardentes de cana envelhecidas em barris de diferentes espécies de madeira. 2009. 138 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ANEXOS

ANEXO A Esquema de área da plantação das forrageiras

10 SM	20 AB	30 AA
9 SM	19 AA	29 SCG
8 AA	18 SCG	28 Branco
7 SCG	17 Branco	27 AB
6 Branco	16 AB	26 SM
5 AA	15 SCG	25 AA
4 SM	14 AA	24 SCG
3 AB	13 SCG	23 Branco
2 SCG	12 Branco	22 AB
1 Branco	11 AB	21 SM

Áreas em negrito correspondem a forrageiras adubadas.

ANEXO B Análises de variância

TABELA 1B Análise de variância para teor de matéria seca.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	2	133.960586	66.980293	2.568	0.2803
Adubação	1	13.717158	13.717158	0.526	0.5437
Erro 1	2	52.160342	26.080171		
Tratamento	8	740.391273	92.548909	1.017	0.1021
Adub*Trat	8	568.901154	71.112644	1.473	0.2167
Erro 2	25	1206.746308	48.269852		
Corte	2	8587.021209	4293.510604	83.586	0.0000
Bloco*Corte	4	77.780299	19.445075	0.379	0.8233
Corte*Adu	2	66.851572	33.425786	0.651	0.5246
Corte*Trat	16	6395.583323	399.723958	7.782	0.0000
Corte*Adub*Trat	16	478.400291	29.900018	0.582	0.8878
Erro 3	75	3852.466557	51.366221		
Total corrigido	161	22173.980072			
CV 1 (%) =	10,98				
CV 2 (%) =	14,94				
CV 3 (%) =	15.41				
Média geral:	46.49395				

TABELA 2B Análise de variância para teor de fósforo.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	2	0.001306	0.000653	1.177	0.4593
Adubação	1	0.030623	0.030623	55.223	0.0176
Erro 1	2	0.001109	0.000555		
Tratamento	8	0.096756	0.012095	21.809	0.0000
Adub*Trat	8	0.006770	0.000846	1.526	0.1984
Erro 2	25	0.013864	0.000555		
Corte	2	0.032696	0.016348	40.387	0.0000
Bloco*Corte	4	0.003759	0.000940	2.322	0.0646
Corte*Adu	2	0.005069	0.002534	6.261	0.0031
Corte*Trat	16	0.014361	0.000898	2.217	0.0113
Corte*Adub*Trat	16	0.013113	0.000820	2.025	0.0221
Erro 3	74	0.029954	0.000405		
Total corrigido	160	0.249378			
CV 1 (%) =	18.17				
CV 2 (%) =	18.17				
CV 3 (%) =	15.52				
Média geral:	0.12962				

TABELA 3B Análise de variância para teor de cálcio.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	2	0.134042	0.067021	1.737	0.3654
Adubação	1	0.125719	0.125719	3.258	0.2128
Erro 1	2	0.077170	0.038585		
Tratamento	8	50.467687	6.308461	76.428	0.0000
Adub*Trat	8	0.392875	0.049109	0.595	0.7728
Erro 2	25	2.063540	0.082542		
Corte	2	1.931006	0.965503	23.839	0.0000
Bloco*Corte	4	0.139185	0.034796	0.859	0.4926
Corte*Adu	2	0.012222	0.006111	0.151	0.8602
Corte*Trat	16	1.264635	0.079040	1.952	0.0283
Corte*Adub*Trat	16	0.652014	0.040751	1.006	0.4603
Erro 3	74	2.997105	0.040501		
Total corrigido	160	0.257199			
CV 1 (%) =	21.80				
CV 2 (%) =	31.88				
CV 3 (%) =	22.33				
Média geral:	0.90111				

