

EFEITOS DE ADITIVOS NATURAIS A BASE DE TANINO SOBRE A FERMENTAÇÃO RUMINAL DE DIETAS DE NOVILHOS TERMINADOS EM CONFINAMENTO USANDO O SISTEMA IN VITRO “DUAL FLOW CONTINUOUS CULTURE”

Gabriel Meurer **Wachekowski**¹; Caio Rodrigues **Monteiro**²; Henrique Gonçalves **Reolon**³; Amanda **Casagrande**⁴; Renata Helena Branco **Arnandes**⁵

Nº 21702

RESUMO – O objetivo do trabalho foi de 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 aparente de nutrientes e parâmetros ruminais usando o sistema in vitro “Dual flow continuous culture system”. Utilizou-se bovinos da raça nelore canulados no rúmen. O delineamento experimental foi um 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 foram fornecidas duas vezes ao dia. Para procedimentos estatísticos utilizou-se PROC MIXED do SAS, com período, tratamento e quadrado como efeito fixo e unidade experimental como efeito aleatório. Realizou-se teste de ajuste linear ou quadrático para relacionar dose de TAN e variáveis respostas. A maior digestibilidade aparente da proteína bruta foi obtida com a dose de 0,16% e a adição de TAN reduziu a digestibilidade da matéria orgânica (51,3 vs 49,6%). O pH não diferiu entre as dietas. Concentração de isobutirato foi superior em 0,08% TAN. Inclusão de TAN reduziu a concentração total de AGV, acetato, butirato, valerato e acetato: propionato ($P < 0,05$). Nossos resultados, indicam que os extratos de tanino adicionados em dietas de bovino de corte em baixas concentrações tem o potencial de reduzir acetato, o que pode ser benéfico do ponto de vista energético e ambiental, uma vez que menor acetato pode acarretar em menor produção de metano.

Palavras-chaves: *Produção animal, eficiência alimentar, sustentabilidade, padrão fermentativo, sistemas in vitro.*

¹ Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduando em Zootecnia, IFRO – campus Colorado do Oeste – RO; gmeurer87@gmail.com

²Colaborador, mestrando em Zootecnia (UFLA), graduação em Zootecnia, Lavras, MG.

³Colaborador, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduando em Zootecnia, IFRO – campus Colorado do Oeste – RO

⁴Colaborador, Bolsista UDESC: Graduação em Zootecnia, UDESC, Chapecó – SC

⁵Orientador, pesquisadora do Instituto de Zootecnia campus Sertãozinho – SP, renata@agricultura.sp.gov.br.

ABSTRACT – *The objective of this study was to evaluate the effect of increasing doses of condensed tannin extract from *Acacia mearnsii* (TAN): 0,00; 0,08; 0,16; 0,32 e 0,64 (% da matéria seca da dieta; MS) sobre a digestibilidade aparente de nutrientes e parâmetros ruminais usando o sistema in vitro “Dual flow continuous culture system”. To carry out the experiment, rumen-cannulated Nelore cattle were used. The experimental design was 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 were fed twice a day. For statistical procedures, the SAS PROC MIXED was used, with period, treatment and square as fixed effect and experimental unit as random effect. A linear or quadratic adjustment test was performed to relate TAN dose and response variables. The highest apparent digestibility of crude protein (CP) was obtained with a dose of 0,16% and the addition of TAN reduced organic matter digestibility (51,3 vs 49,6%). The pH did not differ between diets. Isobutyrate concentration was higher at 0,08% TAN. Inclusion of TAN reduced the total concentration of VFA, acetate, butyrate, valerate and acetate: propionate. Our results indicate that tannin extracts added to beef cattle diets at low concentrations have the potential to reduce acetate, which can be beneficial from an energy and environmental standpoint, since less acetate can lead to lower production of methane.*

Keywords: Animal production, feed efficiency, sustainability, fermentation pattern, in vitro systems

