



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL E PASTAGENS



UTILIZAÇÃO DO EXTRATO PURIFICADO DE TANINOS CONDENSADOS DE  
PLANTAS DA CAATINGA SOBRE A FERMENTAÇÃO  
MICROBIANA RUMINAL *IN VITRO*

Autora: Diana Rocha dos Anjos  
Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Dulciene Karla de Andrade Silva

GARANHUNS/PE  
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL E PASTAGENS

UTILIZAÇÃO DO EXTRATO PURIFICADO DE TANINOS CONDENSADOS DE  
PLANTAS DA CAATINGA SOBRE A FERMENTAÇÃO  
MICROBIANA RUMINAL *IN VITRO*

Dissertação apresentada, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Pastagens PRPPG/UFRPE em cumprimento às exigências acadêmicas para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal e Pastagens, da Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns. Área de Concentração: Produção Animal.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Dulciene Karla de A. Silva  
Coorientador: Dr. Rodrigo Mendonça de Lucena

GARANHUNS/PE  
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL E PASTAGENS

UTILIZAÇÃO DO EXTRATO PURIFICADO DE TANINOS CONDENSADOS DE  
PLANTAS DA CAATINGA SOBRE A FERMENTAÇÃO  
MICROBIANA RUMINAL *IN VITRO*

---

**Prof. Dr. Mozart A. Fonseca - University of Nevada, Reno**  
(Examinador Externo)

---

**Prof. Dr. Evaristo Jorge Oliveira de Souza UFRPE/UAST**  
(Examinador Interno)

---

**Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Dulciene Karla de Andrade Silva - UFRPE/UAG**  
(Orientadora)

## SUMÁRIO

Página

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	5
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	6
<b>RESUMO</b> .....	7
<b>ABSTRACT</b> .....	8
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>10</b>
2.1 Geral.....	10
2.2 Específicos .....	10
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>10</b>
3.1 Taninos.....	10
3.2 Espécies vegetais com potencial taninífero.....	12
<b>3.3 Efeitos dos taninos condensados na população microbiana ruminal</b> .....	<b>13</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>14</b>
4.1 Locais de coleta do material vegetal .....	14
4.2 Material vegetal.....	16
4.3 Determinações químico-bromatológicas.....	17
4.4 Purificação de taninos .....	18
4.5 Quantificação de taninos .....	19
4.6 Produção de gás <i>in vitro</i> .....	20
4.7 Análise estatística dos dados .....	21
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>21</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>27</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	<b>28</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>28</b>

## LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Estrutura química de taninos hidrolisáveis.....	11
Figura 2. Estrutura química de taninos condensados.....	12
Figura 3. Precipitação pluvial diária em Delmiro Gouveia-AL, no mês março de 2017. ....	15
Figura 4. Precipitação pluvial diária em Sertânia-PE, no mês março de 2017.....	16
Figura 5. Temperatura máxima, média e mínima e precipitação pluvial e diária do município de Santa Terezinha-PB, no período de abril a maio de 2017.....	16
Figura 6. Análise de componente principal.....	25
Figura 7. Curvas de produção de gás <i>in vitro</i> em diferentes níveis de extrato purificado de taninos condensados .....	26

## LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Curva de calibração para a quantificação de taninos condensados pelo método fenóis precipitáveis por proteína (PPP) .....	20
Tabela 2. Solução utilizada para quantificação de taninos condensados pelo método fenóis precipitáveis por proteína (PPP). .....	20
Tabela 3. Composição químico-bromatológica dos extratos vegetais do Angico vermelho e Jurema preta de diferentes locais de coleta.....	22
Tabela 4. Concentração de taninos condensados precipitáveis por proteína.....	23
Tabela 5. Produção de gás <i>in vitro</i> com diferentes níveis de extrato purificado de taninos condensados. ....	24
Tabela 6. Quantificação da FDN e PIDN da produção de gás .....	25

## RESUMO

ANJOS, Diana Rocha. **Utilização do extrato purificado de taninos condensados de plantas da caatinga sobre a fermentação microbiana ruminal *in vitro*.**

O estudo de plantas ricas em conteúdo de taninos é uma alternativa que vem ganhando destaque nas pesquisas quanto aos seus benefícios como aditivo na produção de ruminantes. Diante deste cenário, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do extrato purificado de taninos condensados sobre a produção de gás *in vitro* e sua relação com a nutrição animal. Foram utilizadas duas espécies forrageiras: Jurema preta (*Mimosa tenuiflora* (Willd) Poiret) e Angico vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan) coletadas nos municípios de Delmiro Gouveia/AL, Sertânia/PE e Santa Terezinha/PB. Foram realizadas as análises proximais e também a quantificação de taninos condensados pela metodologia dos fenóis precipitáveis por proteína (PPP). Para produção de gás *in vitro* foi utilizado sistema de incubação e medição de pressão automatizados. Nos ensaios, foram utilizadas diferentes concentrações de taninos condensados purificado de cascas para cada uma das espécies (2,5, 5, e 7,5% em relação a matéria seca da forragem utilizada). Os dados foram submetidos à análise de variância seguido da comparação de médias entre os grupos pelo teste Tukey a 5% de significância e a análise de componente principal. A Jurema preta foi a espécie que apresentou maiores concentrações de taninos condensados, apresentando nos extratos das folhas as maiores concentrações de todas as amostras coletadas. A adição dos taninos condensados purificados diminuiu a produção total de gás em 48 horas. O efeito da inibição da produção de gás ficou mais intenso quando utilizado 7,5% de tanino condensado (redução de 36% em jurema e 47,7% de angico). No entanto, houve diminuição na produção de gás causada pelos taninos condensados, possivelmente não resultou em alteração na digestibilidade, indicando o potencial de utilização destas plantas na redução de emissão de gases sem perda energética para o ruminante.

**Palavras-chave:** polifenol, produção de gás, ruminantes.

## ABSTRACT

ANJOS, Diana Rocha. **Use of purified extract of condensed tannins from caatinga plants on *in vitro* ruminal microbial fermentation.**

The study of plants with tannin rich content is an alternative that has been highlighting in research on its benefits as an additive in ruminant production. From this point of view, the aim of this study was to evaluate the effects of the purified condensed tannin extract on *in vitro* gas production and its relation with animal nutrition. Two forage species were used: Jurema preta (*Mimosa tenuiflora*) and Angico vermelho (*Anadenanthera macrocarpa*) collected in the cities of Delmiro Gouveia/AL, Sertânia/PE e Santa Terezinha/PB. The standard chemical and bromatological analyzes were performed and as well as the quantification of condensed tannins by protein precipitated phenol (PPP) methodology. For *in vitro* gas production, an automated incubation and pressure measurement system was used. In the tests, were used different concentrations of purified condensed tannins from bark of the two forage species (2.5, 5, and 7.5% relative to the dry matter of the forage used). The data were submitted to analysis of variance (ANOVA) followed by the comparison of means between groups using Tukey test at 5% of significance and principal component analysis. The Jurema preta was the species that showed higher concentrations of condensed tannins in protein, showing in the extracts of the leaves, the highest concentrations for all sample collected. Addition of the purified condensed tannins led to a decrease in total gas production in 48 h. The effect of inhibition of gas production was more intense when using 7.5% of condensed tannin (decrease of 36% in jurema and 47.7% angico). However, the drop in gas production caused by condensed tannins likely did not result in a change in the digestibility, indicating the potential of these plants to reduce gas emissions without energetic loss for the ruminant.

Key words: polyphenol, gas production, ruminants.

## 1. INTRODUÇÃO

Estudos realizados com compostos bioativos de plantas têm despertado o interesse da indústria alimentícia humana, animal, farmacêutica, entre outras, devido à promissora utilização de seus compostos. Dentre estas substâncias bioativas que fazem parte do metabolismo secundários das plantas estão o grupo dos compostos fenólicos, são substâncias que apresentam grande diversidade de estruturas, são classificados como fenóis simples ou polifenóis. Entre estes compostos podemos citar os taninos que são as substâncias naturais mais numerosas e extensamente distribuídas nos vegetais.

