



**LINIKER NUNES DE OLIVEIRA**

**SUPPLEMENTATION OF LOW DOSAGES OF *ACACIA*  
*MEARNSII* TANNIN EXTRACT TO DAIRY COWS**

**LAVRAS - MG**

**2022**

**LINIKER NUNES DE OLIVEIRA**

**SUPPLEMENTATION OF LOW DOSAGES OF *ACACIA MEARNsii* TANNIN  
EXTRACT TO DAIRY COWS**

**SUPLEMENTAÇÃO DE BAIXAS DOSAGENS DE EXTRATO DE TANINO DE  
*ACACIA MEARNsii* PARA VACAS LEITEIRAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Marcos Neves Pereira  
Orientador

**LAVRAS - MG  
2022**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Oliveira, Liniker Nunes de.

Suplementação de baixas dosagens de extrato de tanino de  
*Acacia mearnsii* para vacas leiteiras / Liniker Nunes de Oliveira. -  
2022.

76 p.

Orientador(a): Marcos Neves Pereira.

Coorientador(a): Marina de Arruda Camargo Danés.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. comportamento ingestivo. 2. tanino condensado. 3. ácidos  
graxos no leite. I. Pereira, Marcos Neves. II. Danés, Marina de  
Arruda Camargo. III. Título.

**LINIKER NUNES DE OLIVEIRA**

**SUPPLEMENTATION OF LOW DOSAGES OF *ACACIA MEARNSII* TANNIN  
EXTRACT TO DAIRY COWS**

**SUPLEMENTAÇÃO DE BAIXAS DOSAGENS DE EXTRATO DE TANINO DE  
*ACACIA MEARNSII* PARA VACAS LEITEIRAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovado em 30 de abril de 2022

Dr. Marcos Neves Pereira/UFLA

Dra. Marina de Arruda Camargo Danés/UFLA

Dra. Rayana Brito da Silva/ Better Nature Reserch Center

Dr. Erick Darlisson Batista/UFLA – Suplente interno

Dr. Gustavo Augusto Andrade/IF Sul de Minas – Machado – Suplente externo

Dr. Marcos Neves Pereira

Orientador

**LAVRAS - MG**

**2022**

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

LINIKER NUNES DE OLIVEIRA – Filho de Flavio Cesar de Oliveira e Sandra Vieira Nunes de Oliveira, nascido na cidade de Uberlândia – MG, no dia 20 de julho de 1995. Graduado em Medicina Veterinária no ano de 2018 na Universidade Federal de Uberlândia (UFU) em Uberlândia – MG. Em março de 2020 ingressou no curso de Mestrado em Zootecnia, na área de Produção e Nutrição de Ruminantes na Universidade Federal de Lavras, sob a orientação do Prof. Marcos Neves Pereira.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus por todas as bênçãos colocadas sobre mim, por ter me oferecido forças, amigos e um local para completar meus objetivos.

Aos meus pais, Flávio e Sandra, que sempre me apoiaram e me deram força, me educando e me direcionando para o caminho certo. À minha irmã Sara e aos meus avós, Valdeci e João Nunes, que sempre ficaram na torcida pela minha vitória.

Agradeço a todos os meus parentes: Lucas Afonso, André, Patrícia Nunes, Patrícia Jacqueline, Danilo, Joana e Katia. Aos meus amigos, em especial Lucas Ezer e Lucas Manuel por terem me guiado.

Agradeço, em especial, à Cecília, que sempre esteve ao meu lado, participando de todas as etapas, pelos conselhos, incentivos e diversas manifestações de carinho.

Aos pós-graduandos e graduandos orientados pelo professor Marcos, em especial o Wesley, Lucas Carneiro, Alan, Cássia, Josué e Gustavo.

Ao professor Marcos Neves pela orientação durante todos esses anos como mestrando, pela dedicação e tempo destinados à transferência de conhecimento. À sua esposa Renata, por toda a sua ajuda, paciência e compreensão dadas a mim durante o mestrado.

Agradeço aos funcionários da fazenda São Francisco (Geraldo, Toin, Josi e Tião) por todos os momentos de amizade, diversão e trabalho duro que tivemos ao longo desses anos.

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio durante a realização deste trabalho.

Muito obrigado a todos!

## RESUMO GERAL

### SUPLEMENTAÇÃO DE BAIXAS DOSAGENS DE EXTRATO DE TANINO DE *ACACIA MEARNsii* PARA VACAS LEITEIRAS

A suplementação de vacas leiteiras com taninos pode reduzir a degradação ruminal da proteína dietética e pode ter efeito benéfico na excreção urinária de N, mas altas dosagens podem penalizar a função ruminal, digestibilidade da dieta, ingestão de ingredientes e produção de leite. Este estudo avaliou o efeito de baixas dosagens (0, 0,14, 0,29 ou 0,43% da MS) de extrato de tanino condensado da casca de *Acacia mearnsii* (TA) na produção e composição de leite, consumo de matéria seca (CMS), digestibilidade, atividade mastigatória e comportamento ingestivo, fermentação ruminal, e partição de N em vacas leiteiras. Vinte vacas Holandesas ( $34,7 \pm 4,8$  kg/d,  $590 \pm 89$  kg, and  $78 \pm 33$  dias em lactação) foram alimentadas individualmente com uma sequência de 4 tratamentos em 5 quadrados latinos 4X\$ (períodos de 21 dias). O TA substituiu a polpa cítrica na ração total e os demais ingredientes da ração foram mantidos constantes. As dietas continham 17,1% de proteína bruta, principalmente de farelo de soja e feno de alfafa. O modelo estatístico teve os efeitos de vaca, período e tratamento. Foram avaliados os contrastes linear, quadrático e cúbico do nível de TA. A significância foi declarada em  $P \leq 0.05$  e a tendência em  $P \leq 0.10$ . A TA não promoveu efeito sobre o CMS (21,8 kg/d), produção de leite (33,1 kg/d) e componentes do leite. A proporção na gordura do leite de ácidos graxos (AG) de origem mista foi reduzida linearmente, o AG De Novo aumentou e a secreção diária de AG insaturado foi aumentada pelo TA. Vacas alimentadas com TA apresentaram aumento linear na proporção molar de butirato e redução de propionato no líquido ruminal, enquanto o acetato não diferiu. Houve uma tendência da relação A/P ser aumentada linearmente pelo TA. Vacas alimentadas com TA reduziu linearmente a produção microbiana no rúmen, estimadas pelas concentrações de alantoína e creatinina na urina, e a concentração total de protozoários não diferiu. A digestibilidade aparente do trato total da fibra em detergente neutro, amido, e proteína bruta não diferiu. Não houve grande efeito do TA na atividade mastigatória, embora o TA tenha induzido um aumento linear no tamanho da refeição e duração da primeira refeição diária e reduzido a frequência de refeição por dia. O comportamento de ruminação não diferiu. Vacas alimentadas com 0,43% de TA recusaram partículas da dieta > 19 mm pela manhã. Houve tendência para diminuição lineares em NUL (16,1 a 17,3

mg/dL), N na urina (150 to 166 g/d and 29.8 to 32.9% de ingestão de N) e N ureico plasmático (NUP) em 6, 18 e 21 h pós-alimentação da manhã, e o NUP 12 h pós-alimentação foi reduzido pelo TA. A proporção de ingestão de N no leite (27,1%) e nas fezes (25,2%) não diferiu. Reduções no N na urina, NUL e NUP sugerem que o TA reduziu a desaminação ruminal de AA, mas a diminuição na produção microbiana no rúmen pode ter compensado o ganho no suprimento de proteína dietética absorvível, e o desempenho da lactação não diferiu. No geral, TA até 0,43% na MS não afetou o CMS e a lactação e houve uma tendência a reduzir a excreção de N na urina.

**Palavras-chave:** Comportamento ingestivo, tanino condensado, ácidos graxos do leite, balanço de nitrogênio, produção de proteína microbiana, digestibilidade.



## GENERAL ABSTRACT

The supplementation of dairy cows with tannins can reduce the ruminal degradation of dietary protein and can have beneficial effect on urinary N excretion, but high dosages can penalize rumen function, diet digestibility, feed intake, and milk yield. This study evaluated the effect of low dosages (0, 0.14, 0.29, or 0.43% of DM) of condensed tannin extract from the bark of *Acacia mearnsii* (**TA**) on milking performance, dry matter intake (**DMI**), digestibility, chewing and sorting behaviors, rumen fermentation, and N partition of dairy cows. 20 Holstein cows ( $34.7 \pm 4.8$  kg/d,  $590 \pm 89$  kg, and  $78 \pm 33$  d in lactation) were individually fed a sequence of 4 treatments in 5, 4x4 Latin squares (21-d periods). TA replaced citrus pulp in the total mixed ration and other feed ingredients were kept constant. Diets had 17.1% crude protein, mostly from soybean meal and alfalfa haylage. The statistical model had the effects of cow, period, and treatment. Linear, quadratic, and cubic contrasts of TA level were evaluated. Significance was declared at  $P \leq 0.05$  and tendency at  $P \leq 0.10$ . TA had no effect on DMI (21.8 kg/d), milk yield (33.1 kg/d), and milk components. The proportion in milk fat of Mixed origin fatty acids (**FA**) was linearly reduced, De Novo FA was increased, and the daily secretion of unsaturated FA was increased by TA. Cows fed TA had linear increase in the molar proportion of butyrate and reduction in propionate in rumen fluid, while acetate did not differ. There was a tendency for the A/P ratio to be linearly increased by TA. Cows fed TA had linear reduction in rumen microbial yield, estimated by the concentrations of allantoin and creatinine in urine, and total protozoa concentration did not differ. The total tract apparent digestibility of neutral detergent fiber, starch, and crude protein did not differ. There was no major effect of TA on chewing behavior, although TA induced a linear increase in meal size and length of the first daily meal and reduced meal frequency per d. Rumination behavior did not differ. Cows fed 0.43% TA refused feed particles > 19 mm in the morning. There were tendencies for linear decreases in MUN (16.1 to 17.3 mg/dL), urine-N (150 to 166 g/d and 29.8 to 32.9% of N intake), and plasma urea-N (**PUN**) at 6, 18, and 21 h post-morning feeding, and PUN 12 h post-feeding was reduced by TA. The proportion of N intake in milk (27.1%) and feces (25.2%) did not differ. Reductions in urine-N, MUN, and PUN suggest that TA reduced ruminal AA deamination, but the decrease in rumen microbial yield may have offset the gain in absorbable dietary protein supply, and

lactation performance did not differ. Overall, TA up to 0.43% of DM did not affect DMI and lactation and there was a tendency to reduce urine-N excretion.

**Keywords:** chewing behavior, condensed tannin, milk fatty acids, nitrogen balance, rumen microbial yield, digestibility

## RESUMO INTERPRETATIVO E RESUMO GRÁFICO

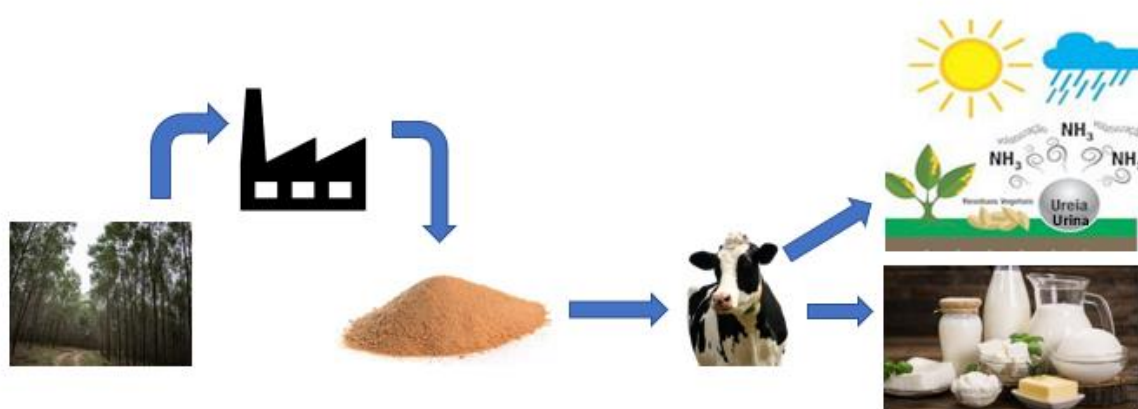
### Suplementação de baixas dosagens de extrato de tanino de *Acacia mearnsii* para vacas leiteiras

Elaborado por **Liniker Nunes de Oliveira** e orientado por **Marcos Neves Pereira**

---

Vacas leiteiras apresentam baixa eficiência em utilizar o nitrogênio ingerido para a síntese de proteína do leite, por isso estratégias vem sendo estudadas a fim de aumentar esta eficiência. Uma das estratégias que podem ser adotadas, é a suplementação de extrato de tanino de *Acacia mearnsii*, onde o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de baixas dosagens (0, 0,14, 0,29 ou 0,43% da MS) de extrato de tanino condensado da casca de *Acacia mearnsii* no consumo de matéria seca, produção e composição de leite, digestibilidade, atividade mastigatória e comportamento ingestivo, fermentação ruminal, e partição de nitrogênio em vacas leiteiras.

A produção e composição do leite e consumo de matéria seca não foram afetados pela suplementação de tanino, apesar que houve redução no nitrogênio ureico do leite, nitrogênio ureico no plasma e redução de nitrogênio excretado na urina. A síntese de proteína microbiana reduziu linearmente com a suplementação de tanino, entretanto não houve diferença na concentração e produção de proteína do leite, sugerindo que os taninos reduzem a disponibilidade de nitrogênio no rúmen, mas por compensação, aumenta o aporte de proteína no intestino delgado. O uso de extrato de tanino de *Acacia mearnsii* pode ser utilizado com o objetivo de reduzir a excreção de nitrogênio via urina para o meio ambiente, visto que o nitrogênio liberado pela urina pode ser volatilizado como amônia, perdido através da lixiviação como nitrato e emitido como óxido nitroso.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1. Subclasses dos flavonoides.....</b>	<b>18</b>
--	-----------

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 01	15
1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Taninos	17
2.1.1 Tipos e composição química	17
2.1.2 Extrato de tanino de <i>Acacia mearnsii</i>	20
2.2 Efeitos de taninos em ruminantes	21
2.2.1 Produção de leite e consumo	21
2.2.2 Digestibilidades	22
2.2.3 Atividade mastigatória	23
2.2.4 Partição de N dietético	24
2.2.5 Fermentação ruminal e perfil de ácidos graxos no leite	25
2.3 Metabolismo de proteínas em ruminantes	28
2.4 Impacto de taninos sobre o meio ambiente: metano	30
3 REFERÊNCIAS	32
CAPITULO 2 – ARTIGO	43
ABSTRACT	45
INTRODUCTION	46
MATERIALS AND METHODS	49
<i>Cows and treatments</i>	49
<i>Feed analysis</i>	50
<i>Performance</i>	50
<i>Rumen fermentation</i>	51
<i>Digestibility</i>	52
<i>Microbial yield</i>	52
<i>Chewing and sorting</i>	53
<i>Plasma urea-N</i>	54
<i>N partition</i>	54
<i>Statistical Analysis</i>	55
RESULTS	55
<i>Diets</i>	55
<i>Intake, performance and milk fatty acids</i>	55

<i>Rumen fermentation, microbial yield and digestibility</i>	56
<i>Chewing and sorting</i>	56
<i>Urea-N in milk and plasma and N partition</i>	57
DISCUSSION	57
CONCLUSIONS	61
REFERENCES	62

## CAPÍTULO 01

### 1 INTRODUÇÃO

Os taninos são um grupo diversificado de compostos polifenólicos capazes de formar complexos com proteínas e outras macromoléculas (Bravo, 1998). Os taninos podem interferir na palatabilidade dos alimentos devido à adstringência (Griffiths, 2013), podem limitar a digestão de proteínas e carboidratos no rumen (Carulla et al., 2005) e intestinos (Duodu et al., 2003), podem afetar a biohidrogenação ruminal de lipídeos (Khiaosa-Ard et al., 2009), crescimento microbiano (Ahnert et al., 2015) e diversidade microbiana (Vasta et al., 2019), e têm o potencial de reduzir a excreção de metano por ruminantes (Jayanegara et al., 2012). Os taninos também podem reduzir o timpanismo espumoso em bovinos em pastejo (Min et al., 2012) e parasitas gastrointestinais (Mueller-Harvey, 2006) e demonstrou aumentar as atividades de enzimas antioxidantes no plasma e no fígado (Liu et al., 2013). Os taninos são capazes de se ligar às proteínas e a possibilidade de reduzir a degradação ruminal da proteína dietética (para aumentar a oferta de PNDR) e a perda urinária de N criou interesse na suplementação de tanino para vacas leiteiras (Aguerre et al., 2016, 2020). No entanto, os taninos podem reduzir a produção de proteína microbiana no rumen e a absorção ruminal de AA pelo animal pode não aumentar, mesmo com o aumento da proporção de PB da dieta como PNDR (Wang et al., 1996; MacAdam e Villalba, 2015). Os taninos também podem diminuir a digestibilidade de FDN (Reed, 1995). Extensas revisões avaliaram o efeito dos taninos na fermentação ruminal, digestibilidade da dieta, consumo da dieta e desempenho de ruminantes (Makkar, 2003; Frutos et al., 2004; Mueller-Harvey, 2006; Herremans et al., 2020). A resposta animal à suplementação de taninos depende do tipo de produto e dosagem (Aboagye et al., 2018).

Os taninos são classificados em condensados (TC) ou hidrolisáveis (TH) com base em sua capacidade de resistir à hidrólise sob condições ácidas ou alcalinas suaves em açúcares e ácidos carboxílicos fenólicos (Van Soest, 1994). O TC é considerado como tendo maior capacidade de ligação à proteína do que o TH e não é degradada no rúmen (Makkar et al., 1995). *Acacia mearnsii* (acácia negra), originado da Austrália, tem sido cultivada no sul do Brasil como fonte de madeira e extração de taninos da casca, para uma variedade de aplicações comerciais (Tanac, Montenegro,

Brasil). O extrato de tanino de *Acacia mearnsii* (TA) é uma fonte de TC (Ahmed et al., 2005).

Vários experimentos avaliaram dosagens de TA na dieta de ruminantes. Carulla et al. (2005) alimentaram ovelhas com TA a 2,5% da MS da dieta e observaram reduções nas excreções N na urina e metano, associadas a reduções no consumo de forragem, digestibilidade da FDN, proporção acetato/propionato no líquido ruminal, produção de proteína microbiana no rumen e aumento da perda de energia fecal. Ávila et al. (2015) observaram que quando 1,5% de TA na MS da dieta foi fornecido a novilhos em gaiolas metabólicas, houve reduções na digestibilidade no trato total de FDN e no consumo de matéria orgânica digestível (CMOD), um deslocamento da perda de N da dieta de urina para fezes e aumento do fluxo duodenal de N não amoniacal e N não microbiano e AA, sem efeito sobre o fluxo de N microbiano. Grainger et al. (2009) observaram que TA a 0,9% e 1,5% do CMS estimados desviou o N da urina para as fezes e reduziu a excreção de metano de vacas leiteiras pastejando azevem, mas também reduziu o CMS, a energia digestível, digestibilidade de PB e a produção de leite. Griffiths (2013) observou que a produção de leite foi reduzida quando a TA foi administrada na forma de Drench diariamente para vacas leiteiras em pastejo em aproximadamente 0,6% a 2,9% da MS da dieta. Orlandi et al. (2015) alimentaram TA com 0, 0,9, 1,8 e 2,7% da MS da dieta para novilhos e observaram redução de N na urina e aumento de N fecal, redução na produção de proteína microbiana e digestibilidade da FDN e aumento do fluxo duodenal de proteína verdadeira da dieta com o aumento da dosagem. Por outro lado, Orlandi et al. (2020) observaram que TA a 0,38% da MS não afetou o CMS, digestibilidade da FDN, produção de proteína microbiana e partição de N em ovinos. Alves et al. (2017) observaram uma redução na excreção de metano quando TA foi fornecido a 0,7% da MS da dieta para vacas leiteiras em pastejo, sem efeito sobre a produção de leite e CMS.

