



**CAIO RODRIGUES MONTEIRO**

**EFEITO DE NÍVEIS DE ADITIVO NATURAL À BASE DE  
TANINO SOBRE A FERMENTAÇÃO E  
DIGESTIBILIDADE RUMINAL**

**LAVRAS - MG  
2021**

**CAIO RODRIGUES MONTEIRO**

**EFEITO DE NÍVEIS DE ADITIVO NATURAL À BASE DE TANINO SOBRE A  
FERMENTAÇÃO E DIGESTIBILIDADE RUMINAL**

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

Prof. Dra. Marina de Arruda Camargo Danes  
Orientadora

Dr. Eduardo Marostegan de Paula  
Coorientador

**LAVRAS – MG**

**2021**

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

Monteiro, Caio Rodrigues.

Efeito de níveis de aditivo natural à base de tanino sobre a  
fermentação e digestibilidade ruminal / Caio Rodrigues Monteiro. -  
2021.

54 p.

Orientador(a): Marina Arruda Camargo Danes.

Coorientador(a): Eduardo Marostegan Paula.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Tanino. 2. Fermentação ruminal. 3. aditivo. I. Danes, Marina  
Arruda Camargo. II. Paula, Eduardo Marostegan. III. Título.

**CAIO RODRIGUES MONTEIRO**

**EFEITO DE NÍVEIS DE ADITIVO NATURAL À BASE DE TANINO SOBRE A  
FERMENTAÇÃO E DIGESTIBILIDADE RUMINAL**

**EFFECT OF LEVELS OF BASED-TANNINS NATURAL ADDITIVE ON  
RUMINAL FERMENTATION AND DIGESTIBILITY**

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

APROVADA em 30 de julho de 2021.

Dra. Marina de Arruda Camargo Danes, UFLA

Dr. Eduardo Marostegan de Paula, IZ

Dr. Rafael Fernandes Leite, UFSJ

Dra. Iraídes Ferreira Furusho Garcia, UFLA

Profa. Dra. Marina de Arruda Camargo Danes  
Orientadora

**LAVRAS – MG  
2021**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que, não apenas hoje, mas ao longo de todos os momentos de minha vida esteve presente, permitindo-me alçar voos cada vez mais altos.

A todos os membros de minha família, em especial ao meu irmão Gustavo e aos meus pais Marcílio e Regina, pelo amor, carinho, incentivo e por nunca mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida e pudesse almejar cada vez horizontes mais distantes.

À minha namorada, Juliana Alves, por estar presente comigo em mais essa etapa e em todos os momentos dos meus últimos anos, festejando os bons momentos, confortando-me e me ajudando a enfrentar nos ruins. Pela paciência e compreensão dos momentos de ausência que se fizeram necessário para alcançar mais esse objetivo pessoal

À minha orientadora Marina de Arruda Camargo Danés e co-orientadores Eduardo Marostegan de Paula e Rafael Fernandes Leite, que sempre estiveram presentes durante todo esse processo de formação acadêmica, contribuindo com valiosos conhecimento e experiência para que esse trabalho se concretizasse.

Aos diversos amigos que fiz durante essa etapa de minha vida por compartilharem a alegria nos bons momentos e pelo companheirismo e apoio nos momentos difíceis. Pelos ensinamentos, trocas culturais e momentos enriquecedores que proporcionaram.

Ao Centro Avançado de Pesquisa de Bovinos de Corte do Instituto de Zootecnia (IZ), em nome de todos os pesquisadores, colaboradores e alunos, que além de toda a estrutura e condições para que esse projeto se realizasse, ofereceu-me uma receptividade que jamais será esquecida.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2019/17243-0) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

À TANAC S.A. por acreditar em um modelo de desenvolvimento tecnológico baseado na parceria público-privado, fornecendo apoio financeiro para realização de pesquisas de relevante impacto para sociedade.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade de formação e capacitação pessoal e profissional.

À Universidade Federal de São João del-Rei, pelo reconhecimento da importância da capacitação e por fornecer o incentivo e todas as condições para que esse desenvolvimento profissional dos seus colaboradores realmente ocorra.

## RESUMO

Diversas moléculas naturais tem potencial de utilização como aditivo sustentável e seguro para alimentação de ruminantes, possibilitando aumento da produtividade e redução de impactos ambientais. Objetivou-se avaliar o efeito de doses crescentes de extrato de tanino condensado de *Acacia mearnsii* (TAN): 0,00; 0,08; 0,16; 0,32 e 0,64% (da matéria seca da dieta; MS) sobre a digestibilidade de nutrientes e parâmetros ruminais. Hipotetizou-se que baixas doses de TAN podem reduzir relação acetato:propionato sem alterar digestibilidade dietética, pH ruminal e produção total de AGV. Realizou-se três experimentos: cultivo anaeróbico contínuo (in vitro; E1); in situ (E2) e cultura por batelada (in vitro; E3). Para obtenção de inóculo para E1 e E3 e incubação de E2, utilizou-se bovinos nelores canulados no rúmen. O E1 foi conduzido em quadrado latino replicado 5x5, com cinco períodos de 10 dias (7 de adaptação e 3 de coleta). A cultura foi mantida em anaerobiose com temperatura controlada e as dietas (2 mm) foram fornecidas duas vezes ao dia. O E2 foi conduzido em delineamento em 2 blocos casualizado, replicados em 3 períodos. O E3 foi conduzido em delineamento de blocos casualizado, considerando o período de incubação como bloco. Para procedimentos estatísticos utilizou-se PROC MIXED do SAS, com período, tratamento e quadrado como efeito fixo e unidade experimental como efeito aleatório para E1; bloco, tratamento e período como efeito fixo para E2 e bloco e tratamento como efeito fixo para E3. Utilizou-se a declaração LSMEANS para comparação de médias, com o ajuste proposto por Tukey-Kramer para efeitos significativos. Comparou-se, por declaração CONTRAST, dietas com (CT) e sem (ST) tanino e dietas com menor (BT; 0,08 e 0,16%) e maior (AT; 0,32 e 0,64%) inclusão de tanino. Realizou-se teste de ajuste linear ou quadrático para relacionar dose de TAN e variáveis respostas. Estabeleceu-se significância em  $P \leq 0,05$  e tendências com  $P \leq 0,10$ . Em E1, não houve diferença na digestibilidade da proteína bruta (PB;  $P=0,07$ ) e CT aumentou a digestibilidade da matéria orgânica ( $P=0,02$ ; 51,0 vs 49,3%) e matéria seca ( $P=0,04$ ; 46,4 vs 45,2%), comparado a ST. O pH não diferiu entre tratamentos ( $P>0,10$ ). A concentração final de amônia foi inferior em dietas com AT, em relação a BT (0,69 vs 0,56 mg/dL;  $P<0,01$ ). Concentração de isobutirato foi superior em 0,08% TAN ( $P<0,01$ ). Ainda em E1, inclusão de TAN (CT) reduziu total de AGV ( $P<0,01$ ), acetato ( $P<0,01$ ), butirato ( $P=0,04$ ), valerato ( $P=0,03$ ) e acetato:propionato ( $P<0,05$ ), comparado a dietas ST. Em E2, observou-se efeito quadrático ( $P<0,02$ ) entre doses de TAN e digestibilidade de MS e PB. Dietas CT reduziram a digestibilidade da MS (58,9 vs 54,5%;  $P<0,01$ ) e PB (56,1 vs 54,4%;  $P=0,03$ ), enquanto que a digestibilidade da PB foi superior para AT, em relação a BT ( $P<0,01$ ). Em E3, observou-se menor teor de acetato ( $P<0,01$ ) e maior de butirato ( $P<0,01$ ) quando adicionado TAN. Adição de TAN comparado ao controle reduziu a relação acetato:propionato, aumentou digestibilidade da matéria seca e matéria orgânica dietética e não alterou pH e concentração amoniacal do meio, porém reduziu o total de AGV e acetato.

Palavras-chave: *Acacia mearnsii*; digestibilidade ruminal, fermentador de cultivo contínuo, *in vitro*.

## ABSTRACT

Several natural molecules have the potential to be used as a sustainable and safe additive for ruminant feed, enabling increased productivity and reduced environmental impacts. The objective of this study to evaluate the effect of increasing doses of *Acacia mearnsii* condensed tannin extract (TAN): 0.00; 0.08; 0.16; 0.32 and 0.64% (diet dry matter; DM) on nutrient digestibility and ruminal parameters, with different laboratory methods. Three experiments were carried out: dual flow continuous culture system (in vitro; E1); in situ (E2) and batch culture (in vitro; E3). To obtain inoculum for E1 and E3 and incubation of E2, Nellore cattle cannulated in the rumen were used. E1 was conducted in a replicated 5x5 Latin square, with five periods of 10 days (7 of adaptation and 3 of collection). The culture was kept in anaerobic conditions at controlled temperature and diets (2 mm) were fed twice a day. E2 was conducted in a randomized 2-block design (ruminal environment), replicated in 3 periods. E3 was conducted in a randomized block design, considering the incubation period as a block. For statistical procedures, SAS PROC MIXED was used, with period, treatment and square as fixed effect and experimental unit as random effect for E1; block, treatment and period as a fixed effect for E2 and block and treatment as a fixed effect for E3. The LSMEANS statement was used to compare means, with the adjustment proposed by Tukey-Kramer for significant effects. Diets with (CT) and without (ST) tannin were compared, by CONTRAST statement, and diets with low (BT; 0.08 and 0.16%) and high (AT; 0.32 and 0.64%) tannin. A linear or quadratic adjustment test was performed to relate TAN dose and response variables. Significance was established at  $P \leq 0.05$  and trends at  $P < 0.10$ . In E1, there was no difference in crude protein digestibility (CP;  $P=0.07$ ) and CT increased the digestibility of organic matter (OM;  $P=0.02$ ; 51.0 vs 49.3%) and dry matter (DM;  $P=0.04$ ; 46.4 vs 45.2%), compared to ST. The pH did not differ between diets ( $P>0.10$ ). The final ammonia concentration was higher with 0.16% TAN ( $P=0.01$ ) and lower in diets with AT, compared to BT (0.69 vs 0.56 mg/dL;  $P<0.01$ ). Isobutyrate concentration was higher at 0.08% TAN ( $P<0.01$ ). Inclusion of TAN reduced total VFA ( $P<0.01$ ), acetate ( $P<0.01$ ), butyrate ( $P=0.04$ ), valerate ( $P=0.03$ ) and acetate:propionate ( $P<0.05$ ). In E2, there was a quadratic effect ( $P<0.02$ ) between doses of TAN and digestibility of DM and CP. CT diets reduced the digestibility of DM (58.9 vs 54.5%;  $P<0.01$ ) and CP (56.1 vs 54.4%;  $P=0.03$ ), while the CP digestibility was higher for AT, compared to BT ( $P<0.01$ ). In E3, there was a lower content of acetate ( $P<0.01$ ) and higher of butyrate ( $P<0.01$ ) when TAN was added. Addition of TAN compared to the control reduced the acetate:propionat ratio, increased the digestibility of DM and OM and did not change the pH and ammonia concentration of the medium, but reduced the total VFA and acetate.

Keywords: *Acacia mearnsii*, dual-flow continuous culture system, *in vitro*, ruminal digestibility

## Efeito de níveis de aditivo natural à base de tanino sobre a fermentação e digestibilidade ruminal

Elaborado por **Caio Rodrigues Monteiro** e orientado por **Marina de Arruda Camargo Danes**

Aditivos alimentares para ruminantes podem modificar o padrão da fermentação ruminal de forma benéfica, melhor a digestibilidade dos alimentos e reduzir impactos ambientais. Diversas moléculas naturais tem potencial para uso como aditivo para ruminantes, dentre as quais destaca-se o polifenol de origem vegetal denominado tanino. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de doses crescentes de extrato de tanino condensado de *Acacia mearnsii*: 0,00; 0,08; 0,16; 0,32 e 0,64% (da matéria seca da dieta) sobre a digestibilidade de nutrientes e parâmetros ruminais. Para tal, foram utilizados três métodos experimentais: cultivo anaeróbico contínuo de microrganismos ruminais; método *in situ* e técnica de produção de gás.

No experimento de cultivo contínuo, não houve diferença na digestibilidade da proteína bruta. O agrupamento dos tratamentos com tanino (TAN) aumentou a digestibilidade da matéria orgânica quando comparado ao tratamento controle (sem tanino), reduziu a produção total de ácidos graxos voláteis, de acetato, butirato, valerato e a relação acetato:propionato, além de aumentar a concentração final de propionato. Ainda neste experimento, O agrupamento das duas doses maiores (0,32 e 0,64%) comparado com o das doses menores (0,08 e 0,16%) reduziu o acúmulo de amônia. No experimento de produção de gases, TAN reduziu a concentração final de acetato, tendeu a reduzir a relação acetato:propionato e aumentou proporção de butirato. No experimento *in situ* observou-se que TAN reduziu a digestibilidade da matéria seca e da proteína. Em geral, os resultados convergiram em que doses crescentes de tanino reduziram relação acetato:propionato e melhoraram digestibilidade com poucas alterações no ambiente ruminal.





## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 HIPÓTESE .....	2
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	2
3.1 Taninos.....	2
3.1.1 Caracterização geral.....	2
3.1.2 Taninos condensados de Acácia Negra ( <i>Acacia mearnsii</i> ).....	4
3.1.3 Taninos na alimentação de ruminantes .....	5
3.1.4 Interação entre taninos e nutrientes da dieta .....	7
3.1.5 Efeitos sobre a população de microrganismos ruminais.....	9
3.2 Técnicas <i>in vitro</i> de avaliação da fermentação ruminal.....	12
3.2.1 Caracterização geral.....	12
3.2.2 Cultura <i>batch</i> (incubação em massa) e técnica de produção cumulativa de gases <i>in vitro</i> .....	12
3.2.3 Técnicas de cultura contínua.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Local dos experimentos .....	19
4.2 Tratamentos e dietas experimentais .....	19
4.2 Experimento 1 - Sistema de cultura contínua de fluxo duplo ( <i>Dual Flow Continuous Culture System</i> ) .....	21
4.3 Experimento 2 – Digestibilidade ruminal da proteína e matéria seca ( <i>in situ</i> ).....	23
4.4 Experimento 3 - Cinética ruminal de produção de gás .....	24
4.5 Análise estatística.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.1 Experimento 1 – Sistema de cultivo contínuo de fluxo duplo .....	29
5.2 Experimento 2 - Digestibilidade ruminal <i>in situ</i> .....	38
5.3 Experimento 3 – Produção de gás <i>in vitro</i> .....	41
6. CONCLUSÃO.....	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	45

# 1 INTRODUÇÃO

Ruminantes constituem importante fonte de proteínas de alta qualidade para humanos e se destacam pela capacidade de gerar alimento utilizando fontes de baixa qualidade, porém, durante a fermentação ruminal geram compostos potencialmente poluidores, principalmente metano, gás carbônico e derivados de amônia,

O aumento da produtividade e a redução dos impactos ambientais são os principais desafios da pecuária moderna. Várias moléculas possuem potencial para modificar e melhorar o processo de fermentação ruminal, seja pela interação com a dieta, seja pela interação com a microbiota ruminal (MCGUFFEY *et al.*, 2001).

Dentre as moléculas com potencial para modificar a fermentação ruminal, compostos fenólicos naturais merecem destaque, pois se efetivos atendem simultaneamente à busca por produtividade e à crescente demanda da sociedade por sustentabilidade e segurança alimentar (PATRA e SAXENA, 2010).

Tanino condensado constituem em um polifenol naturalmente encontrado em várias espécies vegetais, possível de ser extraído comercialmente e com potencial de ser utilizado como aditivo alimentar. Dentre os potenciais efeitos benéficos do uso de tanino condensado que se tem indícios na literatura cita-se: possibilidade de alterar o perfil fermentativo do rúmen e reduzir a relação acetato:propionato, reduzir emissão de metano e excreção de nitrogênio no ambiente (NORRIS, 2020).

Vários trabalhos foram desenvolvidos buscando entender o efeito dos taninos condensados na dieta de bovinos, porém a maioria dos estudos testaram doses superiores a 1,5% de inclusão e, apesar de alguns efeitos benéficos, obtiveram alta recorrência de efeitos negativos, como a redução da digestibilidade de nutrientes e do consumo de matéria seca. (NORRIS, 2020; PIÑEIRO-VÁZQUEZ *et al.*, 2017). Apesar de existirem, são escassos estudos com doses inferiores a 1,5%, portanto, mais trabalhos são necessários para tentar explorar os efeitos benéficos da molécula com redução efeitos negativos.

Nesse contexto, o atual trabalho teve por objetivo estudar se há e quais os efeitos de baixos níveis de inclusão de um aditivo natural à base de tanino de *Acacia mearnsii* (0 a 0,64% MS da dieta) sobre digestibilidade ruminal de nutrientes dietéticos e parâmetros de fermentação, utilizando técnicas *in vitro* e *in situ*.

## **2 HIPÓTESE**

Baixas doses de extrato de tanino (menores que 0,64% da MS da dieta) podem reduzir relação acetato:propionato sem alterar a digestibilidade da dieta, pH ruminal e produção de demais ácidos orgânicos.

## **3 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **3.1 Taninos**

#### **3.1.1 Caracterização geral**

As plantas podem produzir uma ampla variedade de compostos secundários, dentre os quais, destaca-se três grupos principais: terpenos, compostos nitrogenados e compostos fenólicos, sendo que, neste último grupo, encontra-se os Taninos (AGOSTINI COSTA *et al.*, 2012). Taninos são polímeros de polifenóis solúveis em água e em solventes orgânicos polares de peso molecular relativamente alto (500-3000 unidades de massa atômica), que podem formar complexos com diferentes substratos, tais como íons metálicos, polissacarídeos e proteínas, e, no caso destas precipitando-as (HARTISH; KOLODZIEJ, 1997; SMERIGLIO *et al.*, 2017). Essa capacidade de formar complexos com outros substratos está relacionada à presença de muitos grupos hidroxila fenólicos capazes de fazer ligações de hidrogênio inter e intramoleculares (HARTISH; KOLODZIEJ, 1997).

A formação de complexos proteína-taninos depende de vários fatores, dentre os quais cita-se: pH e força iônica do meio, ponto isoelétrico da proteína, presença e concentração de diferentes compostos (PEDREIRO, 2018).

Os taninos que ocorrem nas plantas, podem ser classificados principalmente em dois tipos, conforme sua estrutura e propriedades químicas: 1) taninos hidrolisáveis (TH) e 2) taninos condensados (TC) (HAGERMAN *et al.*, 1992). Os TH possuem um núcleo central de carboidrato (geralmente d-glicose) ao qual os ácidos carboxílicos fenólicos são ligados por ésteres de ácido gálico (galotanino) ou ácido elágico (elagitaninos), já os TC são aqueles que não possuem carboidrato central e são derivados por condensação de precursores de flavonoides ou polímeros de flavonoides (BAKER, 1999) (Figura 1).