Taninos são compostos fenólicos biossintetizados a partir da rota do ácido chiquímico. Este grupo tem como característica unidades fenólicas formadas por um grupo hidroxila e um anel aromático. De acordo com a estrutura química este grupo de polifenóis está dividido em taninos hidrolisados (TH) e taninos condensados (TC). Apesar de este grupo ser numeroso, apenas os grupos dos taninos condensados são de interesse para a nutrição animal. Os taninos condensados possuem a capacidade de se ligar a outras macromoléculas, formando complexos que podem causar impacto na nutrição animal, especialmente quando se ligam as proteínas (BAYOURTHE & ALI-HAIMOUD-LEKHAL, 2014).

Diversas pesquisas têm sido realizadas no intuito de demonstrar a eficácia do uso dos taninos condensados em relação aos benefícios para animais ruminantes, visando a otimização do padrão de fermentação ruminal, melhoria na eficiência alimentar e no desempenho. Aditivos alimentares como os antibióticos são utilizados em ruminantes para melhorar a fermentação ruminal e reduzir a produção de metano pelos micro-organismos no rúmen. Porém, o uso de antibióticos como aditivos alimentares em animais tem sido uma preocupação crescente devido ao potencial aparecimento de resíduos na produção de carne e leite, além de conferir resistência microrganismos ruminais.

Como estratégia nutricional, a utilização dos metabólitos secundários tem sido uma importante área de pesquisa na nutrição animal. Esta tendência deverá continuar devido à crescente demanda por produtos naturais que possam trazer os mesmos benefícios que os aditivos existentes no mercado, mas sem os efeitos adversos.

A caatinga possui uma grande variedade de espécies vegetais produtoras de compostos secundários que podem ser usados na melhoria da produção animal em diversos aspectos como, aumento da eficiência de utilização da energia e proteína, diminuição do impacto ambiental através da mitigação de metano e CO<sub>2</sub> e de atividades anti-helmíntica e antioxidantes.

Diante deste cenário, o desafio da produção animal no Semiárido é promover o uso dos recursos alimentares regionais, dada as características químicas únicas das espécies forrageiras nativas, visando o desenvolvimento sustentável e econômico dos sistemas de produção e a valorização de seus produtos como uma estratégia de desenvolvimento e reconhecimento desta região.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Avaliar os efeitos do extrato purificado de taninos condensados sobre a produção de gás *in vitro* e sua relação com a nutrição animal.

### **2.2 Específicos**

- Determinar a composição químico-bromatológica e os teores de taninos condensados de folhas com hastes e cascas das espécies Angico Vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan) e a Jurema Preta (*Mimosa tenuiflora* (Willd) Poiret);
- Avaliar o efeito da adição de diferentes níveis do extrato purificado de taninos condensados de Angico vermelho e Jurema preta sobre a produção de gás *in vitro*.

## **3. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **3.1 Taninos**

As plantas produzem uma diversidade de componentes orgânicos que podem ser divididos em metabólitos primários e secundários. O metabolismo primário está relacionado ao conjunto de funções fundamentais para o desenvolvimento do ciclo de vida dos vegetais como, respiração e fotossíntese. Já o metabolismo secundário desempenha importante papel na interação dos vegetais com o meio externo (OLIVEIRA et al., 2011). A produção dos compostos secundários ocorre em um órgão ou tecido específico, sendo armazenados a princípio dentro de vacúolos. Existem variações na concentração destes metabólitos e geralmente são sintetizados e armazenados em diferentes extratos da planta (MEZZOMO, 2013).

Dentre os principais produtos gerados pelo metabolismo secundário das plantas, estão os taninos que são compostos polifenólicos caracterizados pela presença de grupamento hidroxila ligado a um anel benzênico. Possuem elevado peso molecular (500- 3000 Daltons) (NAUMANN et al., 2017). Com base na estrutura química os taninos são classificados em hidrolisáveis (TH) e condensados (TC). Taninos hidrolisáveis são ésteres de ácido gálico ou elágico ligados a um núcleo de poliol, tipicamente glucose, dependendo do ácido formado após hidrólise (Figura 1) (NAUMANN et al., 2017). Por outro lado, os taninos condensados ou proantocianidinas consistem em polímeros formados pela condensação de moléculas de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol, (Figura 2) (PAES, 2010).

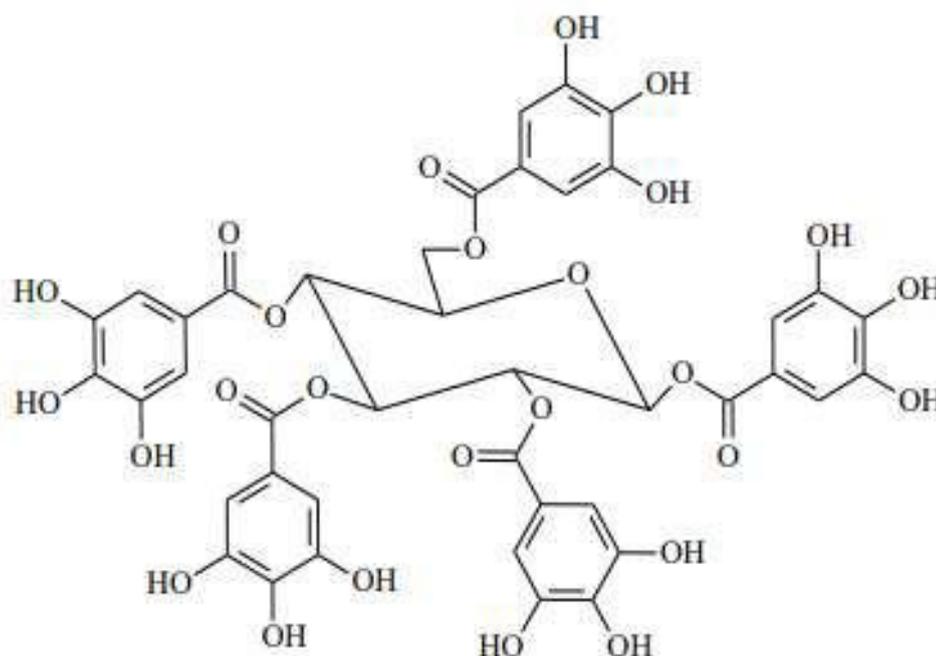


Figura 1. Estrutura química de tanino hidrolisável. Fonte: Oliveira, (2012).

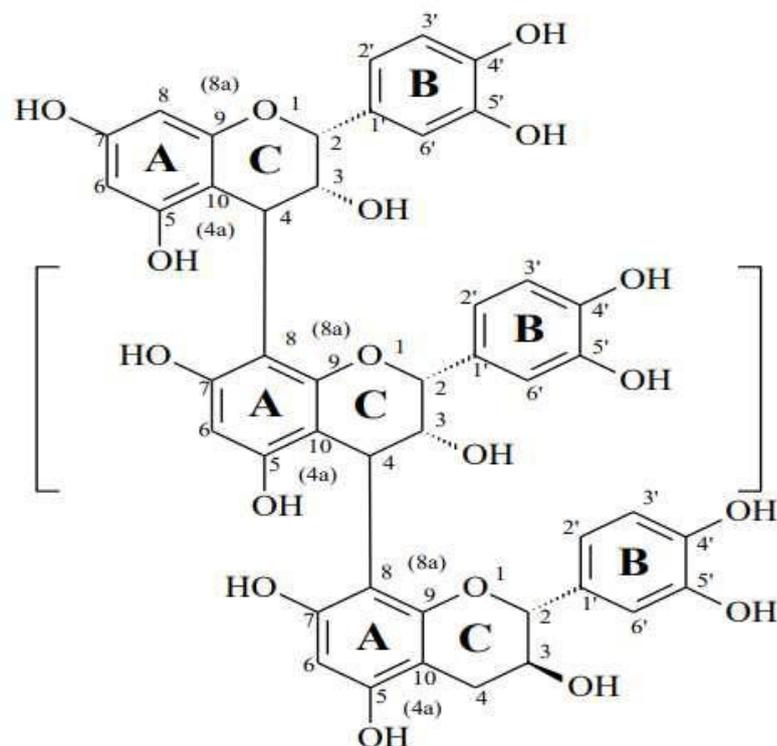


Figura 2. Estrutura química de tanino condensado. Fonte: Oliveira, (2012).