O efeito de dosagens graduadas de um extrato de tanino de quebracho e castanha contendo TC e TH no desempenho e partição de N de vacas leiteiras de alta produção foi avaliado em 2 experimentos (Aguerre et al., 2016, 2020). Aguerre et al. (2016) observaram reduções lineares no CMS e na produção e concentração de proteína do leite e uma tendência para redução de leite corrigido por sólidos em vacas leiteiras alimentadas com 0, 0,45, 0,90 ou 1,80% de MS de extrato de tanino, independentemente da concentração de PB da dieta. Os taninos reduziram



linearmente o N ureico no leite e no plasma, a concentração ruminal de  $\text{NH}_3$  e ácidos graxos de cadeia ramificada e a digestibilidade do trato total de PB e FDN, e não tiveram efeito sobre o perfil de AGV ruminal. O extrato de tanino avaliado induziu um aumento linear na excreção de N nas fezes (214 a 256 g/d), uma redução no N na urina (213 vs 177 g/d), e não afetou o N do leite (175 g/d) ou a eficiência de utilização de N (29,7% da ingestão de N no leite). Os autores sugeriram que a concentração ótima de extrato de tanino foi de 0,45% da MS com base na redução da concentração e produção de proteína do leite, CMS e digestibilidade em maiores concentrações de extrato de tanino na dieta. Aguerre et al. (2020) alimentaram vacas leiteiras em lactação por 13 semanas com o mesmo extrato de tanino (0, 0,45 e 1,80% da MS). Eles não observaram efeito na produção de leite, leite corrigido por sólidos e nitrogênio ureico no plasma. A maior concentração de proteína verdadeira do leite foi observada com 0,45% do produto tanino na dieta. Parece que o limite superior para a suplementação de extrato de tanino para vacas leiteiras, sem efeito prejudiciais na função ruminal, digestibilidade, CMS e lactação, é em torno de 0,5% da MS da dieta. Não há experimentos avaliando baixas dosagens graduadas de TA para vacas leiteiras em lactação.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de 0, 0,15, 0,30 e 0,45% de TA na MS da dieta sobre a produção e composição do leite, CMS, digestibilidade do trato total, fermentação ruminal, comportamento ingestivo e partição de N de vacas leiteiras. As dosagens foram escolhidas para representar quantidades diárias de TA razoavelmente atribuíveis às vacas em mistura de rações formuladas para fornecer aditivos alimentares com baixa inclusão na dieta e assumindo que uma dosagem máxima de TA de 0,5% da MS seria próximo do ótimo. Nossa hipótese era que a suplementação de TA até 0,45% da MS aumentaria a secreção de proteína do leite e reduziria a perda N na urina.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Taninos**

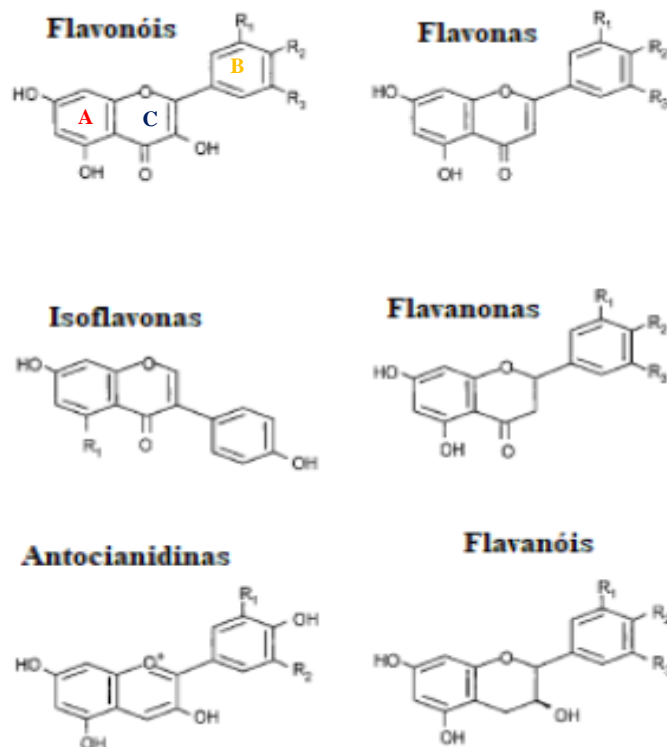
#### **2.1.1 Tipos e composição química**

Os taninos pertencem a um grupo de compostos fenólicos advindos do metabolismo secundário das plantas (BUTLER et al., 1984), que possuem alto peso molecular (RUBANZA, 2005) capazes de se complexar com celulose, lipídeos,

minerais, ácidos nucleicos e por AA, tornando esses substratos resistentes aos ataques microbianos (O'DONOVAN; BROOKER, 2001). A principal característica de interesse dos taninos é a sua alta afinidade por proteínas, protegendo-as da degradação ruminal e aumento do fluxo de AA para o intestino delgado para ser utilizado pelo animal (MAKKAR, 2003).

Os compostos fenólicos possuem em sua estrutura básica um anel aromático ligado a uma ou mais hidroxilas (OH). Os compostos fenólicos são classificados em duas principais classes: flavonoides e não-flavonoides (VELDERRAIN-RODRÍGUEZ et al., 2014). Os flavonoides são compostos que possuem 15 átomos de carbono: C6-C3-C6, contendo 2 anéis aromáticos (A e B) ligados a 3 carbonos, formando um anel heterocíclico (C). Suas principais subclasses são: flavonóis, isoflavonas, flavanonas, Coantocianidinas e flavanóis (MANACH et al., 2014).

**Figura 2. Subclasses dos flavonoides**



Fonte: Adaptado de Manach et al. (2004)

Já a composição dos ácidos fenólicos pode ser classificada em dois subgrupos: derivados do ácido hidroxibenzoico e derivados do ácido hidroxicinâmico. Os derivados de ácido hidroxicinâmico possuem uma estrutura C6-C3, sendo conhecidos

como ácido cafeico, ferúlico e *p*-cumárico. Já os derivados de hidroxibenzoicos estão organizados em uma configuração C6-C1, como por exemplo, os ácidos gálicos e elágicos (Cong-Cong, 2017).

Os taninos podem ser classificados em duas classes: TC e TH (ARAPASITAS, 2012). Os taninos condensados, que também são chamados de proantocianidinas, são formados por diferentes subunidades de flavan-3-ol, que “apresentam OH no carbono 3”, representados por monômeros de catequinas e/ou flavan-3,4-diol, geralmente ligados por carbono-carbono (4-8 ou 6-8) com uma ampla diversidade estrutural (DE JESUS et al., 2012).

Para os taninos hidrolisáveis, existe a combinação de ácido gálico, ácido hexahidroxidifênicos e um núcleo central de glicose, sendo classificados em dois subgrupos: galatotaninos ou elagitaninos (LANDETE, 2011). Esse composto é facilmente degradado por hidrólise química, promovendo liberação dos seus componentes primários (MCLEOD, 1974).

De acordo com Reed (1995), os TH são associados aos efeitos tóxicos no metabolismo animal. Essa intoxicação geralmente é desencadeada por grande ingestão de TH. Isso ocorre devido à degradação de taninos hidrolisados por microrganismos ruminais, tendo como produto final o ácido gálico, sendo carregado pela corrente sanguínea e transportado para o fígado. Quando ocorre grande aumento de fenóis para o fígado, a ponto de ultrapassar sua capacidade de detoxificação, fígado e rins podem sofrer necrose (MAKKAR, 2003).

O grau de afinidade entre tanino-proteína vai depender das características químicas (ZUCKER, 1983), peso molecular e flexibilidade (MUELLER-HARVEY; MCALLAN, 1992). As proteínas com maior afinidade são maiores e hidrofóbicas com sua estrutura flexível, aberta e rica em prolina (KUMAR; SINGH, 1984). Esses complexos podem ser formados por três tipos de ligações:

- Ligações hidrogenadas, ligações com o grupo carboxílico (-COOH) da proteína;
- Ligações iônicas entre o íon fenolato e o sítio catiônico da proteína (exclusivos em taninos hidrolisáveis);
- Ligações covalentes, ocorre através da oxidação dos polifenóis à quinonas e sua condensação com os grupos nucleofílicos das proteínas, sendo considerada a única ligação irreversível (KUMAR; SINGH, 1984), visto que interações iônicas e covalentes são menos comuns de ocorrer.

As principais estruturas que podem variar no tanino condensado são: número de hidroxilas no anel aromático A e B, posição dos grupos de hidroxilas, mudança tridimensional nos carbonos 2, 3 e 4 do anel C, posição e ligação entre as unidades e número de unidades de flavanol (MUELLER-HARVEY, 1999).

Sendo assim, existem vários tipos de taninos condensados, ou seja, são compostos heterogêneos que pode promover respostas distintas em relação à capacidade de ligação (adstringência), impacto sobre a digestão e valor nutritivo (MUELLER-HARVEY, 1999).

### **2.1.2 Extrato de tanino de *Acacia mearnsii***

A Acácia negra (*Acacia mearnsii*) é uma leguminosa arbustiva de origem Australiana (SCHNEIDER et al., 2000), encontrada principalmente na região do Rio Grande do Sul do Brasil. A acácia negra é caracterizada por apresentar folhas de coloração verde-escura e que atinge uma altura média de 10 a 30 metros (SCHNEIDER, 2003).

De acordo com Schneider (2003), a *Acacia mearnsii* representou de 9,4% a 18,7% de tanino em relação ao peso da casca verde da árvore. A extração de tanino da casca da árvore pode ser obtido através de autoclaves, o que promove a extração de água por temperatura, tempo e pressão específica (MISSIO et al., 2017). Taninos de acácia negra são classificados como profisetinidines, em que em sua estrutura apresenta ligações 4 – 8 entre os anéis aromáticos e apresentam configurações 3,4 trans (SANTIAGO et al., 2020). Desde 2010, a acácia negra se mantém como a quarta espécie mais cultivada para fins comerciais no Brasil (IBÁ, 2017).

Esta leguminosa arbustiva tem múltiplos propósitos, como: recuperação de solos degradados, fixação de nitrogênio e produção de taninos. No Brasil ela vem sendo plantada com a finalidade de ser como agente floculante no tratamento de águas e efluentes, formação de pellets de madeira para produção de energia e principalmente para produção de taninos para curtimento de couro. Além disso, existe também a linha de produtos (mínimo de 70% de TC) para nutrição animal. (Tanac S.A., Montenegro, RS, Brasil).

## 2.2 Efeitos de taninos em ruminantes

### 2.2.1 Produção de leite e consumo

De acordo com White et al. (2017), vacas com produção de leite inferior a 30 kg/d com teor de gordura de 3%, tem potencial para atender toda sua exigência de proteína suprida com fontes de PNDR de alimentos convencionais, mas quando a produção de leite ultrapassa os 30 kg/d, há uma melhor resposta e necessidade da suplementação com fontes ricas em PNDR. Com o objetivo de aumentar o PNDR, a suplementação de taninos tem sido uma das estratégias estudadas para aumentar a produção de leite.

Aguerre et al. (2016) alimentaram vacas holandesas de alta produção, onde substituíram casca de arroz por extrato de TH e TC misturados com doses: 0, 0,45, 0,90 e 1,80% da MS da dieta e observaram redução linear no CMS, concentração de proteína do leite e nitrogênio ureico do leite (NUL) sem efeito em produção de leite, independente do nível de proteína bruta (PB) da dieta (15,3 vs. 16,6%). Entretanto, a suplementação de 0,45% de TH e TC misturados aumentou a concentração de proteína do leite. GRIFFITHS et al. (2013) observaram que a suplementação de 0,6, 1,4 e 2,9% de extrato de TA via oral por “Drench” não afetou o CMS, mas houve uma redução em produção de leite, com maior produção de leite na menor dose de TA em vacas leiteiras em pastejo. Como também, a suplementação de 40 g/d de TA por meio da cânula ruminal em vacas em lactação, Aprianita et al. (2014) observaram queda na produção de proteína, gordura e lactose do leite, sem afetar a produção de leite dos animais.

Trabalhando com dose de 1 e 3% de extrato de TA, Gerlach et al. (2018) não observaram diferença significativa no CMS, produção e composição do leite, exceto para NUL e produção de proteína do leite quando suplementaram 3% de extrato de TA na MS da dieta para vacas leiteiras, indicando redução de PDR e AA disponíveis na porção do duodeno em vacas leiteiras. Essa redução de absorção de AA para o intestino pode ser devido a falha de dissociação de tanino-proteína no abomaso, formação de tanino com enzimas digestivas, retorno do complexo de tanino-proteína da dieta no ambiente duodenal ou interação entre tanino com mucosa intestinal. (FRUTOS *et al.*, 2004). O mesmo ocorreu com Avila et al. (2020), quando alimentaram cinco novilhos da raça Jersey com as doses: 0, 0,6, 1,2, 1,8 e 2,4% de extrato de TC de acácia negra na MS da dieta em relação ao CMS.

Entretanto, Grainger et al. (2009) observaram que TA a 0,9% e 1,5% do CMS estimado reduziu o CMS e produção de leite em vacas leiteiras pastejando azevem. A resposta sobre o consumo pode estar diretamente relacionada com a afinidade de ligação entre tipo de tanino e nutriente, efeito adstringente pela ligação com proteínas salivares e redução de digestibilidade dos nutrientes (MAKKAR et al., 1993, 2003; WAGHORN, 2008). Narjisse et al. (1995) infundiram tanino diretamente no rúmen de ovinos para observar se a palatabilidade era responsável pela redução de consumo voluntário dos animais. Os autores constataram redução de digestibilidade da digesta no rúmen, mostrando que esse efeito pode prejudicar o esvaziamento do trato digestivo, gerando sinais de enchimento e saciedade para os centros nervosos envolvidos no controle da ingestão.

O mesmo foi observado por Carulla et al. (2005), onde alimentaram ovelhas com TA a 2,5% da MS da dieta e observaram reduções no consumo de forragem. Por outro lado, Alves et al. (2017) não observaram efeito no CMS e produção de leite quando o TA foi fornecido a 0,7% da MS da dieta para vacas leiteiras em pastejo. Orlandi et al. (2020) observaram que TA a 0,38% da MS não afetou o CMS.

### **2.2.2 Digestibilidades**

Orlandi et al. (2015) alimentaram TA com 0, 0,9, 1,8 e 2,7% da MS da dieta para novilhos e observaram tendência para redução de digestibilidade aparente de fibra em detergente neutro (FDN) e redução na digestibilidade aparente e verdadeira de PB, sem efeito na digestibilidade de matéria orgânica (MO). Por outro lado, Kozloshi et al. (2012) observaram em ovelhas que quando infundiram 2, 4 e 6% de TA na MS da dieta via cânula, houve redução linear na digestibilidade aparente de MS, MO, FDN e PB e digestibilidade verdadeira de MO e PB. Além disso foram observados redução linear na digestibilidade ruminal de MO e PB. O efeito de queda de digestibilidade de fibra pode ser em virtude de que taninos podem prejudicar a adesão de microrganismos que degradam carboidratos fibrosos como consequência do complexo de tanino-parede celular dos carboidratos ou por efeito direto sobre os microrganismos celulolíticos (PATRA; SAXANA, 2009)

Avila et al. (2020) alimentaram novilhos da raça Jersey e observaram que a suplementação de 0, 0,5, 1,0, 1,5 e 2% de TA na MS da dieta reduziu de forma linear a digestibilidade aparente de PB, sem efeito na digestibilidade aparente de MS, MO e

FDN. É possível que parte da associação entre tanino-proteína não é desfeita no abomaso, além disso taninos dissociados que chegam no duodeno, pode se complexar com enzimas do intestino ou se complexar novamente às proteínas dietéticas, reduzindo assim, a digestibilidade de PB (WAGHORN, 2008; McNABB et al., 1998).

### 2.2.3 Atividade mastigatória

A redução da palatabilidade pode ser defendida através da adstringência do tanino (Griffiths, 2013). A adstringência é capacidade dos taninos de se ligarem às proteínas da saliva (MAKKAR et al., 1993), o qual é medido pelas gramas de proteínas que se precipitam por gramas de TC extraídas, sendo determinada pela técnica de difusão radial (HAGERMAN 1987). Lima et al. (2019) verificaram que ao utilizar 3% de TC de *Mimosa tenuiflora* em ovinos, aumentou o tempo ingerindo (hora/dia), embora não foi observado efeito no tempo mastigando, tempo ruminando e tempo e número de mastigação por bolo ruminal, com avaliação durante 24 horas a cada 5 minutos.

Já para Nascimento et al. (2021), observaram aumento linear no tempo ruminando (minutos/dia), número de mastigação por bolo ruminal e redução no tempo em ócio para cabras em lactação, sendo suplementadas com dieta contendo 80% de silagem de mandioca cortadas 1/3 do total da planta, sendo este material misturado com TC no período de pré ensilagem nas seguintes doses: 0, 2,5, 5,0 e 7,5% de TC de extrato de *Mimosa*. Após 56 dias de armazenamento, a silagem foi ofertada junto ao concentrado para os animais. O comportamento ingestivo foi avaliado de forma individual a cada 10 minutos durante 4 dias. Neste experimento não foram observados entre os tratamentos o tempo ingerindo (minutos/dia), taxa de ingestão e ruminação e tempo de mastigação por bolo ruminal. A principal causa de animais terem aumentado o tempo ruminando e número de mastigação por bolo ruminal observado por Nascimento et al., (2021) foi para reduzir o tamanho de partículas da digesta e aumentar a disponibilidade de nutrientes (LIMA et al., 2019).

Sant'ana et al. (2022) avaliaram a suplementação de 5% de TA na MS da dieta vs. o grupo controle em cabras em lactação e relataram redução na taxa de ruminação da MS (0,15 vs. 0,19 kg de MS ingerida/hora ruminando) e de FDN (0,09 vs. 0,11 kg de FDN ingerido/hora ruminando), o que remete maior tempo ruminando por Kg de MS e FDN, embora o CMS, FDN ingerido, tempo ruminando, tempo ingerindo, número

e tempo de mastigação por bolo ruminal não foram observados entre os tratamentos. O complexo entre tanino-proteína reduz a digestibilidade de proteína no ambiente ruminal, o que pode prejudicar a SPM, ocasionando de forma indireta a redução na digestibilidade de outros nutrientes: CNF e FDN (MUIR, 2011). Isto pode reduzir a taxa de digestão do conteúdo e aumento no enchimento ruminal (MAKKAR, 2003).

#### **2.2.4 Partição de N dietético**

A ingestão excessiva de N aumenta exponencialmente a excreção de N na urina, enquanto que o N fecal e NUL aumenta de forma linear em vacas leiteiras (CASTILLO et al., 2000). Com base neste levantamento da literatura, a relação de N na urina para N fecal pode variar de menor de 1 em baixas ingestão de N (< 400 g/d) a mais de 2 em alta ingestão de N (>700 g/d). Avila et al. (2020) observaram que a suplementação de 0, 0,6, 1,2, 1,8 e 2,4% de TA em dietas isoproteicas e isoenergéticas para vacas leiteiras não observaram diferença significativa para a síntese de proteína microbiana, eficiência de síntese de proteína microbiana e nitrogênio ureico no plasma em novilhos. Isso pode ser devido à adaptação de alguns microrganismos ruminais ao tanino (McSWEENEY et al., 2001). Entretanto, Aguerre et al. (2016) utilizaram 0, 0,45, 0,90 e 1,80% de TH e TC misturados e observaram redução linear no nitrogênio ureico no plasma, aumento de N fecal e redução de N na urina.