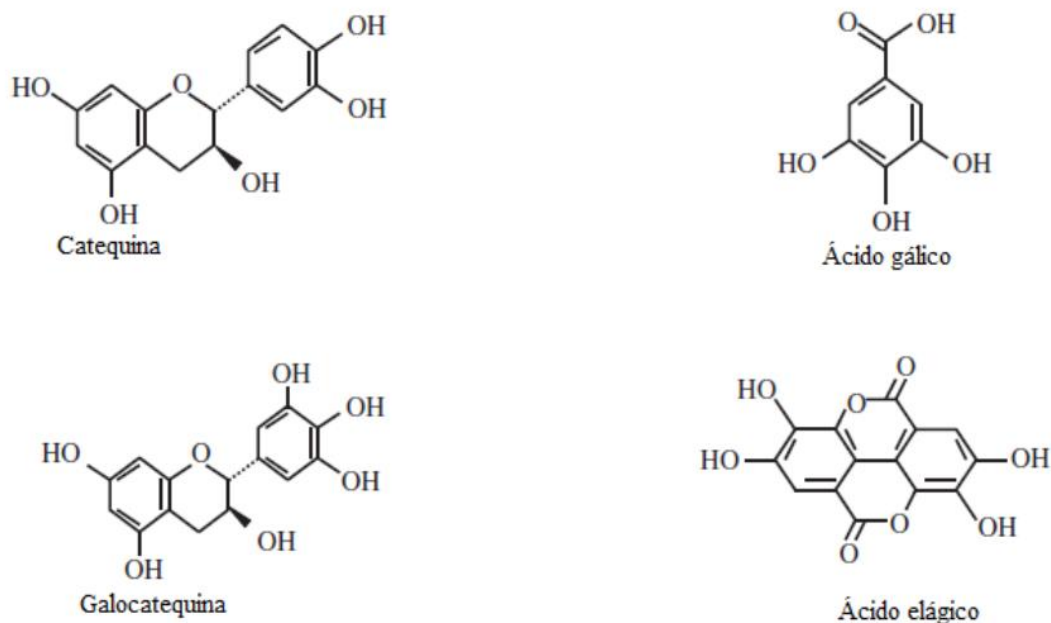


Figura 1. Unidades monoméricas de taninos condensados (catequina e galocatequina) e taninos hidrolisáveis (ácido gálico e ácido elágico). Fonte: Adaptado de Patra e Saxena (2010).

Os TH ocorrem principalmente em frutos e galhas de plantas, além de árvores e arbustos em áreas tropicais, ao passo que TC são mais comumente encontrados em leguminosas forrageiras, árvores e arbustos, tendo maior importância para a nutrição de ruminantes (MIN *et al.*, 2003).

Os TC tem aplicabilidade em alguns processos industriais, como adstringente ou estabilizante na indústria de alimentos (WAGHORN, 2008), produção de resinas para uso na indústria de painéis de madeira (BATTESTIN *et al.*, 2004), aplicações na indústria coureira por meio do princípio de associação dos polifenóis com o colágeno (VICKERY; VICKERY, 1981), tratamento de águas de abastecimento e de efluentes industriais, como coagulantes e floculantes e como condicionadores de lama para perfuração de poços de petróleo (SANTOS; MELLO, 1999). Toda essa aplicabilidade faz com que haja processos industriais bem estabelecidos para obtenção da molécula de forma economicamente viável.

Além da utilização em processos industriais, houve um crescente interesse do uso de taninos como aditivo alimentar em dietas de ruminante, justificada pela potencial ação antibiótica dos taninos sobre algumas populações microbianas ruminais e também devido às proibições de utilização de ionóforos tradicionais em alguns países (AVILA *et*

al.,2020; KOENIG; BEAUCHEMIN, 2018; AGUERRE *et al.*, 2016; AHNERT *et al.*, 2015).

### 3.1.2 Taninos condensados de Acácia Negra (*Acacia mearnsii*)

Os taninos condensados, também designados por proantocianidinas são flavonóides poliméricos, constituídos geralmente por subunidades de 3-flavanóis (PEDREIRO, 2018) e várias plantas são ricas desse tipo de molécula. Dentre as plantas ricas em TC, destaca-se a Acácia negra (*Acacia mearnsii*). Acácia negra é uma árvore (10 a 30 m de altura), oriunda da Austrália e com boa adaptabilidade a diferentes tipos de solo (SCHNEIDER *et al.*, 2000). Várias plantas possuem a presença tanto de TC, quanto TH em sua composição, porém, Ahmed *et al.* (2005) observaram apenas a presença de TC em cascas da espécie *A. mearnsii*.

No Brasil, acácia negra é cultivada majoritariamente na região sul para a extração comercial de taninos a partir de sua casca (RIBEIRO, 2014) e o fluxograma do processo de extração do tanino é descrito na Figura 2.

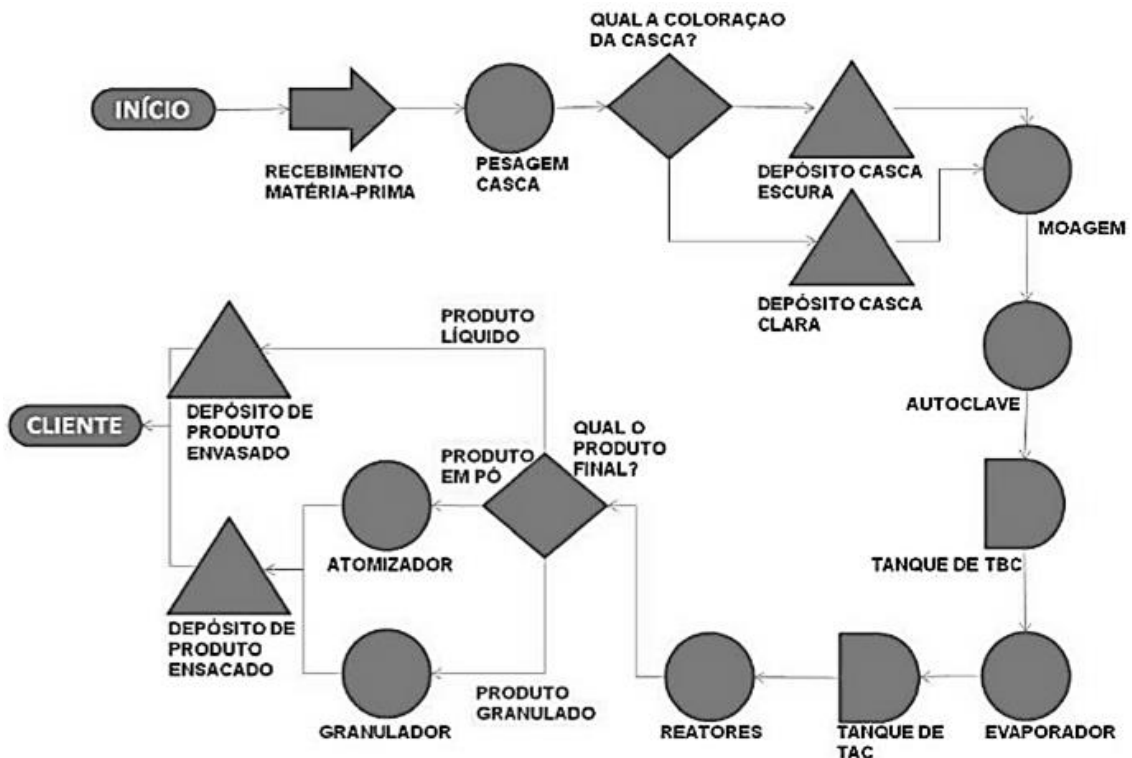


Figura 2. Fluxograma do processo de obtenção de taninos a partir da casca de *Acacia mearnsii*. Em que TAC: tanino de alta concentração; TBC: Tanino de baixa concentração (MENEZES, 2013).

### 3.1.3 Taninos na alimentação de ruminantes

Muitas vezes taninos são associados à impactos negativos na produção animal e são frequentemente descritos como fatores anti-nutricionais. Dentre os impactos negativo associados a taninos da dieta, cita-se: redução na ingestão e digestibilidade do alimento e, conseqüentemente, redução na produtividade animal (MUELLER-HARVEY, 2006; HERVÁS *et al.*, 2003; AGUERRE *et al.*, 2016). Os efeitos negativos dos taninos estão associados principalmente a altas concentrações desse composto na dieta (KOZLOSKI *et al.*, 2012). Altas taxas de consumo de tanino pelos ruminantes podem ocorrer: naturalmente, devido a existência de uma grande variedade de plantas forrageiras ricas nesse composto ou pela inclusão de extratos concentrados na dieta.

Kumar e Vaithyanathan (1990) destacaram três como os motivos principais para redução de consumo, comumente observada quando ruminantes são expostos a dietas de alto nível de tanino: 1) redução da palatabilidade da dieta, associada ao aumento da adstringência pela a ligação de taninos e proteínas salivares; 2) distensão ruminal, resultante do enchimento causado pela redução na digestibilidade da MS, especialmente da FDN e 3) resposta hormonal induzida pela ligação dos taninos à parede celular do intestino delgado, que além de inativar enzimas, induz reação imunológica.

A redução da digestibilidade da MS do alimento se deve principalmente à capacidade de taninos se ligarem a outros compostos dietéticos, como proteínas, celulose, hemicelulose, pectina e minerais, reduzindo a degradabilidade ruminal e/ou retardando a sua digestão (MCSWEENEY *et al.*, 2001). A reatividade do tanino com compostos alimentares ocorre quando há condições no meio para tal, principalmente associado ao valor de pH (maior reatividade em valores próximos à neutralidade) e pode ser reversível quando as condições do meio não forem mais adequadas para sustentar a reação, como por exemplo em ambientes ácidos (OLIVEIRA; BERCHIELLI, 2007).

Além do efeito sobre as proteínas alimentares, taninos também podem prejudicar a digestibilidade da matéria seca (MS), por meio da formação de complexos com enzimas secretadas e proteínas endógenas, reduzindo a eficiência dos processos digestivos (BUTLER, 1992). Waghorn (2008) observou que dietas ricas em tanino (> 5% MS) podem afetar negativamente a produção animal quando a proteína bruta (PB) da dieta é um fator limitante, porque altas doses de taninos podem dificultar a dissociação por completo desse composto com a proteína dietética no intestino delgado e, conseqüentemente, reduzir a absorção de aminoácidos.

O ácido gálico e os produtos oriundos da degradação de taninos hidrolisáveis, ao contrário daqueles oriundos de taninos condensados, podem ser absorvidos no intestino delgado de animais (MCLEOD, 1974) e são potencialmente tóxicos para ruminantes (DOLLAHITE *et al.*, 1962; HAGERMAN *et al.*, 1992).

Apesar dos efeitos dietéticos negativos, taninos, quando consumidos em baixas concentrações, podem ter efeito de modulador do ambiente ruminal, por ação antibiótica em alguns grupos de microrganismos, principalmente protozoários, arqueias e bactérias fibrolíticas (BRUTTI, 2017). A capacidade de atuação como antibiótico tem como mecanismo principal a inativação de enzimas digestivas desses grupos de bactérias, dificultando a obtenção de nutrientes (BRUTTI, 2017).

A capacidade desses compostos de manipular o ambiente ruminal é uma característica de interesse zootécnico, pois pode acarretar em benefícios à produtividade animal com a utilização de taninos como aditivos alimentares. O interesse na utilização de taninos como aditivos alimentares se torna ainda maior, devido às restrições de algumas classes de ionóforos em alguns locais, como, por exemplo, a proibição para fins não médicos em animais estabelecida pela legislação da União Europeia a partir de janeiro de 2006 (número CE 1831/2003).

Além da ação antibiótica, taninos ainda podem ser explorados nutricionalmente para reduzir a velocidade e o potencial de degradabilidade ruminal de alguns nutrientes, podendo melhorar a sincronização de liberação e, conseqüentemente, aumentar a eficiência microbiana (MAKKAR *et al.*, 2003; BHATTA *et al.*, 2009), aumentando a eficiência de utilização do N dietético (BRUTTI, 2017) e aumentando a secreção de proteína no leite (BARRY; MCNABB, 1999).

Woodward *et al.* (2001) e Waghorn *et al.* (2002) observaram que a utilização de taninos como suplemento alimentar teve potencial para reduzir em até 20% as emissões entéricas de metano (CH<sub>4</sub>), quando comparado a dietas sem a utilização de aditivos. Outros benefícios, como redução de casos de timpanismo e aumento nas concentrações de ácido linoleico conjugado no leite também foram relatados (BENCHAAR *et al.*, 2008; CIESLAK *et al.*, 2012).

Em geral, os efeitos da presença de taninos na dieta de ruminantes dependem da dose e do tipo de tanino. Grainger *et al.* (2009) descrevem que os efeitos dos taninos na dieta podem ser potencializados pela adstringência ou a presença de taninos hidrolisáveis. Grainger *et al.* (2009) mostraram que TC da espécie Quebracho (*Schinopsis spp.*), parece

ser menos adstringente e com menor capacidade de influenciar na fermentação que TC da espécie Acácia negra (*A. mearnsii*).

Taninos condensados de *Acacia mearnsii* têm sido usados como aditivo para modificar a fermentação ruminal e/ou melhorar a digestibilidade de nutrientes em ruminantes (PERNA JUNIOR *et al.*, 2017; KOZLOSKI *et al.*, 2012); entretanto, segundo Avila *et al.* (2020), os resultados encontrados na literatura ainda são conflitantes, sendo necessário maiores estudos para elucidar a eficiência ou não desse aditivo.

### **3.1.4 Interação entre taninos e nutrientes da dieta**

A utilização de concentrações de TC (20-40 g/kg na MS) na dieta pode ser uma alternativa para otimização do fornecimento de proteínas aos ruminantes (AHNERT *et al.*, 2015), devido à capacidade dos taninos em se ligar às proteínas e formar complexos tanino-proteínas, aumentando o escape ruminal e, conseqüentemente, os teores de proteína não degradável no rúmen (PNDR)

Dentre os fatores responsáveis por otimizar ou possibilitar a reação entre TC e proteínas, o pH do meio tem papel fundamental e cada proteína tem um pH ótimo para interação (JONES; MANGAN, 1977). Oliveira e Berchielli (2007) relataram que em pH quase neutro (6,5 – 7,5) TC podem se ligar a proteínas e formar complexos TC-proteína, que se dissociam em meios com pH inferior a 3,5.

Devido a presença de minerais como cálcio, magnésio, sódio e potássio (BRUTTI, 2017) e aos valores de pH normalmente encontrados, o rúmen é um ambiente propício à formação de complexos tanino-proteínas (OLIVEIRA; BERCHIELLI, 2007).

Complexos tanino-proteína são resistentes à degradação por microrganismos ruminais e podem reduzir as taxas de degradação da proteína em nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>), aumentar o fluxo de proteína para o intestino delgado (MAKKAR, 2003; BEAUCHEMIN *et al.*, 2007; AL-DOBAIB, 2009) e reduzir a excreção de N na urina. Alguns autores observaram um potencial aumento nos teores de N fecais em compensação às reduções de N urinário (DSCHAAK *et al.*, 2011).

O abomaso é um ambiente propício à dissociação dos complexos tanino-proteínas, devido às características ácidas do meio, possibilitando a posterior absorção das proteínas no duodeno (OLIVEIRA; BERCHIELLI, 2007). Kariuki e Norton (2008) verificaram a ocorrência de dissociação pós-ruminal dos complexos tanino-proteínas, por meio de infusão abomasal de um complexo taninoalbumina, que teve alta taxa de aproveitamento pelo animal.



Avaliando a inclusão de extratos de taninos para vacas em lactação, Aguerre *et al.* (2016), observaram que a complexação desses polifenóis com a proteína dietética, aumentou a fração de PNDR, reduzindo as concentrações de amônia e ácidos graxos de cadeia ramificada no rúmen e nitrogênio ureico no sangue. Porém, taninos podem ter reduzido a atividade microbiana ruminal, reduzindo a digestibilidade dos nutrientes em geral e o aporte de proteína microbiana no duodeno. Ahnert *et al.* (2015) observaram menor fluxo duodenal de proteína microbiana com uso de TC de quebracho para novilhos, além de aumento nos teores de N fecal com níveis crescentes de TC na dieta, sugerindo que o aumento da PNDR com uso de taninos pode estar relacionado a perdas de digestibilidade da proteína (aumento da fração C) ou maiores perdas de proteínas endógenas.

Apesar de já ser conhecida a capacidade de TC dissociarem quando o pH do meio se reduz abaixo de 3,5 não pode-se garantir que essa proteína será digerida e absorvida, uma vez que o pH intestinal aumenta para valores acima de 5,0 após o piloro (TERRIL *et al.*, 1994), podendo ocorrer uma nova associação entre TC e proteínas (MCNABB *et al.*, 1998) ou uma ligação dos TC com enzimas digestivas prejudicando a absorção de aminoácidos (WAGHORN *et al.*, 1999).

Avila *et al.* (2020) em um estudo utilizando TC de acácia negra na dieta de novilhos Jersey observaram que a inclusão de TC em níveis de até 20 g/kg de MS reduziu a digestibilidade aparente da PB e não recomendaram esses níveis de inclusão de TC para melhoria da utilização de nutrientes em novilhos. Beauchemin *et al.* (2007) obtiveram redução na digestibilidade total aparente da PB em novilhos.

A capacidade dos taninos de se complexarem com proteínas depende não somente da concentração total de tanino, como também da estrutura da molécula, dessa forma, há dificuldades em correlacionar concentração de tanino na dieta com os efeitos esperados. Min *et al.* (2003) relataram que concentrações equivalentes de diferentes fontes de taninos concentrados tiveram variados efeitos na degradação da PB, uma vez que a reatividade entre TC e proteínas depende parcialmente do peso molecular, tipo de estrutura terciária e o conteúdo em aminoácidos das proteínas.

Além da alta afinidade que os TCs têm em se ligar as proteínas, eles podem se complexar com outros polímeros, tais como: celulose, hemicelulose, pectina e amido (SMITH *et al.*, 2005; AHNERT *et al.*, 2015). Quando avalia-se os efeitos dos taninos sobre as fibras, esses efeitos podem ocorrer principalmente de duas formas: redução da digestão da fibra por complexação com lignocelulose, causando indisponibilização de

substratos para a digestão (MCSWEENEY *et al.*, 2001; SMITH *et al.*, 2005; AHNERT *et al.*, 2015) ou ação antimicrobiana dos TC sobre bactérias celulolíticas e fungos (PATRA; SAXENA, 2009).

Dickhoefer *et al.* (2016) observaram que o acréscimo de tanino na dieta acarretou em redução nas proporções de acetato e aumento nas concentrações de propionato no rúmen. Avila *et al.* (2020) observaram que o uso de CT de acácia negra (*A. mearnsii*) em níveis de até 20 g/kg reduziu a proporção de acetato para novilhos. Alterações nas proporções de ácidos graxos produzidos no rúmen, podem estar associadas a reduções nas populações de bactérias fibrolíticas (DICKHOEFER *et al.*, 2016).

Ahnert *et al.* (2015) observaram que a inclusão de TC de quebracho em níveis de até 6% para novilhos acarretou em redução na síntese de proteína microbiana, mesmo com valores de N-amoniaco do líquido ruminal dentro da variação ótima para o crescimento microbiano, sugerindo que o efeito negativo estava associado à redução na digestibilidade dos carboidratos, reduzindo a disponibilidade de energia para os microrganismos ruminais.