Por décadas os taninos condensados foram utilizados em diversas atividades humanas como curtimento de couros, na indústria de petróleo como agentes de suspensão, dispersantes e fluidificantes em lama de perfuração, controlando a viscosidade de argilas na perfuração de poços, além de sua utilização na fabricação de tintas e adesivos especiais para madeira e derivados (PIZZI, 1993).

Atualmente os taninos condensados estão sendo estudados para avaliar os níveis e formas de inclusão na dieta de ruminantes sobre a produção animal. Estes compostos utilizados em níveis adequados apresentam potencial para melhorar a eficiência do uso dos alimentos pelos animais, atuando no metabolismo de ácidos graxos de cadeia curta, e também favorecendo a relação simbiótica entre os microrganismos presentes no rúmen e seu hospedeiro, devido à grande capacidade que os taninos possuem de se associarem e precipitarem com as proteínas. (SOUZA, 2015).

### 3.2 Espécies vegetais com potencial taninífero

O grande desafio da produção animal no Semiárido é fazer uso de alternativas que possam proporcionar a utilização dos recursos vegetais da caatinga. Algumas espécies vegetais que ocorrem na Caatinga e que apresentam características morfológicas e funcionais de adaptação às condições edafoclimáticas regionais, se destacam tais como, o angico vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan) e a jurema preta (*Mimosa tenuiflora* (Willd)

Poiret).

Essas espécies vêm ganhando destaque por apresentarem potencial taninífero, onde a jurema preta dentre as espécies estudadas, possui os maiores teores de taninos condensados, sendo considerada uma espécie com grande potencial de uso pela indústria (SOUZA, 2015).

A jurema preta (*Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret), pertence à família *Fabaceae*, subfamília *Mimosoideae*. É uma leguminosa com alta frequência na caatinga, muito resiliente à seca, com grande capacidade de rebrota durante todo o ano além de possuir boa aceitabilidade por caprinos e ovinos, seja *in natura*, ou fenada. No período de estiagem suas folhas e frutos caem no chão passando a compor a serapilheira desse modo também utilizada na alimentação dos animais em pastejo na caatinga (ARAÚJO et al., 2010).

Quanto as características químico-bromatológica da jurema preta, apresenta valores interessantes no ponto de vista nutricional, segundo Souza (2015) relata valores em g/kg de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) respectivamente: 468,0 a 415,0 para folhas com hastes; 468,0 a 415,0 para cascas; 159,3 para folhas; 91,3 para cascas; 378,6 para folhas; 440,2 para cascas.

Outra espécie com destaque nas regiões de vegetação da Caatinga é o angico vermelho *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan, pertencente à família *Mimosaceae* (Carvalho, 2003). É uma espécie bem distribuída pelo território Brasileiro, é muito utilizada como matéria prima para várias atividades como repovoamento de áreas degradadas, na construção civil, como madeira para carvão entre outros usos. Tem como característica a rápida propagação da espécie e crescimento moderado a rápido. Possui adaptação a solos rasos, compactados, mal drenados e até encharcados (Gonçalves et al., 2008).

Em relação a sua composição química o angico vermelho também apresenta características importantes, tais como valores em g/kg para MS, PB, PDA para folha com hastes: 428,83, 199,6, 66,64, respectivamente (Souza, 2015).

### **3.3 Efeitos dos taninos condensados na população microbiana ruminal**

A comunidade microbiana que habita o rúmen é extremamente complexa, composta por bactérias, fungos, protozoários e *Archaeas* metanogênicas. Essas comunidades microbianas evoluíram com seus animais hospedeiros por milhões de anos e realizam funções metabólicas que são essenciais para o desenvolvimento, saúde e nutrição do animal (MORGAVI et al., 2010). Entretanto é fundamental que ocorra um equilíbrio dentro deste

ecossistema que está diretamente relacionado com o alimento fornecido ao animal (KARRI et al., 2015).

A microbiota ruminal produz, entre outros produtos, ácidos graxos de cadeia curta como butirato, propionato e acetato, os quais podem ser absorvidos através de papilas ruminais e satisfazerem grande parte dos requerimentos de energia e carbono dos animais. O gás hidrogênio ( $H_2$ ) também é formado e é o maior precursor da formação de metano ( $CH_4$ ) nos animais ruminantes (HENDERSON et al., 2010). O metano produzido no rúmen representa perda de energia para o animal (JOHNSON E JOHNSON, 1995; NOLLET et al., 1997) e contribui significativamente nas emissões de gases de efeito estufa globais (IPCC, 2014). Portanto, diminuir as emissões de metano pode beneficiar a produção animal e o meio ambiente (WALLACE et al., 2014).

Estratégias de mitigação das emissões de  $CH_4$  nos ruminantes como melhorando o manejo nutricional, a manipulação da fermentação ruminal pela mudança da composição dos alimentos, a adição de inibidores da metanogênese podem melhorar a produtividade. Essas estratégias incluem: aumento da quantidade de grãos, inclusão de forrageiras leguminosas contendo taninos condensados e compostos ionóforos. Essas emendas nutricionais também aumentam a eficiência da utilização dos alimentos e, portanto, são possíveis de serem adotadas pelos produtores (PATRA, 2012).

Em função disto, pesquisas vêm sendo desenvolvidas visando à utilização de taninos condensados com a intenção de redução da produção de metano, promovendo maior eficiência na utilização de energia nos ruminantes (ARGÔLO, 2010). O uso dos metabólitos secundários das plantas tem sido uma importante área de pesquisa para substituir, com mais eficiência, os aditivos utilizados na alimentação animal. Esta tendência deverá continuar devido à crescente demanda por produtos naturais que possam trazer os mesmos benefícios quanto os aditivos existentes no mercado (PATRA, 2012).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Locais de coleta do material vegetal**

Foram registrados dados de temperatura e precipitação pluvial do local de coleta que são fatores que tendem a influenciar na produção de taninos condensados, incluindo a verificação da presença de patógenos e insetos nas plantas.

Foram realizadas coletas de material vegetal e solo em três municípios da região Nordeste, todos em área do bioma da Caatinga. Em Delmiro Gouveia, município de estado de

Alagoas, a coleta ocorreu em área de Caatinga onde apresentava característica bastante antropizada em relação a vegetação nativa. Em Sertânia, município do estado de Pernambuco, a coleta foi no Centro de Treinamento e Profissionalização em Caprinovinocultura, pertencente ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) em área de Caatinga preservada. Em Santa Terezinha, estado da Paraíba a coleta foi realizada na Fazenda Lameirão pertencente à Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

Os dados climáticos dos municípios de Delmiro Gouveia, Sertânia e Santa Terezinha referentes à precipitação pluvial e temperatura dos meses de coleta estão representados nas Figuras 3, 4 e 5. Estes foram obtidos a partir da estação meteorológica automática do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET, 2018).

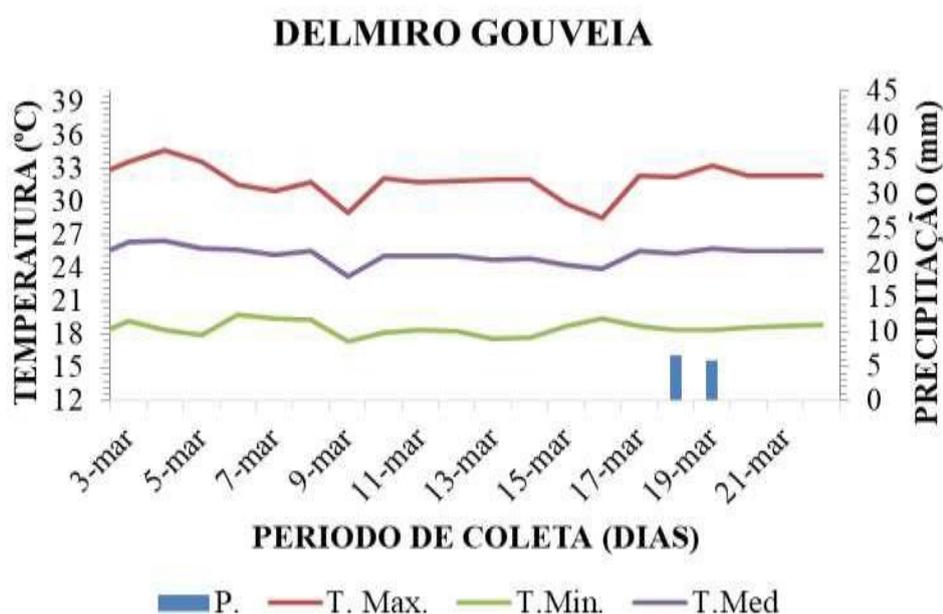


Figura 3. Precipitação pluvial diária em Delmiro Gouveia-AL, coleta das amostras no dia 8 março de 2017. Fonte: INMET, 2018.