Carulla et al. (2005) alimentaram ovelhas com TA a 2,5% da MS da dieta e observaram reduções de proteína microbiana no rúmen e N na urina, aumento de N nas fezes, o que pode ser explicado pela redução da absorção de amônia no rúmen, apesar que não houve diferença significativa sobre o N retido. Avila et al. (2015) utilizaram 1,5% de TA na MS da dieta em novilhos e observaram aumento no fluxo duodenal de N total, N alfa amino e AA, que porventura refletem na redução de degradação de proteína no rúmen, todavia não mostrou diferença significativa no fluxo de N microbiano para o duodeno. Isso é sugestivo de que a queda de PDR não foi suficiente para limitar a síntese de proteína microbiana, indicando que a concentração N amoniacal foi suficiente para condicionar a manutenção de microrganismos, de acordo com o estudo *in vitro* de Satter e Slyter (1974), que seria de 5 mg/dL.

Além disso, observaram redução na excreção de N na urina e aumento na excreção de N nas fezes, sem afetar o N retido, o que corrobora com Souza (2021), que utilizou 4% de TA na MS da dieta em ovinos. Orlandi et al. (2015) observaram



redução linear de N amoniacal no ambiente ruminal quando alimentaram novilhos com TA de: 0, 0,9, 1,8 e 2,7% da MS da dieta.

Ademais, houve efeito quadrático sobre a eficiência de síntese de proteína microbiana com maior valor para dose de 1,8% de TA, sugerindo que utilizar doses acima de 1,8% de TA pode exercer efeito negativo mais intenso na absorção de nutrientes pelas bactérias ruminais do que o efeito negativo sobre a atividade catabólica pelas enzimas que estão associadas à membrana bacteriana. Para o fluxo de duodeno, foi observado o aumento linear de N total e N alfa amino, AA não essencial e tendência para aumento de AA gliconeogênicos e AA total em novilhos. Além disso, foi observado aumento linear na eficiência de utilização de N e N nas fezes, com efeito quadrático para N na urina, com menor valor de N na urina na dose de 1,8% de TA.

### **2.2.5 Fermentação ruminal e perfil de ácidos graxos no leite**

Existe inconsistência em resultados relacionando o efeito de taninos sobre a redução ou aumento de protozoários no rúmen (MAKKAR, 2003). YÁÑEZ RUIZ et al. (2004) mostraram que o número de protozoários diminuiu com suplementação de taninos. O mesmo foi visto por Carulla et al. (2005), que suplementaram 2,5% de TA em cordeiros e Lima et al. (2019), que alimentaram ovelhas com 3% de TC de *Mimosa tenuiflora*.

Vasta et al. (2010) alimentaram ovinos com dose de 6,4 g/Kg de taninos totais de quebracho e mostraram aumento do número de protozoários. Entretanto, Benchaar et al. (2008) não observaram diferença na utilização de tanino quebracho com inclusão de 15% de tanino de quebracho para vacas leiteiras.

Khiaosa-Ard et al. (2009) utilizaram TC da planta *Onobrychis viciifolia*, que contém 8,4% de tanino, sendo ofertado 1,1 g/Kg de TC na MS da dieta. O segundo tratamento desse experimento foi utilizado o extrato de tanino da acácia negra com a mesma quantidade (1,1 g/Kg) e o grupo controle. Foi verificado maior população de microrganismos com utilização de extrato de tanino de acácia negra em relação aos outros tratamentos por método *in vitro*. Isso pode ter ocorrido devido à queda de protozoários em relação aos outros tratamentos, visto que os protozoários realizam predação e lise de bactérias, diminuindo assim a população de bactérias (Makkar, 2003).

Desse modo, foi observado queda na produção de acetato, butirato, relação acetato: propionato (mol/100mol) e metano com utilização de 1,1 g/Kg de TC na MS, em ambos os tratamentos com taninos. Ademais, observou-se aumento de propionato, não mostrando diferença significativa para pH ruminal e produção de ácidos graxos totais (AGVs) em mM (milimol). Isso corrobora com que foi observado: queda de digestibilidade aparente de FDN, PB e MO.

Carulla et al. (2005), observaram suplementação de 2,5% de TA na MS da dieta em ovinos reduziu a degradação de FDN e FDA, diminuindo a relação acetato: propionato e acetato. Todavia, aumentou propionato, butirato e valerato (mol/100 mol). Entretanto, Beauchemin et al. (2018) não observaram diferença significativa na produção de AGVs (mM), acetato, propionato, butirato, relação acetato propionato na proporção (mol/100 mol), mas houve redução para ácidos graxos de cadeia ramificada (isobutirato e isovalerato) com inclusão de 2,5% de TA na MS da dieta.

Kemp e Lander (1984) classificaram 2 grupos de bactérias que fazem parte da biohidrogenação. O grupo A (*Ruminococcus albus* e *Butyrivibrio* sp.) que realiza a hidrogenação do ácido rumênico (C18:2 *cis*-9, *trans*-11) e o grupo B (*Fusocillus babrahamensis*, *Fusocillus* sp. e o *Clostridium proteoclasticum*) que é capaz de utilizar o (C18:1 *trans*-11) para terminar a hidrogenação em ácido esteárico (C18:0) (DURMIC et al., 2007). Além disso, tem sido observado que a etapa de hidrogenação de C18:1 para C18:0 parece ser limitante, devido a menor quantidade de espécies presente no grupo B, que são capazes de realizar essa atividade (GRIINARI; BAUMAN, 1999).

Khiaosa-ard et al. (2019) e Vasta et al. (2010) têm mostrado por método *in vitro*, em 48 horas, que a utilização de taninos pode inibir a biohidrogenação dos ácidos graxos insaturados. Segundo Khiaosa-ard et al. (2009), dose de 1,1 g/Kg de TC de acácia negra obteve-se maior quantidade de ácido vacênico (C18:1 *trans*-11), enquanto que na dieta sem tanino e a dita que tinha 1,1 g/Kg da planta *Onobrychis viciifolia* rica em TC obteve-se maior ácido esteárico (C18:0) como produto final da biohidrogenação, sugerindo que a utilização de tanino de acácia negra inibiu as bactérias do grupo B que realizam a última etapa de biohidrogenação de C18:1 *trans*-11 para ácido esteárico, validando o que Durmic et al. (2007) expôs com o uso de extrato de *Acácia mearnsii*, em que houve o efeito inibitório seletivo para *Clostridium proteoclastridium* P18, mas não em *Butyrivibrio fibrisolvens*. Essa queda de biohidrogenação pode ser devido à redução de protozoários, limitando a quantidade

de H<sub>2</sub> para o meio ruminal, intensificando a competição por bactérias que fazem metanogênese e bactérias do grupo B (TURNER et al.,2005).

Vasta et al. (2008) utilizaram (*Acacia cyanophylla*, *Ceratonia siliqua* e *Schinopsi lorentzii*) de forma separada com as doses de 0,6 mg/ml e 1 mg/ml de tanino no fluido ruminal por tempo de incubação por 12h por método *in vitro*, onde ocorreu o aumento do nível de C18:1 *trans*-11 e redução de C18:0. Além disso, houve redução de síntese de proteína microbiana, *isobutirato*, *isovalerato*, *valerato* e relação acetato: propionato. A utilização de taninos também reduziu a quantidade de C15:0 iso, C15:0 anteiso, C16:0 iso e C17:0 anteiso. Esses resultados ocorreram devido a menor quantidade encontrada de *isovalerato* e *isobutirato* no rúmen, que são AA precursores para a síntese de ácidos graxos de cadeia ramificada *iso* e *anteiso*.

Tajima et al. (2001) relata que as bactérias celulolíticas, por exemplo, as *Ruminococcus flavefaciens* e *Butyrivibrio fibrisolvens*, apresentam em grande parte da sua camada lipídica os ácidos graxos na forma *iso*. Para bactérias amilolíticas *Ruminobacter amylophilus*, *Succinivibrio dextrinosolvens* e *Prevotella ruminicola*, estas contêm maior quantidade de ácidos graxos de cadeia ímpar e anteiso. Jones et al. (1994) observou que ao utilizar leguminosas *Onobrychis viciifolia Scop* e *Lotus corniculatus L.*, contendo TC, reduziu-se a quantidade de *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Streptococcus bovis* e pouco efeito foi observado sobre *Prevotella ruminicola* e *Ruminobacter amylophilus*. Diante do exposto, observa-se que o complexo de tanino-AA ramificado pode prejudicar a população dos microrganismos.

Vasta et al. (2009) observaram que ao utilizar taninos totais de quebracho com dose de 4,7% de tanino na MS da dieta, houve maior quantidade de ácidos graxos poli-insaturados e redução de ácidos graxos saturados e monoinsaturados no tecido adiposo de cordeiros. Uma possível explicação para o aumento de ácidos graxo poli insaturados é devido à mudança da rota de biohidrogenação no rúmen, formando o *trans*-10, *cis*-12 como produto final (BAUMGARD *et al.*, 2001).

Estes autores também demonstraram que no ambiente ruminal houve aumento significativo de ácido rumênico (C18:2 *cis*-9, *trans*-11), sugerindo que esse aumento se dá devido ao *feedback* negativo sobre o acúmulo de ácido vacênico, visto que houve uma menor relação de ácido esteárico/ácido vacênico, refletindo no aumento de CLA. Em contrapartida, a suplementação de 40 g/d de TA por infusão intraruminal, Aprianita et al. (2014) não verificaram redução nos ácidos graxos monoinsaturados e

De Novo no leite, sugerindo que acácia negra nessa dose não foi eficaz de interferir nas bactérias responsáveis pela biohidrogenação.

### 2.3 Metabolismo de proteínas em ruminantes

As proteínas dietéticas podem ser classificadas em proteína degradável no rúmen (PDR) e proteína não degradável no rúmen (PNDR). A PDR é composta por proteína verdadeira e nitrogênio não proteico (NNP) (BACH et al., 2005). Ao se formular uma dieta, é necessário primeiramente suprir as exigências dos microrganismos ruminais e, em seguida, atender às exigências do animal. Ruminantes são capazes de alcançar algum desempenho produtivo mesmo quando alimentados com dietas sem inclusão de proteína verdadeira (VIRTANEN, 1966), uma vez que os microrganismos ruminais são capazes de sintetizar aminoácidos (AA) e proteína verdadeira a partir de amônia e esqueletos de carbono. Com base em estudos *in vitro*, a concentração mínima de amônia no fluido ruminal para manter o crescimento microbiano foi ao redor de 5 mg/dL (SATTER; SLYTER, 1974) e a disponibilidade de carboidratos rapidamente fermentáveis determina a síntese microbiana em balanço positivo de N no rúmen (HALL e HEREJEK, 2001).

A substituição de fontes de proteína verdadeira por uréia pode deprimir o fluxo de proteína para o intestino. Quatro dietas isoproteicas (16,6% de PB) com alta inclusão de proteína oriunda de silagem de alfafa e variando na fonte de N e na inclusão de silagem de grão úmido de milho, foram ofertadas para vacas leiteiras com os tratamentos: ureia (1,9% da matéria seca (MS)), farelo de soja (12,1% da MS), farelo de canola (16,1% da MS) e farelo de algodão (14,1% da MS). Houve redução nos fluxos omasais de AA, AA de cadeia ramificada, AA essenciais, AA não essenciais e síntese de proteína microbiana (SPM) quando foi utilizada uma fonte exclusiva de NNP (uréia) (BRITO et al., 2007a). Como consequência, vacas produziram menos leite (32,9 kg/d) ao serem suplementadas com uréia em relação aos animais suplementados com farelo de soja (40,0 kg/d), farelo de algodão (40,5 kg/d) e farelo de canola (41,1 kg/d), demonstrando a necessidade de proteína verdadeira para maximizar a SPM e fluxo de PNDR para vacas leiteiras (BRITO et al., 2007a).

O ambiente ruminal é o local onde ocorre a maior parte da degradação dos alimentos, sendo assim o metabolismo ruminal pode ser atribuído como o principal

modulador de eficiência de utilização de nitrogênio (EUN) (TAMMINGA, 1992). Os valores de EUN normalmente não ultrapassam de 25 a 30% (ROTZ et al., 1990), sendo reflexo de baixa eficiência em vacas leiteiras (LOBLEY, 2002). Diferentemente das fezes e leite, a perda de N na urina em g/d aumentou de forma exponencial com o aumento de ingestão de N a partir de 400 g/d (CASTILLO et al., 2000), demonstrando que em ingestão excessiva de N, a perda urinária ocorre em maior magnitude em relação a perda de N via fezes ou a capacidade de incorporação de N no leite (nitrogênio ureico do leite – NUL) (SPEK et al., 2013). As perdas de N na urina, fezes e leite podem ser mensuradas em laboratório, mas a retenção de N no animal é mensurada apenas por cálculo (N excretado/N ingerido).

Nos últimos anos, a substituição de proteína bruta (PB) em proteína metabolizável promoveu um grande avanço na área de nutrição de ruminantes. Os sistemas que promovem suporte nas formulações de ração que utilizam a proteína metabolizável exige que as proteínas sejam fracionadas no sentido de melhor caracterizá-las (SNIFFEN et al., 1992). O termo proteína metabolizável foi utilizado em 1972, para se referir as proteínas que são digeridas no intestino (SATTER; ROFFLER 1975). A proteína metabolizável é composta por AA proveniente da degradação da proteína microbiana, proteínas dietéticas que não sofreram degradação ruminal e proteínas endógenas (NRC, 2001).

Os sistemas de *Cornell Net Carbohydrate and Protein System* (CNCPS) e *National Research Council* (NRC), consideram que existem frações para proteína, sendo que o NRC considera a fração “A”, que representa a porcentagem da PB que é nitrogênio não proteico (instantaneamente solubilizado no tempo zero), e uma pequena porção de proteína verdadeira que escapa do saco devido a sua alta solubilidade ou que apresentam pequenas partículas, a fração “B” composta por nitrogenados proteicos de degradação mais lenta e a fração “C” que é não degradada no rúmen e indigestível nos intestinos. Para o modelo CNCPS, a fração “B” é subdividida em três grandes porções. Neste contexto, pode se concluir que em ambos os sistemas a PNDR é composta por parte da fração B e C da proteína dos ingredientes da dieta.

De acordo com o modelo do NRC (2001), a eficiência de utilização da PNDR para atender a exigência de proteína metabolizável é de 70 a 90%. Por outro lado, a eficiência de utilização da PDR pelos microrganismos ruminais para a síntese de proteína microbiana é de 85%. Além disso a proteína microbiana é composta de 20%

de N associado aos ácidos nucleicos e 80% de proteína verdadeira. Como a digestibilidade da proteína verdadeira microbiana é de 80%, a eficiência de uso da proteína microbiana para atender as exigências de proteína metabolizável é de 64.4%. Desta forma a eficiência de uso da PNDR é maior do que a eficiência de uso da PDR. Pensando no planejamento de dieta de vacas leiteiras, a previsão da proteína microbiana e o fluxo de PNDR a partir do rumem é de importância fundamental, a participação dessas proteínas constitui a proteína metabolizável e o fornecimento da PNDR afetará a composição dos aminoácidos. Sendo importante balancear dietas de forma suprir as exigências dos microrganismos ruminais com PDR e complementar as exigências de proteína metabolizável do animal com PNDR (Santos e Pedroso, 2010).

#### **2.4 Impacto de taninos sobre o meio ambiente: metano**

Os principais GEE são o metano ( $\text{CH}_4$ ), dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), que são responsáveis pelo aquecimento global. O  $\text{CH}_4$  tem potencial de aquecimento global de 25 vezes superior ao  $\text{CO}_2$  durante o período de 100 anos (VAN DER ZAAG et al., 2011), enquanto que  $\text{N}_2\text{O}$  apresenta potencial de aquecimento global de 298 superior ao  $\text{CO}_2$  durante um período de 100 anos (DIJKSTRA et al., 2013). O  $\text{CO}_2$  permanece na porção atmosférica em torno de 1000 anos, enquanto que o  $\text{N}_2\text{O}$  permanece por 114 anos e  $\text{CH}_4$  por 10 anos.

O setor pecuário pode ter participação no aparecimento desses gases na porção atmosférica, pois alguns deles são produzidos pela fermentação ruminal. A principal forma que os ruminantes eliminam tais gases é via eructação, que se constituem de 2/3 de  $\text{CO}_2$  e 1/3 de  $\text{CH}_4$ , sendo liberados em maior parte via eructação (LIMA, 2002). Várias pesquisas observaram redução em metano, quando suplementaram 2,5% de TA em ovelhas Carulla et al. (2005), 1,5% de TA em novilhos Ávila et al. (2015), 0,9% a 1,5% de TA em vacas leiteiras Grainger et al. (2009) e 0,7% de TA Alves et al. (2017) em vacas leiteiras em pastejo. Entretanto, a avaliação de excreção de metano não pode ser baseada em relação acetato:propionato quando a suplementação é em baixas dosagens (< 2% de tanino na MS da dieta) segundo a meta-análise realizada por Jayanegara et al. (2012), pois existe uma diversidade de respostas muito grande relacionando a excreção de metano com relação acetato propionato em baixas doses.

O setor agropecuário foi responsável por 87,1% da emissão de  $N_2O$  nacional em 2016. Emissões provenientes do manejo de dejetos de animais corresponderam a 3,1% do total emitido pelo setor agropecuário (BRASIL, 2021). Nos Estados Unidos, a pecuária, como um todo, responde por 3,4% do total de emissões de GEE e para o setor de produção leiteira, a participação é de 1,3% (EPA, 2017). Entretanto, considerando a grande quantidade de nitrogênio excretado pelo animal e que parte dele a planta não é capaz de utilizar a tempo, o N excretado é perdido através da lixiviação como  $NO_3$ , volatilizado como  $NH_3$  e emitido como  $N_2O$  (PAUL et al., 1998).

As principais rotas de perda de N pelos ruminantes ocorrem pelas fezes e pela urina (TAMMINGA, 1992). A capacidade de induzir perda de N por volatilização de  $NH_3$  ou desnitrificação para ( $N_2O$ ) no solo de forma isolada através de fezes e urina é diferente. O N urinário possui maior capacidade poluente que o N fecal (LESSA et al., 2014) devido à maior disponibilidade de nitrogênio na urina e maior interação com os microrganismos do que em fezes, suportando a ideia de que urina resulta em maior emissão de  $N_2O$  (WHITEHEAD, 2000; CAI; AKIYAMA, 2016).

Sendo assim, estratégias para aumentar a EUN e reduzir o impacto negativo sobre o ambiente têm sido relevantes para ruminantes, atuando na rota de excreção (ROTZ et al., 1999). A mineralização de nitrogênio ocorre por enzimas microbianas que realizam aminização de N orgânicos a partir de macromoléculas compostas por nitrogênio, em N orgânicos simples, como AA e ácidos nucleicos. Na mineralização também ocorre a amonificação onde N orgânico de moléculas simples se transforma em amônio ( $NH_4$ ) (ZAMAN et al., 1999 a; b). A amonificação da ureia na urina é reconhecida como hidrólise de ureia e a taxa de mineralização é mais rápida na urina do que em fezes (BOLAN et al., 2004) e vários estudos validam que a mineralização de N no solo aumenta após a aplicação de urina (AMBUS et al., 2007; HARTMANN et al., 2013) ou fezes (HATCH et al., 2000; ANTIL et al., 2001).

A nitrificação é o próximo passo, a qual é mediada por enzimas de microrganismos (oxidação de amônia) em meio aeróbico formando, a partir do  $NH_4$ , nitrito ( $NO_2^-$ ) e depois nitrato ( $NO_3^-$ ), liberando  $N_2O$  como produto final pela desnitrificação. A desnitrificação microbiana ocorre sob limitação de oxigênio, pois os microrganismos usam o  $NO_3^-$  na respiração com carbono orgânico para fonte de energia na presença de  $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$ , NO e  $N_2O$  redutases (PHILIPPOT, 2002). Sendo assim, a restrição de oxigênio no solo, que pode ser favorecida com maior compactação devido à menor aeração e maior umidade (SOUZA et al., 2021),

aumenta a desnitrificação, que também é favorecida em temperaturas mais altas (até 30,8°C) (BOLAN et al., 2004).