1 INTRODUÇÃO

Com o intenso crescimento da pecuária nacional modificações no manejo alimentar dos animais é necessário, a fim de tornar a atividade cada vez mais lucrativa, eficiente e sustentável. Com isso a inclusão de aditivos naturais em dietas de bovinos de corte pode trazer melhores condições para o desenvolvimento sustentável e precoce dos animais de produção. Uma das formas de se melhorar a eficiência do uso dos nutrientes pelos ruminantes é através da diminuição das perdas de energia, como através do metano que pode causar uma perda de 2 a 12% sobre a ingestão de energia bruta da dieta (JOHNSON, 1995). Para isso se faz necessário modular a fermentação e digestão ruminal a fim de se aumentar a produção de propionato no rúmen e, consequentemente, diminuir a produção de metano

Além disso, o uso de aditivos na alimentação dos ruminantes melhora o aproveitamento dos nutrientes da dieta através da alteração da microbiota ruminal, que por sua vez alteram o padrão de fermentação e digestão ruminal do alimento, podendo resultar em uma melhoria da eficiência animal (MCGUFFEY; RICHARDSON; WILKINSON, 2001). Dentre os aditivos ionóforos usados comercialmente, a monensina apresenta bons resultados há várias décadas. Por exemplo, no experimento conduzido por NEUMANN et al. (2018), onde o uso de monensina na dieta de animais confinados foi avaliado, os autores observaram uma redução da ingestão de matéria seca e aumento da eficiência alimentar e peso vivo final nos animais que receberam aditivos na dieta.

No entanto, o uso de ionóforos para manejo alimentar animal vem sendo proibido por algumas organizações governamentais devido a preocupação desses aditivos poderem causar resistência a antibióticos pelos microrganismos. Desta forma, em 2003 a União Europeia restringiu o uso de ionóforos em dietas de ruminantes pela legislação (CE) N.O 1831/2003. Por isso o estudo de aditivos naturais como por exemplo os taninos, se faz necessário para a substituição do uso dos ionóforos sintéticos

As plantas produzem diversos complexos orgânicos primários e secundários. Os taninos são classificados como complexos secundários que atuam como defesa contra predadores (PAIS, 1998), além de ser são um grupo heterogêneo de macro moléculas solúveis em água. Além disso, tais compostos fenólicos secundários são quimicamente reativos podendo formar ligações inter e intramoleculares de hidrogênio, capazes de interagir e precipitar moléculas, como exemplo, carboidratos e proteínas (SMERIGLIO et al., 2017). Devido a grande diversidade estrutural dos taninos os mesmos passaram a ser classificados segundo sua estrutura química. Por isso os taninos, que podem ser hidroliticamente fracionados em seus componentes através de ácido, bases ou enzimas (tanases), são classificados como taninos hidrolisáveis, já os compostos proantocianidinas oligoméricas e poliméricas, os quais não são hidrolisáveis, foram classificados como taninos condensados (KHANBABAEE; VAN REE, 2001).

Porém, o uso desses compostos fenólicos como aditivos alimentares utilizados para a melhoria da eficiência animal não é bem difundida. Por isso pesquisas vem sendo realizadas para o total entendimento do mecanismo de ação desses compostos a nível ruminal. O estudo de HARVEY (2006), mostrou que taninos inclusos na dieta de animais ruminantes podem se complexar com proteínas tanto de origem dietéticas quanto salivares, podendo gerar um aumento da proteína ruminal de escape, com isso mais pesquisas são necessárias, afim de encontrar uma concentração ótima entre os taninos naturais e as proteínas dos alimentos.

Ao avaliar a inclusão de tanino em dietas para novilhos não castrados terminados em confinamento, NASCIMENTO, (2019) reportou efeito positivo para o uso deste aditivo alimentar, o qual apresentou resultados semelhantes para eficiência alimentar e características de carcaça quando comparado ao tratamento com o uso de monensina. Desta forma, o desenvolvimento de novas pesquisas a fim de se avaliar o nível de inclusão ideal de taninos em dietas de ruminantes e seus efeitos como aditivos alimentares é de suma importancia para a produção animal. Por isso, o objetivo do presente trabalho é avaliar o padrão fermentativo de diferentes níveis de inclusão de aditivos naturais a base de tanino na alimentação de bovinos em confinamento utilizando o método de fermentação in vitro *“Dual Flow Continuous Culture”*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local dos experimentos

O experimento foi realizado 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).