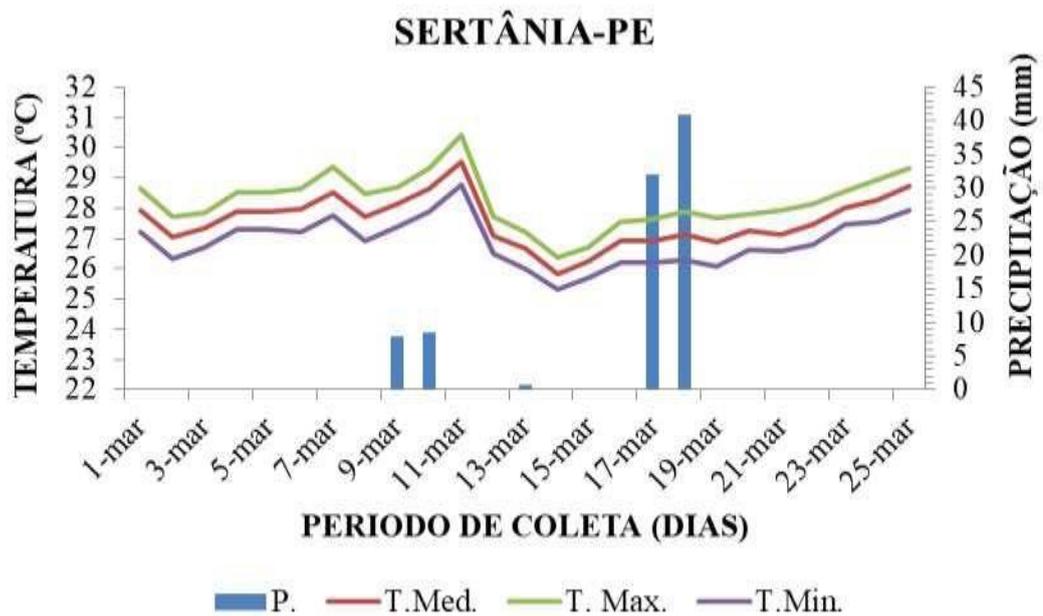


Figura 4. Precipitação pluvial diária em Sertânia-PE, coleta das amostras no dia 22 março de 2017. Fonte: INMET, 2018.

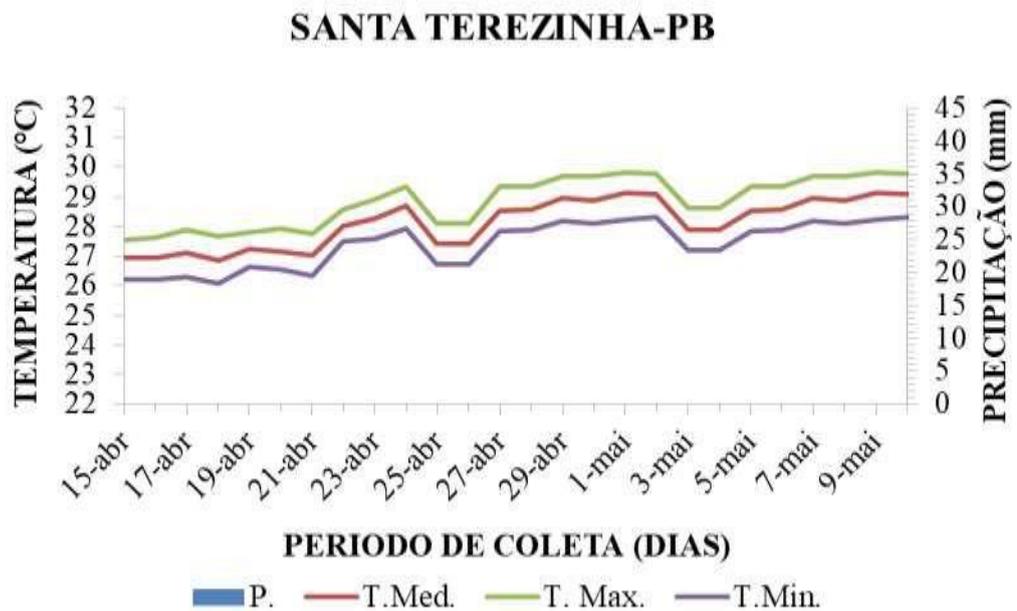


Figura 5. Precipitação pluvial diária em Santa Terezinha-PB, coleta das amostras nos dias 19 de abril e 08 maio de 2017. Fonte: INMET, 2018.

## 4.2 Material vegetal

Foram selecionadas duas espécies forrageiras para extração de material vegetal (casca e folha com hastes): Jurema preta (*Mimosa tenuiflora* (Willd) Poiret) e Angico vermelho (*Anadenanthe macrocarpa* (Benth.) Brenan).

A coleta de folhas com hastes foi realizada de maneira intercalada ao perímetro das plantas. Para a coleta das amostras de cascas, foram retiradas porções externas do caule, de modo a não atingir o câmbio vascular da planta, evitando o contorno do mesmo na altura de 1,30m do solo, retirando-se estes fragmentos utilizando um facão.

Para cada coleta do material vegetal, as amostras foram identificadas em sacos plásticos, armazenadas e transportadas em caixas isotérmicas contendo gelo, de modo a garantir a estabilização das reações de ligação entre os taninos condensados e as proteínas e fibras das cascas e folhas com hastes.

Todas as amostras foram transportadas para o Laboratório de Nutrição Animal (LANA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco - Unidade Acadêmica de Garanhuns –UFRPE/UAG, onde os extratos vegetais foram secos à temperatura de 40 °C, em estufa com circulação de ar por um período de 72h. Em seguida, estes extratos foram moídos em moinho tipo Willye®. Para a realização das análises químico-bromatológicas e de extração dos taninos condensados, foi utilizado granulometria de 1 mm e de 2 mm para determinação da produção de gás *in vitro* da matéria seca. Em seguida, o material foi armazenado em potes plásticos fechados, devidamente identificados e conservados em freezer a -20 °C.

## 4.3 Determinações químico-bromatológicas

As determinações químico-bromatológicas constaram de: matéria seca (MS, método 930.15), matéria mineral (MM, método 942.05), matéria orgânica (MO, método 942.05), proteína bruta (PB, método 954.01) e o extrato etéreo (EE, método 920.39), segundo metodologia descrita pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 1990). As determinações de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) de acordo com Van Soest et al., (1991), e adaptação de Senger et al., (2008). O material remanescente da análise de fibra em detergente ácido (FDA) foi submetido à análise de nitrogênio para obtenção dos valores de nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA). A lignina foi determinada segundo a metodologia sugerida por Goering & Van Soest (1970), pelo método da solubilização da celulose mediante imersão das amostras em ácido sulfúrico a 72% (v/v) obtenção da lignina digerida em ácido (LDA). Os carboidratos totais (CHOT) foram estimados de acordo com SNIFFEN et al. (1992), através da equação:  $CHOT = 100 - (PB + EE + MM)$ . Os carboidratos

não fibrosos (CNF) foram obtidos através da diferença entre os CHOT e a FDN.