Como visto anteriormente, os principais processos responsáveis pela produção de N<sub>2</sub>O, a partir de excretas (urina e fezes), é pela nitrificação (NH<sub>4</sub> → NO<sub>2</sub>) e desnitrificação (NO<sub>3</sub> → N<sub>2</sub>O + N<sub>2</sub>) por organismos (CAI; CHANG; CHENG, 2017). A intensidade de nitrificação e desnitrificação é dependente de fatores como temperatura, aeração e quantidade de água no solo, bem como fatores que controlam o processo de disponibilidade de N, como a quantidade de N inorgânico presente nas excretas. Mais de 70% de N oriundo, presente na urina, está na forma de ureia, e em menor quantidade os AAs e peptídeos (HAYNES; WILLIAMS, 1993). A ureia é rapidamente hidrolisada após a excreção e, posteriormente, é convertida em amônio (NH<sub>4</sub>) no solo (SORDI et al., 2014).

Nas fezes, a quantidade de N que é solúvel em água é aproximadamente 20 a 25% e N indigestível de 15 a 25%, sendo que o restante são células de microrganismos (BOLAN et al., 2004). Nesse sentido, a urina tem maior presença de N que sofre mineralização mais rápida do que em fezes (DIJKSTRA et al., 2013, KROL et al., 2016, LUO et al., 2014) e, conseqüentemente, maior fator de emissão (FE) (quantidade de N aplicado no solo sendo emitido como N<sub>2</sub>O).

### 3 REFERÊNCIAS

ABOAGYE, I. A.; OBA, M.; CASTILLO, A. R.; KOENIG, K. M.; IWAASA, A. D.; AND KAREN AND BEAUCHEMIN. Effects of hydrolysable tannin with or without condensed tannin on methane emission, nitrogen use, and performance of beef cattle fed a high-forage diet. **Journal of Animal Science**, v. 96, n 12. p. 5276-5286, 2018.

AGUERRE, M. J.; CAPOZZOLO, M. C.; LENCIONI, P.; CABRAL C.; WATTIAUX, M. A. Effect of quebracho-chestnut tannin extracts at two dietary crude protein levels on performance, rumen fermentation and nitrogen partitioning dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v.99, p.4476–4486., 2016.

AGUERRE, M. J.; CAPOZZOLO, M. C.; LENCIONI, P.; CABRAL C.; WATTIAUX, M. A. Effect of feeding a quebracho-chestnut tannin extracts lactating cow performance, and nitrogen utilization efficiency. **Journal of Dairy Science**. v. 99, p. 4476–4486, 2020



AHMED, M.; KHIRSTOVA, P.; ICHO, G. Comparative study of tannins of *Acacia nilotica* an indigenous tanning material in Sudan with *Acacia mearnsii*. **Suranaree Journal Science Technology**. v. 12, p. 259-265, 2005.

AHNERT, S.; DICKHOEFER, U.; SCHULZ, F.; and SUSENBETH, A. Influence of ruminal Quebracho tannin extract infusion on apparent nutrient digestibility, nitrogen balance, and urinary purine derivatives excretion in heifers. **Livestock Science**. v. 177, p. 63–70. 2015.

ANTIL, R.S.; LOVELL, R.D.; HATCH, D.J.; JARVIS, S.C. Mineralization of nitrogen in permanent pastures amended with fertilizer or dung. **Journal of Biology Fertility Soils**, v. 33, p. 132–138, 2001.

APRIANITA, A.; DONKOR, O.N.; MOATE, P.J.; WILLIAMS, S. R. O.; AULDIST, M. J.; GREENWOOD, J. S.; HANNAG, M. C.; WALES, W. J and VASILJEVIC, T. Effects of dietary cottonseed oil and tannin supplements on protein and fatty acid composition of bovine milk, **Journal of Dairy Research**, v.81, p.183–192, 2014.

ARAPASITAS, P. Hydrolysable tannin analysis in food. **Food Chemistry Journal**, v.135, n.3, p.1708-1717, 2012.

AVILA, A. S.; ZAMBOM, M. A.; FACCENDA, A.; WERLE, C. H. Black Wattle (*Acacia mearnsii*) Condensed Tannins as Feed Additives to Lactating Dairy Cows. **Journal of Animals**, v. 10, p.1-12, 2020.

AVILA, S. C.; KOZLOSKI, G. V.; MCLEOD, K. P.; HARMON, D. L. Effect of inclusion of *Acacia mearnsii* tannin extract on nitrogen and energy balance in growing beef cattle fed a low-protein corn silage diet. **Journal of Animal Science**, v. 94, 2016.

AVILA, S. C.; KOZLOSKI, G. V.; ORLANDI, T.; MEZOOMO, M. P.; STEFANELLO, S. Impact of a tannin extract on digestibility, ruminal fermentation, and duodenal flow of amino acids in steers fed maize silage and concentrate containing soybean meal or canola meal as protein source. **Journal of Agriculture Science**, v. 153, p. 943-953, 2015.

BACH, a.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, D. M. Nitrogen Metabolism in the Rumen. **Journal of Dairy Science**., v. 88, p.9-21, 2005.

BEAUCHEMIN, K and McGinn, S. M. (2018) Feeding condensed tannins to mitigate ammonia emissions from beef feedlot cattle fed high protein finishing diets containing distillers grains. **Journal of Animal Science**. v. 96, n. 10, p. 4414-4430, 2018.

BOLAN, N. S. et al. Gaseous Emissions of Nitrogen from Grazed Pastures: Processes, Measurements and Modelling, Environmental Implications, and Mitigation. **Advances In Agronomy Journal**, v. 84, p.37-120, 2004.

BRASIL. Ministério da Ciência e Tecnologia. Comunicação Nacional Inicial do Brasil à Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre Mudança do Clima. **Coordenação-Geral de Mudanças Globais de Clima (Comunicação Nacional)**. Brasília, 103p. 2021.

BRAVO, L. 1998. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BRITO, A. F. and BRODERICK, G. A. Effects of different protein supplements on omasal nutrient flow and microbial protein synthesis in lactation dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 90, p.1816–1827, 2007a.

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

CAI, Y.; AKIYAMA, H. Nitrogen loss factors of nitrogen trace gas emissions and leaching from excreta patches in grassland ecosystems, A summary of available data. **Science Total Environment Journal**. v. 572, p. 185–195, 2016.

CAI, Y.; CHANG, S. X.; CHENG, Y. Greenhouse gas emissions from excreta patches of grazing animals and their mitigation strategies. **Earth-science Reviews**, [s.l.], v. 171, p.44-57, 2017.

CARULLA, J. E.; KREUZER, M.; MACHMULLER, A.; HESS, H. D. 2005. Supplementation of *Acacia mearnsii* decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.56, p. 961-970, 2005.

CASTILLO, A. R. et al. A review of efficiency of nitrogen utilization in lactating dairy cows and its relationship with environmental pollution. **Journal of Animal and Feed Sciences**, n. 9, p. 1 -32, 2000.

CHEN, X. B.; GOMES, M. J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: an overview of the technical details. In: **International Feed Resources United**, 1992, Aberdeen. Proceedings... Aberdeen: [s.n.], 1992. p. 1-20.

DE JESUS, N. Z. T. FALCÃO, H, D. S.; GOMES, I. F.; LEITE, T. J. D. A.; LIMA, G. R. D. M.; FILHO. J. M. B.; TAVARES, J. F.; DA SILVA, M. S.; FILHO, P. F. D. A.; BATISTA, L. M. Tannins, peptic ulcers and related mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 3203-3228, 2012.

CONG-CONG, X. et al. Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant material. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 15, n.10, p.721-731, 2017.

DIJKSTRA, J.; OENEMA, O.; GROENIGEN, J. W.; SPEL, J. W.; VAN VUUREN, A. M.; BANNINK, A. Diet effects on urine composition of cattle and N<sub>2</sub>O emissions. **Journal of Animal**, v. 7, p.292-302, 2013.

DUODU, K. G.; TAYLOR, J. R. N.; BELTON, P. S.; HAMAKER, B. R. Factor affecting sorghum protein digestibility. **Journal of Cereal Science**. v. 38, p.117-131, 2003.

DURMIC, Z.; McSWEENEY, C. S.; KEMP, G. W.; HUTTON, P.; WALLACE, R. J.; VERCOE, P. E. Australian plants with potential to inhibit bacteria and processes involved in ruminal biohydrogenation of fatty acids. **Animal Feed Science Technology**, v. 145, n. 1, p. 271-284, 2007.

EPA. Inventory of U.S. Greenhouse Gas Emissions and Sinks: 1990–2015. EPA 430-P-17–001. **Environmental Protection Agency** (EPA), Washington DC, 2017.

FRUTOS, P. et al. Review. Tannins and ruminant nutrition. **Spanish Journal Of Agricultural Research**, [s.l.], v. 2, n. 2, p.191-202, 2004.

GERLACH, K.; PRIES, M.; THOLEN, E.; SCHMITHAUSEN, A. J.; BUSER, W.; SUDEKUM, K. -H. Effect of condensed tannins in ration of lactating dairy cows on production variables and nitrogen use efficiency. **Journal of Animal**, v. 12, p 1847-1855, 2018.

GRAINGER, C.; CLARKE, T.; AULDIST, M. J. et al. Potential use of *Acacia mearnsii* condensed tannins to reduce methane emissions and nitrogen excretion from grazing dairy cows. **Canadian Journal of Animal Science**, v.89, p.241-251, 2009.

GRIFFITHS, V.M.; CLARKA, C.E.F.; CLARK, D.A. et al. Supplementing lactating dairy cows fed high-quality pasture with black wattle (*Acacia mearnsii*) tannin. **Journal of Animal**, v.7, n.11, p.1789–1795, 2013.

GRIINARI, J. M., and D. E. BAUMAN. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. Pages 180–200 in **Advances in Conjugated Linoleic Acid Research**. Vol. 1. Yurawecz, M. P.; Mossoba, M. M.; Kramer, J. K. G.; Pariza, M. W.; Nelson, G. J.; ed. AOCS Press, Champaign, IL, 1999.

HAGERMAN, A. E. Radial diffusion method for determining tannin plant extracts. **Journal of Chemical Ecology**. v. 13, p.437-449, 1987.

HALL, M. B.; HEREJK, C. Differences in yields of microbial crude protein from in vitro fermentation of carbohydrates. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 11, p. 2486-2493, Nov. 2001.

HARTMANN, A.A.; BARNARD, R.L.; MARHAN, S.; NIKLAUS, P.A.; 2013. Effects of drought and N-fertilization on N cycling in two grassland soils. **Oecologia Journal**, v. 171, n. 3, p. 705–717, 2013.

HATCH, D.J.; LOVELL, R.D.; ANTIL, R.S.; JARVIS, S.C.; OWEN, P.M. Nitrogen mineralization and microbial activity in permanent pastures amended with nitrogen fertilizer or dung. **Biology Fertility Soils Journal**, v. 30, p. 288–293, 2000.

HAYNES, R.J.; WILLIAMS, P.H. Nutrient cycling and soil fertility in the grazed pasture ecosystem. **Advances in Agronomy Journal**. V. 49, p. 119–199, 1993.

IBÁ, Indústria Brasileira de Árvores. **Relatório Anual da Indústria Brasileira de Árvores**: Ano base 2016. São Paulo: Studio 113, 2017.

KEMP, P.; LANDER, D. J. Hydrogenation in vitro of  $\alpha$ -linolenic acid to stearic acid by mixed cultures of pure strains of rumen bacteria. **Journal of General Microbiology**. v. 130, p.527–533, 1984

HERREMANS, S.; VANWINDEKENS, D.; DECRUYENAERE, V.; BECKERS, Y.; FROIDMONT, E. Effect of dietary tannins on milk yield and composition, nitrogen partitioning and nitrogen use efficiency of lactating dairy cows: A meta-analysis. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. v. 104, p. 1209-1218, 2020.

JAYANEGARA. A.; LEIBER, F.; KREUZER, M. Meta-analysis of the relationship between dietary dietary tannin level and methane formation in ruminants from in vivo and in vitro experiments. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. v. 96, n. 3, p. 365-375, 2011.

KHIAOSA-ARD, R., S. F. BRYNER, M. R. L. SCHEEDER, H.-R. WETTSTEIN, F. LEIBER, M. KREUZER, and C. R. SOLIVA. 2009. Evidence for the inhibition of the terminal step of ruminal  $\alpha$ -linolenic acid biohydrogenation by condensed tannins. **Journal of Dairy Science**. 92:177–188.

KOZLOSKI, G. V.; HARTEK, C. J.; HENTZ, F.; ÁVILA, S. C.; ORLANDI, T.; STEFANELLO, C. M. Intake, digestibility and nutrients supply to wethers fed ryegrass and intraruminally infused with levels of *Acacia mearnsii* tannin extract. **Journal of Small ruminant Research**. v. 106, p. 125-130, 2012.

KROL, D.J. et al. Improving and disaggregating N<sub>2</sub>O emission factors for ruminant excreta on temperate pasture soils. **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 568, p.327-338, 2016.

KULLING, D. R.; MENZI, H.; KROBER, T. F.; NEFTEL, A.; SUTTER, F.; LISCHER, P.; KREUZER, M. Emissions of ammonia, nitrous oxide and methane from different types of dairy manure during storage as affected by dietary protein content. **Journal of Agriculture Science**, v. 137, p. 235–250, 2001.

KUMAR, R.; SINGH, M. Tannins: their adverse role in ruminant nutrition. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 32, p. 447-453, 1984.

LANDETE, J. M. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: a review about source, metabolism, functions and health. **Food Research International Journal**, v.44, n.5, p.1150-1160, jun. 2011.

LEINMULLER, E.; STEINGASS, H.; MENKE, K. Tannin in ruminant feedstuffs. **Animal Research and Development Journal**, v.33, p.9-62, 1991.

LESO, L.; BARBARI, M.; LOPES, M. A.; DAMASCENO, F. A.; GALAMA, P. Invited review: Compost-bedded pack barns for dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 103, n. 3. p1092-1093, 2020.

LESSA, A. C. R. et al. Bovine urine and dung deposited on Brazilian savannah pastures contribute differently to direct and indirect soil nitrous oxide emissions. **Agriculture, Ecosystems and Environment Journal**, v. 190, p. 104-111, 2014.

LIMA, M. A. de. Agropecuária brasileira e as mudanças climáticas globais: caracterização do problema, oportunidades e desafios. **Caderno de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 19, n. 3, p. 451-472. 2002.

LIMA, P. R.; APDINI, T.; FREIRE, A. S.; SANTANA, A. S.; MOURA, L. M. L.; NASCIMENTO, J. C. S.; RODRIGUES, T. T. S.; DIJKSTRA, J.; GARCEZ NETO, A. F.; QUEIROZ, M. A. Á.; MENEZES, D. R. Dietary supplementation with tannin and soybean oil on intake, digestibility, feeding behavior, ruminal protozoa and methane emission in sheep. **Journal of Animal Feed Science and Technology**, p. 10-17, 2019.

LIU, H. W.; ZHOU, D. W. LI, K. Effects of chestnut tannins on performance and antioxidative status of transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 96, n. 9, p. 5901–5907, 2013

LOBLEY, G. E. 2002. Protein turnover—What does it mean for animal production? Pages 1–15 in Proc. Symp. Amino Acids: Meat, Milk, and More. H. Lapierre and D. R. Ouellet, ed. Quebec, Canada. Canadian. **Society Animal Science**, 2002.

LUO, J. et al. Nitrous oxide emission factors for urine and dung from sheep fed either fresh forage rape (*Brassica napus* L.) or fresh perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). **Journal of Animal**, v. 9, n. 03, p.534-543, 2014.

MACADAM, J. W.; VILLALBA, J. J. Beneficial effects of temperate forage legumes that contain condensed tannins. **Journal of Agriculture**. v. 5, p. 475-491, 2015.

MAGALHÃES, R.T.; GONÇALVES, L.C.; MAURÍCIO, R.M. et al. Avaliação de quatro genótipos de sorgo pela técnica “in vitro” semiautomática de produção de gases. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.5, p.101-111, 2006.

MAKKAR, H. P. S, MLUMMEL, M.; BECKER, K. *In vitro* effects of and interactions between tannins and saponins and fate of tannins in the rumen. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 69, n. 4, p. 481-493, 1995.

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

MAKKAR, H. P. S.; SINGH, B. Effect of storage and urea addition on detannification and in sacco dry matter digestibility of mature oak (*Quercus incana*) leaves. **Journal of Animal Feed Science Technololy**. v. 41, p. 247–259, 1993.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food source and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n.5, p. 727-747, Maio 2004.

MARCELINO, P. D. R. **Parâmetros ruminais de bovinos alimentados com dietas contendo níveis de extrato de acácia negra**. 2017. Dissertação (Mestrado em Produção de Ruminantes) – Universidade Federal da Bahia, Salvador.

McNABB, W.C.; PETERS, J.S.; FOO, L.Y.; WAGHORN, G.C.; JACHSON, F.S. Effect of condensed tannins prepared from several forages on the in vitro precipitation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (Rubisco) protein and its digestion by trypsin (EC 2.4.21.4) and chymotrypsin (EC 2.4.21.1). **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 77, p. 201–212, 1998.

McSWEENEY, C. S.; PALMER, B.; McNEILL, D. M. et al. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v.91, p.83-93, 2001.

MILLEN, D. D.; ARRIGONI, M. D. B.; PACHECO, R. D. L. Rumenology. 1 ed. **São Paulo**: Editora UNESP, 2016. 107-112 p.

MIN, B. R.; PINCHAK, W. E.; HERNANDEZ, K.; HERNANDEZ, C.; HUME, M. E.; VALENCIA, E.; FULFORD, J. D. Effects of plant tannin supplementation on animal responses and in vivo ruminal bacterial populations associated with bloat in heifers grazing wheat forage. **Professional Animal Scientist**. v. 28, p. 464–472, 2012.

MISSIO, A. L.; TISCHER, B.; SANTOS, P. S. B.; CODEVILLA, C.; MENEZES, C. R.; BARIN, J.; HASELEIN, C. R.; LABIDI, J.; GATTO, D. A.; PETUTSCHNIGG, A.; TINDI, G. Analytical characterization of purified mimosa (*Acacia mearnsii*) industrial tannin extract: Single and sequential fractionation. **Separation and Purification Technology**.v. 186, p. 218-225, 2017

MUELLER-HARVEY, I. E.; McALLAN, A. B. Tannins. Their biochemistry and nutritional properties. In: **Advances in plant cell biochemistry and biotechnology**, Vol. 1 (Morrison I.M., ed.). JAI Press Ltd., London (UK), pp. 151-217, 1992.

MUELLER-HARVEY, I. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.86, p.2010–2037, 2006.

MUELLER-HARVEY, I., 1999. Tannins: their nature and biological significance. In: Caygill, J. C., Mueller-Harvey, I. (Eds.), Secondary Plant Products. **Anti-nutritional and Beneficial Actions in Animal Feeding**. Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp. 17–39.

MUIR, J.P. The multi-faceted role of condensed tannins in the goat ecosystem. **Small Ruminant Research**, v. 98, p. 115–120, 2011.

NARJISSE, H.; ELHONSALI, M. A.; OLSEN, J. D. Effects of oak (*Quercus ilex*) tannins on digestion and nitrogen balance in sheep and goats. **Small Ruminant Research**, v. 18, p. 201-206, 1995.

NASCIMENTO, T. V. C., OLIVEIRA, R. L., MENEZES, D. R., LUCENA, A. R. F., QUEIROZ, M. A. Á, LIMA, A. G. V. O., RIBEIRO, R. D. X and BEZERRA, L. R. Effects of condensed tannin-amended cassava silage blend diets on feeding behavior, digestibility, nitrogen balance, milk yield and milk composition in dairy goats. **Journal of Animal Biosciences**, v. 15, p. 1751-7311, 2021.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of dairy cattle. 7. Ed. Whashington: **National Academy of Sciences Journal**, 2001. 381 p.