TABELA 4B Análise de variância para teor de proteína bruta.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	2	7.022039	3.511020	16.324	0.0577
Adubação	1	0.549175	0.549175	2.553	0.2512
Erro 1	2	0.430178	0.215089		
Tratamento	8	1167.237848	145.904731	224.098	0.0000
Adub*Trat	8	10.796550	1.349569	2.073	0.0783
Erro 2	25	16.276871	0.651075		
Corte	2	58.174581	29.087291	38.742	0.0000
Bloco*Corte	4	29.109073	7.277268	9.693	0.0000
Corte*Adu	2	0.233094	0.116547	0.155	0.8565
Corte*Trat	16	105.359884	6.584993	8.771	0.0000
Corte*Adub*Trat	16	27.751805	1.734488	2.310	0.0081
Erro 3	75	56.309544	0.750794		
Total corrigido	161	1479.250644			
CV 1 (%) =	6.16				
CV 2 (%) =	10.72				
CV 3 (%) =	11.51				
Média geral:	7.5287062				

TABELA 5B Análise de variância para teor de FDN.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	2	37.018959	18.509479	0.863	0.5367
Adução	1	14.102504	14.102504	0.658	0.5025
Erro 1	2	42.885231	21.442615		
Tratamento	8	8280.498384	1035.062298	13.130	0.0000
Adub*Trat	8	220.177295	27.522162	0.349	0.9373
Erro 2	25	1970.75630	78.830245		
Corte	2	888.356205	444.178102	12.382	0.0000
Bloco*Corte	4	111.334626	27.833657	0.776	0.5444
Corte*Adu	2	41.702382	20.851191	0.581	0.5618
Corte*Trat	16	1398.466765	87.404173	2.437	0.0053
Corte*Adub*Trat	16	576.918050	36.057378	1.005	0.4615
Erro 3	73	2618.714888	35.872807		
Total corrigido	159	16200.931419			
CV 1 (%) =	7.17				
CV 2 (%) =	13.75				
CV 3 (%) =	9.28				
Média geral:	64.56606				

TABELA 6B Análise de variância para teor de FDA.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	2	3.577282	1.788641	0.015	0.9849
Adução	1	0.081097	0.081097	0.001	0.9814
Erro 1	2	233.650324	116.825162		
Tratamento	8	999.601273	124.950159	14.372	0.0000
Adub*Trat	8	88.702565	11.087821	1.275	0.3001
Erro 2	25	217.345667	8.693827		
Corte	2	547.229936	273.614968	35.999	0.0000
Bloco*Corte	4	34.126980	8.531745	1.123	0.3526
Corte*Adu	2	11.545944	5.772972	0.760	0.4715
Corte*Trat	16	193.790550	12.111909	1.594	0.0923
Corte*Adub*Trat	16	90.953970	5.684623	0.748	0.7363
Erro 3	73	554.838471	7.600527		
Total corrigido	159	2975.444059			
CV 1 (%) =	26.55				
CV 2 (%) =	7.24				
CV 3 (%) =	6.77				
Média geral:	40.70406				

TABELA 7B Análise de variância para teor de lignina.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Bloco	2	23.252187	11.626094	1.212	0.4522
Adubação	1	22.207357	22.207357	2.314	0.2676
Erro 1	2	19.190829	9.595415		
Tratamento	8	284.173836	35.521730	7.699	0.0000
Adub*Trat	8	51.431208	6.428901	1.393	0.2474
Erro 2	25	115.349782	4.613991		
Corte	2	69.744252	34.872126	7.499	0.0011
Bloco*Corte	4	57.252089	14.313022	3.078	0.0212
Corte*Adu	2	65.584637	4.099040	0.882	0.5920
Corte*Trat	16	2.745487	1.372744	0.295	0.7453
Corte*Adub*Trat	16	70.474972	4.404686	0.947	0.5213
Erro 3	73	339.452162	4.650030		
Total corrigido	159	1120.858799			
CV 1 (%) =	25.85				
CV 2 (%) =	17.93				
CV 3 (%) =	18.00				
Média geral:	11.9830625				

TABELA 8B Análise de variância para teor de polifenóis.