#### **4.4 Purificação de taninos**

Para o extrato purificado de taninos condensados foi utilizada a metodologia segundo (TERRILL et al., 1992). A amostra (20g) foi colocado em um becker com capacidade de 600 mL, e adicionado 300 mL de solução de acetona 70% (v/v). A solução foi submetida a agitação em agitador magnético 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a amostra foi deixada sem agitação para decantação das partículas insolúveis. Então, o conteúdo do becker foi filtrado utilizando papel filtro em funil de vidro.

Em seguida, o conteúdo filtrado foi transferido para um funil de separação de 500 mL, onde foi adicionado éter etílico P.A. na proporção 1:1. Então, foi realizada homogeneização manual por aproximadamente 10 segundos e foi deixado parado para promover a separação do conteúdo em duas fases (o procedimento de lavagem foi realizado três vezes). Após a lavagem, a fase superior foi descartada e a inferior coletada. Em seguida, a solução passou por processo de volatilização do éter e acetona residuais por aproximadamente 5 horas utilizando um agitador magnético, até que o cheiro dos solventes tenha desaparecido completamente da amostra. Foi realizada uma nova filtragem da solução utilizando funil e papel filtro.

Em seguida foi realizada cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 para separação dos taninos condensados. Foi diluída 4g de Sephadex em 16 mL de metanol:água 50%. A coluna foi preparada utilizando uma seringa de 60 mL sem êmbolo com saída rosqueada (com válvula reguladora) voltada para baixo e fixada em suporte com garrafa. Dentro da seringa foi acomodada, com o auxílio do êmbolo, uma camada fina de algodão para recebimento da Sephadex. Em seguida, a Sephadex foi adicionada cuidadosamente para formação da coluna por onde passou a amostra.

Em seguida, a solução filtrada foi adicionada (cuidadosamente) com metanol/água na coluna com Sephadex. A amostra passou pela coluna, onde os taninos se ligaram ao Sephadex (mudaram para cor mais escura) e o restante da amostra foi filtrada e descartada. Foi adicionado metanol 50% até que o filtrado obtivesse coloração clara.

Após a filtragem de toda a solução, a coluna foi lavada com acetona 70% para desfazer a ligação do tanino com a Sephadex. Repetiu-se esta etapa até que todo o tanino se despreendeu, tornando a Sephadex com coloração clara novamente, e o filtrado contendo os taninos. Em seguida, a solução passou por processo de volatilização do éter e acetona residuais por aproximadamente 5 horas utilizando um agitador magnético, até que o cheiro dos solventes tivesse desaparecido completamente da amostra. A coluna de Sephadex foi armazenada com metanol 50% em geladeira.

A amostra foi armazenada em frasco de polietileno fechado e levada ao freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 12 h. Após esse período, a amostra foi fechada com plástico filme de pvc transparente e levada rapidamente para o liofilizador modelo LD 1500 (Terroni Equipamentos Científicos Ltda., São Carlos, Brasil), até a total remoção da água (aproximadamente quatro dias). Após liofilizada, a amostra foi armazenada em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.5 Quantificação de taninos**

Como o interesse desta pesquisa é a fração bioativa dos taninos condensados, foi utilizado na quantificação de taninos o método de proteína precipitável por fenólicos ou método BSA (HAGERMAN E BUTLER, 1978).

Foram pesadas 50 mg do material vegetal em microtubo de 1,5 mL. Em seguida, foi adicionado ao tubo 1 mL de metanol:água 50% e a amostra foi agitada em vortex. A cada 5 min, as amostras foram agitadas manualmente até 30 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi utilizado para quantificação de taninos.

Foi adicionado em um novo microtubo de 1,5 mL: 250 uL do tampão A pH4.9, 50 uL de BSA (10 mg/mL), 50 uL de metanol:água 50% e 50 uL de amostra (sobrenadante da etapa anterior). Os tubos foram agitados em vortex e incubados por 30 min a temperatura ambiente (aproximadamente  $23^{\circ}\text{C}$ ). Após incubação, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 250 uL do tampão A. As amostras foram novamente centrifugadas a 13000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado. O precipitado foi dissolvido em 800 uL de SDS/TEA e agitado em vórtex até que a amostra se tornou completamente dissolvida. Em seguida, foi adicionado 200 uL de Cloreto de ferro ( $\text{FeCl}_3$ ) e foi incubado por 30 min a temperatura ambiente (aproximadamente  $23^{\circ}\text{C}$ ).

Foi preparado uma amostra branco (800 uL de SDS/TEA e 200 uL de  $\text{FeCl}_3$ ). As amostras foram lidas em espectrofotômetro em absorvância de 510 nm. A curva de calibração e as soluções estoques foram preparadas conforme Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Diluições para curva de calibração para a quantificação de taninos pelo método BSA

Diluição	Tampão A (uL)	BSA (uL)	MeOH/H <sub>2</sub> O 50% (uL)	AT* (uL)	Total (uL)	CT conc. (g/L)
1	25	50	800	0	1100	0,00
2	25	50	750	50	1100	0,05
3	25	50	700	100	1100	0,09
4	25	50	600	200	1100	0,18
5	25	50	500	300	1100	0,27
6	25	50	400	400	1100	0,36
7	25	50	200	600	1100	0,55
8	25	50	0	800	1100	0,73

\*Solução de 1g/L de ácido tânico foi utilizada como referência e diluições.

Tabela 2. Solução utilizada para quantificação de taninos pelo método BSA

Tampão A	Ácido acético 2 M, NaCl 1,7 M. Acetato de sódio 2 M, NaCl 1,7 M. Tampão A: misturar 40 mL da solução de ácido acético com 60 mL de acetato de sódio, ajustar pH para 4.9 com NaOH e completar para 1L.
BSA 10mg/L	250 mg Albumina de soro bovino em 25 mL de Tampão A.
SDS/TEA	50 mL de trietanolamina, 10 g SDS e completar para 1L
FeCl <sub>3</sub>	0,01 M de FeCl <sub>3</sub> em 0,01 M de HCl.

#### 4.6 Produção de gás *in vitro*

Para a avaliação da bioatividade dos taninos condensados presentes nas amostras coletadas foi realizado um experimento de produção total de gases *in vitro*, utilizando-se câmara de fermentação anaeróbica baseada em TEDESCHI et al. (2008).

Esta câmara inclui sensores de pressão ligados aos frascos de incubação (frascos de vidro de 160 mL), e um computador compatível equipado com software PicoLog para aquisição de dados (ADC-32 Precision Data Loggers).

O líquido ruminal foi obtido a partir de três caprinos machos fistulados no rúmen, alimentados com ração composta por 60% de capim elefante e 40% de uma mistura concentrada a base de farelo de milho e soja. O líquido ruminal foi filtrado através de quatro camadas de gaze e armazenado em garrafa térmica pré-aquecida. Foram registrados o pH e potencial redutor do líquido ruminal, logo após a coleta.

O processo fermentativo ocorreu em frasco de 160 mL, onde foram adicionados: 10 mL de solução de macro e micronutrientes, 0,75 mg de amostra de capim Tifton 85 (2mm), 12,5 mL de líquido ruminal e água destilada até completar 50 mL. O desenho experimental consistiu

de frascos referência, nos quais foi adicionado apenas o feno de capim Tifton 85 e de frascos em que foi adicionado o feno citado e extratos purificados de taninos condensados (CT) de cascas de Jurema preta e de Angico vermelho. As concentrações de taninos condensados utilizadas foram 2,5, 5, e 7,5% em relação a MS vegetal utilizada do feno de capim Tifton 85.

Em seguida, os frascos foram fechados com tampas de borracha butílica e friso selador de alumínio. Então, todos os frascos foram levados à câmara de fermentação, onde cada frasco foi conectado a um sensor de pressão por meio de uma agulha de seringa (0,38x13 mm). Quando a temperatura no interior da câmara de fermentação atingiu 39°C, foram iniciados os registros. A pressão no interior dos frascos foi registrada em mV automaticamente pelo software a cada cinco minutos durante 48h. Em seguida, os dados foram convertidos em mL de gás.