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

ORLANDI, T. KOSLOSKI, G. V, ALVES, T. P. MESQUITA, F. R. ÁVILA, S. C. Digestibility, ruminal fermentation and duodenal flux of amino acids in steers fed grass forage plus concentrate containing increasing levels of *Acacia mearnsii* tannin extract. **Journal of Animal Feed Science and Technology**, p. 37- 45, 2015.

ORLANDI, T., POZO, C. A., MEZZOMO, M. P and KOZLOSKI, G. V. *Acacia mearnsii* tannin extract as a feed additive: impact on feed intake, digestibility and nitrogen excretion by sheep fed a tropical grass – based diet. **Ciência Rural**, v. 50:9 p. 1-6, 2020.

PATRA, A.K.; SAXENA, J. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: A review of the effects on microbial populations. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.96, n.4, p.363–375, 2009.

PAUL, J. W.; DINN, N. E.; KANNANGARA, T.; FISHER, L. J. Protein content in dairy cattle diets affects ammonia losses and fertilizer nitrogen value. **Journal of Environment. Quality**. v. 27, p. 528–534, 1998.

PENKETT, S. A.; JONES, B. M. R.; BRICE, K. A.; EGGLETLON, E. E. J. The importance of atmospheric ozone and hydrogen peroxide in oxidizing sulfur dioxide in cloud and rainwater. **Atmospheric Environmet Chemistry**, v. 13. p.123-37, 1979.

PHILIPPOT, L. Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes. **Biochimica et Biophysica Acta Gene Structure and Expression**. v. 1577, p. 355–376, 2002.

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

ROTZ, C. A. et al. Feeding strategy, nitrogen cycling, and profitability of dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 12, p. 2841-2855, 1999.

RUBANZA, C. D. K. Polyphenolics and tannins effect on in vitro digestibility of selected *Acacia* species leaves. **Animal Feed Science and Technology**, v. 119, p. 129-142. 2005.

SANT'ANA, A. S.; SILVA, A. P. R.; NSCIMENTO, S. P. O.; MORAES, A. A.; NOGUEIRA, J. F.; BEZERRA, F. C.; COSTA, C. F.; GOUVEIA, J. J. S.; GOUVEIA, G. V.; RODRIGUES, R. T. S.; BONFA, H. C.; MENEZES, D. R. Tannin as a modulator of rumen microbial profile, apparent digestibility and ingestive behavior of lactating goats: A preliminary metagenomic view of goats adaptability to tannin. **Research in Veterinary Science**, v. 145, p. 159-168, 2022.

SANTIAGO, M. C. P. A.; ANJOS, M. R.; JESUS, M. S. C.; SOUZA, M. L. M.; PACHECO, S.; BIZZO, H. R. Analysis and characterization of condensed tannins by liquid chromatography. **Brazilian Journal of Development**. v. 8, p. 61446-61462, 2020.

SATTER, L. D.; SLYTER, L. L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. **British Journal of Nutrition**, v. 32, n. 2, p. 199-208, 1974.

SCHNEIDER, P.R.; FLEIG, F.D.; FINGER, C.A.G. et al. Crescimento da acácia-negra, *Acácia mearnsii* De Wild em diferentes espaçamentos. **Ciência Florestal**, v.10, n.2, p.101–112, 2000.

SCHNEIDER, P.R and TONINI, H. Utilização de variáveis dummy em equações de volume para *Acacia mearnsii* De Wild. **Ciência Florestal**, v.13, n.2, p.121–129, 2003.

SEINFELD, JOHN H.; PANDIS, SPYROS N. Atmospheric chemistry and physics: from air pollution to climate change. 2<sup>nd</sup> ed. **New jersey: Willey Interscience**, 2006.

SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, J.D.; VAN SOEST, P.J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3562-3577, 1992.

SORDI, A. et al. Nitrous oxide emission factors for urine and dung patches in a subtropical Brazilian pastureland. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 190, p. 94–103, 2014.

SOUZA, M. N.; BAYLER, C.; LASSALAS, M.; MICHELON, G. M.; SCHAITZ, L. H., BIASIOLO, R.; CIVIERO, M.; FILHO, H. M. N. R. Effects of ground and *Acacia mearnsii* tannin extract supplementation on nitrogen excretion and nitrous oxide emissions from sheep. **Livestock Science**. v.246, p.10458, 2021.

SPEK, J. W. et al. Prediction of urinary nitrogen and urinary urea nitrogen excretion by lactating dairy cattle in northwestern Europe and North America: A meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 7, p. 4310-4322, 2013.

TAJIMA, K.; AMINOV, R.I.; NAGAMINE, T.; MATSUI, H.; NAKAMURA, M.; BENNO, Y. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. **Applied and Environment Microbiology**. v. 67, p. 2766–2774, 2001.

TAMMINGA, S. Nutrition management of dairy cows as a contribution to pollution control. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 1, p. 345-357, 1992.



TURNER, S.-A.; WAGHORN, G. C.; WOODHARD, S. L.; THOMSON, N. A. Condensed tannins in birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) affect the detailed composition of milk from dairy cows. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v. 65, p. 283–289, 2005.

UNFCCC 2015 **Adoption of the Paris Agreement**.

VAN DER ZAAG, A.C.; WAGNER-RIDDLE, C.; PARK, K. H.; GORDON, J. Methane emissions from stored liquid dairy manure in a cold climate. **Animal Feed Science Technology**, p. 581–589, 2011.

VAN SOEST, P.J., 1994. Nutritional Ecology of the Ruminant, 2nd ed. **Cornell University Press**, Ithaca, NY.

VASTA, V., H. P. S. MAKKAR, M. MELE, and A. PRIOLO. 2008. Ruminal biohydrogenation as affected by tannins *in vitro*. **British Journal of Nutrition**. 102:82–92.

VASTA, V., M. MELE, A. SERRA, M. SCERRA, G. LUCIANO, M. LANZA, and A. PRIOLO. Metabolic fate of fatty acids involved in ruminal biohydrogenation in sheep fed concentrate or herbage with or without tannins. **Journal of Animal Science**. 87:2674–2684, 2009.

VASTA, V.; DAGHIO, M.; CAPPUCCI, A.; BUCCIONI, A.; SERRA, A.; VITI, C.; MELE, M. Invited review: Plant polyphenols and rumen microbiota responsible for fatty acid biohydrogenation, fiber digestion, and methane emission: Experimental evidence and methodological approaches. **Journal of Dairy Science**, v. 102, p. 3781-3804, 2019.

VELDERRAIN-RODRÍGUEZ, G. R. et al. Phenolic compounds: their journey after intake. **Food Function**, v.5, n.2, p.189-197, 2014.

VIRTANEN, A. I. Milk production of cows on protein-free feed. **Science**, v. 153, p. 1603-1614, 1966.

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

WAGHORN, G. C.; SHELTON, I. D.; McNABB, W. C. Effects of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on its nutritive value for sheep. 1. Non-nitrogenous aspects. **Journal of Agricultural Science**, v. 123, p. 99-107, 1994.

WANG, Y.; WAGHORN, G. C.; McNABB, W. C.; BARRY, T. N.; HEDLEY, M. J.; SHELTON, I. D. Effects of condensed tannins in *Lotus corniculatus* upon the digestion of methionine and cysteine in the small intestine of sheep. **Journal of Agricultural Science**, v. 127, p. 413–421, 1996.

WHITE, R. R.; ROMAN-GARCIA, Y.; FIRKINS, J. L.; KONONOFF, P.; VANDEHAAR, M. J.; TRAN, H.; MCGILL, T.; GARNETT, R.; HANIGAN, M. D. Evaluation of the National Research Council (2001) dairy model and derivation of new prediction equations. 2. Rumen degradable and undegradable protein1. **Journal of Dairy Science**. v. 100, p. 1–17, 2017.

WHITEHEAD, D.C., 2000. Nutrient elements in grassland, soil-plant-animal relationships. **Centre for Agriculture and Bioscience International Publishing**.

WHO. Ambient (outdoor) air quality and health. [Geneva], mar. 2014b. (**Media Centre Fact Sheet Sheep**, n.313).Disponível em:<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs313/en/index.html>>; Acesso em: set. 2014.

YÁÑEZ RUIZ, D.R, MOUMEN, A.; MARTIN GARCIA, A. I.; MOLINA ALCAIDE, E. . Ruminant fermentation and degradation patterns, protozoa population, and urinary purine derivatives excretion in goats and weathers fed diets based on two-stage olive cake: effect of PEG supply. **Journal of Animal Science** v. 82, p. 2023-2032, 2004.

ZAMAN, M.; DI, H.J.; CAMERON, K.C. A field study of gross rates of N mineralization and nitrification and their relationships to microbial biomass and enzyme activities in soils treated with dairy effluent and ammonium fertilizer. **Soil Use Manage**. V. 15,p. 188–194, 1999a.

ZAMAN, M.; DI, H.J.; CAMERON, K.C.; FRAMPTON, C.M. Gross nitrogen mineralization and nitrification rates and their relationships to enzyme activities and the soil microbial biomass in soils treated with dairy shed effluent and ammonium fertilizer at different water potentials. **Biology and Fertility of Soils**, v.29, p. 178–186, 1999b.

ZUCKER, W. V. Tannins: does structure determine function? An ecological perspective. **The American Naturalist**, v. 121, p. 335-365, 1983.

**CAPITULO 2 – ARTIGO**

**Supplementation of low dosages of *Acacia mearnsii* tannin extract to dairy cows**

## INTERPRETIVE SUMMARY

**Supplementation of low dosages of *Acacia mearnsii* tannin extract to dairy cows.** By Oliveira *et al.* *Acacia mearnsii* tannin extract at 0, 0.14, 0.29, or 0.43% of diet dry matter had no effect on dry matter intake and lactation performance and tended to reduce milk and plasma urea-N concentrations and urinary N loss in dairy cows. The tannin extract reduced rumen microbial yield and did not affect the total tract digestibility of nutrients. The decrease in rumen microbial yield may have offset the gain in absorbable dietary protein supply, and lactation performance did not differ.

## RUNNING HEAD

### TANNINS FOR DAIRY COWS

#### **Supplementation of low dosages of *Acacia mearnsii* tannin extract to dairy cows**

L. N. Oliveira<sup>1</sup>, R. B. Silva<sup>2</sup>, C. D. S. Oliveira<sup>1</sup>, C. C. Oliveira<sup>1</sup>, M. A. N. Pereira<sup>2</sup>, R. A. N. Pereira<sup>3</sup>, M. A. C. Danés<sup>1</sup>, T. J. DeVries<sup>4</sup>, and M. N. Pereira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG 37200-900, Brazil

<sup>2</sup>Better Nature Research Center, Lavras, MG 37203-016, Brazil

<sup>3</sup>Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Lavras, MG 37200-970, Brazil

<sup>4</sup>University of Guelph, Guelph, ON N1G 2W1, Canada

\*Corresponding author: M. N. Pereira. Universidade Federal de Lavras, Departamento de Zootecnia, Lavras, MG, 37200-900, Brazil. E-mail: mpereira@ufla.br

## ABSTRACT

The supplementation of dairy cows with tannins can reduce the ruminal degradation of dietary protein and can have beneficial effect on urinary N excretion, but high dosages can penalize rumen function, diet digestibility, feed intake, and milk yield. This study evaluated the effect of low dosages (0, 0.14, 0.29, or 0.43% of DM) of condensed tannin extract from the bark of *Acacia mearnsii* (**TA**) on milking performance, dry matter intake (**DMI**), digestibility, chewing and sorting behaviors, rumen fermentation, and N partition of dairy cows. 20 Holstein cows ( $34.7 \pm 4.8$  kg/d,  $590 \pm 89$  kg, and  $78 \pm 33$  d in lactation) were individually fed a sequence of 4 treatments in 5, 4x4 Latin squares (21-d periods). TA replaced citrus pulp in the total mixed ration and other feed ingredients were kept constant. Diets had 17.1% crude protein, mostly from soybean meal and alfalfa haylage. The statistical model had the effects of cow, period, and treatment. Linear, quadratic, and cubic contrasts of TA level were evaluated. Significance was declared at  $P \leq 0.05$  and tendency at  $P \leq 0.10$ . TA had no effect on DMI (21.8 kg/d), milk yield (33.1 kg/d), and milk components. The proportion in milk fat of Mixed origin fatty acids (**FA**) was linearly reduced, De Novo FA was increased, and the daily secretion of unsaturated FA was increased by TA. Cows fed TA had linear increase in the molar proportion of butyrate and reduction in propionate in rumen fluid, while acetate did not differ. There was a tendency for the A/P ratio to be linearly increased by TA. Cows fed TA had linear reduction in rumen microbial yield, estimated by the concentrations of allantoin and creatinine in urine, and total protozoa concentration did not differ. The total tract apparent digestibility of neutral detergent fiber, starch, and crude protein did not differ. There was no major effect of TA on chewing behavior, although TA induced a linear increase in meal size and length of the first daily meal and reduced meal frequency per d. Rumination behavior did not differ. Cows fed 0.43% TA refused feed particles > 19 mm in the morning. There were tendencies for linear decreases in MUN (16.1 to 17.3 mg/dL), urine-N (150 to 166 g/d and 29.8 to 32.9% of N intake), and plasma urea-N (**PUN**) at 6, 18, and 21

h post-morning feeding, and PUN 12 h post-feeding was reduced by TA. The proportion of N intake in milk (27.1%) and feces (25.2%) did not differ. Reductions in urine-N, MUN, and PUN suggest that TA reduced ruminal AA deamination, but the decrease in rumen microbial yield may have offset the gain in absorbable dietary protein supply, and lactation performance did not differ. Overall, TA up to 0.43% of DM did not affect DMI and lactation and there was a tendency to reduce urine-N excretion.

**Key words:** chewing behavior, condensed tannin, milk fatty acids, nitrogen balance, rumen microbial yield, digestibility

## INTRODUCTION

Tannins are a diverse group of polyphenolic compounds capable of forming complexes with protein and other macromolecules (Bravo, 1998). Tannins can interfere in food palatability due to astringency (Griffiths, 2013), can limit protein and carbohydrate digestion in the rumen (Carulla et al., 2005) and intestines (Duodu et al., 2003), can affect the ruminal biohydrogenation of lipids (Khiaosa-Ard et al., 2009), microbial growth (Ahnert et al., 2015), and microbial diversity (Vasta et al., 2019), and have the potential to reduce methane excretion by ruminants (Jayanegara et al., 2012). Tannins can also reduce bloat potential in grazing cattle (Min et al., 2012) and gastrointestinal parasitic infestation (Mueller-Harvey, 2006) and has been shown to increase antioxidant enzyme activities in plasma and liver (Liu et al., 2013). Tannins are capable of binding protein and the possibility of reducing the ruminal degradation of dietary protein (to increase RUP supply) and urinary N loss has created interest on tannin supplementation for dairy cows (Aguerre et al., 2016, 2020). However, tannins can reduce rumen microbial yield and the absorption of AA by the animal may not increase, even with increased proportion of dietary CP as RUP (Wang et al., 1996; MacAdam and Villalba, 2015). Tannins can also decrease NDF digestibility (Reed, 1995). Extensive

reviews have evaluated the effect of tannins on rumen fermentation, diet digestibility, feed intake, and performance of ruminants (Makkar, 2003; Frutos et al., 2004; Mueller-Harvey, 2006; Herremans et al., 2020). The animal response to tannin supplementation is dependent on type of product and dosage (Aboagye et al., 2018).

Tannins are classified in condensed (**CT**) or hydrolysable (**HT**) based on their capacity to resist hydrolysis under mild acid or alkaline conditions into sugars and phenolic carboxylic acids (Van Soest, 1994). CT is considered to have higher binding capacity to protein than HT and is not degraded in the rumen (Makkar et al., 1995). *Acacia mearnsii* (Black wattle), originally from Australia, has been cultivated in the south of Brazil as a source of wood and tannin extract from the bark, for a variety of commercial applications (Tanac, Montenegro, Brazil). The tannin extract of *Acacia mearnsii* (**TA**) is a source of CT (Ahmed et al., 2005).

Various experiments have evaluated dosages of TA in the diet of ruminants. Carulla et al. (2005) fed TA at 2.5% of diet DM to sheep and observed reductions in urinary N and methane excretions, associated with reductions in forage intake, NDF digestibility, acetate to propionate ratio in rumen fluid, and rumen microbial yield and increased fecal energy loss. Avila et al. (2015) observed that when 1.5% TA in diet DM was fed to steers in metabolic cages there were reductions in the total tract digestibility of NDF and digestible organic matter (**OM**) intake (**DOMI**), a shift of dietary N loss from urine to feces, and increased duodenal flow of non-ammonia non-microbial N and AA, with no effect on microbial N flow. Grainger et al. (2009) observed that TA at 0.9% and 1.5% of estimated DMI partitioned N away from urine towards feces and reduced methane excretion of dairy cows grazing ryegrass, but also reduced DMI, digestibility of energy and CP, and milk yield. Griffiths (2013) observed that milk yield was reduced when TA was drenched daily to grazing dairy cows at approximately 0.6 to 2.9% of diet DM. Orlandi et al. (2015) fed TA at 0, 0.9, 1.8, and 2.7% of diet DM to steers and observed a reduction of N in urine and an increase in fecal N, reduced rumen

microbial yield and NDF digestibility, and increased duodenal flow of feed true protein with increase in dosage. Conversely, Orlandi et al. (2020) observed that TA at 0.38% of DM did not affect DMI, NDF digestibility, rumen microbial yield, and N partitioning in sheep. Alves et al. (2017) observed a reduction in methane excretion when TA was fed at 0.7% of diet DM to grazing dairy cows, with no effect on milk yield and DMI.

The effect of graded dosages of a supplemental tannin extract from quebracho and chestnut containing CT and HT on lactation performance and N partition of high producing dairy cows was evaluated in 2 experiments (Aguerre et al., 2016, 2020). Aguerre et al. (2016) observed linear reductions in DMI and milk protein yield and concentration and a tendency for reduced solids corrected milk yield of dairy cows fed 0, 0.45, 0.90, or 1.80% of DM of tannin extract, independently of diet CP concentration. Tannins linearly reduced urea-N in milk and plasma, rumen  $\text{NH}_3$  and branched-chain fatty acids concentration, and the total tract digestibility of CP and NDF, and had no effect on rumen VFA profile. The tannin extract evaluated induced a linear increase in fecal N excretion (214 to 256 g/d), a reduction in urine N (213 vs 177 g/d), and did not affect milk-N (175 g/d) or the efficiency of N utilization (29.7% of N intake in milk). The authors suggested that the optimum concentration of tannin extract was 0.45% of DM based on the reduction in milk protein concentration and yield, DMI, and digestibility at higher concentrations of tannin extract in the diet. Aguerre et al. (2020) fed lactating dairy cows for 13 weeks with the same tannin extract (0, 0.45, and 1.8% of DM). They observed no effect on milk yield and reductions in milk and plasma urea-N. The highest milk true protein concentration was observed with 0.45% tannin product in the diet. It seems that the upper limit for tannin extract supplementation to dairy cows, without detrimental effects on rumen function, digestibility, DMI, and lactation, is around 0.5% of diet DM. There are no experiments evaluating graded low dosages of TA to lactating dairy cows.



The objective of this study was to evaluate the effect of 0, 0.15, 0.30, and 0.45% of TA in diet DM on milking performance, DMI, total tract digestibility, rumen fermentation, chewing behavior, and N partition of dairy cows. Dosages were chosen to represent daily amounts of TA reasonably allocable to cows in feed mixes formulated to supply feed additives at low inclusion in the diet and assuming that a maximum TA dosage of 0.5% of DM would be close to optimum. Our hypothesis was that TA supplementation up to 0.45% of DM would increase milk protein secretion and would reduce urinary N loss.