2.2 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 Nelore 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. Os ingredientes e a quantidade de cada ingrediente que será utilizada na dieta são apresentados na Tabela 1 e a composição bromatológica esperada é apresentado na Tabela 2. A composição média esperada foi obtida por amostragem e análise bromatológica dos ingredientes separados para realização do ensaio experimental.

Tabela 1. Quantidade (g de MS/vaso fermentador/dia) e composição em ingredientes (% da matéria seca) da dieta proposta.

Ingrediente	Quantidade (g de MS/vaso fermentador/dia)	% da MS da dieta
Milho, grão	30,589	39,303
Silagem de milho	17,889	22,985
Polpa cítrica	14,327	18,408
Caroço de algodão	10,067	12,935
Farelo de amendoim	1,316	1,692
Farelo de soja	1,316	1,692
Mistura mineral ¹	2,323	2,985
Total	77,828	100,000

¹Composição mineral: 16 g/Kg Ca, 80 mg/kg Co, 1000 mg/kg Cu, 22 g/Kg S, 80 g/Kg P, Mg 8 g/Kg, Mn 700 mg/Kg, 18 mg/Kg Se, 120 g/Kg Na, 3600 mg/Kg Zn, 80 mg/Kg I.

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; 0,0344; 0,0689; 0,1378; 0,2755 g/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, sendo que, antes da moagem, a silagem de milho foi seca em estufa de ventilação forçada a 55°C até estabilização de peso.

Os bovinos doadores de líquido ruminal receberam dieta na proporção 60:40 de forragem e concentrado, durante, ou pelo menos, 14 dias antes da coleta de fluido ruminal. A forragem utilizada para alimentação dos bovinos doadores de conteúdo ruminal foi silagem de milho, assim como as dietas experimentais, e o concentrado foi composto de milho, soja e mistura mineral livre de aditivos alimentares.

Tabela 2. Composição dos ingredientes dietéticos. Média \pm DP de, pelo menos, duas amostras retiradas do banco de alimentos que será utilizado no experimento.

Ingrediente/ Nutriente	MS	PB	EE	FDN	Cinzas	CNF
	% MN			% MS		
Milho grão	89,56 \pm 0,06	10,45 \pm 0,13	4,02 \pm 0,79	5,28 \pm 0,12	1,00 \pm 0,02	79,25
Silagem de milho	30,12 \pm 0,42	8,75 \pm 0,20	2,86 \pm 0,80	45,67 \pm 0,15	7,02 \pm 0,21	35,7
Polpa cítrica	89,72 \pm 0,03	7,85 \pm 0,04	2,59 \pm 0,87	22,29 \pm 0,10	10,24 \pm 0,13	57,03
Caroço de algodão	93,89 \pm 0,42	25,95 \pm 0,40	19,24 \pm 1,54	45,97 \pm 1,63	6,95 \pm 1,56	1,94
Farelo de amendoim	92,43 \pm 0,45	60,65 \pm 0,26	1,28 \pm 1,04	21,53 \pm 0,62	7,74 \pm 0,06	8,8
Farelo de soja	90,90 \pm 0,00	49,18 \pm 0,44	1,94 \pm 0,77	15,93 \pm 1,29	5,68 \pm 0,01	27,27
Mistura mineral	97,23 \pm 0,02	---	---	---	87,59 \pm 2,65	12,41
TANFEED ²	90,39 \pm 0,05	---	---	---	3,69 \pm 0,01	96,38

¹MS = Matéria seca. PB = Proteína bruta. EE = extrato etéreo (valores tabelados; CQBAL, 2020). FDN = Fibra em detergente neutro. CNF = Caboidratos não fibrosos = 100 – (PB + FDN + EE + cinzas). MN = matéria natural. ²Tanino condensado de *Acacia mearnsii* (teor mín. 70% de Tanino; Tanac SA, montenigor, RS, Brasil).