Após 48h de fermentação, os frascos foram abertos para verificação do pH e potencial redutor. Em seguida, foi adicionado 80 mL de solução detergente neutro a cada frasco que foi fechado com tampas de borracha butílica e friso selador de alumínio e levado a autoclave por 60 minutos a 105°C (VAN SOEST, 1991). Após este processo, as amostras foram filtradas a vácuo utilizando papel filtro, funil buchner e levadas a estufa a 60°C por 48h. Após registrado o peso do resíduo, foi realizada a análise de nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN).

#### **4.8. Análise estatística dos dados**

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido da comparação de médias entre os grupos pelo teste Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Os cálculos foram realizados no Microsoft Excel 2013 e os gráficos gerados no software OriginPro8. A análise de componente principal foi realizada no software XLSTAT 2014, com matriz de correlação Pearson (n) a 5% de significância.

### **5. RESULTADOS**

As espécies jurema preta e angico vermelho apresentaram valores aproximados em relação à composição químico-bromatológica, mesmo em localidade diferentes. As concentrações MS para angico vermelho foram em média de 574,1 g/kg Matéria Natural (MN) para as folhas com hastes nas localidades de Delmiro Gouveia e Santa Terezinha e para as cascas desta espécie os valores encontrados foram de 613,6 g/kg MN. Para as folhas com hastes e cascas da jurema preta, os valores encontrados ficaram com média de 514,2 e 693,5g/kg MN respectivamente nas localidades de Sertânia e Santa Terezinha. (Tabela 3).

Com relação à PB, os teores encontrados para as folhas com hastes, foram mais altos nas duas espécies em relação aos teores encontrados nas cascas. Este resultado é bastante relevante

dada à importância das folhas com hastes dessas espécies forrageiras da Caatinga como excelente fonte de proteína para os animais. Entretanto, apesar dos altos teores de proteína bruta nos extratos vegetais, estes apresentaram teores significativos ligados à FDN, ficando indisponível para a absorção dos microrganismos ruminais e para utilização animal, pois estes se associam aos taninos condensados e a lignina presentes nas plantas.

Tabela 3. Composição químico-bromatológica em g/kg dos extratos vegetais de das espécies forrageiras em seus diferentes locais de coleta

Extrato/ local de coleta	MS <sup>1</sup>	MO <sup>2</sup>	MM <sup>2</sup>	EE <sup>2</sup>	PB <sup>2</sup>	FDN <sup>2</sup>	FDA <sup>2</sup>	PIDA	LIG <sup>2</sup>	CHT	CNF
Angico Vermelho											
Folha+haste (DG)	550,4	937,0	63,0	40,1	174,3	310,1	211,0	69,2	87,9	722,6	412,5
Folha+haste (ST)	597,8	940,1	59,9	37,5	141,8	276,5	171,2	71,0	69,4	760,7	484,3
Casca (DG)	724,8	939,3	60,7	13,7	74,5	554,5	385,6	73,4	229,1	851,1	296,6
Casca (ST)	502,4	940,3	59,7	16,7	78,2	637,0	529,5	87,7	314,4	845,4	208,4
Jurema Preta											
Folha+haste (ST)	543,4	915,5	84,5	53,0	154,3	229,7	124,3	79,8	51,9	708,2	478,5
Folha+haste (S)	485,0	941,3	58,7	48,7	175,5	247,1	112,7	86,5	42,1	717,1	470,0
Casca (ST)	660,9	950,0	50,0	4,9	106,8	482,3	387,5	105,9	220,4	838,2	355,9
Casca (S)	726,2	967,2	32,8	5,2	104,2	557,1	499,3	120,2	333,8	857,9	300,7

MS-Matéria Seca; MO-Matéria Orgânica; MM-Matéria Mineral; EE-Etrato Etéreo; PB-Proteína Bruta; FDN- Fibra em Detergente Neutro; FDA-Fibra em Detergente Ácido; PIDA-Proteína Insolúvel em Detergente Ácido; LIG-Lignina; CHT-Carboidrato Totais; Carboidrato Não Fibroso. DG=Delmiro Gouveia; ST=Santa Terezinha; S=Sertânia.

<sup>1</sup>g/kg Matéria Natural. <sup>2</sup>g/kg de Matéria Seca.

As folhas de jurema preta mostraram teores de taninos condensados de 2,7 vezes mais que nas cascas coletadas no município de Santa Terezinha. Em relação as plantas coletadas no município de Sertânia, foi encontrada duas vezes mais TC nas folhas em comparação às cascas. Jurema preta apresentou nas folhas concentrações de TC 2,4 vezes maiores que em angico vermelho nas plantas coletadas em Santa Terezinha (Tabela 4).

Tabela 4. Concentração de taninos condensados em g. Kg<sup>-1</sup> de matéria seca

Local de coleta	Jurema preta		Angico vermelho	
	Folha	Casca	Folha	Casca
Santa Terezinha (PB)	54,37	20,11	22,3	20,3
Sertânia (PE)	44,60	22,14	*	*
Delmiro Gouveia (AL)	*	*	13,9	18,5

\* Não houve plantas acessíveis para a coleta.

Foram testadas diferentes concentrações de taninos condensados purificados para avaliar seus efeitos sobre a atividade microbiana ruminal *in vitro* e sua relação com a nutrição animal. Foram utilizadas as concentrações de 2,5, 5 e 7,5% em relação a MS da foragem utilizada. A adição dos taninos condensados purificados conduziu a uma diminuição na

produção total de gás em 48 h. O uso de 2,5% TC de angico e jurema não foi suficiente para causar alterações significativas com relação ao controle nos experimentos 1 e 3 (Tabela 5). No entanto, quando aumentamos a concentração para 5%, no experimento 1, notamos uma redução na produção de gás de 20,4% quando utilizado TC de jurema e 18,8% quando usado TC de angico. O efeito da inibição da produção de gás ficou mais intenso quando utilizado 7,5% de TC (36% de jurema e 47,7% de angico). Quando comparados os efeitos entre as duas espécies foi observado diferença significativa apenas na concentração 7,5%. (Tabela 5).

Tabela 5. Efeito da adição de taninos condensados purificados na produção total de gás *in vitro* após 48h.

Exp <sup>1</sup>	Líquido ruminal <sup>2</sup> (g)	TC <sup>3</sup> (%)	produção total de gás (mL) <sup>4</sup>		mL gás/g líquido ruminal <sup>5</sup>	
			Jurema Preta	Angico Vermelho	Jurema Preta	Angico Vermelho
1	0,53 ±0,00	0	90,7 ±0,5aA	90,7 ±0,5aA	170,8 ±1,0	170,8 ±1,0
		2,5	83,7 ±4,8aA	85,0 ±0,3aA	157,5 ±9,0	160,0 ±0,5
		5	72,2 ±0,7aB	73,7 ±1,9aB	135,9 ±1,3	138,8 ±3,6
		7,5	58,0 ±1,8aC	34,1 ±19,5bC	109,3 ±3,6	64,3 ±36,7
2	0,40 ±0,00	0	17,1 ±4,5aD	17,1 ±4,5aD	43,3 ±11,4	43,3 ±11,4
		2,5	64,9 ±1,2aA	60,7 ±0,3aA	163,5 ±3,3	152,7 ±1,0
		5	49,0 ±2,8aB	48,7 ±7,5aB	123,3 ±7,3	122,7 ±19,1
		7,5	29,8 ±0,4aC	38,3 ±2,3bC	75,0 ±1,2	96,4 ±5,9
3	0,64 ±0,01	0	90,2 ±0,8A	nr	141,7 ±1,3	Nr
		2,5	81,4 ±3,6A	nr	127,9 ±5,7	Nr
		5	72,1 ±0,0B	nr	113,3 ±0,0	Nr
		7,5	27,8 ±23,5C	nr	43,8 ±36,9	Nr

<sup>1</sup> Experimentos

<sup>2</sup> Massa de microrganismos utilizada para fermentação. Calculada a partir da concentração do líquido ruminal, expressa em g/L do material volatilizado em mufla do líquido ruminal, o qual corresponde a massa de matéria orgânica representada principalmente pelos microrganismos

<sup>3</sup> Porcentagem de tanino condensado relativo a matéria seca de forragem

<sup>4</sup> Volume de gás produzido em 48h de incubação

<sup>5</sup> Volume de gás produzido em 48h dividido pela massa do líquido ruminal que representou a matéria orgânica (microrganismos) utilizados na fermentação.