## **MATERIALS AND METHODS**

Experimental procedures were approved by The University of Lavras Bioethics Committee in Utilization of Animals: Protocol 033/20.

### ***Cows and treatments***

The experiment was conducted from July to October, 2020 in an open-walled, sand-bedded tie-stall barn. 20 Holstein cows ( $34.7 \pm 4.8$  kg/d,  $590 \pm 89$  kg, and  $78 \pm 33$  DIM), 8 primiparous and 12 multiparous [ $2.40 \pm 1.14$  parity (2 - 7)], were assigned to the experiment. Cows were milked 3 x/d starting at 0500, 1300, and 1900 h in an adjacent herringbone parlor. Cows formed 5, 4x4 Latin squares primarily by parity (1 vs. > 1) and then milk yield and DIM. A sequence of 4 treatments, balanced for carry-over effect, was assigned to each cow for 21-d periods (15-d adaptation). Treatments were: 0, 0.15, 0.30, or 0.45% of TMR DM of TA (Tanafeed. Tanac, Montenegro, Brazil).

TA replaced citrus pulp in the TMR while other feed ingredients were kept constant (Table 1). The TMR for each treatment was mixed once per d in a 1.2 m<sup>3</sup> stationary vertical mixer (Unimix 1200, Casale, São Carlos, Brazil) after weighting each feed with a precision scale (MOD B-520. Líder Balanças, Araçatuba, Brazil) and cows were fed at 0700 h. Feed was pushed-up manually with a broom at least 10 x/d. TA was mixed with SBM before addition to the mixer to improve homogenization to the TMR. The TMR offered and orts per

cow were measured daily (MOD B-520. Líder Balanças, Araçatuba, Brazil). Feed was offered to each cow to allow for 10 to 15% of offered as daily refusal and was increased to be around 15% orts during the evaluation of particle size sorting behavior. Samples of whole plant corn silage, ensiled corn grain, and alfalfa haylage were collected weekly for DM determination with a microwave oven (by drying for 5 min and then in 3 min steps until a stable weight was obtained) and the TMR was adjusted accordingly. Individual feeds, each TMR, and orts per cow were sampled daily and formed weekly composites during the 3<sup>rd</sup> week of each experimental period. The composition of a treatment in ingredients was the total intake of an ingredient DM (orts assumed to have the same ingredient composition of the offered TMR on a DM basis) divided by total DMI. The composition of a treatment in nutrients was the total intake of a nutrient (TMR offered – orts per cow) divided by total DMI.

### ***Feed analysis***

Composite samples per period of feed ingredients, orts per cow, and TMR per treatment were dried in a forced-air oven at 55°C for 72 h and ground to pass a 1-mm diameter mesh screen (Wiley mill. Thomas Scientific, Swedesboro, NJ). The DM concentration was determined at 105°C for 24 h and ash was at 550°C for 8 h. Samples were sent to a commercial laboratory (3rLab/Rock River Laboratories, Lavras, Brazil) for determination of CP with a Kjeldhal steamer distillator (AOAC International, 2002), NDF by filter bag technique with heat-stable  $\alpha$ -amylase (ANKOM Technology, Macedon, USA. Schlau et al., 2021), ether extract (AOAC International, 1990), and starch with  $\alpha$ -amylase and amyloglucosidase and colorimetry for glucose as described in Fernandes et al. (2022), adapted from Hall (2015). Data from feed analyses were used to calculate the concentrations of NFC (100 - CP - NDF - ether extract - ash) and non-starch NFC (**NSNFC**).

### ***Performance***

The mean milk yield and DMI of d 16 to 21 were used to compare treatments. An aliquot of the yield of each milking was collected and composited per cow per day in

proportion to the yield of each milking. Composite milk sample were stored under refrigeration in flasks containing 2-bromo-2-nitropropane-1-3-diol preservative and manually agitated daily until shipping to a commercial laboratory. Milk components (crude protein, casein, lactose, fat, and TS), MUN, SCC, and milk fatty acids were measured by mid-infrared analysis (Nexgen FTS/FCM. Bentley Instruments Inc., Chaska, USA) at the Laboratory of the Paraná State Holstein Breeders Association (APCBRH, Curitiba, Brazil). Milk energy secretion (Mcal/d) was calculated (NRC, 2001):  $[(0.0929 \times \% \text{ fat}) + (0.0547 \times \% \text{ protein}) + (0.0395 \times \% \text{ lactose})] \times \text{kg of milk}$ . ECM (kg/d) was calculated as: Milk energy secretion/0.70 (assumes 0.70 Mcal/kg of milk with 3.7% fat, 3.2% protein, and 4.6% lactose, representative of Brazilian Holsteins). The feed efficiencies were calculated as milk yield/DMI and ECM/DMI. BW was measured on d 16 to 20 immediately after the morning and afternoon milking with an individual walk-over weigh scale (Eziweigh2. Tru-Test Brasil, Porto Alegre, Brazil) and a mean value was generated per cow per period. BCS was assessed on a 1 to 5 scale (Wildman et al., 1982) on d 21 and was the mean of 3 independent evaluators.

### ***Rumen fermentation***

On d 21, samples of ruminal fluid were obtained with a flexible oro-gastric tube, with the goal of having minimum saliva contamination. Samples were obtained at  $10.6 \pm 0.12$  h after the morning feeding (0700 h), at random within square. Samples of ruminal fluid were frozen in liquid nitrogen and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ , and then centrifuged at  $4^{\circ}\text{C}$  at  $8,855 \times g$  for 15 min. The supernatant was analyzed for VFA by gas-liquid chromatography (CP 3800 Gas Chromatography Varian. Varian Chromatography Systems, Palo Alto, USA), with a capillary column [CP-Wax 58 (FFAP) CB. Varian Analytical Instruments, Palo Alto, USA]. A rumen sample was mixed to a 36% formaldehyde solution for total protozoa counting. Samples were stained according to Dehority (1984) and total protozoa was enumerated with an optical microscope in a Neubauer chamber (Warner, 1962).

### ***Digestibility***

The total tract apparent digestibility of OM, NDF, starch, and CP was estimated by fecal sampling on d 16 to 20 of each experimental period. Spot samples obtained around 0800, 1300, and 1800 h were frozen and formed period composites on a fresh basis. Fecal DM and nutrient concentration was determined as already described for feeds and orts. Acid insoluble ash (Van Keulen and Young, 1977) in the consumed TMR and in orts and feces per cow were used to estimate the daily fecal DM excretion based on intake of internal marker divided by fecal marker concentration. Digestible OM (DOMI), NDF, starch, and CP intakes (kg/d) were calculated. Fecal samples were evaluated for viscosity and pH (Phmetro Digimed DM 20. Digicrom Analítica, São Paulo, Brazil). Fecal viscosity was evaluated according to an adaptation of the methodology of Cannon et al. (2010). Samples of 100 g of fresh feces were diluted in 120 mL of water. The solution was homogenized with a metal spatula for 30 s and filtered through 2 layers of cheesecloth. The viscosity of the solution was measured with a rotational viscometer (Model DV-E. Brookfield Engineering Laboratories, Middleboro, MA) at 100 rpm, with spindle LV-1, and temperature of 24°C.

### ***Microbial yield***

Rumen microbial yield was estimated with urine spot samples obtained simultaneously to fecal sampling by vulvar stimulation (d 16 to 20; 0800, 1300, and 1800 h). For the evaluation of allantoin (**Alla**) concentration in urine, spot samples (120 mL/d) were diluted with 20% sulfuric acid (5 mL) throughout the sampling procedure and were immediately refrigerated at 4°C. At the end of each sampling day, a 4% sulfuric acid solution was added to the urine samples (5 mL urine and 20 mL acid) and frozen at -20°C. Alla was analyzed as in Young and Conway (1942). Creatinine (**Crea**) was analyzed in urine samples refrigerated during sampling and frozen at the end of each day with a laboratory kit (Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios Ltda, Goiânia, Brazil). The relative rumen microbial yield was estimated by the Alla to Crea ratio multiplied by BW or  $BW^{0.75}$  measured 2 x/d during d

16 to 20 (Chen et al., 1995). The ratio between the relative rumen microbial yield and DOMI estimated the efficiency of microbial synthesis.

### ***Chewing and sorting***

During d 17 to 19 of each treatment period, rumination and eating behaviors were monitored by visual observation at 5-min intervals continuously for 24 hours each day as in Pereira et al. (1999). Buccal activities were: rumination, eating, drinking, and idleness. Eating, rumination, and chewing (eating + rumination) were calculated (min/d and min/kg DMI).

Individual feeding observations were combined and separated into meals using a meal criterion (i.e., the minimum duration of time between meals) calculated for each cow. Meal criteria were calculated for each cow using methods described by DeVries et al. (2003); in summary, a software package (MIX 3.1.3; MacDonald and Green, 1988) was used to fit normal distributions to the frequency of  $\log_{10}$ -transformed intervals of time between recorded eating observations. If the interval of time between 2 recorded observations of eating exceeded the determined meal criterion, this was classified as a different meal. The number of different meals in a day was termed meal frequency (meals/d). Total meal time (min/d) was the total eating time (eating observations/d  $\times$  5 min), plus all the non-feeding intervals shorter than the length of the meal criterion of each cow. Meal duration (min/meal) was calculated as the total daily meal time divided by the meal frequency. Finally, meal size was the ratio between daily DMI (kg/d) and meals/d. The duration and time post-feeding of the longest daily meal was calculated. The duration of the first daily meal was measured with a stopwatch. Five evaluators observed the behavior of all cows, individually, after offering feed at 0700 h until the last cow finished its first meal.

Particle size sorting behavior in periods of the day was evaluated on d 17 to 19 of each treatment period with the Penn State particle separator with the 19- and 8-mm diameter screens and pan (Lammers et al., 1996). The particle distribution and weigh of the offered

TMR and availableorts of each cow was measured at 0700 (at feeding), 1200, 1900, and 0500 h (during morning milking). The predicted intake (as-fed basis) of particles on each screen was: % TMR retained on screen  $\times$  kg of TMR consumed. The observed intake of particles was: % TMR retained on screen  $\times$  kg of TMR offered - % orts retained on screen  $\times$  kg of orts. The selection index (Leonardi and Armentano, 2003) was:  $100 \times$  (observed intake/predicted intake). Sorting values below 100% represent selective refusal, above 100% represent preferential intake, and equal to 100% represent no selection. A mean value was generated per cow per period. The proportion of daily DMI in the morning (0700 to 1200 h), afternoon (1200 to 1900 h), and night (1900 to 0700 h) were determined.

### ***Plasma urea-N***

Blood samples were collected from the coccygeal vessels immediately before the start of the first daily meal before the morning milking (0700) and at 1.5, 3, 6, 12, 18, and 21 h after first meal on d 18 of each treatment period. Samples were collected in tubes with EDTA and were centrifuged at  $2,000 \times g$  for 10 min at room temperature. Plasma was obtained and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  for urea-N determination (**PUN**) with a commercial kit (Urea-UV, Doles Reagents for Laboratory Ltda, Goiânia, Brazil).

### ***N partition***

Excretions of N in urine and feces were measured with creatinine and acid insoluble ash as markers, respectively. Urine and feces were spot sampled on d 16 to 20, as previously described. Creatinine was analyzed as previously described for the estimation of rumen microbial yield. For the evaluation of total N content of urine, spot samples (120 mL/d) were diluted with 20% sulfuric acid (5 mL) throughout the sampling procedure and were immediately refrigerated at  $4^{\circ}\text{C}$  (same procedure described for Alla). At the end of the each day, the pH of the sample was adjusted to  $< 3$  ( $2.40 \pm 0.45$ ) with drops of 95% sulfuric acid (Êxodo Científica, Sumaré, Brazil) and samples were frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The endogenous purine excretion was 0.23805 mmol/kg BW, the mean value of Valadares et al. (1999), Lee

et al. (2019), Chizzotti et al. (2008), and Pereira et al. (2021). Fecal sampling and the estimation of fecal excretion were as previously described for digestibility. Fecal and urine N concentrations were determined with a Kjeldhal steamer distillator (AOAC International, 2002). The N concentration in milk was: Milk CP/6.38 (Ipharraguerre and Clark, 2005). The proportion of N intake (% of daily intake) and excretion (g/d) of urine-N, milk-N, and fecal-N were calculated.

### **Statistical Analysis**

Data were analyzed with Proc Mixed of SAS. The Latin square model had the random effect of cow (1 to 20) and the fixed effects of period (1 to 4) and of treatment (0, 0.15, 0.30, 0.45% DM TA). The measured dosages of TA concentrations in the diet were slightly different from the planned, and were used to report results (0, 0.14, 0.29, 0.43% DM TA). Preplanned contrasts were: Linear (-3 -1 1 3), quadratic (1 -1 -1 1), and cubic (-1 3 -3 1) of TA concentration in the diet. Degrees of freedom were calculated with the Kenward-Roger option. Significance was declared at  $P \leq 0.05$  and tendency at  $0.05 < P \leq 0.10$ .

## **RESULTS**

### **Diets**

The experimental diets (Table 1) had similar concentrations in DM of ingredients and nutrients. CP was around 17.1% of DM, mostly from soybean meal and alfalfa haylage. Starch was 29.8% of DM, mostly from silages of whole plant corn and rehydrated corn grain. TA replaced citrus pulp in the diet, citrus pulp ranged from 6.0 to 6.4% of diet DM. The actual concentration of TA in the consumed diets were: 0.14, 0.29, and 0.43% of DM.

### **Intake, performance and milk fatty acids**

Intake and milking performance are in Table 2. There was no effect of treatment ( $P \geq 0.14$ ) on variables related to milk components content or daily secretion, SCC, feed efficiency, or body size. DMI was not affected by TA concentration in the diet ( $P \geq 0.41$ ). Differences were detected on the secretion (g/d) of milk fatty acid (**FA**) (Table3). More TA in the diet

induced linear increase in the secretion of unsaturated (204 vs. 193 g/d,  $P = 0.02$ ) and oleic (146 vs. 137 g/d,  $P = 0.01$ ) and there was a tendency for linear increase in monounsaturated secretion (203 vs. 195 g/d,  $P = 0.06$ ). Milk FA profile (g/100 g FA) was also affected by TA concentration. Cows fed more TA had linear reduction in the concentration of Mixed FA (39.51 vs. 40.17 g/100 g FA) and had increased concentration of short-chain De Novo FA (22.20 vs. 21.57 g/100 g FA) in milk fat. The concentration of palmitic was linearly reduced (44.64 vs. 46.00 g/100 g FA,  $P = 0.05$ ) and unsaturated tended to be increased (18.26 vs. 17.24 g/100 g FA,  $P = 0.07$ ) by TA. There were tendencies ( $P = 0.08$ ) of quadratic changes in the proportions of oleic and stearic in milk fat in response to TA.

#### ***Rumen fermentation, microbial yield and digestibility***

TA affected rumen fermentation profile and microbial yield (Table 4). The increase in diet TA concentration induced a linear reduction in ruminal propionate proportion (23.4 vs. 25.2% of VFA,  $P = 0.02$ ) and a linear increase in butyrate proportion (11.7 vs. 10.8% of VFA,  $P = 0.03$ ). Acetate proportion did not differ (59.9% of VFA,  $P \geq 0.23$ ). There was a tendency for TA to induce a linear increase in the acetate to propionate ratio in rumen fluid (2.63 vs. 2.44,  $P = 0.09$ ). Rumen total protozoa concentration did not differ ( $P \geq 0.26$ ). The variables describing rumen microbial yield and efficiency, based on allantoin and creatinine concentrations in urine, were all linearly reduced by the increase of TA in diet ( $P \leq 0.04$ ), but the total tract digestibility of nutrients did not differ ( $P \geq 0.25$ ). The TA had no effect on DOMI and on the intakes of digestible NDF, starch, and CP ( $P \geq 0.22$ ). Fecal pH (7.57) and viscosity did not differ ( $P \geq 0.11$ ). The daily excretion of urine (26.8 L/d) and urine pH (8.51) were not affected by TA concentration in the diet ( $P \geq 0.17$ ).

#### ***Chewing and sorting***

TA had minor effect on chewing behavior (Table 5). There was a tendency for a quadratic effect of TA on eating time (316 min/d as highest on 0.43% and 302 min/d as lowest on 0.29%,  $P = 0.09$ ) and no other effect of TA on variables describing eating and rumination



behaviors was detected ( $P \geq 0.14$ ). TA induced a linear reduction in meal frequency (8.8 vs. 9.7 meals/d,  $P = 0.01$ ) and linearly increased meal size (2.5 vs. 2.2 kg DM/meal,  $P = 0.02$ ). There was a quadratic increase in meal duration induced by TA (38.8 vs. 35.0 min/meal,  $P = 0.04$ ). Cows fed TA had a linear increase in first meal duration (65.6 vs. 58.5 min/meal,  $P = 0.04$ ). Cubic effects of TA concentration in the diet were detected for particle size sorting behavior in the morning and night ( $P \leq 0.10$ ). TA at 0.43% of DM apparently induced rejection of long (> 19 mm) feed particles in the morning, while cows in the other treatments selected in favor of long particles ( $P < 0.01$ ). 0.43% also tended to induce selection in favor of particles retained on the 8 mm screen, while cows fed the other treatments rejected the 8 mm screen ( $P = 0.06$ ). The selection indexes of particles over the 24 h period (0700 to 0700 h) were all close to 100% (no selection).

#### ***Urea-N in milk and plasma and N partition***

Variables describing urea-N in milk and plasma and N partition are in Table 6. There was a tendency for a linear reduction in MUN with more TA in the diet (16.08 vs. 17.32 mg/dL,  $P = 0.10$ ). Cows fed increased levels of TA had linear reduction in PUN 12 h post-feeding (17.5 vs. 19.6 mg/dL,  $P = 0.01$ ) and there were tendencies of reduced PUN also at 6, 18, and 21 h post-feeding. There was a tendency for the excretion of N in urine to be linearly reduced by TA (150 vs. 166 g/d,  $P = 0.10$ ), as well as urine-N as a proportion of N intake (29.8 vs. 32.9% of daily intake,  $P = 0.10$ ). The excretion of N in feces and in milk were not affected by TA ( $P \geq 0.35$ ). The efficiency of N excretion in milk was 27.1% of daily intake and fecal N was 25.2% of daily intake.

## **DISCUSSION**

Low dosages of TA apparently reduced urine-N loss and had no effect on DMI and milking performance. There was a tendency for the excretion of urine-N to be reduced in approximately 10% of the highest value (166 g/d) with 0.43% TA in diet (150 g/d). The reduction in estimated urinary N excretion when a mixture of CT and HT was fed at 0 or 1.8

% of diet DM was 11% (Aguerre et al., 2020) and the meta-analysis of Herremans et al. (2020) predicted an average reduction of 11% in urine-N in dairy cows supplemented with various sources of tannin. Tannins, in general, are known to reduce ruminal deamination of AA and urinary N loss (Frutus et al., 2009; Makkar, 2003). This is a plausible explanation for the lowered MUN and PUN observed with more TA in the diet. However, the ruminal degradation of carbohydrates could also affect MUN, PUN, and urine-N (reference), independently of ruminal CP degradation. The similarities in the composition of the experimental diets (difference in 0.4% of DM, citrus pulp vs. TA), DMI, and starch and NDF digestibility are suggestive that lowered ruminal protein degradation with TA reduced urine-N loss, instead of potential differences in carbohydrate digestion induced by TA (Reed, 1995). The intakes of digestible starch, NDF, and energy (DOMI) did not differ. The total tract digestibility of CP was not affected by TA, suggesting that the reduction in rumen protein degradation did not induce the formation of indigestible protein in the lower digestive tract (Mueller-Harvey, 2006). The similarity in fecal pH also suggests that TA did not determine the proportion of carbohydrate fermentation in the lower digestive tract.