2.3 Sistema de cultura contínua de fluxo duplo

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), 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 2 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 através de 4 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 (N₂) para manutenção da anaerobiose. Após homogeneização, o líquido ruminal foi transferido para cada um dos vasos fermentadores até que haja transbordo no vaso de efluentes (1297,13 mL/vaso, em média).

Durante o período experimental 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 N₂ a uma taxa aproximada de 40ml/min. Houve infusão contínua de solução tampão ou saliva artificial (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 líquido retirado por sucção, através de um filtro e 5%/h de sólido. Foi acrescentado 0,4 g/L de ureia na saliva artificial para simular a reciclagem do nitrogênio. Para o pH dos vasos fermentadores durante o período experimental houve monitoramento individualmente por um medidor de pH Accumet AP61 (Fisher Scientific, Atlanta, GA) acoplado a cada vaso fermentador. Um software (Simulador de rúmen; Engco LTDA, Piracicaba, SP) 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 líquidos e sólidos foram coletados e pesados para conferência dos fluxos, sendo que nos sete primeiros dias (período de adaptação) os conteúdos foram descartados e nos dias 8, 9 e 10 (período de coleta) foram destinados para retirada de amostras. Vinte e quatro horas antes da primeira coleta e durante o período de amostragem (últimos 3 dias do período experimental), os recipientes de efluentes líquidos e sólidos foram refrigerados a 4°C para minimizar a atividade microbológica após retirada dos efluentes do vaso.

Nos dias 8, 9 e 10, os efluentes da digesta líquidos e sólidos 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). Além disso, duas sub amostras de 10 mL foram filtradas através de 8 camadas de tecido de gaze, preservadas com 0.2 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 50%, centrifugadas a 1.000 × g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante decantado será armazenado a -20°C para subseqüentes análises da concentração de nitrogênio amoniacal (NH₃-N) e ácidos graxos voláteis (AGV) ruminal.

Durante o dia 8 de cada período experimental, o pH do fermentador foi medido 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 espremido 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 $1.000 \times g$ por 10 min e, em seguida, o sobrenadante foi centrifugado a $17.700 \times g$ por 20 min. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os pellets bacterianos foram liofilizados e armazenados para análises de purinas totais, nitrogênio total e MO (BACH et al., 2008) para estimar a síntese de proteína bacteriana.

2.4 Análises Químicas

As amostras dos alimentos e efluente foram analisadas quanto ao 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, tratadas com α -amilase termoestável e sulfito de sódio de acordo com Mertens (2002) e adaptadas para o Ankom200 Fiber Analyzer (Ankom Technology, Macedon, NY). Para o FDA, as amostras foram analisadas sequencialmente de acordo com Van Soest e McQueen (1973) e adaptadas para o Ankom200 Fiber Analyzer. A PB insolúvel em detergente neutro (NIDN) foi isolada por determinação gravimétrica usando α -amilase termoestável e sulfito de sódio, seguida pela análise da PB (método 990.13; AOAC, 2005). A concentração de carboidratos não fibrosos dos ingredientes da ração foi calculada usando a equação: $CNF = 100 - (\% FDN + \% PB + \% EE + \% cinza) + NIDN$, de acordo com o NRC (2001).

A concentração de AGV das amostras de efluentes foi determinada com um cromatógrafo gasoso (modelo 3800; Varian Inc., Walnut Creek, CA) equipado com uma coluna de vidro (180 cm x 4 mm) embalada com GP 10% SP-1200/1% H₃PO₄ em 80/100 Chromosorb WAW (Supelco, Bellefonte, PA). O N₂ foi usado como gás de arraste a uma taxa de fluxo de 85 mL/min. As temperaturas do forno, da porta de injeção e da porta do detector foram de 125, 175 e 180 °C, respectivamente. A concentração de NH₃-N foi determinada de acordo com Chaney e Marbach (1962).

2.5 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 abaixo:

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

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

As digestibilidades verdadeiras ruminais dos nutrientes (MS, MO, PB, CNF, FDN, FDA) foram calculadas conforme exemplificado, a seguir, para MS.