Alguns trabalhos mostraram que pode haver menor atividade microbiana e redução na degradação da fibra em resposta ao uso de taninos na dieta, o que normalmente está ligada a uma redução na produção de AGV totais (BHATTA *et al.*, 2009; CASTRO-MONTOYA *et al.*, 2011). Por outro lado, Dickhoefer *et al.* (2016) obtiveram aumento nas concentrações de AGV, quando incluíram taninos de quebracho (1 a 6% da MS) na dieta de novilhos.

### **3.1.5 Efeitos sobre a população de microrganismos ruminais**

Apesar do potencial efeito antibiótico do tanino para algumas espécies de bactérias, principalmente celulolíticas, McSweeney *et al.* (2001) destacaram que a inclusão de taninos não parece comprometer a síntese microbiana total, devido ao favorecimento do crescimento de outras espécies, devido a redução da competição por substrato, ou seja, há um efeito de substituição de espécies. Smith *et al.* (2005) destacam ainda que microrganismos ruminais podem desenvolver adaptações para reduzir efeitos negativos dos taninos, tais como: detoxificação dos taninos, síntese de polímeros complexantes com taninos e formação de glicocalix extracelular.

Trabalhos mostraram a redução de populações ruminais de *Butyrivibrio fibrisolvens* (MIN *et al.*, 2003) e *Fibrobacter succinogenes* (BAE *et al.*, 1993; MCSWEENEY *et al.*, 2001) em animais consumindo TC quando comparados a animais

não consumindo o que pode reduzir a digestibilidade da fibra dietética com consumo de tanino. O efeito de taninos sobre microrganismos celulolíticos pode estar associado a efeito direto sobre os microrganismos ou sobre as enzimas extracelulares produzidas por esses, atrapalhando funções celulares vitais (PATRA; SAXENA, 2010).

Protozoários ciliados são predadores de bactérias ruminais e esse consumo de bactérias acarreta desperdício de energia e aumento da reciclagem indesejável de nitrogênio no rúmen (BAAH *et al.*, 2007), com isso, ainda segundo Baah *et al.* (2007), reduções nas populações de protozoários no rúmen influenciam na redução das concentrações de amônia no fluído ruminal e aumentam o fluxo de nitrogênio não amoniacal, aminoácidos e N bacteriano para o intestino. Dependendo da concentração e origem (BENCHAAR *et al.*, 2008), há evidências para a possibilidade de redução no número de protozoários com a presença de taninos (MAKKAR, 2003).

Apesar das evidências de efeito, o resultados da adição de TC sobre a população de protozoários são conflitantes: Bhatta *et al.* (2009) avaliaram uma mistura de taninos hidrolisáveis e condensados e observaram uma redução na população total de protozoários, enquanto Avila *et al.* (2020) não observaram redução na população de protozoários com a inclusão de taninos na dieta (20 g/Kg). Benchaar *et al.* (2008) avaliaram o uso de taninos de quebracho (6,40 g/kg de MS) e não observaram efeito sobre o número e distribuição genérica de protozoários ciliados. Alguns estudos com TC de *A. mearnsii* observaram uma diminuição na população de protozoários *Holotrich* (CARULLA *et al.*, 2005; PERNA JUNIOR *et al.*, 2017).

Microrganismos metanogênicos são comumente ligados aos protozoários, seja intercelularmente ou anexo à superfície celular externa dos protozoários (Anantasook *et al.*, 2015). Alguns trabalhos correlacionam a maior produção de metano com o maior número de protozoários presentes (BHATTA *et al.*, 2009). Dessa forma, pode-se obter a redução na produção de metano ruminal com o uso de TC.

Além do efeito sobre os protozoários, a influência do TC na dieta sobre a microbiota ruminal e as emissões de CH<sub>4</sub> foram relatadas (MIN *et al.*, 2003; CARULLA *et al.*, 2005; GRAINGER *et al.*, 2009). Pesquisas sobre estratégias de inibição de CH<sub>4</sub> associadas a dietas ricas em tanino ou extratos de TC *in vivo* foram conduzidas com gado de corte (KRUEGER *et al.*, 2010), ovelhas (WAGHORN *et al.*, 2002 ; WOODWARD *et al.*, 2001, 2002; SLIWINSKI *et al.*, 2004; TIEMANN *et al.*, 2008), vacas leiteiras (WOODWARD *et al.*, 2001; BEAUCHEMIN *et al.*, 2007) e cabras (ANIMUT *et al.*,

2008) e, apesar desses trabalhos, os mecanismos dos efeitos associativos entre TC e metanogênese não são bem compreendidos.

## **3.2 Técnicas *in vitro* de avaliação da fermentação ruminal**

### **3.2.1 Caracterização geral**

Dentre as técnicas experimentais para estimativa da digestibilidade de alimentos e/ou dietas, o ensaio *in vivo* é considerado o melhor e mais preciso método disponível (DIJKSTRA *et al.*, 2005), porém, devido à onerosidade e as questões éticas para experimentação com animais vivos, vários métodos *in vitro*, que simulam os processos que acontecem no animal vivo, são propostos como alternativa para o estudo de alimentos na nutrição de ruminantes.

O uso das técnicas *in vitro* permite a manipulação de um ou mais parâmetros do animal que, se mantiverem a correlação com os eventos biológicos *in vivo*, podem ser apropriadas para estudar a resposta do animal a um fator, minimizando interferência de outros (LEMOS, 2013).

Apesar de tentar modular os eventos biológico que acontecem *in vivo*, simular exatamente todas as condições reais com toda sua complexidade, não deve ser objetivo de um sistema *in vitro*, pois é a possibilidade de simplificação do sistema ruminal que torna essas técnicas interessantes (MADEIRA, 1992).

As principais vantagens das técnicas *in vitro* são: (1) capacidade de testar vários tratamentos em um curto período de tempo; (2) capacidade de testar níveis mais elevados e até potencialmente tóxicos de um determinado aditivo alimentar; e (3) baixo custo experimental quando comparado com experimento com animais vivos (HRISTOV *et al.*, 2012). López (2005) classifica os sistemas *in vitro* em dois tipos principais: culturas *batch* (ou incubações em massa) e culturas contínuas.

### **3.2.2 Cultura *batch* (incubação em massa) e técnica de produção cumulativa de gases *in vitro***

Cultura *batch* consiste na incubação de um substrato para estimativa da extensão da degradação no rúmen ou a digestibilidade por medidas em um único ponto final (NETO, 2015). Ainda conforme Neto (2015), a principal desvantagem desse tipo de sistema é não ser possível o alcance do estado de equilíbrio, pois não há reposição de substrato e remoção de produtos finais. São exemplos de cultura em massa o uso de *filter bags*, a metodologia de Tilley e Terry (1963) e a técnica de produção cumulativa de gases *in vitro*.

A produção cumulativa de gases *in vitro* permite avaliar diversos parâmetros de fermentação ruminal de ingredientes utilizados na nutrição de animais ruminantes, tais como: degradação da matéria seca (MS), proteína e fibra, bem como a produção de ácidos graxos voláteis (AGVs) e a síntese de proteína microbiana (KEIM *et al.*, 2017). Esta técnica considera a conversão dos principais carboidratos da dieta de animais ruminantes (amido, pectinas, celulose e hemicelulose) em gases oriundos da fermentação (H, CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>), além da reação dos AGVs com o bicarbonato (MIZUBUTI *et al.*, 2014). A técnica permite a determinação da importância das frações de cada carboidrato no fornecimento de energia aos microrganismos ruminais (PELL; SCHOFIELD, 1993), além de considerar equivalente a produção de gás e massa celular bacteriana em relação à quantidade de substrato digerida (MIZUBUTI *et al.*, 2014). A primeira versão da técnica foi proposta por Menke *et al.* (1979), a qual media a pressão oriunda do processo fermentativo de alimentos volumosos, em seringas de vidro.

Com o passar do tempo, a metodologia proposta por Menke *et al.* (1979) sofreu modificações propostas inicialmente por Pell e Schofield (1993). Ainda baseada em estudos com alimentos volumosos, a adaptação passou a ser considerada uma técnica semi-automatizada, uma vez que os dados de pressão são registrados por sistema computadorizado com sensores de pressão (PELL; SCHOFIELD, 1993). Outra modificação foi proposta por Theodorou *et al.* (1994), a qual permitia verificar a cinética de degradação ruminal de outros alimentos, além das forragens. Este sistema, permite a geração de gráficos que representam as curvas de produção cumulativa de gases dentro de frascos de incubação (THEODOROU *et al.*, 1994). Atualmente, o sistema automático de produção de gás *in vitro* é composto por frascos de incubação equipados com transdutores de pressão sem fio conectados a um computador, os quais permitem registrar a pressão cumulativa dentro dos frascos em intervalos de tempo pré-estabelecidos (ANKOM TECHNOLOGY, s/d)

Entretanto, a técnica apresenta limitações que devem ser consideradas, tais como: 1) baixo volume de amostra utilizado, o que amplifica a possibilidade de erro experimental; 2) dificuldade para padronizar e conservar os alimentos utilizados, uma vez que é necessária a correção dos desvios causados no perfil da população microbiana encontrada no líquido ruminal; 3) *in vitro*, a produção de gás de determinado alimento pode se baixa comparado com situação *in vivo*; 4) as flutuações do pH dos alimentos e do líquido ruminal no sistema fechado, podem interferir negativamente no desenvolvimento

da flora microbiana, o que reduz as taxas de degradação dos alimentos ao final do período de incubação (MIZUBUTI *et al.*, 2014).

### 3.2.3 Técnicas de cultura contínua

As técnicas de cultura contínua (CC) foram desenvolvidas como alternativa para estudo do metabolismo ruminal em condições mais próximas à fermentação *in vivo*, quando comparadas às incubações em massa (HOOVER *et al.*, 1976). A principal vantagem das técnicas de CC em relação as incubações em massa é a possibilidade de manutenção da cultura por períodos maiores e de forma relativamente estável (CZERKAWSKI; BRECKENRIDGE, 1977).

É possível um maior tempo de cultivo nos sistemas de CC porque há a adição regular de tampão e nutrientes, além da remoção contínua de produtos da fermentação, atingindo condições de equilíbrio (HOOVER *et al.*, 1976). Em CC é possível o estabelecimento de uma população microbiana estável e que pode ser mantida por maiores períodos de tempo, possibilitando a medição de parâmetros de fermentação, degradação de nutrientes, produtos finais e síntese de proteína microbiana (LÓPEZ, 2005).

Os primeiros registros de tentativas de criação de sistemas de CC eficientes, segundo Madeira (1992), datam da década de 1950, quando o trabalho intitulado "*La Technique de Cultura Continue: Théorie et Applications*" (MONOD, 1950), apresentou bases teóricas para modelagem da cinética da fermentação que permitiriam o cultivo de microrganismos em condição de equilíbrio dinâmico a uma taxa constante de crescimento microbiano e com a manutenção da composição do meio de cultura.

Warner (1956), propôs critérios para padronização de sistemas *in vitro* para cultivo de microrganismos ruminais a fim de garantir o rigor científico, a repetibilidade e a possibilidade de comparação dos resultados gerados. Os critérios propostos por Warner (1956) para que um sistema de CC seja considerado adequado foram: a) manutenção da quantidade e aparência normais das bactérias e protozoários; b) manutenção de taxas normais de digestão de celulose, amido e proteína, e as interações normais entre essas taxas; e c) habilidade de previsões quantitativas de resultados *in vivo*.

Um dos primeiros trabalhos que obtiveram sucesso na manutenção de microbiota ruminal em sistema de CC com fluxo contínuo de saliva foi proposto por Rufener *et al.* (1963), onde seis fermentadores foram mantidos com infusão constante de saliva que proporcionava a renovação de 1,43 volumes por dia. Para estabelecer essa taxa de

renovação e o fornecimento de substrato, foram utilizados como referência os valores médios equivalentes a um bovino adulto de 500 kg, com volume ruminal de 70 litros.

Slyter *et al.* (1964) propuseram alterações no modelo proposto por Rufener *et al.* (1963), principalmente trocando o material do recipiente do fermentador de plástico para vidro e aumentando a taxa de renovação para 1,5 vezes ao dia. O modelo de Slyter *et al.* (1964) atingiu o estado de "*steady-state*" com 4 dias de cultura e foi eficiente para manutenção da fermentação em estado constante pelos 21 dias de duração do ensaio (verificado pelas taxas de produção de AGVs), sugerindo que o modelo seria capaz de manter a cultura pelo tempo que necessário fosse.

Ao longo do tempo, o modelo de Slyter *et al.* (1964) teve várias modificações importantes como o aumento do volume do vidro e o fornecimento de substrato para cultura de forma direta no meio (sem o acondicionamento em sacos, como ocorria no modelo original), porém, até 1976, todos os modelos mantiveram a característica de ser sistemas de CC de fluxo simples, isso é, a existência de apenas um único orifício para remoção de material do meio, que ocorre por transbordo, para os efluentes líquidos e sólidos. (MADEIRA, 1992).

Apesar do sucesso na obtenção de estado de "*steady-state*" e na manutenção das bactérias ruminais no CC de fluxo simples, tanto o modelo proposto por Rufener *et al.* (1963), quanto Slyter *et al.* (1964), não obtiveram êxito na manutenção da população de protozoários no meio de cultura. Rufener *et al.* (1963) observaram o decréscimo na população de protozoários na ordem de cem vezes. Slyter e Putnam (1967) relataram que os números de protozoários diminuem acentuadamente em comparação com os níveis ruminais.

Hoover *et al.* (1976) atribuíram a redução na população de protozoários nos sistemas de CC de fluxo simples ao uso de taxas de renovação acima de 1 volume/dia, pois nessas condições o tempo de geração desses microrganismos seria maior do que seu tempo de permanência no fermentador. Quando utilizada taxa de diluição maior que 1,0 (volume do fermentador/dia), o número de protozoários declina devido ao carreamento e quando a taxa de diluição é menor que 1,0 pode ocorrer declínio desses microrganismos devido ao acúmulo de produtos finais da fermentação e consequente queda no pH do meio (ABE; KUMENO, 1973).

Em condições ruminais *in vivo*, as taxas de renovação de líquidos superam 1,5 volume/dia, sendo que a taxa de passagem dos protozoários do rúmen para o omaso corresponde a apenas de 6 a 29% da taxa de fluxo de líquidos (HOOVER *et al.*, 1976).



Dessa forma, para manutenção do número de protozoários, os sistemas de culturas contínuas devem retardar o fluxo da digesta sólida, enquanto permite o fluxo líquido a uma taxa similar à rúmen (HOOVER *et al.*, 1976).

Hoover *et al.* (1976), na tentativa de solucionar o problema da manutenção da população de protozoários do inóculo no meio de cultura, propôs uma significativa adaptação aos modelos de fermentadores existentes até então: a incorporação de um sistema duplo de remoção de efluentes. O sistema de dupla remoção proposto por Hoover *et al.* (1976) consistia na manutenção do sistema de transbordo do volume excedente, porém com o acréscimo de uma bomba com filtro para remoção de produtos da fermentação e principalmente líquidos do meio. Este sistema de dupla saída permite a remoção de líquido e sólidos com taxas diferentes, simulando o diferencial para os fluxos de líquidos e sólidos e não prejudicando a manutenção da quantidade de protozoários, pois reduz a passagem desses microrganismos por transbordo (HOOVER *et al.*, 1976).

Hoover *et al.* (1976), para validação da proposta de CC de fluxo duplo, relataram que em quatro incubações, com variadas taxas de renovação total (1,32 a 1,52 volumes/dia), a população de protozoários se manteve em valores próximos a contagem do inóculo.

O equipamento original proposto por Hoover *et al.* (1976) é composto por um vaso fermentador de vidro com uma porta de transbordamento para permitir um volume de líquido máximo de 2.277 mL. O vaso é magneticamente agitado e aquecido por um *spray* de água quente controlado termostaticamente, possui entradas para solução tampão, alimentação sólida e para o gás nitrogênio, além de um termostato. No sistema há ainda um filtro acoplado a uma bomba para remoção de material filtrado e líquidos, com controle independente da saída de efluentes sólidos e dosadores de ácido e base que podem ser utilizados em experimentos que se deseja controlar o pH do meio (HOOVER *et al.*, 1976). Um diagrama esquemático do aparelho é mostrado na Figura 3.

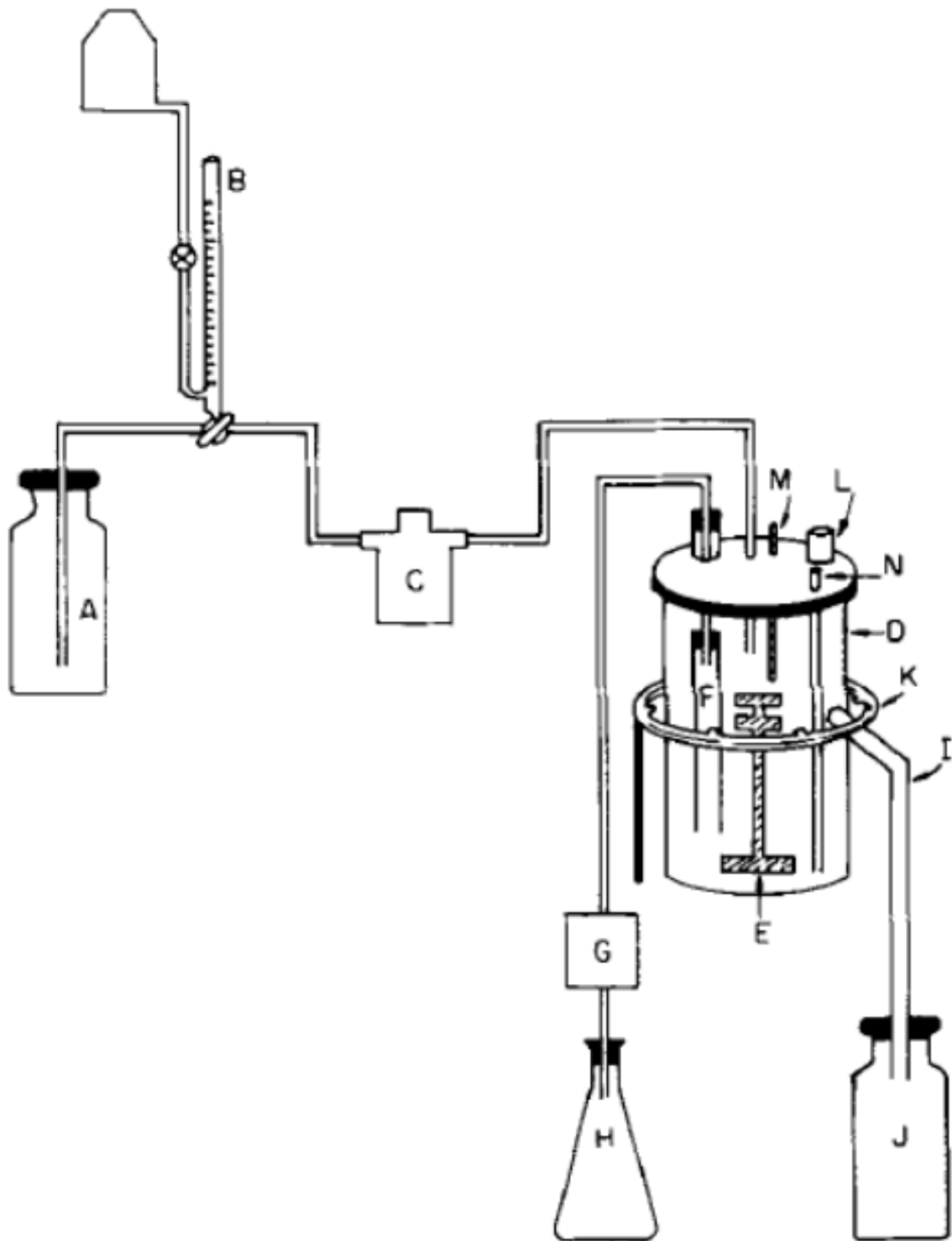


Figura 3. Representação esquemática de aparelho de cultura contínua de fluxo duplo, proposto por Hoover *et al.* (1976). A. reservatório para solução tampão; B. bureta; C. bomba peristáltica; D. jarro fermentador; E. agitador magnético; F. filtro; G. bomba peristáltica; H. reservatório de efluente filtrado; I. saída de transbordo; J. reservatório de efluentes de transbordo K. anel de aspersão de água aquecida; L. orifício de alimentação; M. porta entrada para sonda térmica; N. porta de entrada de gás (HOOVER *et al.*, 1976).