The negative environmental impact of urine-N was reduced with TA supplementation in this experiment, urine-N is considered to be more detrimental to the environment than fecal-N (Lessa et al., 2014). The capacity of TA to reduce urinary N loss in ruminants had been shown, although at dosages that also reduced intake, digestibility, and animal performance (Carulla et al., 2005; Grainger et al., 2009). Tannins excreted in feces can have beneficial effect on manure N emissions (Sliwinski et al., 2004, Powell et al, 2011), leading to additional environmental advantage. However, potential economic returns to TA supplementation driven by milking performance and feed efficiency was not detected in this experiment, similarly to the meta-analysis of Herremans et al. (2020).

The TA concentrations in diet resulted in mean intakes of 30.2, 63.5, and 94.6 g/d of TA on treatments 0.14, 0.29, and 0.43, respectively. TA up to 95 g/d had no effect on total tract diet digestibility, DMI, and lactation performance in this experiment. The reduction in rumen microbial yield is a plausible explanation for the lack of positive response in cow performance, even with greater RUP supply with TA (Wang et al., 1996; MacAdam and Villalba, 2015). A limitation in N availability for rumen microbial growth induced by TA does not seem to be a plausible explanation for the lowered microbial yield with TA. Diet CP content was apparently excessive (17% of DM), inducing high concentrations of MUN (16.7 mg/dL) and PUN (17.5 - 25.6 mg/dL) in all treatments. The estimated RDP balance of the experimental diet was + 263 g/d based on the dairy NRC (2001) model. The negative effect of TA on microbial yield was apparently directly mediated and acted on a diet of excessive N supply. TA can affect rumen microbial diversity (Sant'ana et al, 2022) and is known to inhibit rumen microbial yield at high dosage in the diet (Carulla et al., 2005; Orlandi et al., 2015). Curiously, although rumen microbial yield was negatively affected by low dosages of TA in this experiment, diet digestibility was not penalized by the reduction in microbial yield. There was no difference in total protozoa concentration, suggesting that the reduction in microbial yield was driven by action on rumen bacteria. TA can change rumen microbiome (Sant'ana et al., 2022).

Although the changes induced by TA on milk FA secretion and profile were apparently of low biological significance, they support the concept that TA can affect the ruminal biohydrogenation of unsaturated FA, even at low dosages in the diet. The supplementation of tannin to improve the nutraceutical properties of dairy products through manipulation of milk fat composition has been extensively investigated (Purba et al., 2020). Our data suggest that TA increased the secretion (g/d) of unsaturated FA in milk, suggestive of a reduction in ruminal biohydrogenation of FA. CT is able to depress the biohydrogenation of unsaturated fatty acids by changes in rumen microbiome composition (Vasta et al., 2019). Cows fed more

TA in the diet also had increased proportion of short-chain De Novo FA and decreased proportion of Mixed FA, at the same milk fat concentration and yield. Pasture rich in CT reduced the proportion of preformed and increased the proportion of De Novo FA in milk fat of grazing dairy cows (Turner et al., 2005). The changes in milk FA profile are not easily predictable and the impact on milk quality may be minor, but they suggest that low dosages of TA could affect rumen function.

Rumen fermentation profile was affected by TA supplementation at low dosages. Cows fed increasing concentrations of TA in the diet had increased proportion of butyrate, lowered proportion of propionate, and similar proportion of acetate in total VFA. A tendency was observed for a linear increase in the acetate to propionate ratio in rumen fluid with more TA in the diet. This change in rumen fermentation profile does not support a reduction in methane emission in response to TA. The effect of tannins on methane excretion is variable and is not highly correlated with the acetate to propionate ratio (Jayanegara et al., 2012), although tannins can have direct inhibitory effect on methanogens (Scalbert, 1991; Tavendale et al., 2005). Based on the meta-analysis of Jayanegara et al. (2012), more consistent reductions in methane excretion in response to tannin is observed at high dosages (> 2% of DM). TA reduced DMI and methane excretion in sheep at 2.5% of DM (Carulla et al., 2005) and in grazing dairy cows at up to 1.5% of DM (Grainger et al., 2009), associated to extreme depressions in DMI and milking performance. At the low dosages evaluated in our study, TA apparently had a direct effect on rumen fermentation, in addition to the reduction in rumen microbial yield.

Effects of TA were detected on chewing behavior. The effect of tannin on chewing behavior may be driven by the capacity of tannin to bind protein in saliva, leading to astringency (Mueller-Harvey, 2010). Cows fed more TA in the diet had long first meal and less frequent and bigger meals. Although there were effects of TA on meal behavior and

particle size selection in our experiment, daily DMI was not affected by TA. There was no evidence that diet palatability was a major issue within the TA concentrations supplemented. Rumination behavior did not differ, coherent with the absence of an effect of TA on NDF digestibility. The selection indexes of particles over the 24 h period (0700 to 0700 h) were all close to 100%, suggesting that particle size selectivity was not of large magnitude in this experiment.

There are reports of reduced urine excretion when high dosages of TA were fed to sheep (Carulla et al., 2005) and cows (Grainger et al., 2009). Reduced urine excretion is usually attributed to tannin as a result of reduced water intake. Urine excretion was not affected by TA in our experiment, suggesting that dosages were adequate for lactating dairy cows.

The ratio of urine-N to fecal-N was 1.24 on 0% TA, 1.33 on 0.14% TA, 1.29 on 0.29% TA, and 1.14 on 0.43% TA. Excessive N intake increases urine-N excretion exponentially while fecal-N increases linearly in dairy cows (Castillo et al., 2000). Based on this survey of the literature, the urine-N to fecal N ratio can range from less than 1 at low N intake (< 400 g/d) to more than 2 at high N intake (> 700 g/d). The average N intake across treatment was 592 g/d in our experiment. TA was apparently effective in reducing urine-N loss in dairy cows excreting more N in urine than in feces. Under this scenario, TA had no detectable effect on the excretion of N in feces and milk. The effect of low dosages of TA in cows fed limited protein supply needs evaluation.

## **CONCLUSIONS**

The supplementation of low dosages of TA to lactating dairy cows tended to induce a linear reduction in MUN, PUN, and urine-N, suggestive of reduced ruminal proteolysis of dietary protein. TA induced minor changes in milk fatty acid profile and secretion, suggestive

of effect on ruminal FA biohydrogenation. Ruminal butyrate proportion was linearly increased and propionate was reduced by TA, there was no evidence of a less methanogenic rumen fermentation profile in response to TA. TA affected chewing behavior, but daily DMI was not affected by TA. The low dosages of TA did not affect the total tract apparent digestibility of nutrients, but were capable of reducing rumen microbial yield. Lactation performance did not differ, suggesting that the possible gain in dietary protein supply with TA may have been offset by the reduction in protein from rumen microbes. Overall, TA up to 0.43% of DM did not affect DMI and lactation and tended to reduce urine-N excretion.

### REFERENCES

- Aboagye, I. A., M. Oba, A. R. Castillo, K. M. Koenig, A. D. Iwaasa and Karen and Beauchemin. 2018. Effects of hydrolysable tannin with or without condensed tannin on methane emission, nitrogen use, and performance of beef cattle fed a high-forage diet. *Journal of Animal Science*. 12:5276:5286.10.1093/jas/sky352.
- Aguerre, M. J., B. Duval, J. M. Powell, P. A. Vadas, and M. A. Wattiaux. 2020. Effects of feeding a quebracho-chestnut tannin extract on lactating cows performance and nitrogen utilization efficiency. *Journal of Animal Science*. 103:2264-2271. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17442>.
- Aguerre, M. J., M. C. Capozzolo, P. Lencioni, C. Cabral, and M. A. Wattiaux. 2016. Effect of quebracho-chestnut tannin extracts at two dietary crude protein levels on performance, rumen fermentation and nitrogen partitioning in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 99:4476–4486. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10745>.
- Ahmed, M., P. Khirstova, and G. Icho. 2005. Comparative study of tannins of *Acacia nilotica* an indigenous tanning material in Sudan with *Acacia mearnsii*. *Suranaree Journal of Science Technology*. 12: 259-265.

- Ahnert, S., U. Dickhoefer, F. Schulz, and A. Susenbeth. 2015. Influence of ruminal Quebracho tannin extract infusion on apparent nutrient digestibility, nitrogen balance, and urinary purine derivatives excretion in heifers. *Livestock Science*. 177:63–70. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.04.004>.
- Alves, T. P., A. C. D. Orsoletta, and H. M. N. R. Filho. 2017. The effect of supplementing *Acacia mearnsii* tannin extract on dairy cow dry matter intake, milk production, and methane emission in a tropical pasture. *Tropical Animal Health Production*. 49:1663-1668. [10.1007/s11250-017-1374-9](https://doi.org/10.1007/s11250-017-1374-9).
- AOAC International, 1990. *Official methods of analysis*, 15th ed. AOAC International, Gaithersburg.
- AOAC International, 2002. *Official methods of analysis*, 16th ed. AOAC International, Gaithersburg.
- Avila, S. C., G. V. Kozloski, T. Orlandi, M. P. Mezzomo, and S. Stefanello. 2015. Impact of a tannin extract on digestibility, ruminal fermentation and duodenal flow of amino acids in steers fed maize silage and concentrate containing soybean meal or canola meal as protein source. *The Journal of Agricultural Science*. 153:943-953. <https://doi.org/10.1017/S0021859615000064>.
- Bravo, L., 1998. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*. 56, 317-333. [10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x](https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x).
- Cannon, S. J., G. C. Fahey, Jr. M. R. Murphy, C. L. Dikeman, B. L. Miller, and J. K. Drackley. 2010. Inclusion of psyllium in milk replacer for neonatal calves. 1. Effects on growth, digesta viscosity, rate of passage, nutrient digestibilities, and metabolites in blood. *Journal of Dairy Science*. 93:3652– 3660. [10.3168/jds.2009-2731](https://doi.org/10.3168/jds.2009-2731).

- Carulla, J. E., M. Kreuzer, A. Machmuller, and H. D. Hess. 2005. Supplementation of *Acacia mearnsii* decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Australian Journal of Agricultural Research*. 56:961-970. 10.1071/AR05022.
- Castillo, A. R., E. Kebreab, D. E. Beever, and J. France. 2000. A review of efficiency of nitrogen utilization in lactating dairy cows and its relationship with environmental pollution. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 9:1-32. <https://doi.org/10.22358/jafs/68025/2000>.
- Chen, X. B., A. T. Mejia, D. J. Kyle, and E. R. Orskov. 1995. Evaluation of the use of purine derivative: Creatinine ratio in spot urine and plasma samples as an index of microbial protein supply in ruminants: Studies in sheep. *Journal of Agriculture Science*. 125:137–143. 10.1017/S002185960007458X.
- Chizzotti, M. L., S. C. V. Filho, R. F. D. Valadares, F. H. M. Chizzotti and, L. O. Tedeschi. 2008. Determination of creatinine excretion and evaluation of spot urine sampling in Holstein cattle. *Livestock Science*. 113:218-225. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2007.03.013>.
- Dehority, B. A. 1984. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa. *Applied and Environmental Microbiology*. 48:182-185. 10.1128/aem.48.1.182-185.1984.
- DeVries, T. J., M. A. G. von Keyserlingk, D. M. Weary, and K. A. Beauchemin. 2003. Measuring the feeding behavior of lactating dairy cows in early to peak lactation. *Journal of Dairy Science*. 86:3354-3361. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73938-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73938-1).
- Duodu, K. G., J. R. N. Taylor, P. S. Belton, and B. R. Hamaker. 2003. Factor affecting sorghum protein digestibility. *Journal of Cereal Science*. 38: 117-131. 10.1016/S0733-5210(03)00016-X.
- Fernandes, T., K. T. Silva., B. F. Carvalho, R. F. Schwan, R. A. N. Pereira, M. N. Pereira, and C. L. S. Ávila. 2022. Effect of amylases and storage length on losses, nutritional value, fermentation, and microbiology of silage of corn and sorghum kernels. *Animal Feed*



- Science and Technology. Journal of Dairy Science. 285(24):115227. 10.1016/j.anifeedsci.2022.115227.
- Frutos, P., G. Hervás, F. J. Giráldez and A. R. Mantecón. 2004. Review. Tannin and ruminant nutrition. Spanish Journal of Agricultural Research. 2:191-202. 10.5424/sjar/2004022-73.
- Grainger, C., T. Clarke, M. J. Auldist., K. A. Beauchemin., S. M. McGinn., G. C. Waghorn, and R. J. Eckard. 2009. Potencial use of *Acacia mearnsii* condensed tannins to reduce methane emissions and nitrogen excretion from grazing dairy cows. Journal of Animal Science. 89:241-251. 10.4141/CJAS08110.
- Griffiths, V.M., C. E. F. Clark, D. A. Clark, and G. C. Waghorn. 2013. Supplementing lactating dairy cows fed high-quality pasture with black wattle (*Acacia mearnsii*) tannin. Animal. 7:1789–1795. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.02.002>.
- Hall, M. B. 2015. Determination of dietary starch in animal feeds and pet food by an enzymatic-colorimetric method: collaborative study. Journal of Dairy Science. 98:397-409. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.15-012>.
- Herremans , S., D. Vanwindekens., V. Decruyenaere., Y. Beckers, and E. Froidmont. 2020. Effect of dietary tannins on milk yield and composition, nitrogen partitioning and nitrogen use efficiency of lactating dairy cows: A meta-analysis. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 104:1209-1218. <https://doi.org/10.1111/jpn.13341>.
- IPHARRAGUERRE, I. R.; and J. H. CLARK. 2005. Varying protein and starch in the diet of dairy cows. II. Effects on performance and nitrogen utilization for milk production. Journal of Dairy Science, 88:2556-2570. 10.3168/jds.S0022-0302(05)72932-5.
- Jayanegara. A., F. Leiber, and M. Kreuzer. 2011. Meta-analysis of the relationship between dietary dietary tannin level and methane formation in ruminants from in vivo and in vitro experiments. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 96:365-375. 10.1111/j.1439-0396.2011.01172.x.

- Khiaosa-ard, R., S. F. Bryner, M. R. L. Scheeder, H. R. Wettstein, F. Leiber, M. Kreuzer, and C. R. Soliva. 2009. Evidence for the inhibition of the terminal step of ruminal linolenic acid biohydrogenation by condensed tannins. *Journal of Dairy Science*. 92:177–188. 10.3168/jds.2008-1117.
- Lammers, B. P., D. R. Buckmaster, and A. J. Heinrich. 1996. A simple method for the analysis of particle sizes of forages and total mixed rations. *Journal of Dairy Science*. 79:922–928. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76442-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76442-1).
- Lee, C., D. L. Morris, and P. A. Dieter. 2019. Validating and optimizing spot sampling of urine to estimate urine output with creatinine as a marker in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 102:236-245. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15121>.
- Leonardi, C., and L. E. Armentano. 2003. Effect of quantity, quality, and length of alfalfa hay on selective consumption by dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 86:557–564. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73634-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73634-0).
- Lessa, A. C. R., B. E. Madari, D. S. Paredes, R. M. Boddey, S. Urquiaga, C. P. Jantalia, and B. J. R. Alves. 2014. Bovine urine and dung deposited on Brazilian savannah pastures contribute differently to direct and indirect soil nitrous oxide emissions. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 190:104-111. <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2014.01.010>.
- Liu, H. W., D. W. Zhou, and K. Li. 2013. Effects of chestnut tannins on performance and antioxidative status of transition dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 96:5901–5907. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6904>.
- MacAdam, J. W, and J. J. Villalba. 2015. Beneficial effects of temperate forage legumes that contain condensed tannins. *Journal of agriculture*. 5:475-491. 10.3390/agriculture5030475.

- MacDonald, P.D. M., and P. E. J. Green. 1988. User's Guide to Program MIX: An interactive program for fitting mixtures of distributions. Release 2.3, January 1988. Ichthus Data Systems, Hamilton, Ontario, Canada.
- Makkar, H. P. S. 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research*. 49:241-256. [10.1016/S0921-4488\(03\)00142-1](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(03)00142-1).
- Makkar, H. P. S., M. Blummel, and K. Becker. 1995. In vitro effects of and interactions between tannins and saponins and fate of tannins in the rumen. *Journal of Science Food Agricultural*. 69:481-493. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740690413>.
- Min, B. R., W. E. Pinchak, K. Hernandez, C. Hernandez, M. E. Hume, E. Valencia, and J. D. Fulford. 2012. Effects of plant tannin supplementation on animal responses and in vivo ruminal bacterial populations associated with bloat in heifers grazing wheat forage. *Professional Animal Science*. 28:464–472. [https://doi.org/10.15232/S1080-7446\(15\)30386-7](https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)30386-7).
- Mueller-Harvey, I. 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal of Science Food Agriculture*. 86:2010–2037. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2577>.
- National Research Council. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. Natl. 686 Acad. Press, Washington, DC.
- Orlandi, T., C. A. Pozo, M. P. Mezzomo, and G. V. Kozloski. 2020. Acacia mearnsii tannin extract as a feed additive: impact on feed intake, digestibility and nitrogen excretion by sheep fed a tropical grass-based diet. *Ciência Rural*. 50(9) <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200095>.
- Orlandi, T., G. V. Kozloski, T. P. Alves, F. R. Mesquita, and S. C. Avila. 2015. Digestibility, ruminal fermentation and duodenal flux of amino acids in steers fed grass forage plus

- concentrate containing increasing levels of *Acacia mearnsii* tannin extract. *Animal Feed Science and Technology*. 210:37-45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.09.012>.
- Pereira, M. N., E. F. Garrett, G. R. Oetzel, and L. E. Armentano. 1999. Partial replacement of forage with non forage fiber sources in lactating cow diets. I. Performance and health. *Journal of Dairy Science*. 82:2716-2730. [10.3168/jds.s0022-0302\(99\)75528-1](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(99)75528-1).
- Pereira, M. N., M. N. M. Júnior, R. C. Oliveira, G. G. Salvati, and R. A. N. Pereira. 2021. Methionine precursor effects on lactation performance of dairy cows fed raw or heated soybeans. *Journal of Dairy Science*. 104:2996-3007. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18696>.
- Powell, J. M., M. J. Aguerre, and M. A. Wattiaux. 2011. Dietary crude protein and tannin impact dairy manure chemistry and ammonia emissions from incubated soils. *Journal of Environmental Quality*. 40:1767-1774. [10.2134/jeq2011.0085](https://doi.org/10.2134/jeq2011.0085).
- Purba.,R. A. P., P. Paengkoum, and S. Paengkoum. 2020. The links between supplementary tannin levels and conjugated linoleic (CLA) formation in ruminants: A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE*. 15(3): e0216187. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216187>.
- Reed, J. D. 1995. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legume. *Journal of Dairy Science*. 73:1516-1528. [10.2527/1995.7351516x](https://doi.org/10.2527/1995.7351516x).
- Sant'ana, A. S., A. P. R, Silva, S. P. O. Nascimento, A. A. Moraes, J. F. Nogueira, F. C. M. Bezerra, C. F. Costa, J. J. S. Gouveia, G. V. Gouveia, R. T. S. Rodrigues, H. C. Bonfa, and D. R. Menezes. 2022. Tannin as a modulator of rumen microbial profile, apparent digestibility and ingestive behavior of lactating goats: A preliminary metagenomic view of goats adaptability to tannin. *Research in Veterinary Science*. 145:159-168. [10.1016/j.rvsc.2022.02.002](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.02.002).