FV	GL	QM	Pr>Fc
Bloco	2	3718.158106	0.7965
Adubação	1	69025.526919	0.1613
Erro 1	2	14555.645271	
Tratamento	8	21050888.984897	0.0000
Adubação*Tratamento	8	391131.866183	0.0000
Erro 2	32	2443.107197	
Corte	2	99719.618757	0.0000
Bloco*Corte	4	2530.659180	0.6625
Corte*Adubação	2	456123.559319	0.0000
Corte*Tratamento	16	353356.494670	0.0000
Corte*Adubação*Tratamento	16	365731.341271	0.0000
Erro 3	66	4203.764186	0.0000
CV 1 (%) =	8.75		
CV 2 (%) =	3.58		
CV 3 (%) =	4.70		
Média geral:	1379.03907		

ANEXO C Tabelas de teores médios de análises químicas em que não foi significativa a adubação

TABELA 1C Teores médios em porcentagem de matéria seca.

Forrageiras	1º corte		2º corte		3º corte	
	Adubadas	Sem adubação	Adubadas	Sem adubação	Adubadas	Sem adubação
Gramínea solteira	49,66 a A	50,60 a A	49,44 a A	50,59 a A	50,35 ab A	50,71 b A
Gramínea + Stylosanthes Campo Grande	45,96 ab A	38,73 ab A	44,72 a A	50,23 a A	55,09 ab A	51,89 ab A
Gramínea + Stylosanthes Mineirão	35,25 ab A	33,66 ab A	48,62 a A	44,65 ab A	50,78 ab A	51,81 ab A
Gramínea + Amendoim Belmonte	46,31 ab A	43,53 ab A	47,50 a A	51,55 a A	45,70 b A	48,73 b A
Gramínea + Amendoim Amarillo	46,64 ab A	47,99 ab A	42,69 a A	43,15 ab A	48,98 b A	51,56 ab A
Stylosanthes Campo Grande	36,02 ab B	47,07 ab A	34,60 a A	41,84 ab A	63,29 ab A	60,71 ab A
Stylosanthes Mineirão	29,42 b A	30,37 b A	33,66 a A	39,36 ab A	62,59 ab A	62,66 ab A
Amendoim Belmonte	35,71 ab A	33,97 ab A	31,82 a A	26,61 b A	64,49 ab A	69,31 a A
Amendoim Amarillo	44,88 ab B	30,07 b B	40,22 a A	33,81 ab A	68,62 a A	62,32 ab A

Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem, pelo teste de Tuckey, em nível de 5% de probabilidade e comparam as adubações em cada corte. Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem, pelo teste de Tuckey, em nível de 5% de probabilidade e comparam as forrageiras entre os cortes.

TABELA 2C Teores médios em porcentagem de cálcio na matéria seca.

Forrageiras	1º corte		2º corte		3º corte	
	Adubadas	Sem adubação	Adubadas	Sem adubação	Adubadas	Sem adubação
Gramínea solteira	0,372 c A	0,310 c A	0,505 b A	0,487 c A	0,368 c A	0,283 c A
Gramínea + Stylosanthes Campo Grande	0,392 c A	0,320 c A	0,680 b A	0,470 c A	0,438 c A	0,250 c A
Gramínea + Stylosanthes Mineirão	0,395 c A	0,427 c A	0,565 b A	0,503 c A	0,345 c A	0,283 c A
Gramínea + Amendoim Belmonte	0,447 c A	0,233 c A	0,500 b A	0,470 c A	0,277 c A	0,263 c A
Gramínea + Amendoim Amarillo	0,340 c A	0,305 c A	0,550 b B	1,003 bc A	0,425 c A	0,250 c A
Stylosanthes Campo Grande	1,330 b A	1,220 b A	1,587 a A	1,460 ab A	1,200 b A	1,133 b A
Stylosanthes Mineirão	1,420 b A	1,487 ab A	1,675 a A	1,507 ab A	1,200 b A	1,267 ab A
Amendoim Belmonte	1,263 b A	1,240 b A	1,553 a A	1,677 a A	1,233 ab A	1,200 b A
Amendoim Amarillo	2,147 a A	2,067 a A	2,087 a A	1,500 ab B	1,800 a A	1,767 a A

Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem, pelo teste de Tuckey, em nível de 5% de probabilidade e comparam as adubações em cada corte.

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem, pelo teste de Tuckey, em nível de 5% de probabilidade e comparam as forrageiras entre os cortes.

TABELA 3C Teores médios em porcentagem de FDN na matéria seca.