Após a criação do sistemas de cultivo contínuo de fluxo duplo de Hoover *et al.* (1976), alguns autores propuseram melhorias e/ou adaptações, como, por exemplo, Del Bianco Benedeti *et al.* (2015) e Silva *et al.* (2016), porém, não houve nenhuma grande alteração conceitual na metodologia, restringindo a maior parte das modificações à automações de procedimentos. Portanto, a maioria dos trabalhos com fermentadores de CC publicados após 1976 adotaram como base o equipamento proposto por Hoover *et al.* (1976).

Histrov *et al.* (2012) realizaram meta análise para investigar cento e oitenta estudos de efeitos da dieta ou dos aditivos alimentares na fermentação ruminal, nas populações microbianas e na digestibilidade dos nutrientes, publicados entre 1980 e 2010, objetivando a comparação entre técnicas de CC e entre CC e ensaios *in vivo*. Segundo Histrov *et al.* (2012), os ensaios em sistemas CC são geralmente caracterizados com menores concentrações totais de AGV e acetato, contagens extremamente baixas ou falta de protozoários ruminais e menores valores para digestibilidades de MO e FDN, quando comparados aos métodos *in vivo*. Histrov *et al.* (2012) ainda ressaltam que os dados de digestibilidade devem ser interpretados com o entendimento de que os sistemas CC são projetados para simular o rúmen, não o trato digestivo total. No geral, a variabilidade foi muito maior para CC em comparação com dados experimentais *in vivo*, o que pode ser parcialmente atribuído à variabilidade no projeto dos fermentadores de CC, variabilidade no inóculo ruminal e, talvez, tratamentos experimentais mais extremos do que aqueles *in vivo* (HISTROV *et al.*, 2012).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local dos experimentos

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Nutrição Animal do Centro Avançado de Pesquisa de Bovinos de Corte, Instituto de Zootecnia, situado no município de Sertãozinho, São Paulo, Brasil. Todos os procedimentos que envolvam animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Zootecnia (protocolo: 294-19).

### 4.2 Tratamentos e dietas experimentais

As dietas experimentais foram formuladas para atender ou exceder as recomendações do NRC gado de corte (NASEM, 2016), utilizando como referência animais nelores não castrados, com peso corporal (PC) inicial médio de 400 kg e PC final médio de 570 Kg, com um ganho diário de peso (GDP) de 1,45 Kg.

Tabela 1: Composição bromatológica média dos ingredientes dietéticos utilizados.

Ingrediente/ Nutriente	MS <sup>2</sup>	PB <sup>2</sup>	EE <sup>2</sup>	FDN <sup>2</sup>	Cinzas	CNF <sup>2</sup>
	% MN			% MS		
Milho, grão	89,56	10,45	4,02	5,28	1,00	79,25
Silagem de milho	30,12	8,75	2,86	45,67	7,02	35,7
Polpa cítrica	89,72	7,85	2,59	22,29	10,24	57,03
Caroço de algodão	93,89	25,95	19,24	45,97	6,95	1,94
Farelo de amendoim	92,43	60,65	1,28	21,53	7,74	8,8
Farelo de soja	90,90	49,18	1,94	15,93	5,68	27,27
Mistura mineral	97,23	---	---	---	87,59	---
TANFEED <sup>1</sup>	90,39	---	---	---	3,69	---

<sup>1</sup> Aditivo a base de tanino condensado de *Acacia mearnsii* (teor mín. 70% de tanino; Tanac SA, montenegor, RS, Brasil).

<sup>2</sup> MS = matéria seca; PB = proteína bruta; EE = extrato etéreo; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; CNF = carboidratos não fibrosos, determinado por cálculo, CNF = 100 – (PB + EE + Cinzas + FDN).

Fonte: do autor.

Tabela 2: Nível de inclusão de ingredientes e composição química das dietas utilizadas em todos os ensaios experimentais

Itens	Dose de tanino (% da MS)				
	0	0,08	0,16	0,32	0,64
<i>Ingrediente, % MS</i>					
Milho, grão	39,30	39,27	39,24	39,18	39,05
Silagem de milho	22,99	22,97	22,95	22,91	22,84
Polpa cítrica	18,41	18,39	18,38	18,35	18,29
Caroço de algodão	12,94	12,92	12,91	12,89	12,85
Farelo de amendoim	1,69	1,69	1,69	1,69	1,68
Farelo de soja	1,69	1,69	1,69	1,69	1,68
Mistura mineral	2,98	2,98	2,98	2,98	2,97
TANFEED <sup>1</sup>	0,00	0,08	0,16	0,32	0,64
<i>Composição nutricional</i>					
MS <sup>3</sup> (% MN)	95,34	95,74	95,78	95,68	95,53
PB <sup>3</sup> (% MS)	11,63	11,48	11,70	11,69	11,47
FDN <sup>3</sup> (% MS)	27,85	27,35	27,78	27,39	27,65
FDA <sup>3</sup> (% MS)	15,44	14,77	14,78	14,71	15,41
Cinzas (% MS)	7,09	7,12	7,09	7,07	6,97

<sup>1</sup> Aditivo a base de tanino condensado de *Acacia mearnsii* (teor mín. 70% de tanino; Tanac SA, montenigor, RS, Brasil).

<sup>2</sup> EPM = Erro Padrão da Média. Para EPM diferente entre médias de uma mesmo variável foi reportado o maior.

<sup>3</sup> MS = matéria seca; PB = proteína bruta; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido

Fonte: do autor.

Os tratamentos foram constituídos pela inclusão de diferentes doses de extrato de Tanino de Acácia Negra (*Acacia mearnsii*): 0; 0,08; 0,16; 0,32 e 0,64% (0; 0,06; 0,12; 0,25; 0,50 g de MS/dia/vaso fermentador) na matéria seca (MS) da dieta basal (Tabela 1). Todos os ingredientes foram moídos em um moinho do tipo *Willey* até atingirem a granulometria de 2 mm para o experimento 1 e 2 e granulometria de 1 mm para o Experimento 3. Antes da moagem, a silagem de milho foi seca em estufa de ventilação forçada a 55°C até estabilização de peso.

Tanto os bovinos doadores de líquido ruminal, quanto aqueles utilizados para etapa *in situ* receberam dieta na proporção 60:40 de forragem e concentrado sem aditivos, durante, pelo menos, 14 dias antes da coleta de fluido ruminal e durante todo o período de incubações. A forragem utilizada para alimentação dos bovinos utilizados nos

experimentos foi silagem de milho, assim como as dietas experimentais, e o concentrado foi composto de milho, soja e mistura mineral livre de aditivos alimentares.

#### **4.2 Experimento 1 - Sistema de cultura contínua de fluxo duplo (*Dual Flow Continuous Culture System*)**

**Descrição geral e coleta de amostras.** Para o ensaio experimental foram utilizados dez vasos fermentadores com volume individual médio de 1297,13 mL ( $\pm$  32,82 mL) em sistema de cultura contínua de fluxo duplo (modelo ENG-RM-1; Engco LTDA, Piracicaba, SP, Brasil), adaptados a partir do modelo proposto por Hoover *et al.* (1976).

Os fermentadores foram inoculados com uma mistura de fluido ruminal homogeneizado e não diluído, colhido aproximadamente duas horas após a alimentação, de dois bovinos machos da raça Nelore (peso corporal médio de 550 Kg) canulados no rúmen. O conteúdo ruminal foi coletado, filtrado manualmente em quatro camadas de gaze e acondicionado em recipiente térmico isolado e pré-aquecido até atingir um volume total de aproximadamente de 13 L. Após a coleta, o líquido ruminal foi homogeneizado em *Erlenmeyer* de 5.000 mL mantido a 39°C em banho maria pré aquecido e com infusão contínua de nitrogênio gasoso (N<sub>2</sub>) para manutenção da anaerobiose. Após homogeneização, o líquido ruminal foi transferido para cada um dos vasos fermentadores até que houvesse o transbordo no vaso fermentador (1297,13 mL/vaso de volume, em média).

Durante o período experimental os fermentadores foram alimentados duas vezes ao dia (08:00 e 18:00) com 38,91 g de MS de dieta/trato/fermentador, totalizando 77,82 g/dia de MS de dieta. O conteúdo de cada vaso fermentador foi continuamente agitado por hélice central a 250 rotações por minuto e a condição de anaerobiose foi mantida pela infusão contínua de N<sub>2</sub> a uma taxa aproximada de 40ml/min. Houve infusão contínua de solução tampão (Weller; Pilgrim, 1974) nos frascos fermentadores a 2,16 mL/min para proporcionar uma taxa de diluição de 10%/h. O fluxo de saída de efluentes foi ajustado diariamente para garantir a partição em 5%/h de efluente retirado por sucção, através de um filtro e 5%/h por transbordo. Foi acrescentado 0,4 g/L de ureia na solução tampão para simular a reciclagem do nitrogênio. O pH dos vasos fermentadores foi monitorado individualmente por um medidor de pH Accumet AP61 (Fisher Scientific, Atlanta, GA, EUA) acoplado a cada vaso fermentador. Um *software* (Simulador de rúmen; Engco LTDA, Piracicaba, SP, Brasil) foi utilizado para, com auxílio de um computador,

monitorar e registrar em tempo real as informações de temperatura, pH, velocidade de agitação, taxa de infusão de saliva e remoção de efluente filtrado.

Durante todo o experimento uma vez por dia às 08:00, os efluentes obtidos por bomba e transbordo foram coletados e pesados para conferência dos fluxos, sendo que nos sete primeiros dias (período de adaptação) os conteúdos foram descartados e nos dias oito, nove e dez (período de coleta) foram destinados para retirada de amostras. Vinte e quatro horas antes da primeira coleta e durante o período de amostragem (últimos três dias de cada período experimental), todos os recipientes de efluentes foram refrigerados a 4°C para minimizar a atividade microbológica após retirada dos efluentes do vaso fermentador.

Nos dias oito, nove e dez, os efluentes da digesta de cada fermentador foram coletados, homogeneizados e uma amostra de 500 mL foi retirada e armazenados em -20°C para análises posteriores de MS, matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA). Além disso, duas sub amostras de 10 mL foram filtradas em oito camadas de tecido de gaze, preservadas com 0,2 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a 50%, centrifugadas a 1.000 × g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante decantado foi armazenado a -20°C para subseqüentes análises da concentração de nitrogênio amoniacal (NH<sub>3</sub>-N) e ácidos graxos voláteis (AGV) ruminal.

Durante o dia oito de cada período experimental, o pH do fermentador foi medido manualmente com um medidor de pH portátil Accumet AP61 (Fisher Scientific, Atlanta, GA), 01:00 antes, imediatamente antes da primeira alimentação, 01:00, 02:00, 04:00, 06:00, 09:00, 10:00, 11:00, 12:00, 16:00, 18:00 e 20:00 após a alimentação da manhã.

No dia 10, todo o conteúdo de cada fermentador foi retirado e prensado manualmente por quatro camadas de gaze, a fração sólida restante da filtração foi lavada com 700 mL de solução salina (NaCl) na concentração de 0,9% (peso/volume). Todo o conteúdo líquido foi centrifugado a 1.000 × g por 10 min e, em seguida, o sobrenadante foi centrifugado a 17.700 × g por 20 min. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os pellets bacterianos foram liofilizados e armazenados para futuras análises de purinas totais, nitrogênio total e MO (BACH *et al.*, 2008) para estimar a síntese de proteína bacteriana.

**Análises químicas.** As amostras dos alimentos e efluente foram analisadas quanto a MS (método 934.01), EE (método 920.85) e cinzas (método 938.08) de acordo com AOAC (1990). O teor de proteína bruta das amostras de ração foi determinado usando um analisador de nitrogênio de combustão *Dumatherm* (método 990.13; AOAC, 2005).

O conteúdo de matéria orgânica foi calculado como a diferença entre o teor de DM e as cinzas. Para FDN, as amostras foram analisadas, sendo tratadas com  $\alpha$ -amilase termoestável de acordo com Mertens (2002) e adaptadas para o analisador de fibras Ankom200 (Ankom Technology, Macedon, NY). A determinação do teor de FDA foi realizada de forma sequencial a análise de FDN, de acordo com Van Soest e McQueen (1973) e adaptadas para o analisador de fibras o Ankom200.

A concentração de AGV das amostras de efluentes foi determinada com um cromatógrafo gasoso (modelo Nexus GC-2030AF; Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com uma coluna de capilar (0,53 mm  $\times$  30 m) embalada com GP 10% SP-1200/1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> em 80/100 Chromosorb WAW (Supelco, Bellefonte, PA). O He<sub>2</sub> foi usado como gás de arraste a uma taxa de fluxo de 34,5 mL/min. As temperaturas do forno, da porta de injeção e da porta do detector foram de 125, 175 e 180 °C, respectivamente. Amostras de efluente foram analisadas quanto ao N total, conforme descrito anteriormente.

**Cálculos.** Os cálculos das taxas de fluxo dos fermentadores foram realizados de acordo com proposto por Stern e Endres (1991), visando a obtenção de uma taxa de diluição total (TDT) de 10%/h e uma taxa de diluição sólida (TDS) de 5%/h, calculadas conforme equação a seguir:

$$TDT (\%) = \frac{\text{filtrado (ml/h)} + \text{transbordo (ml/h)}}{\text{volume do frasco do fermentador}} \times 100$$

$$TDS (\%) = \frac{\text{transbordo (ml/h)}}{\text{volume do frasco do fermentador}} \times 100$$

As digestibilidades dos nutrientes (MS, MO, PB, MM, FDN) foram calculadas conforme exemplificado, a seguir, para MS.

$$Dig_{MS} (\%) = \frac{MS \text{ Dieta} - (MS \text{ efluente} - MS \text{ saliva})}{MS \text{ dieta}} \times 100$$

#### 4.3 Experimento 2 – Digestibilidade ruminal da proteína e matéria seca (*in situ*)

**Descrição geral.** Este experimento teve como principal objetivo, avaliar a digestibilidade ruminal da proteína dietética para os tratamentos estudados. O



experimento foi dividido em 3 períodos, onde 6 repetições de cerca de 5 g de dieta moída a 2 mm de cada tratamento foram acondicionadas em sacos de nylon (Ankom R510, 10 × 5 cm, 50 mm tamanho de poro) e distribuídas igualmente para incubação ruminal por 12 horas em dois bovinos machos da raça Nelore (peso corporal médio de 550 Kg) canulados ruminalmente. Além de três repetições de cada tratamento por boi, também foram incubados 3 sacos vazios por boi por período para serem utilizados como padrão branco.

A incubação de 12 h foi realizada, segundo proposto por *Stern et al.* (2009). Este comprimento de incubação representa o resíduo que escapa da degradação ruminal (O'MARA *et al.*, 1997). Antes do acondicionamento das amostras os sacos foram lavados em água destilada e secos em estufa de ventilação forçada a 55° C. Doze horas após o início da incubação, os sacos foram retirados do rúmen e enxaguados com água até que o escoamento ficasse claro e, logo após, enxaguados mais três vezes (5 min cada) em máquina de lavar automática. Pela característica da dieta testada (baixo teor de fibra) a contaminação bacteriana da amostra pode ser menos crítica (STERN *et al.*, 2009), mesmo assim realizou a suspensão em solução salina, para minimizar essa interferência. Após a lavagem os sacos foram secos em estufa de ventilação forçada a 55° C por 48 horas e encaminhados para pesagem. As amostras originais e os resíduos em todos os sacos foram analisados quanto ao teor de N por analisador de nitrogênio de combustão Dumatherm (método 990.13; AOAC, 2005) e quanto ao teor de matéria seca (método 934.01) para determinação do desaparecimento ruminal de MS e PB.

#### **4.4 Experimento 3 - Cinética ruminal de produção de gás**

*Descrição geral.* Este experimento teve como objetivo avaliar a cinética de produção de gás, a digestibilidade da MO *in vitro*, a concentração de metano e a produção de ATP dos cinco tratamentos propostos. Um aparelho de produção de gás (Sistema de Produção de Gás RF Ankom, Ankom Technology®, Macedônia, NY, EUA) equipados com sensores de pressão que foram conectados sem fio a um computador e foi usado para avaliar a cinética ruminal dos nutrientes e gases. Foram realizados 2 ensaios de incubação com 6 frascos por tratamento, além de 6 frascos vazios, utilizados como branco (6 por ensaio), totalizando 72 unidades experimentais.

Os ingredientes das dietas foram moídos para passar através de uma peneira de 1 mm em moinho tipo Willey (modelo número 2; Arthur H. Thomas Co., Filadélfia, PA). Cada frasco (250 mL) foi preenchido com 0,5 g de cada dieta.

**Solução tampão final.** Foi composta por: solução de resazurina (0,1 g em 100 mL de água destilada); solução tampão (4 g de  $\text{NH}_4\text{CO}_3$ , 35 g de  $\text{NaCO}_3$  em 1 L de água destilada); solução de macro-minerais (5,7 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anidro, 6,2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  anidro, 0,6 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  em 1 L de água destilada); solução de micro-minerais (13,2 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 10,0 g de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ , 1,0 de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , 8,0 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  em 100 mL de água destilada); e solução redutora (625,0 mg de Cisteína-HCl, 4,0 mL de 1 N NaOH, 625,0 mg de  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$  em 100 mL de água destilada). A mistura final das soluções foi composta por 1 mL de solução de rasazurina, 0,1 mL de solução micro-mineral, 200 mL de solução tampão, 200 mL de solução macro-mineral e 400 mL de solução de peptona de caseína (2 g de peptona de caseína; RD; NY, s.d.).