- Scalbert, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 30:3875-3883. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83426-L](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83426-L).
- Schlau, N., D. R. Mertens, K. Taysom, and D. Taysom. 2021. Technical note: Effects of filter bags on neutral detergent fiber recovery and fiber digestion in vitro. *Journal of Dairy Science*. 104:1846-1854. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18731>.
- Sliwinski, B. J., M. Kreuzer, F. Sutter, A. Machmuller, and H.-R. Wettstein. 2004. Performance, body nitrogen conversion and nitrogen emission from manure of dairy cows fed diets supplementation with different plant extract. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 13:73-91. <https://doi.org/10.22358/jafs/67390/2004>.
- Tavendale, M. H., L. P. Meagher, D. Pacheco, N. Walker, G. T. Attwood, and S. Sivakumaran. 2005. Methane production from in vitro rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Animal Feed Science And Technology*. 123:403-419. [10.1016/j.anifeedsci.2005.04.037](https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.04.037).
- Turner. S. A., G. C. Waghorn, S. L. Woodward, and N. A. Thomson. 2005. Condensed tannins in birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) affect the detailed composition of milk from dairy cows. *New Zeland Society of Animal Production*. 65:283-289.
- Valadares, R. F. D., G. A. Broderick, S. C. Valadares, and M. K. Clayton. 1999. Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. *Journal of Dairy Science*. 82:2686–2696. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75525-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75525-6).
- Van Keulen, V. J, and B. A. Young. 1977. Evaluation of acid-insoluble ash as a natural marker in ruminant digestibility studies. *Journal of Animal Science*. 44:282-287. <https://doi.org/10.2527/jas1977.442282x>.

- Van Soest, P. J. 1994. Plant defensive chemicals, in: Nutritional Ecology of the Ruminant, Second Edition. Cornell University press, Ithaca, New York, pp. 196-212.
- Vasta, V., M. Daghighi, A. Cappucci, A. Buccioni, A. Serra, C. Viti, and M. Mele. 2019. Invited review: Plant polyphenols and rumen microbiota responsible for fatty acid biohydrogenation, fiber digestion, and methane emission: Experimental evidence and methodological approaches. *Journal of Dairy Science*. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14985>.
- Wang, Y., G. C. Waghorn, W. C. McNabb, T. N. Barry, M. J. Hedley, and I. D. Shelton. 1996. Effects of condensed tannins in *Lotus corniculatus* upon the digestion of methionine and cysteine in the small intestine of sheep. *Journal of Agricultural Science*. 127:413–421. <https://doi.org/10.1017/S0021859600078576>.
- Warner, A.C.I. 1962. Some factors influencing the rumen microbial population. *Journal of General Microbiology*. 28:129-146. <https://doi.org/10.1099/00221287-28-1-129>.
- Wildman, E. E., G. M. Jones, P. E. Wagner, R. L. Boman, J. H. F. Troutt, and T. N. Lesch. 1982. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to standard production characteristics. *Journal of Dairy Science*. 65:495–501.
- Young, E., and C. Conway. 1942. On the estimation of allantoin by the rimini-schryver reaction. *Journal of Biological Chemistry*. p.839-853. 10.1016/S0021-9258(18)45082-X.

**Table 1.** Composition and particle size distribution of treatments containing 0, 0.14, 0.29, and 0.43 % of DM of *Acacia mearnsii* tannin extract

	Tannin			
	0	0.14	0.29	0.43
Ingredients, % of DM				
Corn silage	37.0	37.0	37.0	37.0
Alfalfa haylage	12.8	12.8	12.8	12.8
Whole cottonseeds	9.6	9.5	9.5	9.5
Rehydrated and ensiled corn grain	17.7	17.8	17.8	17.8
Citrus pulp	6.4	6.3	6.1	6.0
Soybean meal	13.8	13.8	13.8	13.8
Tannin extract		0.14	0.29	0.43
Minerals and vitamins <sup>1</sup>	2.7	2.7	2.7	2.7
Nutrients, % of DM				
CP	17.2	17.0	17.0	17.1
NDF	33.3	33.2	33.3	33.2
Starch	28.5	29.1	30.5	31.1
Ether extract	3.8	3.8	3.8	3.8
Ash	6.8	6.7	6.6	6.5
NFC <sup>2</sup>	38.9	39.3	39.3	39.3
Non-starch NFC <sup>3</sup>	10.4	10.2	8.9	8.3
Dry matter, % of as-fed	42.5	42.0	42.5	43.2
Particle distribution, % of as-fed				
> 19 mm <sup>4</sup>	24.2 ± 6.5	24.0 ± 5.5	25.1 ± 5.2	22.4 ± 5.0
8 - 19 mm <sup>4</sup>	39.7 ± 5.7	39.8 ± 5.3	40.0 ± 5.5	41.1 ± 4.4
< 8 mm <sup>4</sup>	36.0 ± 2.4	36.2 ± 2.3	34.8 ± 4.5	36.4 ± 2.3

<sup>1</sup>16.8% limestone, 33.3% sodium bicarbonate, 13.3% magnesium oxide, 8.3% NaCl, 3.3% yeast culture, and 25% minerals and vitamins (23.8% Ca, 16.9% P, 1.85% Mg, 2.27% S, 100 ppm Co, 1.230 ppm Cu, 3.080 ppm Mn, 7.323 Zn, 50.4 ppm Se, 124 ppm I, 615 KUI/kg Vit.A, 153 KUI/kg Vit.D and 3 KUI/kg Vit.E).

<sup>2</sup>Non-fiber carbohydrates = 100 – (CP + NDF + Ether extract + Ash).

<sup>3</sup>Non-starch NFC = NFC – Starch

<sup>4</sup>Penn State Particle Separator. Mean ± SD. N = 60/treatment.

**Table 2.** DMI, lactation performance, SCC, feed efficiency, body BCS, and BW of cows fed of treatments containing 0, 0.14, 0.29, and 0.43 % of DM of *Acacia mearnsii* tannin extract

Item	Tannin				SEM	P-values <sup>1</sup>		
	0	0.14	0.29	0.43		L	Q	C
kg/d								
DMI	21.8	21.6	21.9	22.0	0.67	0.49	0.64	0.41
Milk	33.2	32.9	33.3	32.9	0.99	0.82	0.98	0.46
ECM	30.9	30.8	30.5	31.0	0.84	0.99	0.55	0.40
Fat	1.270	1.242	1.224	1.259	0.0382	0.66	0.23	0.71
Protein	1.031	1.009	1.017	1.029	0.0275	0.98	0.36	0.75
Casein	0.804	0.785	0.786	0.798	0.0224	0.78	0.29	0.90
Lactose	1.567	1.556	1.563	1.578	0.0487	0.69	0.58	0.26
TS	3.945	3.937	3.903	3.951	0.1058	0.96	0.65	0.70
% of milk								
Fat	3.63	3.67	3.66	3.66	0.116	0.65	0.61	0.91
Protein	3.09	3.09	3.06	3.08	0.048	0.61	0.46	0.31
Casein	2.42	2.41	2.39	2.39	0.040	0.14	0.93	0.80
Lactose	4.72	4.73	4.70	4.70	0.030	0.22	0.86	0.90
TS	11.95	11.95	11.88	11.97	0.130	0.95	0.40	0.33
Ln SCC, <sup>2</sup> 0-9	1.10	1.14	1.40	1.23	0.331	0.30	0.47	0.30
Milk/DMI	1.54	1.54	1.53	1.51	0.046	0.41	0.81	0.64
ECM/DMI	1.42	1.43	1.40	1.41	0.031	0.46	0.84	0.41
BCS, 1-5	2.85	2.90	2.87	2.89	0.039	0.36	0.39	0.25
BW, kg	589	590	590	592	19.7	0.35	0.95	0.77

<sup>1</sup>Contrasts: Linear (-3 -1 1 3), Quadratic (1 -1 -1 1), and Cubic (-1 3 -3 1) of level of tannin.

<sup>2</sup>Equivalency of the linear SCC: 1.10 = 26.800 cells/mL, 1.14 = 27.500 cells/mL, 1.40 = 33.000 cells/mL, and 1.23 = 29.400 cells/mL.



**Table 3.** Fatty acid profile of milk fat of cows fed treatment diets containing 0, 0.14, 0.29, and 0.43 % of DM of *Acacia mearnsii* tannin extract

Item	Tannin				SEM	P-values <sup>1</sup>		
	0	0.14	0.29	0.43		L	Q	C
g/100 g milk								
Prefomed <sup>2</sup>	1.31	1.32	1.32	1.32	0.033	0.46	0.57	0.82
Mixed <sup>3</sup>	1.37	1.39	1.38	1.37	0.049	0.65	0.48	0.64
De novo <sup>4</sup>	0.75	0.76	0.76	0.77	0.032	0.21	0.95	0.97
Monounsaturated	0.60	0.61	0.62	0.61	0.019	0.37	0.14	0.66
Polyunsaturated	0.02	0.02	0.02	0.02	0.005	0.94	0.53	0.83
Saturated	2.52	2.54	2.52	2.54	0.085	0.90	0.99	0.65
Unsaturated	0.59	0.61	0.63	0.61	0.024	0.14	0.18	0.59
Palmitic	1.58	1.58	1.55	1.56	0.062	0.56	0.94	0.59
Stearic	0.34	0.34	0.34	0.34	0.010	0.37	0.32	0.88
Oleic	0.42	0.44	0.45	0.44	0.015	0.11	0.14	0.61
g/d								
Prefomed	426	426	431	439	12.6	0.24	0.65	0.96
Mixed	449	447	448	453	17.1	0.76	0.63	0.98
De novo	245	245	250	257	11.2	0.13	0.62	0.95
Monounsaturated	195	197	203	202	6.0	0.06	0.81	0.59
Polyunsaturated	6	7	7	7	1.4	0.64	0.60	0.34
Saturated	826	818	822	842	31.7	0.45	0.38	0.94
Unsaturated	193	196	204	204	7.4	0.02	0.74	0.51
Palmitic	516	508	506	518	21.6	0.94	0.38	0.90
Stearic	109	110	112	113	3.3	0.13	0.82	0.67
Oleic	137	140	146	146	4.3	0.01	0.46	0.49
g/100 g fatty acids								
Prefomed	38.23	38.26	38.39	38.29	0.367	0.59	0.64	0.58
Mixed	40.07	40.17	39.61	39.51	0.328	<0.01	0.54	0.13
De novo	21.69	21.57	22.01	22.20	0.338	<0.01	0.30	0.24
Monounsaturated	17.37	17.64	18.08	17.66	0.410	0.18	0.11	0.29
Polyunsaturated	0.54	0.61	0.61	0.56	0.120	0.86	0.32	0.94
Saturated	73.79	73.35	72.91	73.50	0.581	0.35	0.11	0.46
Unsaturated	17.24	17.56	18.26	17.74	0.454	0.07	0.12	0.17
Palmitic	46.00	45.72	44.64	45.12	0.825	0.05	0.35	0.20
Stearic	9.79	9.89	10.01	9.74	0.199	0.96	0.08	0.39
Oleic	12.33	12.63	13.16	12.79	0.447	0.03	0.08	0.19

<sup>1</sup>Contrasts: Linear (-3 -1 1 3), Quadratic (1 -1 -1 1), and Cubic (-1 3 -3 1) of level of tannin.

<sup>2</sup>Prefomed = Fatty acids  $\geq$  18 C.

<sup>3</sup>Mixed = Fatty acids with 16 or 17 C.

<sup>4</sup>De novo = Fatty acids with 4 to 15 C.

**Table 4.** Rumen molar VFA proportions, total protozoa concentration, total tract apparent digestibility, intake of digestible nutrients, relative rumen microbial yield (urinary Allantoin/Creatinine  $\times$  BW), fecal viscosity, fecal and urine pH, and urine excretion of cows fed treatment diets containing 0, 0.14, 0.29, and 0.43 % of DM of *Acacia mearnsii* tannin extract

Item	Tannin				SEM	<i>P</i> -values <sup>1</sup>		
	0	0.14	0.29	0.43		L	Q	C
molar % of total VFA								
Acetate	59.4	59.8	60.2	60.1	0.73	0.23	0.57	0.88
Propionate	25.2	24.7	24.2	23.4	0.88	0.02	0.76	0.86
Butyrate	10.8	10.8	10.9	11.7	0.33	0.03	0.19	0.76
Isovalerate	1.9	2.0	1.9	2.0	0.06	0.17	0.53	0.14
Valerate	1.8	1.8	1.8	1.8	0.07	0.59	0.78	0.88
Isobutyrate	1.0	1.0	0.9	0.9	0.03	0.23	0.79	0.64
Acetate/Propionate	2.44	2.51	2.54	2.63	0.124	0.09	0.85	0.77
Protozoa, $\times 10^5$ cells/mL	2.40	2.65	2.49	2.15	0.284	0.43	0.26	0.83
Digestibility, % of intake								
DM	75.4	74.9	76.6	75.2	1.83	0.82	0.67	0.28
OM	75.8	75.5	77.0	75.9	1.89	0.72	0.71	0.38
NDF	59.4	59.6	61.5	59.0	3.27	0.94	0.54	0.54
Non-NDF OM	84.9	84.3	85.6	85.2	1.21	0.47	0.91	0.25
Starch	98.4	98.5	98.4	98.2	0.19	0.41	0.31	0.81
CP	78.7	79.3	80.0	78.1	1.71	0.79	0.27	0.61
Digestible intake, kg/d								
OM (DOMI)	15.3	15.1	15.5	15.3	0.42	0.65	0.96	0.37
NDF	2.6	2.6	2.8	2.6	0.24	0.80	0.48	0.50
Starch	5.5	5.5	5.6	5.5	0.22	0.58	0.22	0.24
CP	2.3	2.3	2.4	2.3	0.08	0.90	0.38	0.60
Microbial yield								
(Alla/Crea) $\times$ BW	29.1	26.4	26.0	25.3	1.34	0.04	0.41	0.65
(Alla/Crea) $\times$ BW <sup>0.75</sup>	5.9	5.3	5.3	5.1	0.27	0.03	0.41	0.62
[(Alla/Crea) $\times$ BW]/DOMI	1.95	1.78	1.69	1.67	0.102	0.04	0.41	1.00
[(Alla/Crea) $\times$ BW <sup>0.75</sup> ]/DOMI	0.40	0.36	0.34	0.33	0.022	0.03	0.50	0.86
Fecal viscosity, cP	28.3	27.0	28.3	28.5	1.80	0.64	0.54	0.58
Fecal pH	7.61	7.53	7.56	7.58	0.040	0.82	0.11	0.40
Urine pH	8.48	8.56	8.48	8.50	0.035	0.99	0.41	0.17
Urine, L/d	25.2	25.3	28.3	28.5	1.15	0.17	0.28	0.77

<sup>1</sup>Contrasts: Linear (-3 -1 1 3), Quadratic (1 -1 -1 1), and Cubic (-1 3 -3 1) of level of tannin.

**Table 5.** Chewing and meal behavior and proportion of daily intake and particle size sorting behavior during the day of cows fed treatment diets containing 0, 0.14, 0.29, and 0.43 % of DM of *Acacia mearnsii* tannin extract.

Item	Tannin				SEM	<i>P</i> -values <sup>1</sup>		
	0	0.14	0.29	0.43		L	Q	C
Chewing behavior								
Eating, min/d	312	308	302	316	10.9	0.80	0.09	0.33
Rumination, min/d	393	394	401	398	8.6	0.32	0.73	0.53
Chewing, <sup>3</sup> min/d	705	702	703	715	16.2	0.40	0.39	0.84
Eating, min/kg DMI	14.8	14.9	14.2	14.8	0.88	0.62	0.37	0.14
Rumination, min/kg DMI	18.5	19.0	19.0	18.6	0.91	0.84	0.31	0.74
Chewing, min/kg DMI	33.3	33.9	33.1	33.5	1.72	0.92	0.82	0.35
Meal behavior								
Meal frequency, meals/d	9.4	9.7	9.1	8.8	0.29	0.01	0.21	0.23
Meal size, kg DM/meal	2.3	2.2	2.4	2.5	0.09	0.02	0.11	0.27
Meal duration, min/meal	36.1	35.0	36.4	38.8	1.63	0.01	0.04	0.68
Meal time, min/d	335	330	327	337	11.7	0.90	0.19	0.71
Largest meal size, kg DM/meal	3.6	4.0	3.8	3.6	0.43	0.99	0.15	0.32
Largest meal duration, min/meal	80.4	77.8	83.4	82.6	4.2	0.40	0.79	0.35
Largest meal moment, <sup>3</sup> min	370	383	361	339	43.2	0.47	0.62	0.82
First meal duration, min/meal	58.5	60.2	61.2	65.5	3.92	0.04	0.57	0.71
% of daily intake								
0700 - 1200 h	42.7	40.7	42.3	43.1	2.05	0.59	0.23	0.41
1200 - 1900 h	41.0	40.8	42.3	40.2	1.19	0.82	0.33	0.18
1900 - 0700 h	16.2	18.5	15.4	16.6	1.36	0.58	0.47	0.11
Sorting, <sup>4</sup> Observed/Predicted %								
0700 to 1200 h								
>19 mm	118	103	121	92	8.4	0.05	0.30	<0.01
8-19 mm	95	94	90	103	2.3	0.05	0.01	0.06
<8 mm	93	102	98	102	5.5	0.25	0.56	0.31
1200 to 1900 h								
>19 mm	80	92	86	88	4.5	0.38	0.23	0.15
8-19 mm	102	98	101	102	1.9	0.93	0.14	0.29
<8 mm	108	106	108	106	2.4	0.59	0.73	0.17
1900 to 0700 h								
>19 mm	106	97	126	98	15.4	0.94	0.44	0.10
8-19 mm	96	93	99	96	2.3	0.56	0.91	0.10
<8 mm	110	110	110	108	3.9	0.65	0.82	0.97
0700 to 0700 h								
>19 mm	96	96	97	94	1.9	0.37	0.10	0.26
8-19 mm	99	98	99	100	0.5	0.02	0.02	0.14
<8 mm	102	103	101	103	1.2	0.82	0.68	0.03
Daily orts, % of offered as-fed	14.3	14.7	15.0	14.5	0.34	0.63	0.18	0.59

<sup>1</sup>Contrasts: Linear (-3 -1 1 3), Quadratic (1 -1 -1 1), and Cubic (-1 3 -3 1) of level of tannin.

<sup>2</sup>Chewing = eating + rumination.

<sup>3</sup>Minutes from the daily feeding after the morning milking at 0700 h.

<sup>4</sup>Penn State Particles Separator. > 100 = preferential intake, < 100 = refusal, 100 = no sorting.

**Table 6.** MUN, plasma urea-N (PUN) post-morning feeding (0700 h), and N partition of cows fed treatment diets containing 0, 0.14, 0.29, and 0.43 % of DM of *Acacia mearnsii* tannin extract

	Tannin				SEM	<i>P</i> -values <sup>1</sup>		
	0	0.14	0.29	0.43		L	Q	C
MUN, mg/dL	16.84	17.32	16.70	16.08	0.752	0.10	0.21	0.57
PUN at h post-feeding, mg/dL								
0	22.4	22.9	23.3	21.8	1.18	0.75	0.36	0.71
1.5	25.2	24.5	24.4	24.6	1.40	0.72	0.70	0.60
3	24.0	25.6	24.1	22.6	1.30	0.28	0.17	0.52
6	23.0	21.7	21.1	20.2	1.20	0.08	0.90	0.82
12	19.3	19.5	17.7	17.5	0.74	0.01	0.76	0.19
18	20.0	19.6	17.8	18.7	0.82	0.06	0.32	0.17
21	21.0	22.2	19.5	18.7	0.90	0.09	0.58	0.13
N, g/d								
Intake	599	583	593	591	17.3	0.62	0.37	0.23
Milk	161	159	159	159	4.2	0.67	0.80	0.75
Feces	129	125	123	132	12.2	0.85	0.35	0.72
Urine	160	166	159	150	8.2	0.10	0.28	0.74
N, % of daily intake								
Milk	27.0	27.5	27.0	27.0	0.61	0.91	0.58	0.46
Feces	25.6	24.8	24.3	26.2	2.42	0.84	0.35	0.72
Urine	31.8	32.9	31.6	29.8	1.61	0.10	0.28	0.74

<sup>1</sup>Contrasts: Linear (-3 -1 1 3), Quadratic (1 -1 -1 1), and Cubic (-1 3 -3 1) of level of tannin.