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

2.6 Análise estatísticas

Os dados foram analisados usando o procedimento MIXED de SAS 9.4 (SAS, 2002) com delineamento de quadrado latino 5 × 5 replicado:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + Q_j + P_k + E_{ijk}$$

onde Y_{ijk} é a variável dependente, μ é a média geral, T_i é o efeito fixo da dieta ($i = 1-5$), Q_j do quadrado latino ($j = 1$ ou 2), P_k é o efeito fixo do período ($k = 1-5$) e E_{ijk} é o erro residual.

As médias dos mínimos quadrados e o erro padrão da média foram relatados para todos os dados, com significância declarada em $P \leq 0,05$ e tendências em $0,05 > P \leq 0,10$. Os dados de pH ruminal foram analisados como medidas repetidas de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijklm} = \mu + T_i + Q_j + P_k + F(Q)_{li} + H_m + TH_{im} + E_{ijklm}$$

onde Y_{ijklm} é a variável dependente, μ é a média geral, T_i é o efeito fixo da dieta ($i = 1-5$), Q_j do quadrado latino ($j = 1$ ou 2), P_k é o efeito fixo do período ($k = 1-5$), $F(Q)_{li}$ é o efeito aleatório do fermentador (F) dentro do quadrado (Q) ($l = 1-10$), e E_{ijklm} é o erro residual, H_m é o efeito fixo do tempo ($m = 1-5$), TH_{im} é a interação entre tratamento (T) e tempo (H), e E_{ijklm} é o erro residual. O efeito do fermentador na dieta foi usado como termo de erro para testar o efeito da dieta. A estrutura de covariância a ser utilizada será a que apresentar o menor valor para o critério de informação de Akaike.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 3 são apresentados os resultados para digestibilidade obtidos por meio do sistema *in vitro* de cultivo contínuo. A inclusão de doses de tanino na dieta, reduziu linearmente ($P = 0,03$) a digestibilidade da MO ($P = 0,03$). Apesar de se ter evidenciado ajuste linear para redução da

digestibilidade da MO, a equação obtida pela regressão teve pouco ajuste aos dados experimentais (Digest. MO = $-0,02901 \times \text{dose de tanino} + 0,5172$; $R^2 = 0,07$. Para FDA também foi observado efeito linear negativo entre aumento da dose de tanino e redução da digestibilidade ($P < 0,05$).

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) ¹					EMP ⁴	Regressão ³ (p-valor)	
	0.00	0.08	0.16	0.32	0.64		L	Q
Matéria Orgânica	51,3	50,1	49,3	50,4	48,7	0,007	0,032*	0,813
Fibra detergente neutro	63,5	63,2	61,9	63,9	59,6	0,021	0,212	0,535
Fibra detergente ácido	50,4	51,7	51,6	51,5	46,0	0,020	0,048*	0,128
Proteína Bruta	-4,6c	-3,6cb	-1,6a	-3,5cb	-0,4ba	0,015	0,172	0,507

* Diferença estatística pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). ^{a-b-c} Mínimos quadrados médias consecutivas com sobrescritos diferentes diferem em $P \leq 0,05$. ¹ Aditivo a base de tanino condensado de *Acacia mearnsii* (teor mín. 70% de tanino; Tanac SA, montenogor, RS, Brasil). ³ Teste de ajuste, por regressão, das variáveis respostas e doses de tratamento para os modelos linear (L) e quadráticos (Q). ⁴ EP = Erro Padrão da Média. Para EPM diferente entre médias de uma mesmo variável foi reportado o maior.

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), no entanto, os resultados foram semelhantes aos encontrados na literatura quando a utilização das doses foram maiores, indicando que mesmo com doses menores que 1% da MS na dieta total os taninos tem o potencial de modificar a fermentação ruminal.

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.

Observou-se uma maior digestibilidade aparente da PB para o tratamento com maior inclusão de tanino quando comparado ao controle ($P = 0,03$). Uma possível explicação para este fato pode estar em uma maior retenção de N nos vasos fermentadores que receberam tanino na forma de proteína microbiana. 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) observou uma redução em até 20% na digestibilidade do N quando

acrescentou tanino na dieta. De forma similar, Aguerre *et al.* (2016) também observaram reduções na digestibilidade aparente N com inclusão de tanino.