**Incubação e produção de gás in vitro.** As amostras foram previamente hidratadas com água deionizada para evitar a dispersão de partículas. A coleta de líquido ruminal foi similar ao Experimento 1. Os frascos foram inoculados com 75 ml de solução de líquido ruminal/mistura tampão (1:2), mantendo o “*headspace*” do frasco continuamente infundido com  $\text{N}_2$  para manutenção da anaerobiose e em banho maria para garantir temperatura próxima a adequada (39° C). Garrafas sem amostras de dieta, mas com solução de mistura de líquido ruminal/tampão foram usadas como brancos para corrigir a fermentação do inóculo do rúmen.

Após a incubação das amostras, os frascos foram fechados e colocados em incubadora ventilada sob aquecimento e agitação constante (modelo ENG-RM-1; Engco LTDA, Piracicaba, SP, Brasil), a temperatura dentro da incubadora foi controlada para permanecer em torno de 39°C e a rotação foi de 80 rotações por minuto (RPM).

Um software foi usado para a aquisição de dados (Gas Pressure Monitor, tecnologia Ankom, NY, EUA), e foi configurado para registrar a pressão acumulada a cada 15 minutos, durante 48 h. As válvulas foram configuradas para liberar automaticamente o gás quando a pressão atingir 3,4 kPa (Tagliapietra *et al.*, 2011). No início (0 h) e no final da incubação (48 h), o pH da solução foi medido com um medidor de pH AP61 portátil Accumet (Fisher Scientific, Atlanta, GA).

Os dados da pressão cumulativa às 24 e 48 horas foram convertidos para mL de acordo com a fórmula proposta por Tagliapietra *et al.* (2011), em que produção de gás (mL) =  $(P_c / P_o) \times V_o$ , em que  $P_c$  é a mudança na pressão cumulativa (kPa) no espaço vazio do frasco;  $V_o$  é o volume vazio do frasco (545mL);  $P_o$  é a leitura da pressão atmosférica feita pelo equipamento no início da mensuração. O volume final da produção de gás dos frascos foi corrigido para a contribuição do inóculo pela subtração do volume final de gás

dos frascos utilizados como branco (frascos sem amostra de alimento, apenas inóculo ruminal e saliva artificial).

**Coleta de amostras, análise de ácidos graxos voláteis e amônia.** Foram coletadas sub-amostras de 10mL da solução de líquido ruminal e solução tampão previamente à incubação do material e de cada frasco no final de cada rodada. O material coletado foi filtrado em quatro camadas de gaze e 0,2mL de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 50% foi adicionado para conservação da amostra.

As concentrações de AGVs foram determinadas utilizando cromatografia gasosa. A concentração de amônia foi determinada pelo método colorimétrico descrito por Chaney e Marbach (1962).

#### 4.5 Análise estatística

Testou-se a normalidade dos dados, pressupondo essa condição pelo teste de Shapiro-Wilk, com como nível de significância de  $P < 0,05$ . Quando constatou-se a falta de aderência dos dados à normalidade, utilizou-se o procedimento RANK do SAS 9.4 (SAS, 2002) para realizar a normalização dos dados e um novo teste de Shapiro-Wilk foi realizado para confirmar a aderência a distribuição normal. Os modelos estatísticos para cada experimento são relatados a seguir. Testou-se a homocedasticidade dos dados pelo teste de Bartlett, com como nível de significância de  $P < 0,05$ .

**Experimento 1.** Os dados foram analisados usando o procedimento misto do SAS 9.4 (PROC MIXED; SAS, 2002) com delineamento em quadrado latino 5 × 5 replicado:

$$Y_{ijkl} = \mu + Q_i + P_j + F_k + T_l + E_{ijkl}$$

Onde  $Y_{ijkl}$  é a variável dependente,  $\mu$  é a média geral,  $Q_i$  é o efeito fixo do quadrado latino ( $i = 1$  ou  $2$ ),  $P_j$  é o efeito fixo do período ( $j = 1-5$ ),  $F_k$  é o efeito aleatório da unidade experimental (fermentador;  $k = 1-10$ ),  $T_l$  é o efeito fixo do nível de inclusão do aditivo à base de tanino na dieta ( $l = 0; 0,08; 0,16; 0,32$  ou  $0,64$ ) e  $E_{ijkl}$  é o erro residual.

Os dados de pH ruminal foram analisados como medidas repetidas no tempo de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijklm} = \mu + Q_i + P_j + F_k + T_l + H_m + TH_{lm} + E_{ijklm}$$

Onde  $Y_{ijkjm}$  é a variável dependente,  $\mu$  é a média geral,  $Q_i$  é o efeito fixo do quadrado latino ( $i = 1$  ou  $2$ ),  $P_j$  é o efeito fixo do período ( $j = 1-5$ ),  $F_k$  é o efeito aleatório da unidade experimental (fermentador;  $k = 1-10$ ),  $T_l$  é o efeito fixo do nível de inclusão do aditivo à base de tanino na dieta ( $i = 0; 0,08; 0,16; 0,32$  ou  $0,64$ ),  $H_m$  é o efeito fixo do tempo,  $TH_{im}$  é a interação entre o nível de inclusão do aditivo à base de tanino e tempo ( $H$ ) e  $E_{ijkl}$  é o erro residual.

Utilizou-se a declaração LSMEANS/SLICE do SAS 9.4 (SAS, 2002) para determinar momentos críticos para valores de pH, possíveis de terem sido influenciados de forma diferente pelos tratamentos. Identificados tais pontos utilizou-se os valores de pH desses horários como variável independente.

**Experimento 2.** Para análise da digestibilidade ruminal *in situ* da matéria seca e proteína bruta, utilizou-se o procedimento MIXED do SAS 9.4 (SAS, 2002) com delineamento experimental em blocos casualizados com repetição, conforme modelo a seguir:

$$Y_{ijk} = \mu + B_i + P_j + T_k + E_{ijk}$$

Onde  $Y_{ijk}$  é a variável dependente,  $\mu$  é a média geral,  $B_i$  é o efeito fixo do bloco (boi;  $i = 1$  ou  $2$ ),  $P_j$  é o efeito fixo do período ( $j = 1-3$ ),  $T_k$  é o efeito fixo do nível de inclusão do aditivo à base de tanino na dieta ( $i = 0; 0,08; 0,16; 0,32$  ou  $0,64$ ) e  $E_{ijk}$  é o erro residual.

**Experimento 3.** Os dados do experimento de produção de gases *in vitro* foram analisados utilizando o procedimento MIXED do SAS 9.4 (SAS, 2002) em delineamento de blocos inteiramente casualizados, considerando cada rodada experimental um bloco, conforme modelo abaixo:

$$Y_{ijk} = \mu + P_i + T_j + E_{ijk}$$

Onde  $Y_{ij}$  é a variável dependente,  $\mu$  é a média geral,  $B_i$  é o efeito fixo do bloco (rodada de incubação;  $i = 1$  ou  $2$ ),  $T_j$  é o efeito fixo do nível de inclusão do aditivo à base de tanino na dieta ( $i = 0; 0,08; 0,16; 0,32$  ou  $0,64$ ) e  $E_{ij}$  é o erro residual.

Para todas as variáveis dependentes de todos os experimentos relatou-se as médias e o erro padrão da média. Quando o erro padrão da média foi diferente entre os

tratamentos, relatou-se aquele de maior valor. As comparações de médias foram realizadas usando a declaração LSMEANS do SAS (SAS, 2002) com o ajuste proposto por Tukey-Kramer para todos os efeitos significativos. A significância foi estabelecida em  $P \leq 0,05$  e as tendências foram assumidas em  $P < 0,10$ .

Além da comparação de médias, adicionalmente, em todos os experimentos, comparou-se as variáveis respostas por meio de contraste ortogonal do efeito de tratamentos agrupados, utilizando o delineamento já descrito para cada experimento. Para realização do contraste foi utilizado a declaração CONTRAST no procedimento misto do SAS (PROC MIXED; SAS, 2002) e testou-se: a) efeito da inclusão de aditivo à base de tanino na dieta, por meio da comparação entre o tratamento controle (0%) contra o agrupamento dos demais tratamentos (0,08; 0,16; 0,32 e 0,64%; CON vs TAN) e, b) agrupamento das menores doses de aditivo (BT; 0,08 e 0,16%) comparado contra o agrupamento das maiores doses (AT; 0,32 e 0,64%). Foi declarada significância para quando  $P \leq 0,05$  e tendências em  $0,05 > P < 0,10$ , sendo relatado os valores para P obtidos para os contrastes.

Utilizou-se ainda o procedimento misto do SAS (PROC MIXED; SAS, 2002) para analisar o ajuste dos dados a estruturas de modelo linear e quadrático. Quando encontrado ajuste para os dois modelos, utilizou-se o critério de informação de Akaike (AIC; Akaike, 1974) para avaliar os modelos, optando pela utilização daquele com menor valor de AIC. Para teste dos modelos, foi declarada significância para quando  $P \leq 0,05$  e tendências em  $0,05 > P < 0,10$ , sendo relatado os valores para P obtidos para cada modelo de ajuste e os coeficientes quadráticos, lineares e intercepto, quando houve ajuste.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Experimento 1 – Sistema de cultivo contínuo de fluxo duplo

*Digestibilidade ruminal aparente in vitro.* Não houve diferença significativa para a digestibilidade aparente de fibra em detergente neutro entre os tratamentos ( $P = 0,51$ ; Tabela 3). A inclusão de tanino tendeu a aumentar linearmente a digestibilidade da matéria seca (MS;  $P = 0,07$ ), o que é reforçado pela comparação por contraste entre o controle (ST) e as dietas com tanino (CT) que resultou em 45,2% de digestibilidade da MS para ST e 46,4% para CT. De forma semelhante, a inclusão de tanino na dieta, aumentou linearmente ( $P = 0,02$ ) a digestibilidade da matéria orgânica (MO). Apesar de se ter evidenciado ajuste linear para aumento da digestibilidade da MO, a equação obtida pela regressão teve pouco ajuste aos dados experimentais, com baixa influência da dose de tanino para o intervalo avaliado ( $\text{Digest. MO} = 3,21 \times \text{dose de tanino} + 49,91$ ;  $R^2 = 0,06$ ).

Norris *et al.* (2020) observaram reduções na ordem de 5 a 10% da digestibilidade da MO e MS com a inclusão de doses acima de 1,5% de tanino hidrolisável de Quebracho na dieta de bovinos de corte. Piñeiro-Vázquez *et al.* (2017) e Oliveira *et al.* (2007) também observaram redução da digestibilidade dietética com adição de tanino para bovinos de corte. No presente estudo testou-se doses menores que os trabalhos anteriores (máximo de 0,64% de tanino da MS), porém, mesmo com a diferença entre as doses, houve convergência no comportamento geral dos resultados. Na literatura há também resultados que mostram redução na digestibilidade das frações fibrosas da dieta com a adição de tanino (OLIVEIRA *et al.*, 2007), tal efeito não foi observado neste trabalho.

Discute-se na literatura que a redução da digestibilidade com adição de tanino nas dietas ocorre principalmente pelo efeito desse composto no rúmen, o que de fato é evidenciado pelo presente trabalho. Taninos possuem grupos hidroxila fenólicos capazes de fazer ligações de hidrogênio tanto com frações da dieta, quanto com enzimas de microrganismos, reduzindo a digestibilidade (OLIVEIRA *et al.*, 2007). A principal fração do alimento com potencial de interação com moléculas de tanino é a proteína (OLIVEIRA; BERCHIELLI, 2007), diversos trabalhos mostram a redução da degradação ruminal da PB, com o aumento de tanino na dieta.

No atual estudo, encontrou-se valores baixos para digestibilidade da proteína bruta (Tabela 3), porém, ressalta-se que tais dados constituem a digestibilidade aparente, pois não foi realizada análise para dimensionar a síntese de proteína microbiana, portanto, os

valores da digestibilidade estão subdimensionados. Para obtenção dos valores reais da digestibilidade de proteína microbiana faz-se necessário a descontaminação da PB oriunda de bactérias do efluente, que não foi realizada no presente estudo.

Supondo-se homogeneidade na síntese de proteína microbiana entre os tratamentos, observou-se tendência a maior digestibilidade aparente da PB para os tratamentos com inclusão de 0,16 e 0,64% de extrato de tanino ( $P = 0,07$ ). Tal resultado é de difícil explicação, pois esperava-se menor digestibilidade da PB com o aumento das doses de tanino, devido à complexação do tanino com a PB dietética, dificultando a ação bacteriana. Na literatura a maior parte dos trabalhos divergem do resultado encontrado, pois nota-se com frequência redução da digestibilidade ruminal e até intestinal da PB com adição de tanino. Norris *et al.* (2020) observaram uma redução em até 20% na digestibilidade do N quando acrescentou doses de 1,5 a 4,5 % de extrato de tanino na dieta. De forma similar, Aguerre *et al.* (2016) também observaram reduções na digestibilidade aparente N com inclusão de tanino (0,45 a 1,80% da MS da dieta).

Além dos dados obtidos para digestibilidade da PB com o Experimento 1 divergirem da literatura, esses divergem até mesmo de outro experimento contido nesse trabalho (item 5.2). O experimento 2 foi realizado *in situ* com as mesmas dietas fornecidas aos vasos fermentadores e obteve comportamento diferente para a digestibilidade da proteína. No experimento 2 observou-se maior digestibilidade ruminal para o tratamento controle quando comparado ao agrupamento das dietas com tanino (CT vs ST;  $P = 0,03$ ), mas ao mesmo tempo não encontrou diferença para digestibilidade de N entre o tratamento controle e o nível de inclusão 0,64%, sugerindo um efeito quadrático ( $P < 0,01$ ; Item 5.2; Tabela 4). Tais incongruências e divergências com a literatura indicam a necessidade de maiores estudos com doses menores de inclusão de tanino em dietas de ruminantes, uma vez que a maior parte dos trabalhos já realizados utilizaram doses superiores à 1%.

O pH não foi influenciado pelos tratamentos ( $P > 0,05$ ) e variou ao longo do tempo, sendo as menores médias diárias encontradas entre uma e duas horas após o fornecimento de alimento (Figura 4; Tabela 4). Quando comparado o contraste entre dietas com menor e maior inclusão de tanino (BT vs AT), observou-se diferença ( $P < 0,01$ ) para as médias de pH duas horas após a primeira alimentação do dia. Apenas essa diferença em um único momento durante 24 horas não permite inferir qualquer conclusão.

**Tabela 3.** Efeito da inclusão de doses crescentes de extrato de tanino de *Acacia mearnsii* na digestibilidade aparente de nutrientes em sistema *in vitro* de cultivo contínuo de fluxo duplo.

Variável resposta	Extrato de tanino (% da MS) <sup>1</sup>					EMP <sup>4</sup>	P-valor	Regressão <sup>3</sup> (p-valor)		Contrastes <sup>2</sup> (p-valor)	
	0,00	0,08	0,16	0,32	0,64			L	Q	CT vs ST	BT vs AT
<i>Digestibilidade aparente (%)</i>											
Matéria Seca	45,2 <sup>c</sup>	46,1 <sup>abc</sup>	46,9 <sup>ab</sup>	45,4 <sup>bc</sup>	47,1 <sup>a</sup>	0,54	<b>0,04*</b>	0,07	0,80	<b>0,04*</b>	0,69
Matéria Orgânica	49,3 <sup>c</sup>	50,4 <sup>abc</sup>	51,5 <sup>ab</sup>	50,1 <sup>bc</sup>	52,1 <sup>a</sup>	0,64	<b>0,05*</b>	<b>0,02*</b>	0,90	<b>0,02*</b>	0,84
Fibra detergente neutro	35,8	36,8	38,1	36,1	40,4	2,31	0,51	0,15	0,59	0,43	0,71
Matéria mineral	35,9	36,2	36,3	35,2	35,8	0,74	0,81	0,60	0,74	0,97	0,27
Proteína Bruta	10,8	11,0	14,6	11,0	13,4	1,14	0,07	0,23	0,89	0,19	0,55

\* Diferença estatística pelo teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

<sup>a-b-c</sup> Mínimos quadrados médias consecutivas com sobrescritos diferentes diferem em  $P \leq 0,05$

<sup>1</sup> Aditivo a base de tanino condensado de *Acacia mearnsii* (teor mín. 70% de tanino; Tanac SA, montenegro, RS, Brasil).

<sup>2</sup> Contrastes: CT = com tanino (agrupamento de tratamentos com tanino: 0,08; 0,16; 0,32 e 0,64%), ST = sem tanino (tratamento controle: 0%), BT = agrupamento de tratamentos com menores doses (0,08; 0,16%), AT = agrupamento de tratamentos com maiores doses de tanino (0,32; 0,64%).

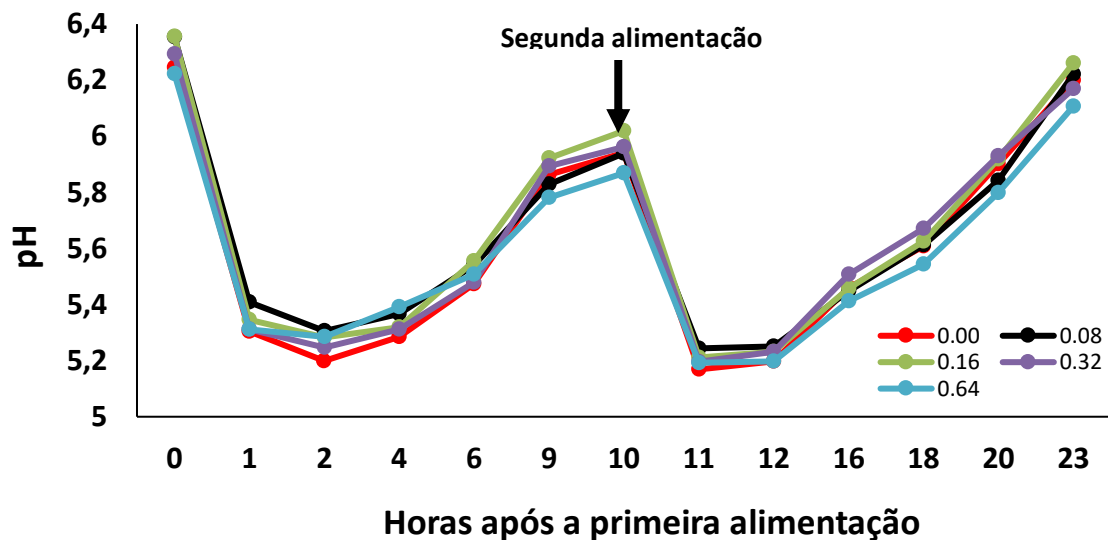
<sup>3</sup> Teste de ajuste, por regressão, das variáveis respostas e doses de tratamento para os modelos linear (L) e quadráticos (Q).

<sup>4</sup> EP = Erro Padrão da Média. Para EPM diferente entre médias de uma mesmo variável foi reportado o maior.

Fonte: do autor.



Figura 4 – Curva de pH para diferentes doses de extrato<sup>1</sup> de tanino de *Acacia mearnsii* em sistema *in vitro* de cultivo contínuo de fluxo duplo.



Legenda: linhas correspondem aos tratamentos indicados pelas cores na legenda. A hora zero corresponde ao momento da primeira alimentação do sistema.