Médias com letras diferentes minúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey. Médias com letras diferentes maiúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey.

nr- não realizado.

Apesar dos diferentes números de produção de gases encontrados nos 3 experimentos, o comportamento microbiológico em relação a utilização dos taninos foi relativamente o mesmo: quanto maior a concentração de taninos utilizada, menor é a produção de gás (Tabela 5 e Figura 6). Observamos também que a produção de gases está inversamente relacionada com o pH, FDN e proteína. Com o aumento da produção de gases, ocorreu uma diminuição

no valor do pH, FDN e PB para a maioria das condições (Tabela 6 e Figura 5).

**Tabela 6. Quantificação da FDN e PIDN da produção de gás**

Tratamentos	TC %	Experimento 1				Experimento 2				Experimento 3			
		FDN <sup>1</sup>	PIDN <sup>2</sup>	pH	pR	FDN <sup>1</sup>	PIDN <sup>2</sup>	pH	pR	FDN <sup>1</sup>	PIDN <sup>2</sup>	pH	pR
Controle	0	54,3	4,5	5,3	65,0	43,0	2,7	5,4	83,7	57,3	4,2	5,2	109,0
Jurema preta	2,5	58,1	4,8	5,3	64,0	53,0	3,4	5,4	91,9	57,7	4,7	5,2	102,5
	5	58,1	4,8	5,4	61,0	55,2	3,7	5,7	76,7	60,2	5,1	5,3	83,0
	7,5	60,3	5,5	5,6	54,0	60,1	4,4	5,9	60,8	62,2	5,2	5,9	70,5
Angico vermelho	2,5	55,0	4,8	5,2	64,0	53,7	3,5	5,4	87,8	nr	nr	nr	nr
	5	57,6	4,6	5,4	57,0	43,2	3,7	5,6	81,1	nr	nr	nr	nr
	7,5	45,5	4,7	5,7	46,0	56,9	4,0	5,9	61,2	nr	nr	nr	nr

TC-Taninos condensados purificados

FDN-Fibra em Detergente Neutro; PIDN-Proteína Insolúvel em Detergente neutro; PR- Potencial redox

nr- não realizado

<sup>1</sup>% Fdn Matéria seca

<sup>2</sup>% PB da Asa.

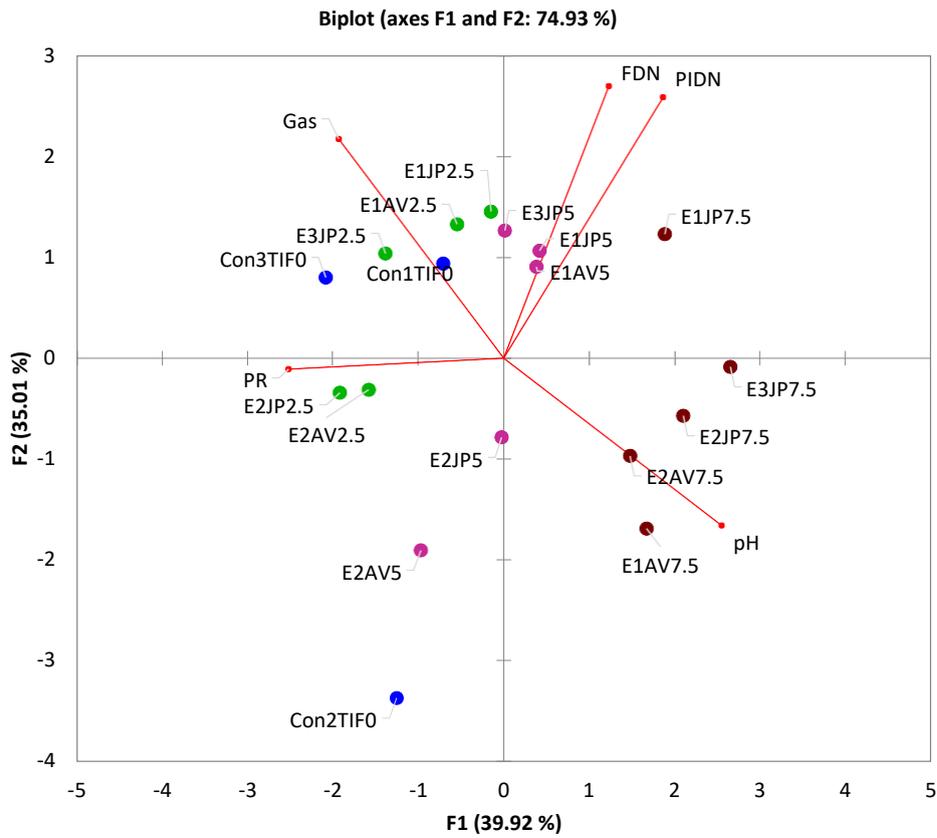


Figura 5. Análise de componente principal com matriz de correlação (Pearson (n) a 5% de significância. Variáveis são indicadas pelas retas: gas (produção total de gas), FDN, PIDN, pH e proteína (PB). Círculos azuis representam o controle, verdes 2,5% TC, cinzas 5% TC e vermelhos 7,5% TC. Os primeiros 2 caracteres do nome representam o experimento, seguido do tipo de tanino, Jurema (JP), Angico (AV) e por último a concentração utilizada, 2,5, 5 e 7,5 % de TC.