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 1).

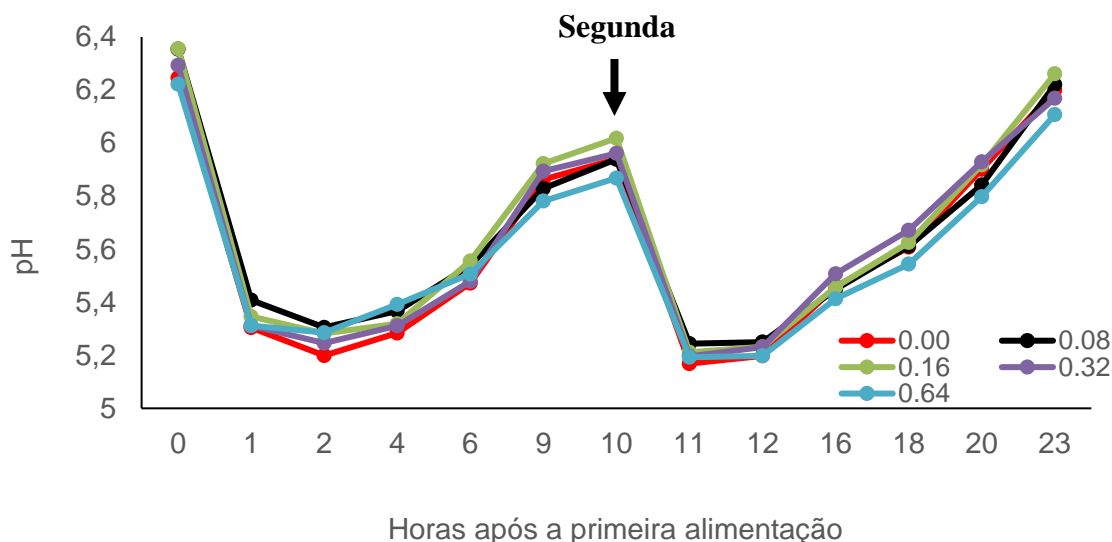


Figura 1. Curva de pH para diferentes doses de extrato¹ de tanino de *Acacia mearnsii* em sistema *in vitro* de cultivo contínuo de fluxo duplo. Cada linha corresponde a um tratamento testado que está indicado pelas cores na legenda. A hora zero corresponde ao momento da primeira alimentação do sistema.

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 2, poderiam interferir na suposta complexação do tanino com outras moléculas, mas esses valores não foram atingidos no presente estudo.

A concentração total de AGV do efluente foi menor para os tratamentos que receberam tanino, 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 4. 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.

Houve efeito linear para AGV total e isobutirato. 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 BENCHAAR, 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 CH₄ por grama de MO fermentada. Além de ser energeticamente favorável ao animal, produzir menos CH₄ 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.



15º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2021

01 a 02 de setembro de 2021

ISBN 978-65-994972-0-9

Tabela 4. 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) ¹					EMP ⁴	Regressão ³ (p-valor)	
	0.00	0.08	0.16	0.32	0.64		L	Q
NH ₃ -N, mg/dL	0.56	0.55	0.53	0.48	0.44	0,10	0,10	0,67
AGV, mM								
Total de AGV	99,60	92,22	90,95	93,33	90,70	2,730	0,029*	0,210
Total de AGVR ⁵	1,40	1,41	1,34	1,32	1,29	0,057	0,100	0,699
Acetato	47,27	42,52	41,88	44,03	42,68	1,516	0,103	0,122
Propionato	33,75	33,15	31,39	32,10	31,42	1,259	0,129	0,244
Butirato	12,58	11,22	12,02	12,00	11,41	0,553	0,088	0,631
Isobutirato	0,49 ^b	0,52 ^a	0,49 ^{bc}	0,48 ^c	0,49 ^{bc}	0,522	0,012*	0,128
Valerato	4,60	3,93	4,32	3,88	3,91	0,303	0,086	0,182
Isovalerato	0,91	0,89	0,86	0,85	0,81	0,052	0,159	0,859
AGV, % do total								
Acetato	47,64	46,36	45,89	47,28	47,11	0,767	0,728	0,235
Propionato	33,70	35,77	34,68	33,74	35,20	0,713	0,345	0,774
Butirato	12,63	12,12	13,18	12,93	12,63	0,512	0,744	0,722
Isobutirato	0,50	0,56	0,55	0,52	0,54	0,567	0,707	0,747
Valerato	4,59	4,21	4,82	4,14	4,25	0,302	0,301	0,510
Isovalerato	0,94	0,98	0,95	0,93	0,91	0,920	0,672	0,799
Acetato:propionato	1,46	1,31	1,34	1,42	1,39	0,053	0,967	0,209