<sup>1</sup>Aditivo à base de tanino condensado (teor mín. 70% de tanino; Tanac SA, Brasil).

Fonte: do autor

Sauvant *et al.* (1999) sugeriram que períodos com pH inferior a 6,0 com menos de quatro horas de duração tem pouca ou nenhuma influência sobre os efeitos do perfil de fermentação. Este resultado foi confirmado por Calsamiglia *et al.* (2002) que testaram diferentes faixas de pH em sistema *in vitro* de cultivo contínuo e obtiveram pouca influência no perfil de fermentação (pequenas influências foram observadas apenas quando o pH do meio foi mantido por 12 horas a 5,7). Valores para pH inferiores a 5 poderiam interferir na suposta complexação do tanino com outras moléculas (OLIVEIRA; BERCHIELLI, 2007), mas esses valores não foram atingidos no presente estudo.

Paula *et al.* (2017), utilizando sistema de cultivo contínuo observaram pH próximo a 6,5 utilizando dietas com 21% de PB. Benedetti *et al.* (2015), também usando sistema de fermentador contínuo e testando dietas para gado de corte, obtiveram mínimas para pH próximas à 5,8. Amaral *et al.* (2016) utilizaram dietas com alta inclusão de amido (inclusão de milho moído entre 38 a 46% da MS da dieta) e observaram, também em sistema *in vitro* de cultivo contínuo, valores para pH próximos aos encontrados no presente estudo. Variações para valores de pH obtidos entre diferentes experimentos com fermentadores de fluxo contínuo são comuns e estão associadas principalmente às

características da dieta fornecida, assim como ocorre no animal. Estima-se que a dieta do presente experimento possuía níveis de amido acima de 35% da MS e CNF acima de 50% da MS, justificando os menores valores para pH em relação a experimentos utilizando dietas com maiores inclusões de fibra.

**Tabela 4.** Efeito da inclusão de doses crescentes de extrato de tanino de *Acacia mearnsii* sobre o pH e acúmulo de amônia em sistema *in vitro* de cultivo contínuo de fluxo duplo.

Variável resposta	Extrato de tanino (% da MS) <sup>1</sup>					EMP <sup>4</sup>	P-valor	Regressão <sup>3</sup> (p-valor)		Contrastes <sup>2</sup> (p-valor)	
	0,00	0,08	0,16	0,32	0,64			L	Q	CT vs ST	BT vs AT
Concentração de amônia do efluente (mg/dL)	0,58 <sup>b</sup>	0,67 <sup>ab</sup>	0,72 <sup>a</sup>	0,55 <sup>b</sup>	0,57 <sup>b</sup>	0,04	<b>0,01*</b>	0,11	0,67	0,61	<b>&lt; 0,01*</b>
pH 0h <sup>5</sup>	6,26	6,35	6,36	6,29	6,22	0,08	0,61	0,31	0,37	0,56	0,18
pH 2h <sup>5</sup>	5,19	5,31	5,28	5,25	5,29	0,04	0,13	0,38	0,53	0,38	<b>&lt; 0,01*</b>
pH 11h <sup>5</sup>	5,19	5,25	5,23	5,23	5,20	0,03	0,44	0,60	0,19	0,20	0,31

\* Diferença estatística pelo teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

<sup>a-b-c</sup> Mínimos quadrados médias consecutivas com sobrescritos diferentes diferem em  $P \leq 0,05$

<sup>1</sup> Aditivo a base de tanino condensado de *Acacia mearnsii* (teor mín. 70% de tanino; Tanac SA, montenegor, RS, Brasil).

<sup>2</sup> Contrastes: CT = com tanino (agrupamento de tratamentos com tanino: 0,08; 0,16; 0,32 e 0,64%), ST = sem tanino (tratamento controle: 0%), BT = agrupamento de tratamentos com menores doses (0,08; 0,16%), AT = agrupamento de tratamentos com maiores doses de tanino (0,32; 0,64%).

<sup>3</sup> Teste de ajuste, por regressão, das variáveis respostas e doses de tratamento para os modelos linear (L) e quadráticos (Q).

<sup>4</sup> EP = Erro Padrão da Média. Para EPM diferente entre médias de uma mesmo variável foi reportado o maior.

<sup>5</sup> pH 0h = pH mensurado imediatamente antes da primeira alimentação do dia; pH 2h = pH mensurado 2 horas após a primeira alimentação do dia; pH 11h = pH mensurado 11 horas após a primeira alimentação do dia.

Fonte: do autor

A concentração final de amônia no efluente diferiu entre os tratamentos ( $P = 0,01$ ), sendo que o maior valor foi encontrado no tratamento com 0,16% da MS de inclusão de aditivo natural à base de tanino (0,718 mg/dL). Quando comparamos menores doses com maiores doses de tanino (contraste BT vs AT) observou-se diferença ( $P < 0,01$ ) no acúmulo final de amônia. Tal resultado pode ser indicativo de que maiores doses de tanino podem ter acarretado na redução da digestibilidade ruminal da PB, gerando menos N solúvel por complexação. A inclusão de tanino em geral comparada ao tratamento controle não diferiu (CT vs ST;  $P = 0,61$ ). Os valores encontrados para acúmulo de amônia foram muito inferiores aos comumente relatados em sistemas de cultivo contínuo. Paula *et al.* (2017) observaram valores em torno de 16,5 mg/dL de N-NH<sub>3</sub>, que é equivalente a aproximadamente 20 mg/dL de NH<sub>3</sub>, porém com o uso de dieta de maior teor proteico que o utilizado no presente estudo (21 vs 11,8% da MS de PB, respectivamente). Brandão *et al.* (2020) em meta-análise comparando dados obtidos de efluentes de sistemas de fluxo contínuo e de coleta omasal, encontraram  $11,3 \pm 4,3$  mg/dL de NH<sub>3</sub> como média de 174 observações de sistemas *in vitro*. A concentração maior de NH<sub>3</sub> encontrada nos trabalhos, provavelmente está relacionada a características das dietas utilizadas, pois a maioria dos trabalhos com sistema de cultivo contínuo foram realizados utilizando dietas com altos teores de PB (superior a 15% da MS). Amaral *et al.* (2016) utilizaram dietas com teores proteicos mais próximos ao adotado no presente estudo: 10, 12 e 14% da MS e obteve valores para NH<sub>3</sub> de 3,5; 3,8 e 10,8 mg/dL, respectivamente. Nota-se que à medida que se reduz o teor proteico da dieta, a concentração final de NH<sub>3</sub> efluente é proporcionalmente reduzida. Portanto, dietas com menores teores proteicos e ainda com utilização de aditivo que visa a redução da degradabilidade da proteína, tendem a fornecer valores mais baixos para concentração NH<sub>3</sub> no efluente. A concentração ruminal de NH<sub>3</sub>-N de 2,4 mg/dL foi relatada como a concentração mínima para o crescimento microbiano adequado (MEHREZ *et al.*, 1977; OWENS e BERGEN, 1983), porém destaca-se que o teor de amônia observado no atual trabalho corresponde ao que escapa do meio de cultivo e não ao do meio em si.

A concentração total de AGV do efluente foi menor para os tratamentos que receberam tanino ( $P < 0,01$ ; 99,9 mM para CT vs 92,2 mM para ST) e essa redução é explicada principalmente pela redução da concentração de acetato nesses tratamentos com tanino ( $P < 0,01$ ; 47,3 vs 42,8 mM para controle e média dos demais tratamentos, respectivamente), conforme apresentado na Tabela 5. A inclusão de tanino ainda reduziu a concentração de butirato ( $P = 0,04$ ) e valerato ( $P = 0,03$ ), aumentou a proporção de propionato ( $P = 0,04$ ) e isobutirato ( $P = 0,04$ ).

Entre os tratamentos analisados individualmente houve diferença apenas para produção de isobutirato. Os efeitos lineares observados para AGV total e isobutirato, apesar de significativos, são pouco explicados pelas equações de regressão encontradas ( $R^2 < 0,1$  para as duas equações).

Os efeitos sobre a produção total de AGV observados com a inclusão de tanino foram opostos ao encontrado por Norris *et al.* (2020), que observou um aumento linear da produção de AGV com a inclusão de tanino na dieta. Apesar de reportado diferenças para produção de AGV, Norris *et al.* (2020) destaca que esse resultado foi inesperado, pois em trabalhos prévios não havia sido encontrado diferenças com acréscimo de tanino. A redução da produção de acetato e aumento da proporção de propionato é um resultado convergente na literatura (HASSANAT E BENCHAAAR, 2013; NORRIS *et al.*, 2020) e esse efeito é explicado pelo fato de tanino ter efeito inibitório para populações de microrganismos fibrolíticos, favorecendo o aumento da população de microrganismos amilolíticos por redução da competição (MIN *et al.*, 2003; BAE *et al.*, 1993; PATRA; SAXENA, 2010). A adição de tanino condensado de *Acacia mearnsii* reduziu ( $P < 0,05$ ) a proporção de acetato:propionato na concentração final de AGV. Resultados como esse são consistentes na literatura e a redução acetato:propionato geralmente se dá pela redução da produção de acetato, sem alterar a produção de propionato, exatamente como observado no presente estudo. A redução na proporção de acetato pode ser benéfica se a digestibilidade da dieta não for alterada, pois dessa forma há favorecimento à eficiência metabólica ruminal e redução da propriedade, produzindo menos moléculas de  $CH_4$  por grama de MO fermentada. Além de ser energeticamente favorável ao animal, produzir menos  $CH_4$  reduz os impactos ambientais negativos da criação de ruminantes. Dschaak *et al.* (2011) também observaram redução na proporção de acetato para propionato com a inclusão de tanino na dieta e não obtiveram alterações para digestibilidade. Os resultados encontrados nesse trabalho, assim como outros da literatura, indicam que, de fato, tanino tem potencial para melhorar a eficiência de dietas de ruminantes, com alteração no perfil de AGV produzidos na fermentação ruminal. Quanto aos valores absolutos para AGV encontrados no presente estudo, todos encontram-se dentro da margem observada para trabalhos com fermentadores de fluxo contínuo (BRANDÃO *et al.*, 2020).

**Tabela 5.** Efeito da inclusão de doses crescentes de extrato de tanino de *Acacia mearnsii* sobre a concentração de ácidos graxo volátil (AGV) no efluente em sistema *in vitro* de cultivo contínuo de fluxo duplo.

Variável resposta	Extrato de tanino (% da MS) <sup>1</sup>					EMP <sup>4</sup>	P-valor	Regressão <sup>3</sup> (p-valor)		Contrastes <sup>2</sup> (p-valor)	
	0,00	0,08	0,16	0,32	0,64			L	Q	CT vs ST	BT vs AT
<i>AGV, mM</i>											
Total de AGV	99,60	92,22	90,95	93,33	90,70	2,730	0,08	<b>0,03*</b>	0,21	< <b>0,01*</b>	0,72
Total de AGVR <sup>5</sup>	1,40	1,41	1,34	1,32	1,29	0,057	0,80	0,10	0,70	0,29	0,34
Acetato	47,27	42,52	41,88	44,03	42,68	1,516	0,07	0,10	0,12	< <b>0,01*</b>	0,68
Propionato	33,75	33,15	31,39	32,10	31,42	1,259	0,48	0,13	0,24	0,28	0,51
Butirato	12,58	11,22	12,02	12,00	11,41	0,553	0,21	0,09	0,63	<b>0,04*</b>	0,66
Isobutirato	0,49 <sup>b</sup>	0,52 <sup>a</sup>	0,49 <sup>bc</sup>	0,48 <sup>c</sup>	0,49 <sup>bc</sup>	0,522	< <b>0,01*</b>	<b>0,01*</b>	0,13	0,48	< <b>0,01*</b>
Valerato	4,60	3,93	4,32	3,88	3,91	0,303	0,08	0,09	0,18	<b>0,03*</b>	0,17
Isovalerato	0,91	0,89	0,86	0,85	0,81	0,052	0,81	0,16	0,86	0,28	0,54
<i>AGV, % do total</i>											
Acetato	47,64	46,36	45,89	47,28	47,11	0,767	0,44	0,73	0,24	0,16	0,12
Propionato	33,70	35,77	34,68	33,74	35,20	0,713	0,22	0,35	0,77	<b>0,04*</b>	0,33
Butirato	12,63	12,12	13,18	12,93	12,63	0,512	0,82	0,74	0,72	0,71	0,94
Isobutirato	0,50 <sup>b</sup>	0,56 <sup>a</sup>	0,55 <sup>a</sup>	0,52 <sup>b</sup>	0,54 <sup>ab</sup>	0,567	<b>0,01*</b>	0,71	0,75	<b>0,05*</b>	0,16
Valerato	4,59	4,21	4,82	4,14	4,25	0,302	0,14	0,30	0,51	0,34	0,13
Isovalerato	0,94	0,98	0,95	0,93	0,91	0,920	0,97	0,67	0,80	0,96	0,73
Acetato:propionato	1,46	1,31	1,34	1,42	1,39	0,053	0,39	0,97	0,21	<b>0,05*</b>	0,13

\* Diferença estatística pelo teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

<sup>a-b-c</sup> Mínimos quadrados médias consecutivas com sobrescritos diferentes diferem em  $P \leq 0,05$

<sup>1</sup> Aditivo a base de tanino condensado de *Acacia mearnsii* (teor mín. 70% de tanino; Tanac SA, montenigor, RS, Brasil).

<sup>2</sup> Contrastes: CT = com tanino (agrupamento de tratamentos com tanino: 0,08; 0,16; 0,32 e 0,64%), ST = sem tanino (controle: 0%), BT = agrupamento de tratamentos com menores doses (0,08; 0,16%), AT = agrupamento de tratamentos com maiores doses de tanino (0,32; 0,64%).

<sup>3</sup> Teste de ajuste, por regressão, das variáveis respostas e doses de tratamento para os modelos linear (L) e quadráticos (Q).

<sup>4</sup> EP = Erro Padrão da Média. Para EPM diferente entre médias de uma mesmo variável foi reportado o maior.

<sup>5</sup> AGVR = Ácido graxo volátil de cadeia ramificada.

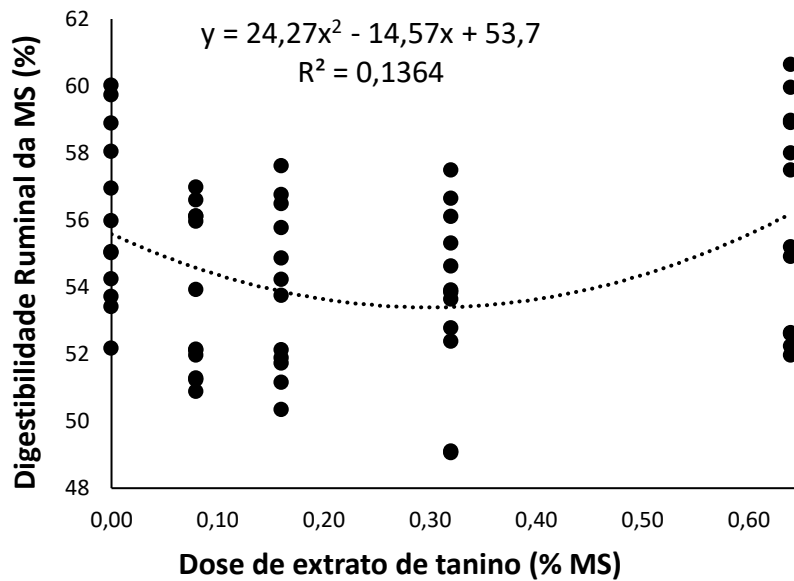
Fonte: do autor

## 5.2 Experimento 2 - Digestibilidade ruminal *in situ*

O aumento das doses de inclusão de aditivo alimentar à base de tanino condensado de *Acacia mearnsii*, afetou de forma quadrática tanto a digestibilidade ruminal da matéria seca, quanto da proteína bruta. ( $P < 0,01$ ; Tabela 6). Apesar do efeito quadrático, não houve um bom ajuste da equação de estimação da digestibilidade da MS pela dose de tanino incluída ( $\text{Dig MS} = 24,27 \times (\text{dose de tanino})^2 - 14,57 \times (\text{dose de tanino}) + 53,7 = 0,1364$ ;  $R^2$ ; Figura 5), ao passo que a equação que relaciona a digestibilidade da PB à dose tanino utilizada, teve um melhor ajuste ao intervalo de dados testado. ( $\text{Dig PB} = 59,96 \times (\text{dose de tanino})^2 - 36,03 \times (\text{dose de tanino}) + 55,72$ ;  $R^2 = 0,417$ ; Figura 6). A inclusão de 0 e 0,64% da MS de extrato de tanino na dieta resultou em maiores valores tanto para digestibilidade da PB ( $P < 0,01$ ), quanto da MS ( $P = 0,02$ ). O menor valor para digestibilidade da MS foi obtido com a utilização da dose intermediária de 0,16% de extrato de tanino ( $P < 0,01$ ). Os contrastes avaliados sugerem que a adição de tanino reduziu significativamente a digestão de MS ( $P < 0,01$ ; 58,9% para ST vs 54,5% para CT) e PB ( $P = 0,03$ ; 56,1% para ST vs 54,4% para CT, respectivamente) e que as doses maiores de tanino testadas aumentaram a digestibilidade da MS ( $P < 0,01$ ).

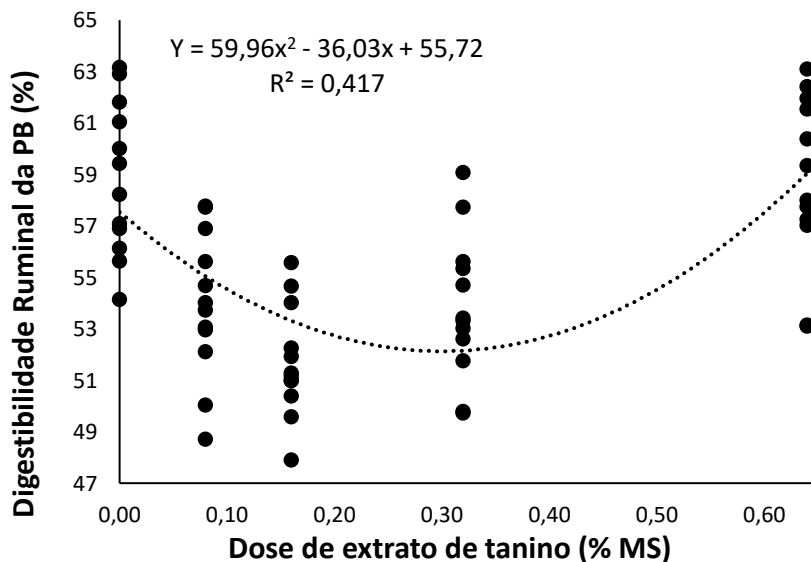
A redução da digestibilidade tanto da MS, quanto da PB observadas quando se compara o tratamento controle até a dose de 0,32% da MS era esperado, devido principalmente à capacidade do tanino em se complexar com moléculas de nitrogênio e reduzir a degradabilidade da PB e, conseqüentemente, reduzir também a digestibilidade da MS em ambientes semelhantes ao rúmen. Resultados como este são comumente relatados na literatura e vários trabalhos mostraram a redução da digestibilidade da MS e PB da dieta à medida que se aumenta inclusão de tanino, conforme já discutido no Item 5.1. Porém, a maior digestibilidade ruminal para PB e MS observado para a dose de 0,64% de tanino, quando comparada às doses menores, foi inesperada e pouco intuitiva. A grande variabilidade dos dados pode ser uma possível explicação para esse resultado, além do alto valor para o intercepto das equações de estimação.