Forrageiras	1º corte		2º corte		3º corte	
	Adubadas	Sem adubação	Adubadas	Sem adubação	Adubadas	Sem adubação
Gramínea solteira	70,09ab A	69,73a A	73,35a A	71,88a A	75,69ab A	77,38a A
Gramínea + Stylosanthes Campo Grande	67,71abc A	67,27ab A	70,65a A	64,57ab A	78,11a A	75,63a A
Gramínea + Stylosanthes Mineirão	73,37a A	69,96a A	65,41ab A	69,34ab A	77,52a A	73,52a A
Gramínea + Amendoim Belmonte	67,04abc A	64,89abc A	70,19a A	64,78ab A	78,21a A	76,33 a A
Gramínea + Amendoim Amarillo	65,44abc A	62,76abc A	66,27ab A	55,45 b A	75,93ab A	78,02 a A
Stylosanthes Campo Grande	55,97 bcd A	62,05abc A	57,53ab A	63,54ab A	62,39abc A	55,82 b A
Stylosanthes Mineirão	56,17 bcd A	49,94 c A	53,65 b A	59,82ab A	59,79 bc A	54,56 b A
Amendoim Belmonte	51,99 cd A	59,16abc A	58,61ab A	61,72ab A	56,89 c A	53,97 b A
Amendoim Amarillo	47,54 d A	52,58 bc A	58,88ab A	57,67ab A	51,59ab A	56,73 b A

Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem, pelo teste de Tuckey, em nível de 5% de probabilidade e comparam as adubações em cada corte.

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem, pelo teste de Tuckey, em nível de 5% de probabilidade e comparam as forrageiras entre os cortes.

TABELA 4C Teores médios em porcentagem de FDA na matéria seca.

Forrageiras	1º corte		2º corte		3º corte	
	Adubadas	Sem adubação	Adubadas	Sem adubação	Adubadas	Sem adubação
Gramínea solteira	37,92ab A	37,76abc A	41,82ab A	41,98ab A	42,47abc A	43,17ab A
Gramínea + Stylosanthes Campo Grande	38,11a A	40,05ab A	41,56ab A	43,49a A	41,81abc A	43,05ab A
Gramínea + Stylosanthes Mineirão	39,18a B	44,56a A	43,34ab A	42,47ab A	41,99abc A	44,01ab A
Gramínea + Amendoim Belmonte	37,02ab A	36,69 bc A	42,16ab A	40,74ab A	42,13abc A	40,04 b A
Gramínea + Amendoim Amarillo	37,69ab A	37,27abc A	41,82ab A	41,49ab A	41,10 bc A	43,02ab A
Stylosanthes Campo Grande	41,73a A	39,55ab A	45,69a A	42,37ab A	48,24ab A	47,48a A
Stylosanthes Mineirão	39,40a A	40,25ab A	38,42ab A	43,20a A	48,61a A	44,11ab A
Amendoim Belmonte	39,18a A	37,12 bc A	38,18 b A	37,54ab A	42,68abc A	38,21 b A
Amendoim Amarillo	30,49 b A	30,85 c A	36,62 b A	35,28 b A	37,64 c A	37,54 b A

Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem, pelo teste de Tuckey, em nível de 5% de probabilidade e comparam as adubações em cada corte.

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem, pelo teste de Tuckey, em nível de 5% de probabilidade e comparam as forrageiras entre os cortes.

TABELA 5C Teores médios em porcentagem de lignina na matéria seca.

Forrageiras	1º corte		2º corte		3º corte	
	Adubadas	Sem adubação	Adubadas	Sem adubação	Adubadas	Sem adubação
Gramínea solteira	11,18a A	9,78a A	10,62a A	10,69ab A	12,79ab A	10,88 bc A
Gramínea + Stylosanthes Campo Grande	10,8a A	11,70a A	11,04a A	9,18ab A	10,70 b A	11,22abc A
Gramínea + Stylosanthes Mineirão	10,47a A	10,68a A	10,93a A	9,94ab A	11,96ab A	12,57abc A
Gramínea + Amendoim Belmonte	11,53a A	10,76a A	10,95a A	8,88 b A	13,65ab A	8,90 c B
Gramínea + Amendoim Amarillo	10,93a A	13,12a A	11,92a A	9,17ab A	12,39ab A	12,20abc A
Stylosanthes Campo Grande	12,74a A	10,67a A	11,09a A	11,73ab A	11,68ab A	10,83 bc A
Stylosanthes Mineirão	12,87a A	14,43a A	13,84a A	12,25ab A	15,45ab A	14,98ab A
Amendoim Belmonte	16,22a A	11,65a B	12,56a A	12,47ab A	15,84ab A	12,40abc A
Amendoim Amarillo	12,37a A	12,10a A	12,40a A	14,72a A	17,25a A	16,67a A

Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem, pelo teste de Tuckey, em nível de 5% de probabilidade e comparam as adubações em cada corte.

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem, pelo teste de Tuckey, em nível de 5% de probabilidade e comparam as forrageiras entre os cortes.

ANEXO D Tabela do teste de Tuckey para média geral das forrageiras

TABELA 1D Médias gerais de matéria seca.

Forrageiras	Matéria seca
Gramínea solteira	50,16 a
Gramínea + Stylosanthes Campo Grande	47,89 a
Gramínea + Stylosanthes Mineirão	43,98 a
Gramínea + Amendoim Belmonte	47,22 a
Gramínea + Amendoim Amarillo	46,98 a
Stylosanthes Campo Grande	46,88 a
Stylosanthes Mineirão	43,23 a
Amendoim Belmonte	43,65 a
Amendoim Amarillo	46,65 a

Letras minúsculas comparam as médias dos tratamentos na coluna

TABELA 2D Médias gerais de fósforo.

Forrageiras	Fósforo
Gramínea solteira	0,12 bc
Gramínea + Stylosanthes Campo Grande	0,11 c
Gramínea + Stylosanthes Mineirão	0,12 bc
Gramínea + Amendoim Belmonte	0,11 c
Gramínea + Amendoim Amarillo	0,12 c
Stylosanthes Campo Grande	0,12 bc
Stylosanthes Mineirão	0,13 bc
Amendoim Belmonte	0,14 b
Amendoim Amarillo	0,19 a

Letras minúsculas comparam as médias dos tratamentos na coluna

TABELA 3D Médias gerais de cálcio.

Forrageiras	Cálcio
Gramínea solteira	0,39 c
Gramínea + Stylosanthes Campo Grande	0,44 c
Gramínea + Stylosanthes Mineirão	0,42 c
Gramínea + Amendoim Belmonte	0,36 c
Gramínea + Amendoim Amarillo	0,50 c
Stylosanthes Campo Grande	1,33 b
Stylosanthes Mineirão	1,36 b
Amendoim Belmonte	1,36 b
Amendoim Amarillo	1,89 a

Letras minúsculas comparam as médias dos tratamentos na coluna

TABELA 4D Médias gerais de proteína bruta.

Forrageiras	Proteína Bruta
Gramínea solteira	5,19 de
Gramínea + Stylosanthes Campo Grande	5,27 de
Gramínea + Stylosanthes Mineirão	5,82 d
Gramínea + Amendoim Belmonte	4,79 e
Gramínea + Amendoim Amarillo	5,17 de
Stylosanthes Campo Grande	8,93 c
Stylosanthes Mineirão	10,18 b
Amendoim Belmonte	10,80 b
Amendoim Amarillo	11,90 a

Letras minúsculas comparam as médias dos tratamentos na coluna

TABELA 5D Médias gerais de FDN.

Forrageiras	FDN
Gramínea solteira	73,02 a
Gramínea + Stylosanthes Campo Grande	70,87 a
Gramínea + Stylosanthes Mineirão	71,40 a
Gramínea + Amendoim Belmonte	70,24 a
Gramínea + Amendoim Amarillo	66,80 ab
Stylosanthes Campo Grande	59,42 bc
Stylosanthes Mineirão	55,48 c
Amendoim Belmonte	57,06 bc
Amendoim Amarillo	54,03 c

Letras minúsculas comparam as médias dos tratamentos na coluna

TABELA 6D Médias gerais de FDA.