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

^{a-b-c} Mínimos quadrados médias consecutivas com sobrescritos diferentes diferem em $P \leq 0,05$

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

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

⁴ EP = Erro Padrão da Média. Para EPM diferente entre médias de uma mesma variável foi reportado o maior.

⁵ AGVR = Ácido graxo volátil de cadeia ramificada.

4 CONCLUSÃO

A inclusão de aditivo natural à base de tanino condensado de *Acacia mearnsii* alterou alguns parâmetros de fermentação no presente estudo. O resultado mais consistente foi a redução na produção de acetato e na relação acetato:propionato. Doses maiores de tanino reduziram a concentração de amônia no meio, quando comparado a doses menores. O pH não foi influenciado por doses de tanino na dieta. Nossos resultados, indicam que os extratos de tanino adicionados em dietas de bovino de corte em baixas concentrações tem o potencial de reduzir acetato, o que pode ser benéfico do ponto de vista energético e ambiental, uma vez que menor acetato pode acarretar em menor produção de metano.

5 AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Instituto de Zootecnia, Sertãozinho, SP pelo apoio logístico necessário para o projeto, também ao CNPq pela concessão da bolsa de iniciação científica, possibilitando a participação de um aluno de graduação nos projetos de pesquisa. À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pela aquisição do equipamento multiusuário Dual flow Continuous culture usado no projeto, processo 2019/17243-0. Agradecemos também a empresa TANAC S.A pelo fornecimento dos extratos a base de tanino.

6 REFERÊNCIAS

- 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.
- 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.
- 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.
- CHANEY, ALBERT L.; MARBACH, EDWARD P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical chemistry**, v. 8, n. 2, p. 130-132, 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.
- HARVEY, I. M. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 2010–2037, n. August 2004, p. 1237–1243, 2006.
- 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.
- 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.
- JOHNSON, K. A.; JOHNSON, D. E. Methane emissions from cattle. **Journal of animal science**, v. 73, n. 8, p. 2483–2492, 1995.
- KHANBABAEI, K.; VAN REE, T. Tannins: Classification and definition. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 6, p. 641–649, 2001.
- 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.
- 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.
- NASCIMENTO, K. DE S. EFEITO DO TANINO NO DESEMPENHO E CARACTERÍSTICAS DE CARCAÇA DE BOVINOS NÃO CASTRADOS TERMINADOS EM CONFINAMENTO. **Universidade Federal de Goiás**, v. 8, n. 2, p. 2019, 2019.
- NEUMANN, M. et al. Growth performance and safety of meat from cattle feedlot finished with monensin in the ration. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 2, p. 697–709, 2018.
- 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. Potencialidades da utilização de taninos na conservação de forragens e nutrição de ruminantes-revisão. **Archives of Veterinary Science**, p. 1-9, 2007.
- 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.
- PAIS, M. P. Valor nutritivo e investimento em defesa em folhas de *Didymopanax vinosum* E. March com a herbivoria em três fisionomias de cerrado. **Universidade de São Paulo**, v. 1, n. Ribeirão



Preto, p. 1–106, 1998.

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.

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

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

SMERIGLIO, A. et al. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 11, p. 1244–1262, 2017.

STERN, M. D.; ENDRES, M.I. **Laboratory Manual: Research Techniques in Ruminant Nutrition**. Department of Animal Science. University of Minnesota. 1991.

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.

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.