Figura 5 – Digestibilidade da proteína bruta (PB) para diferentes doses de extrato<sup>1</sup> de tanino de *Acacia mearnsii* em ensaio *in situ* com 12 horas de incubação em bovino de corte.



<sup>1</sup>aditivo à base de tanino condensado (teor mín. 70% de tanino; Tanac SA, Brasil).  
 Fonte: do autor

Figura 6 – Digestibilidade da proteína bruta (PB) para diferentes doses de extrato<sup>1</sup> de tanino de *Acacia mearnsii* em ensaio *in situ* com 12 horas de incubação em bovino de corte.



<sup>1</sup>aditivo à base de tanino condensado (teor mín. 70% de tanino; Tanac SA, Brasil).  
 Fonte: do autor



**Tabela 6.** Efeito da inclusão de doses crescentes de extrato de tanino de *Acacia mearnsii* no desaparecimento ruminal *in situ* (12 horas de incubação)

Variável resposta	Extrato de tanino (% da MS) <sup>1</sup>					EMP <sup>4</sup>	P-valor	Regressão <sup>3</sup> (p-valor)		Contrastes <sup>2</sup> (p-valor)	
	0,00	0,08	0,16	0,32	0,64			L	Q	CT vs ST	BT vs AT
<i>Digestibilidade ruminal (%)</i>											
Matéria seca	58,9 <sup>a</sup>	53,9 <sup>b</sup>	51,7 <sup>c</sup>	53,8 <sup>b</sup>	58,7 <sup>a</sup>	0,73	< 0,01*	0,11	< 0,01*	< 0,01*	< 0,01*
Proteína bruta	56,1 <sup>a</sup>	53,8 <sup>b</sup>	53,9 <sup>b</sup>	53,7 <sup>b</sup>	56,1 <sup>a</sup>	0,70	0,02*	0,34	< 0,01*	0,03*	0,12

\* Diferença estatística pelo teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

<sup>a-b-c</sup> Mínimos quadrados médias consecutivas com sobrescritos diferentes diferem em  $P \leq 0,05$

<sup>1</sup> Aditivo a base de tanino condensado de *Acacia mearnsii* (teor mín. 70% de tanino; Tanac SA, montenegor, RS, Brasil).

<sup>2</sup> Contrastes: CT = com tanino (agrupamento de tratamentos com tanino: 0,08; 0,16; 0,32 e 0,64%), ST = sem tanino (tratamento controle: 0%), BT = agrupamento de tratamentos com menores doses (0,08; 0,16%), AT = agrupamento de tratamentos com maiores doses de tanino (0,32; 0,64%).

<sup>3</sup> Teste de ajuste, por regressão, das variáveis respostas e doses de tratamento para os modelos linear (L) e quadráticos (Q).

<sup>4</sup> EP = Erro Padrão da Média. Para EPM diferente entre médias de uma mesmo variável foi reportado o maior.

Fonte: do autor.

### 5.3 Experimento 3 – Produção de gás *in vitro*

As respostas à avaliação da produção de gás *in vitro* para as doses de tanino testadas é apresentada na Tabela 7. Não se evidenciou diferença entre os tratamentos para produção de gás após 24 e 48 horas de incubação ( $P = 0,30$  e  $P = 0,35$ , respectivamente). Uma maior produção de gás indicaria maior digestibilidade da matéria orgânica, o que não houve. Portanto, pela metodologia *in vitro* de produção de gases proposta não foi possível evidenciar diferença na digestibilidade da MS dietética. A adição de tanino na dieta teve uma tendência ( $P = 0,09$  para CT vs ST) em reduzir o nitrogênio amoniacal do meio, indicando que possivelmente houve uma redução na degradabilidade proteica pelo mecanismo de complexação do tanino às frações proteicas (como discutido no Item 5.1) este resultado era esperado e comumente observado em diversos trabalhos (NORRIS *et al.*, 2020). A complexação do tanino com a proteína dietética, protege esta da degradação ruminal e pode disponibilizá-la no intestino para ser digerida. Quando este processo ocorre, observa-se aumento do aporte para o animal de proteína não degradável no rúmen (PNDR), que pode ser benéfico quando perfil de aminoácidos da dieta é de interesse. Quando não há a descomplexação da proteína no intestino o que se observa é uma perda da digestibilidade total da PB (NORRIS *et al.*, 2020) ou aumento dos teores de N fecal em detrimento de N urinário, sem alteração da retenção de N (GRAINGER *et al.*, 2009). Quando o efeito é este último, há benefícios com a redução do potencial de poluição das excretas, reduzindo o impacto ambiental da criação de ruminantes (GRAINGER *et al.*, 2009).

Não houve diferença para a produção total de AGV ( $P = 0,29$ ), porém a adição de tanino reduziu a proporção final de acetato ( $P < 0,01$ ), não alterou a proporção de propionato ( $P = 0,18$ ) e aumentou proporção de butirato ( $P < 0,01$ ). Houve ainda uma tendência de redução na relação entre acetato e propionato ( $P = 0,06$ ) com a adição de tanino às dietas. Esses resultados convergem com os resultados obtidos no experimento 1 do presente trabalho (Item 5.1) e com os dados mais comumente encontrados na literatura, como já discutido anteriormente (Item 5.1).

**Tabela 7** Efeito da inclusão de doses crescentes de extrato de tanino de *Acacia mearnsii* sobre parâmetros de fermentação e AGV em sistema *in vitro* de produção de gases

Variável resposta	Extrato de tanino (% da MS) <sup>1</sup>					EMP <sup>4</sup>	P-valor	Regressão <sup>3</sup> (p-valor)		Contrastes <sup>2</sup> (p-valor)	
	0,00	0,08	0,16	0,32	0,64			L	Q	CT vs ST	BT vs AT
pH final	6,28	6,20	6,22	6,20	6,21	0,03	0,07	<b>0,02*</b>	0,12	< <b>0,01</b>	0,11
Total GP <sub>24</sub> <sup>5</sup> , mL/g MS	154	147	147	143	136	7,24	0,30	0,28	0,80	0,16	0,09
Total GP <sub>48</sub> <sup>5</sup> , mL/g MS	169	160	156	154	148	8,68	0,35	0,27	0,45	0,12	<b>0,04*</b>
NH <sub>3</sub> -N, mg/dL	26,6	25,9	25,5	25,6	25,5	0,50	0,43	0,13	0,44	0,09	0,12
AGV total, mM	71,3	84,6	90,6	91,5	83,4	6,60	0,29	0,50	0,12	0,08	0,93
Acetato, % do AGV total	70,4 <sup>a</sup>	66,7 <sup>a</sup>	65,4 <sup>b</sup>	64,7 <sup>b</sup>	65,0 <sup>b</sup>	1,11	< <b>0,01*</b>	<b>0,02*</b>	< <b>0,01*</b>	< <b>0,01*</b>	< <b>0,01*</b>
Propionato, % AGV total	21,0	22,3	22,5	22,5	22,3	0,47	0,68	0,28	<b>0,03*</b>	0,18	0,84
Butirato, % do AGV total	6,4 <sup>c</sup>	7,9 <sup>bc</sup>	8,6 <sup>ab</sup>	8,7 <sup>a</sup>	8,7 <sup>a</sup>	0,47	<b>0,01</b>	<b>0,02*</b>	< <b>0,01*</b>	< <b>0,01*</b>	0,12
Relação acetato:propionato	3,41	2,99	2,91	2,88	2,92	0,13	0,16	0,09	<b>0,03*</b>	0,06	0,15

\* Diferença estatística pelo teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

<sup>a-b-c</sup> Mínimos quadrados médias consecutivas com sobrescritos diferentes diferem em  $P \leq 0,05$

<sup>1</sup> Aditivo a base de tanino condensado de *Acacia mearnsii* (teor mín. 70% de tanino; Tanac SA, montenegro, RS, Brasil).

<sup>2</sup> Contrastes: CT = com tanino (agrupamento de tratamentos com tanino: 0,08; 0,16; 0,32 e 0,64%), ST = sem tanino (tratamento controle: 0%), BT = agrupamento de tratamentos com menores doses (0,08; 0,16%), AT = agrupamento de tratamentos com maiores doses de tanino (0,32; 0,64%).

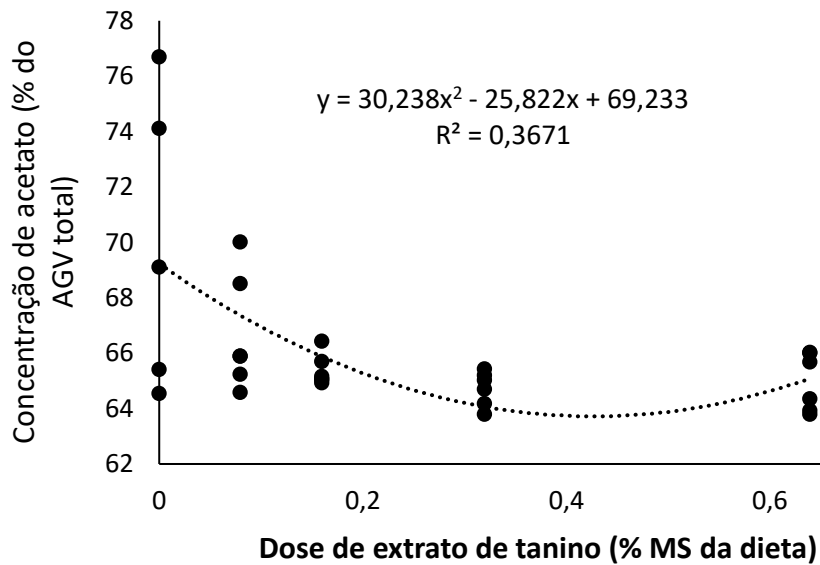
<sup>3</sup> Teste de ajuste, por regressão, das variáveis respostas e doses de tratamento para os modelos linear (L) e quadráticos (Q).

Total GP

<sup>4</sup> EP = Erro Padrão da Média. Para EPM diferente entre médias de uma mesmo variável foi reportado o maior.

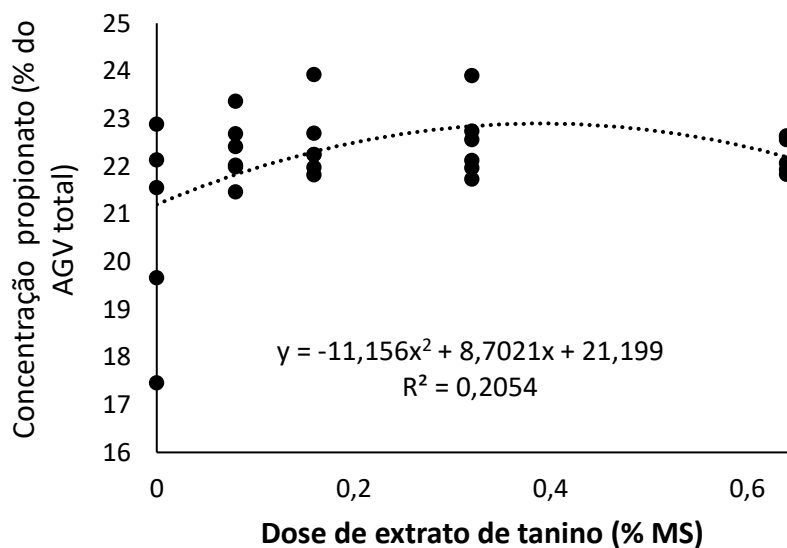
<sup>5</sup> GP = Produção total de gás após 24 e 48 h de incubação para cada grama de matéria seca incubada.

Figura 7 – Concentração de acetato (% do AGV total) para diferentes doses de extrato<sup>1</sup> de tanino de *Acacia mearnsii* em ensaio *in vitro* de produção de gases em sistema de batelada.



<sup>1</sup>aditivo à base de tanino condensado (teor mín. 70% de tanino; Tanac SA, Brasil).  
Fonte: do autor

Figura 8 - Concentração de propionato (% do AGV total) para diferentes doses de extrato<sup>1</sup> de tanino de *Acacia mearnsii* em ensaio *in vitro* de produção de gases em sistema de batelada.



<sup>1</sup>aditivo à base de tanino condensado (teor mín. 70% de tanino; Tanac SA, Brasil).  
Fonte: do autor

## 6. CONCLUSÃO

A utilização do aditivo natural à base de tanino condensado de *Acacia mearnsii* (TAN) reduziu a relação acetato:propionato, proporcionou ganhos em digestibilidade da matéria seca e matéria orgânica dietética e não alterou pH e concentração amoniacal do meio, porém houve reduções na produção total de AGV e acetato. Os resultados encontrados indicam potencial de utilização das doses testadas, com baixos impactos negativos nos parâmetros fermentativos.

As maiores doses de TAN testadas (0,32 e 0,64%) proporcionaram menor acúmulo de amônia quando contrastadas com as menores doses (0,08 e 0,16%), indicando potencial de maiores doses de TAN em reduzir a degradação ruminal da proteína dietética.

Encontrou-se relação quadrática entre os níveis de tanino testados e a digestibilidade ruminal *in situ*, porém recomenda-se estudos mais aprofundados para entender essa relação.

O trabalho evidenciou o potencial do tanino em alterar positivamente parâmetros fermentativos, porém, com os níveis testados não foi possível encontrar uma dose ótima de utilização do aditivo à base de tanino e mais estudos são necessários para entender os mecanismos envolvidos nessa relação e, dessa forma, promover alterações positivas e consistentes.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, M.; KUMENO, F. In vitro simulation of rumen fermentation: apparatus and effects of dilution rate and continuous dialysis on fermentation and protozoal population. **Journal of animal science**, v. 36, n. 5, p. 941-948, 1973.
- AGUERRE, M. J.; CAPOZZOLO, M. C.; LENCIONI, P.; CABRAL, C.; WATTIAUX, M. A. Effect of quebracho-chestnut tannin extracts at 2 dietary crude protein levels on performance, rumen fermentation, and nitrogen partitioning in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 6, p. 4476-4486, 2016.
- AHMED, M.; KHIRSTOVA, P.; ICHO, G. Comparative study of tannins of *Acacia nilotica* an indigenous tanning material in Sudan with *Acacia mearnsii*. **Suranaree Journal of Society Technology**, v. 12, n. 4, p. 259-265, 2005.
- AHNERT, S.; DICKHOEFER, U.; SCHULZ, F.; 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.
- AKAIKE, H. A new look at the statistical model identification. **IEEE Transactions on Automatic Control**, v.19, n.6, p.716-723, 1974
- AL-DOBAIB, S. N. Effect of different levels of quebracho tannin on nitrogen utilization and growth performance of Najdi sheep fed alfalfa (*Medicago sativa*) hay as a sole diet. **Animal Science Journal**, v. 80, n. 5, p. 532-541, 2009.
- ANANTASOOK, N.; WANAPAT, M., CHERDTHONG, A.; GUNUN, P. Effect of tannins and saponins in *S amanea saman* on rumen environment, milk yield and milk composition in lactating dairy cows. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 99, n. 2, p. 335-344, 2015.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.)**, v. 66, n. 1, p. 01-09, 2007.
- ANIMUT, G.; PUCHALA, R.; GOETSCH, A. L.; PATRA, A. K.; SAHLU, T.; VAREL, V. H.; WELLS, J. Methane emission by goats consuming diets with different levels of condensed tannins from lespedeza. **Animal Feed Science and Technology**, v. 144, n. 3-4, p. 212-227, 2008.
- ANKOM. **RF Gas Production System**. p. 1–8, s/d. Disponível em: <[https://www.ankom.com/sites/default/files/document-files/RF\\_Manual.pdf](https://www.ankom.com/sites/default/files/document-files/RF_Manual.pdf)>. Acesso em: 11 de novembro de 2020.
- AOAC International. **Official Methods of Analysis (18th ed.)**, AOAC International, Arlington, VA (2005).

- AVILA, A. S.; ZAMBOM, M. A.; FACCENDA, A.; FISCHER, M. L.; ANSCHAU, F. A.; VENTURINI, T.; FACIOLA, A. P. Effects of Black Wattle (*Acacia mearnsii*) Condensed Tannins on Intake, Protozoa Population, Ruminal Fermentation, and Nutrient Digestibility in Jersey Steers. **Animals**, v. 10, n. 6, p. 1011, 2020.
- BAAH, J.; IVAN, M.; HRISTOV, A. N.; KOENIG, K. M.; RODE, L. M.; MCALLISTER, T. A. Effects of potential dietary antiprotozoal supplements on rumen fermentation and digestibility in heifers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, n. 1-2, p. 126-137, 2007.
- BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M. D. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy science**, v. 88, p. E9 – E21, 2005.
- BACH, A.; RUIZ MORENO, M.; THRUNE, M.; STERN, M. D. Evaluation of the fermentation dynamics of soluble crude protein from three protein sources in continuous culture fermenters. **Journal of animal science**, v. 86, n. 6, p. 1364-1371, 2008.
- BAE, H. D.; MCALLISTER, T. A.; YANKE, J.; CHENG, K. J.; MUIR, A. D. Effects of condensed tannins on endoglucanase activity and filter paper digestion by *Fibrobacter succinogenes* S85. **Applied and environmental microbiology**, v. 59, n. 7, p. 2132-2138, 1993.
- BAKER, S. K. Rumen methanogens, and inhibition of methanogenesis. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 50, n. 8, p. 1293-1298, 1999.
- BARRY, T. N.; MCNABB, W. C. The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. **British Journal of Nutrition**, v. 81, n. 4, p. 263-272, 1999.
- BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos (source and application of tannin and tannase in foods). **Alimentos e Nutrição**, 2008.
- BEAUCHEMIN, K. A.; MCGINN, S. M.; MARTINEZ, T. F.; MCALLISTER, T. A. Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 8, p. 1990-1996, 2007.
- BENCHAAR, C.; MCALLISTER, T. A.; CHOUINARD, P. Y. Digestion, ruminal fermentation, ciliate protozoal populations, and milk production from dairy cows fed cinnamaldehyde, quebracho condensed tannin, or *Yucca schidigera* saponin extracts. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 12, p. 4765-4777, 2008.
- BHATTA, R.; UYENO, Y.; TAJIMA, K.; TAKENAKA, A.; YABUMOTO, Y.; NONAKA, I.; KURIHARA, M. Difference in the nature of tannins on in vitro ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 11, p. 5512-5522, 2009.