Forrageiras	FDA
Gramínea solteira	40,84 bc
Gramínea + Stylosanthes Campo Grande	4bc1,22 abc
Gramínea + Stylosanthes Mineirão	42,84 ab
Gramínea + Amendoim Belmonte	39,80 bc
Gramínea + Amendoim Amarillo	40,44 bc
Stylosanthes Campo Grande	44,33 a
Stylosanthes Mineirão	42,37 ab
Amendoim Belmonte	38,82 c
Amendoim Amarillo	34,95 d

Letras minúsculas comparam as médias dos tratamentos na coluna

TABELA 7D Médias gerais de lignina.

Forrageiras	Lignina
Gramínea solteira	11,06 cd
Gramínea + Stylosanthes Campo Grande	10,79 d
Gramínea + Stylosanthes Mineirão	11,08 cd
Gramínea + Amendoim Belmonte	10,78 d
Gramínea + Amendoim Amarillo	11,60 bcd
Stylosanthes Campo Grande	11,51 bcd
Stylosanthes Mineirão	13,96 ab
Amendoim Belmonte	13,52 abc
Amendoim Amarillo	14,36 a

Letras minúsculas comparam as médias dos tratamentos na coluna

TABELA 8D Médias gerais de polifenóis totais.

Forrageiras	Polifenóis totais
Gramínea solteira	474,2 e
Gramínea + Stylosanthes Campo Grande	483,8 e
Gramínea + Stylosanthes Mineirão	466,7 e
Gramínea + Amendoim Belmonte	481,8 e
Gramínea + Amendoim Amarillo	478,8 e
Stylosanthes Campo Grande	2334,8 c
Stylosanthes Mineirão	2804,7 a
Amendoim Belmonte	2247,0 d
Amendoim Amarillo	2639,4 b

Letras minúsculas comparam as médias dos tratamentos na coluna

ANEXO E Cálculos para quantificação de compostos fenólicos nas forrageiras

Ex.: Concentração de ácido gálico

Dados: Área: 22730,6

Equação da reta: $Y = -5898,66 + 27102,64x$

Massa molar: 170,12g/mol

Curva padrão concentrada: 5×10^{-4} mol/L

Diluições: 3×10^{-7} a 1×10^{-4}

$$Y = -5898,66 + 27102,64x$$

$$22730,6 = -5898,66 + 27102,64x$$

$$x = 0,62 \text{ mol/L}$$

Como foram injetados 20 microlitros no HPLC:

$$0,62 \text{ mol} \frac{\text{1000mL}}{x} \times \frac{\text{0,02 mL (20 microlitros)}}{\text{0,02 mL (20 microlitros)}}$$
$$x = 1,24 \times 10^{-5} \text{ mol}$$

Assim temos: $1,24 \times 10^{-5}$ mol de ácido gálico em cada amostra de 20 microlitros.

Transformando mol em massa (massa molar do ácido gálico: 170,12 g/mol)

$$1 \text{ mol} \frac{\text{170,12g}}{x}$$

$$1,24 \times 10^{-5} \text{ mol} \frac{\text{170,12g}}{x}$$
$$x = 2,11 \times 10^{-3} \text{ g}$$

$2,11 \times 10^{-3}$ g correspondem a 2,11 mg, assim temos 2,11 mg de ácido gálico em cada amostra de 20 microlitros injetada.

O volume final da extração foi de 2,5mL. Foram tirados 20 microlitros para injeção, então:

$$2,11 \text{ mg} \frac{\text{0,02 mL (20 microlitros)}}{x} \times \frac{\text{2,5 mL}}{\text{2,5 mL}}$$
$$x = 263,75 \text{ mg}$$

Temos 263,75 mg de ácido gálico em cada 2,5 mL de extrato.

A extração de volume final 2,5 mL foi feita com 1g de forrageira. Assim, temos 263,75 mg de ácido gálico em cada 1g de forrageira.

A unidade da concentração dos fenólicos é micrograma/mg.

Se são 263,75 mg de ácido gálico em cada 1g de forrageira temos:

$$263750 \text{ microgramas de ácido gálico em 1000mg de forrageira}$$
$$263750 \frac{\text{1000mg}}{x} \times \frac{\text{1mg}}{\text{1mg}}$$
$$x = 263,75 \text{ microgramas/mg}$$