- BRUTTI, D. D. **Taninos na fermentação ruminal in vitro do capim Marandu adubado ou não com nitrogênio.** 2017.
- BUTLER, LARRY G. Antinutritional effects of condensed and hydrolyzable tannins. In: **Plant polyphenols.** Springer, Boston, MA, 1992. p. 693-698.
- BRANDÃO, V. L. N.; MARCONDES, M. I.; FACIOLA, A. P. Comparison of microbial fermentation data from dual-flow continuous culture system and omasal sampling technique: A meta-analytical approach. **Journal of Dairy Science**, v. 103, p. 2347-2362.
- CALSAMIGLIA, S.; STERN, MARSHALL D.; FIRKINS, J. L. Comparison of nitrogen-15 and purines as microbial markers in continuous culture. **Journal of animal science**, v. 74, n. 6, p. 1375-1381, 1996.
- CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; DEVANT, M. Effects of pH and pH fluctuations on microbial fermentation and nutrient flow from a dual-flow continuous culture system. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 574-579, 2002.
- CARULLA, J. E.; KREUZER, M.; MACHMÜLLER, A.; HESS, H. D. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. **Australian journal of agricultural research**, v. 56, n. 9, p. 961-970, 2005.
- CASTRO-MONTOYA, J. M.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Chemical composition of rumen microbial fraction and fermentation parameters as affected by tannins and saponins using an in vitro rumen fermentation system. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 91, n. 3, p. 433-448, 2011.
- CHANEY, ALBERT L.; MARBACH, EDWARD P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical chemistry**, v. 8, n. 2, p. 130-132, 1962.
- CIESLAK, A.; ZMORA, P.; PERS-KAMCZYC, E.; SZUMACHER-STRABEL, M. Effects of tannins source (*Vaccinium vitis idaea* L.) on rumen microbial fermentation in vivo. **Animal feed science and technology**, v. 176, n. 1-4, p. 102-106, 2012.
- COSTA, T. D. S. A.; VIEIRA, R. F.; BIZZO, H. R.; SILVEIRA, D.; GIMENES, M. A. Secondary metabolites. **Embrapa Agroindústria de Alimentos-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2012.
- CZERKAWSKI, J. W.; BRECKENRIDGE, G. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). **British journal of nutrition**, v. 38, n. 3, p. 371-384, 1977.
- DEL BIANCO BENEDETI, P.; GALORO DA SILVA, L.; MAROSTEGAN DE PAULA; E., SHENKORU, T.; MARCONDES, M. I.; MONTEIRO, H. F.; FACIOLA, A. P. Effects of partial replacement of corn with glycerin on ruminal



- fermentation in a dual-flow continuous culture system. **PloS one**, v. 10, n. 11, p. e0143201, 2015.
- DICKHOEFER, U.; AHNERT, S.; SUSENBETH, A. Effects of quebracho tannin extract on rumen fermentation and yield and composition of microbial mass in heifers. **Journal of Animal Science**, v. 94, n. 4, p. 1561-1575, 2016.
- DIJKSTRA, J.; FORBES, J. M.; FRANCE, J. (Ed.). **Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism**. Cabi, 2005.
- DOLLAHITE, J. W.; PIGEON, R. F.; CAMP, B. J. The toxicity of gallic acid, pyrogallol, tannic acid, and *Quercus havardi* in the rabbit. **American journal of veterinary research**, v. 23, p. 1264, 1962.
- DSCHAAK, C. M.; WILLIAMS, C. M.; HOLT, M. S.; EUN, J. S.; YOUNG, A. J.; MIN, B. R. Effects of supplementing condensed tannin extract on intake, digestion, ruminal fermentation, and milk production of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 5, p. 2508-2519, 2011.
- MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Quinta edição. Editora da Universidade Federal São Carlos. Brasil, 2003.
- GRAINGER, C.; CLARKE, T.; AULDIST, M. J.; BEAUCHEMIN, K. A.; MCGINN, S. M.; WAGHORN, G. C.; ECKARD, R. J. 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, n. 2, p. 241-251, 2009.
- HAGERMAN, A. E.; ROBBINS, C. T.; WEERASURIYA, Y.; WILSON, T. C.; MCARTHUR, C. Tannin chemistry in relation to digestion. **Rangeland Ecology & Management/Journal of Range Management Archives**, v. 45, n. 1, p. 57-62, 1992.
- HARTISCH, C.; KOLODZIEJ, H. Galloylhamameloses and proanthocyanidins from *Hamamelis virginiana*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 1, p. 191-198, 1996.
- HASSANAT, F.; BENCHAAAR, C. Assessment of the effect of condensed (acacia and quebracho) and hydrolysable (chestnut and valonea) tannins on rumen fermentation and methane production in vitro. **Journal Science and Food Agriculture**. V 93, p. 332-339. 2013.
- HERVÁS, G.; FRUTOS, P.; GIRÁLDEZ, F. J.; MANTECÓN, Á. R.; DEL PINO, M. C. A. Effect of different doses of quebracho tannins extract on rumen fermentation in ewes. **Animal feed science and technology**, v. 109, n. 1-4, p. 65-78, 2003.
- HOOVER, W. H.; CROOKER, B. A.; SNIFFEN, C. J. Effects of differential solid-liquid removal rates on protozoa numbers in continuous cultures of rumen contents. **Journal of animal science**, v. 43, n. 2, p. 528-534, 1976.

- HRISTOV, A. N.; LEE, C.; HRISTOVA, R.; HUHTANEN, P.; FIRKINS, J. L. A meta-analysis of variability in continuous-culture ruminal fermentation and digestibility data. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 9, p. 5299-5307, 2012.
- JONES, W. T.; MANGAN, J. L. Complexes of the condensed tannins of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) with fraction 1 leaf protein and with submaxillary mucoprotein, and their reversal by polyethylene glycol and pH. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 28, n. 2, p. 126-136, 1977.
- JUNIOR, F. P.; CASSIANO, E. C. O.; MARTINS, M. F.; ROMERO, L. A.; ZAPATA, D. C. V.; PINEDO, L. A.; RODRIGUES, P. H. M. Effect of tannins-rich extract from *Acacia mearnsii* or monensin as feed additives on ruminal fermentation efficiency in cattle. **Livestock Science**, v. 203, p. 21-29, 2017.
- KARIUKI, I. W.; NORTON, B. W. The digestion of dietary protein bound by condensed tannins in the gastro-intestinal tract of sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v. 142, n. 3-4, p. 197-209, 2008.
- KEIM, J. P.; ALVARADO-GILIS, C.; ARIAS, R. A.; GANDARILLAS, M.; CABANILLA, J. Evaluation of sources of variation on in vitro fermentation kinetics of feedstuffs in a gas production system. **Animal Science Journal**, v. 88, n. 10, p. 1547-1555, 2017.
- KOENIG, K. M.; BEAUCHEMIN, K. A. Effect of feeding condensed tannins in high protein finishing diets containing corn distillers grains on ruminal fermentation, nutrient digestibility, and route of nitrogen excretion in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 96, n. 10, p. 4398-4413, 2018.
- KOZLOSKI, G. V.; HÄRTER, C. J.; HENTZ, F.; DE 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. **Small Ruminant Research**, v. 106, n. 2-3, p. 125-130, 2012.
- KRUEGER, W. K.; GUTIERREZ-BAÑUELOS, H.; CARSTENS, G. E.; MIN, B. R.; PINCHAK, W. E.; GOMEZ, R. R.; FORBES, T. D. A. Effects of dietary tannin source on performance, feed efficiency, ruminal fermentation, and carcass and non-carcass traits in steers fed a high-grain diet. **Animal Feed Science and Technology**, v. 159, n. 1-2, p. 1-9, 2010.
- KUMAR, R.; VAITHIYANATHAN, S. Occurrence, nutritional significance and effect on animal productivity of tannins in tree leaves. **Animal feed science and technology**, v. 30, n. 1-2, p. 21-38, 1990.
- LEMONS, B. J. M. **Fermentação ruminal in vitro com adição de extratos de plantas do cerrado**. goiânia: universidade federal de goiás, 2013.

- LÓPEZ, S. In vitro and in situ techniques for estimating digestibility. **Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism, 2nd edn. CAB International, Wallingford, UK**, p. 87-121, 2005.
- MADEIRA, H. M. F. **Validação da técnica de simulação ruminal (RUSITEC) e seu uso para estudo de manipulação da fermentação**. 1992. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- MCGUFFEY, R. K.; RICHARDSON, L. F.; WILKINSON, J. I. D. Ionophores for dairy cattle: current status and future outlook. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. E194-E203, 2001
- 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, n. 3, p. 241-256, 2003.
- MCLEOD, M. N. Plant tannins-their role in forage quality. In: **Nutr Abstr Rev**. 1974. p. 803-815.
- MCNABB, W. C.; PETERS, J. S.; FOO, L. Y.; WAGHORN, G. C.; JACKSON, 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, n. 2, p. 201-212, 1998.
- MCSWEENEY, C. S.; PALMER, B., MCNEILL, D. M.; KRAUSE, D. O. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, n. 1-2, p. 83-93, 2001.
- MEHREZ, A. Z.; ORSKOV E,R.; MCDONALD I. Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. **British Journal Nutrition**. Vol 38, n. 3, p. 437-443.
- MENEZES, C. M. Determinação direta de taninos e umidade em casca de acácia mearnsii (acácia-negra) por espectroscopia no infravermelho e calibração multivariada. 2013.
- MENKE, K. H.; RAAB, L.; SALEWSKI, A.; STEINGASS, H.; FRITZ, D.; SCHNEIDER, W. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. **The Journal of Agricultural Science**, v. 93, n. 1, p. 217-222, 1979.
- MENKE, K. H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. **Animal research and development**, v. 28, p. 7-55, 1988.

- MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC international**, v. 85, n. 6, p. 1217-1240, 2002.
- MIN, B. R.; BARRY, T. N.; ATTWOOD, G. T.; MCNABB, W. C. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. **Animal feed science and technology**, v. 106, n. 1-4, p. 3-19, 2003.
- MIZUBUTI, I. Y.; DE AZAMBUJA RIBEIRO, E. L.; PEREIRA, E. S.; PEIXOTO, E. L. T.; DOS SANTOS MOURA, E.; DO PRADO, O. P. P.; CRUZ, J. M. C. Cinética de degradação ruminal de alimentos proteicos pela técnica in vitro de produção de gases. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 555-566, 2014.
- MONOD, J. **La Technique de Cultura Continue: Théorie et Applications**. Annales de L'Institut Pasteur. Paris, 1950. Vol. 79, p. 390.
- MUELLER, H. I. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, n. 13, p. 2010-2037, 2006.
- NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES, ENGINEERING, AND MEDICINE et al. **Nutrient requirements of beef cattle**. National Academies Press, 2016.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Beef Cattle: Seventh Revised Edition: Update 2000**. Disponível em: <<https://www.nap.edu/catalog/9791/nutrient-requirements-of-beef-cattle-seventh-revised-edition-update-2000>>
- NETO, N. **Óleo bruto de Pterodon Emarginatus Vogel (sucupira) como manipulador da fermentação ruminal em sistema de cultura contínua de duplo fluxo**. 2015.
- NORRIS, A. B.; CROSSLAND, W. L.; TEDESCHI, L. O.; FOSTER, J. L.; MUIR, J. P.; PINCHAK, W. E.; FONSECA, M. A. Inclusion of Quebracho tannin extract in a high-roughage cattle diet alters digestibility, nitrogen balance, and energy partitioning. **Journal of Animal Science**, 13(13), 7410. 2020.
- OLIVEIRA, S. G.; BERCHIELLI, T. T.; PEDREIRA, M. S.; PRIMAVESI, O.; FRIGHETTO, R.; LIMA, M. A. Effect of tannin levels in sorghum silage and concentrate supplementation on apparent digestibility and methane emission in beef cattle. **Animal Feed Science and Technology**, v. 135, p. 235-248, 2007.
- OLIVEIRA, S. G.; BERCHIELLI, T. T. Potencialidades da utilização de taninos na conservação de forragens e nutrição de ruminantes-revisão. **Archives of Veterinary Science**, p. 1-9, 2007.
- OWENS, F. N.; BERGEN W. G. Nitrogen metabolism of ruminant animals: historical perspective, current understanding and future implications. **Journal of animal science**. V. 57, p. 498-518, 1983.

- PATRA, A. K.; SAXENA, J. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. **Phytochemistry**, v. 71, n. 11-12, p. 1198-1222, 2010.
- PAULA; E. M.; MONTEIRO, H. F.; SILVA, L. G.; BENEDETI, P. D. B.; DANIEL, J. L. P.; SHENKORU, T.; BRODERICK, G. A.; FACIOLA, A. P. Effects of replacing soybean meal with canola meal differing in rumen-undegradable protein content on ruminal fermentation and gas production kinetics using 2 in vitro systems. **Journal of dairy science**, n. 7, v. 100, p. 5281-5292, 2017.
- PEDREIRO, S. R. J. **Avaliação de efeitos sinérgicos entre compostos fenólicos do *Cymbopogon citratus***. 2018. Tese de Doutorado. Universidade de Coimbra.
- PELL, A. N.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. **Journal of dairy science**, v. 76, n. 4, p. 1063-1073, 1993.
- PIÑEIRO-VÁZQUEZ, A. T.; CANUL-SOLIS, J. R.; ALAYÓN-GAMBOA, J. A.; AYALA-BURGOS, A. J.; SOLORIO-SÁNCHEZ, F. J.; AGUILAR-PÉREZ, C. F.; KU-VERA, J. C. Energy utilization, nitrogen balance na microbial protein supply in cattle fed Pennisetum purpureum and condensed tannins. **Anim. Physiol. Anim. Nutr.** v. 101, p. 159-169, 2017.
- RD, N.; NY, M. Ankom Rf. [s. l.], n. 315, [s.d.]. Disponível em: <[https://www.ankom.com/sites/default/files/document-files/RF\\_Manual.pdf](https://www.ankom.com/sites/default/files/document-files/RF_Manual.pdf)>
- RUFENER, W. H.; NELSON, W. O.; WOLIN, M. J. Maintenance of the rumen microbial population in continuous culture. **Applied Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 196-201, 1963.
- SAS INSTITUTE. SAS/STAT™ SAS user's guide for windows environment. 2012.
- SAUVANT, D.; MESCHY F.; MERTENS, D. Les composantes de l'acidose ruminal e et les effets acidogènes des rations. **INRA Prod. Anim.** V. 12, p. 49–60. 1999.
- SCHNEIDER, P. R.; FLEIG, F. D.; FINGER, C. A. G.; KLEIN, J. E. M. Crescimento da Acácia-negra, *Acacia mearnsii* em diferentes espaçamentos. **Ciência Florestal**, v. 10, n. 2, p. 101-112, 2000.
- SILVA, L. G.; BUNKERS, J.; PAULA, E. M.; SHENKORU, T.; YEH, Y.; AMORATI, B.; FACIOLA, A. P. Effects of flaxseed and chia seed on ruminal fermentation, nutrient digestibility, and long-chain fatty acid flow in a dual-flow continuous culture system. **Journal of Animal Science**, v. 94, n. 4, p. 1600-1609, 2016.
- ŚLIWIŃSKI, B. J.; KREUZER, M.; SUTTER, F.; MACHMÜLLER, A.; WETTSTEIN, H. R. Performance, body nitrogen conversion and nitrogen emission from manure of dairy cows fed diets supplemented with different plant extracts. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 13, n. 73, p. 91, 2004.

- SLYTER, L. L.; NELSON, W. O.; WOLIN, M. J. Modifications of a device for maintenance of the rumen microbial population in continuous culture. **Applied Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 374-377, 1964.
- SLYTER, L. L.; PUTNAM, P. A. In vivo vs. in vitro continuous culture of ruminal microbial populations. **Journal of Animal Science**, v. 26, n. 6, p. 1421-1427, 1967.
- SMERIGLIO, A.; BARRECA, D.; BELLOCCO, E.; TROMBETTA, D. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. **British journal of pharmacology**, v. 174, n. 11, p. 1244-1262, 2017.
- SMITH, A. H.; ZOETENDAL, E.; MACKIE, R. I. Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins. **Microbial ecology**, v. 50, n. 2, p. 197-205, 2005.
- STERN, M. D.; ENDRES, M.I. **Laboratory Manual: Research Techniques in Ruminant Nutrition**. Department of Animal Science. University of Minnesota. 1991.
- STERN, M. D.; BACH, A.; CALSAMIGLIA, S. Alternative techniques for measuring nutrient digestion in ruminants. **Journal of animal science**, v. 75, p. 2256-2276, 2009.
- TAGLIAPIETRA, F.; CATTANI, M.; HANSEN, H. H.; HINDRICHSEN, I. K.; BAILONI, L.; SCHIAVON, S. Metabolizable energy content of feeds based on 24 or 48 h in situ NDF digestibility and on in vitro 24 h gas production methods. **Animal Feed Science and Technology**, v. 170, n. 3-4, p. 182-191, 2011.
- TERRILL, T. H.; WAGHORN, G. C.; WOOLLEY, D. J.; MCNABB, W. C.; BARRY, T. N. Assay and digestion of 14 C-labelled condensed tannins in the gastrointestinal tract of sheep. **British journal of nutrition**, v. 72, n. 3, p. 467-477, 1994.
- THEODOROU, M. K.; WILLIAMS, B. A.; DHANOA, M. S.; MCALLAN, A. B.; FRANCE, J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal feed science and technology*, 48(3-4), 185-197. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal feed science and technology**, v. 48, n. 3-4, p. 185-197, 1994.
- TIEMANN, T. T.; LASCANO, C. E.; KREUZER, M.; HESS, H. D. The ruminal degradability of fibre explains part of the low nutritional value and reduced methanogenesis in highly tanniferous tropical legumes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 10, p. 1794-1803, 2008.
- TILLEY, J. M. A.; TERRY, D. R. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. **Grass and forage science**, v. 18, n. 2, p. 104-111, 1963.

- VAN SOEST, P. J.; MCQUEEN, R. W. The chemistry and estimation of fibre. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 32, n. 3, p. 123-130, 1973.
- VICKERY, M. L.; VICKERY, B. **Secondary Plant Metabolism**. 1. ed. London: Macmillan Press., 1990.
- WAGHORN, G. C.; TAVENDALE, M. H.; WOODFIELD, D. R. Methanogenesis from forages fed to sheep. In: **Proceedings of the New Zealand Grassland Association**. 2002. p. 167-171.
- WAGHORN, G. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production—Progress and challenges. **Animal Feed Science and Technology**, v. 147, n. 1-3, p. 116-139, 2008.
- WARNER, A. C. I. Criteria for establishing the validity of in vitro studies with rumen micro-organisms in so-called artificial rumen systems. **Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 733-748, 1956.
- WELLER, R. A.; PILGRIM, A. F. Passage of protozoa and volatile fatty acids from the rumen of the sheep and from a continuous in vitro fermentation system. **British Journal of Nutrition**, v. 32, n. 2, p. 341-351, 1974.
- WOODWARD, S. L.; WAGHORN, G. C.; LASSEY, K. R.; LABOYRIE, P. G. Does feeding sulla (*Hedysarum coronarium*) reduce methane emissions from dairy cows?. In: **Proceedings-New Zealand society of animal production**. New Zealand Society of Animal Production; 1999, 2002. p. 227-230.
- WOODWARD, S. L.; WAGHORN, G. C.; ULYATT, M. J.; LASSEY, K. R. Early indications that feeding Lotus will reduce methane emissions from ruminants. In: **Proceedings-New Zealand Society of Animal Production**. New Zealand Society of Animal Production; 1999, 2001. p. 23-26.