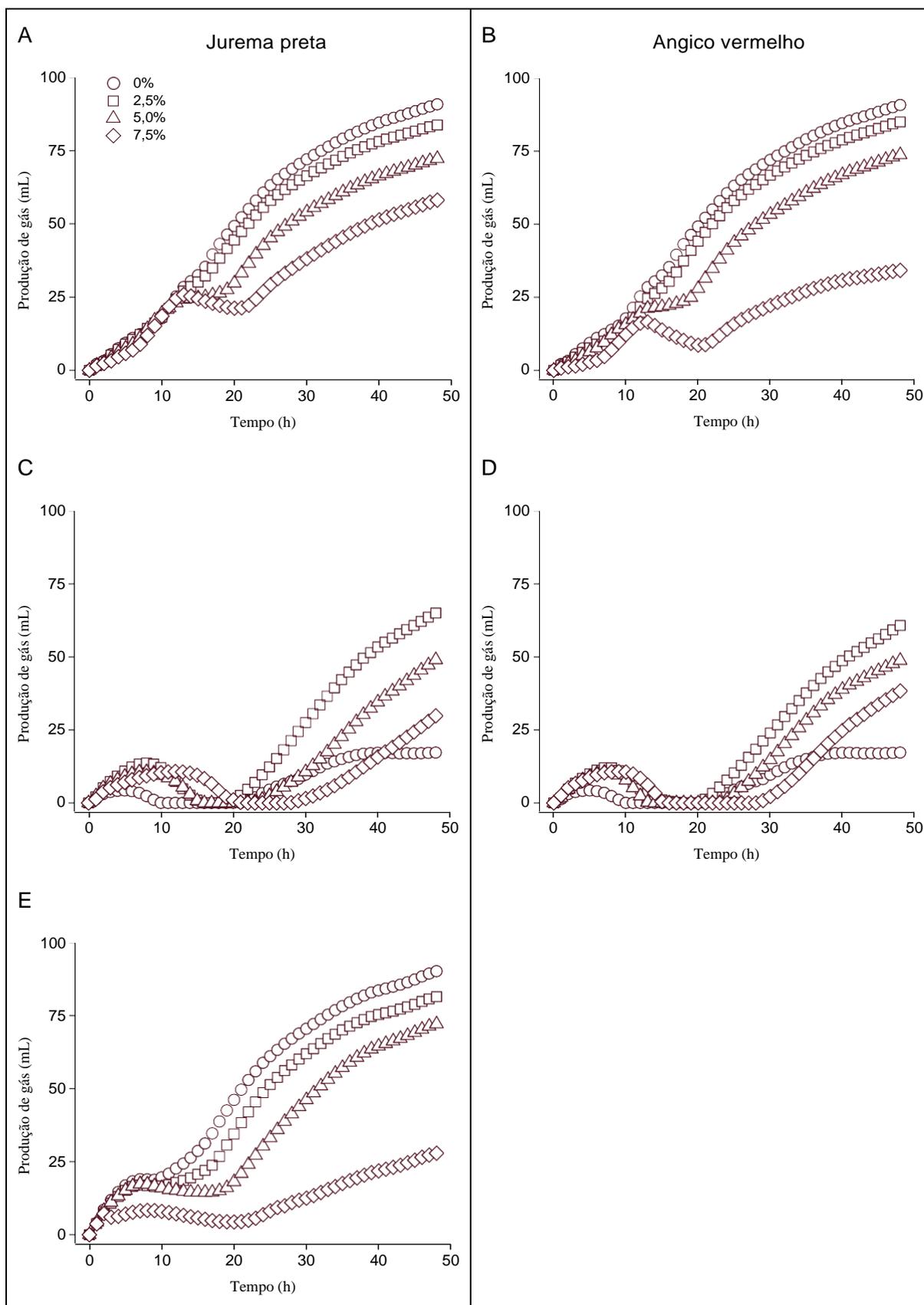


Figura 6. Efeito da adição de taninos condensados purificados na produção de gás *in vitro* após 48h. Experimentos 1 (A e B), 2 (C e D) e 3 (E).

## 6. DISCUSSÃO

Alimentar os ruminantes com forragens contendo taninos condensados pode ser uma prática eficiente natural para redução das emissões de metano e aumento do ganho energético para o animal (NAUMANN et al., 2017). Nos resultados, a adição dos taninos condensados purificados conduziu a uma diminuição na produção total de gás em 48 h, especialmente quando utilizada a concentração de 7,5% em relação a matéria seca da forragem utilizada. Apesar da diminuição da produção de gás, deve-se levar em consideração se houve mudanças da digestibilidade, como a possibilidade de ter havido uma redução da produção ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), o que resultaria em perdas na nutrição animal (NAUMANN et al., 2013). Levando em consideração que as concentrações de TCPB de jurema preta excedem a 5% de sua matéria seca (Tabela 4), temos que ter cautela em sua utilização na alimentação de ruminantes. Os tratamentos que receberam TC apresentaram diminuição da produção de gás, também apresentaram um leve aumento de FDN e proteína (Tabela 6), mas não podemos afirmar que houve diminuição na digestibilidade sem a avaliação da concentração dos ácidos graxos de cadeia curta ou realizando um fermentação com um período superior a 48h.

Nos tratamentos com adição de 5% e 7,5% de TC, foi observado um comportamento não comum nas curvas de produção de gás. Com aproximadamente 10h de incubação houve uma drástica redução na produção de gás (Figura 6, experimentos 1 e 3). Talvez esse fenômeno possa ser explicado pela inibição da metanogênese pelo TC. Nas arqueas metanogênicas, o dióxido de carbono é reduzido para produzir energia, criando metano como produto metabólico, entretanto o CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> poderiam ser utilizados pelos microrganismos homoacetogênicos para produzir acetato, uma fonte primária de energia para os animais ruminantes. Portanto, se menos H<sub>2</sub> é convertido em metano, então mais H<sub>2</sub> estará disponível para produção de AGCC, resultando em um aumento da energia metabolizável pelo animal (NAUMANN et al., 2017). Outra hipótese alternativa ou aditiva a considerar, seria a habilidade dos TC em inibir o uso de H<sub>2</sub> na metanogênese (NAUMANN et al., 2013a). Becker et al., (2014) relataram diminuição da produção de metano de fluido ruminal *in vitro* que ocorreu linearmente com a adição do composto fenólico catequina flavan 3. Neste experimento, eles observaram que pelo menos seis átomos de hidrogênio são capturados por moléculas de catequina. Este comportamento pode ser a explicação para a redução temporária da pressão encontrada em nosso experimento de produção de gás *in vitro* com a adição de TC.

Encontramos que o uso de taninos condensados na fermentação *in vitro* promove uma diminuição na produção de gases pelos microrganismos ruminais. No entanto, também observamos que a concentração dos microrganismos do líquido ruminal, é de fundamental importância na produção de gases, como evidenciado no experimento 2. Este experimento apresentou valores de produção de gases mais baixos que os outros, possivelmente porque o líquido ruminal possuía menor número de microrganismos de acordo com os valores de matéria orgânica inoculados (Tabela 5). Observamos no experimento 2 que o controle (sem adição de TC) apresentou mais baixa produção de gás que os tratamentos com TC (Figura 6 C e D), o que sugere que em relativas baixas concentrações de microrganismos, os taninos podem promover maior produção de gases. Estes resultados mostram que devemos levar em consideração as proporções entre microrganismos, forragem e taninos condensados para alcançar o efeito nutricional desejado.

## 7. CONCLUSÃO

A Jurema preta apresentou características interessantes para utilização como fonte de proteína para alimentação animal. Esta planta da caatinga possui altos teores de taninos condensados biologicamente ativos, se tornando uma espécie com grande potencial para o uso como aditivo que promova diminuição na produção de gases, sem comprometer o ganho nutricional em ruminantes. No entanto, serão necessários mais estudos para determinação das proporções ideais entre microrganismos ruminais, forragem e taninos condensados na elaboração de novas dietas a base de plantas ricas em taninos condensados como a Jurema preta.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, K. D.; DANTAS, R.T; ANDRADE, A. P. et al. Uso de espécies da caatinga na alimentação de rebanhos no município de São João do Cariri – PB. **Revista RA'E GA**, n.20, p.157-171, 2010.

ARGÔLO, L.S. **Análise molecular e do processo fermentativo da microbiota ruminal utilizando extratos etanólicos de leguminosas arbóreas tropicais**. Tese 167f. (Doutorado em Zootecnia), UESB – Itapetinga-BA, 2010.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official Methods of Analysis**. 15<sup>th</sup> Ed. AOAC, Arglington, USA, 1990. 745 p.

BAYOURTHE, C.; ALI-HAIMOUD-LEKHAL, D. Les extraits de plantes chez le ruminant effets sur les fermentations dans le rumen et la qualité lipidique des produits animaux. **INRA Productions Animales**. v.4, n.27, p. 317-328, 2014.

BECKER, P.M.; WIKSELAAR, P.G.; FRANSSEN, M.C.R.; VOS, R.C.H.; HALL, R.D.;

BEEKWILDER, J. Evidence for a hydrogen-sink mechanism of (+) catechin-mediated emission reduction of the ruminant greenhouse gas methane. **Metabolomics**. v.10, p.179-189, 2014.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Colombo: Embrapa-CNPQ; Brasília-DF.: Embrapa-SPI, 2003. 1039p.

GEE, G.W.; OR, D. Particle-size analysis. In: DANE, J.H. & TOPP, G.C., eds. **Methods of soil analysis. Physical methods**. Madison, Soil Science Society of America, 2002. Part 4. p.255-293,2002.

GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. **Forage fiber analysis (Apparatus, reagents, procedures and some applications)**. Washington, DC: USDA, 1970. (Agricultural Handbook, 379).

GONÇALVES, O.E.; PAIVA, H.N.; NEVES, J.C.L.; GOMES, J.M. Crescimento de mudas de angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan) sob diferentes doses de macronutrientes. **Revista Árvore**, v.32, n.6, p.1029-1040, 2008.

HAGERMAN, A.E.; BUTLER, L.G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.26, p.809-812, 1978.

HENDERSON, G.; NAYLOR, G.E.; LEAHY, S.C.; JANSSEN, P.H. Presence of novel, potentially homoacetogenic bacteria in the rumen as determined by analysis of formyltetrahydrofolate synthetase sequences from ruminants. **Applied Environment Microbiology**. v.76, n.7, p.2058-66,2010.

**INMET. Instituto Nacional de Meteorologia.**

Disponível em:<<http://www.inmet.gov.br/portal/>> Acesso em 15 de março de 2018.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE - IPCC. **Climate change 2014. Synthesis report 2014**. [<http://www.ipcc.ch/report/ar5/wg3/>]

JOHNSON K. A; JOHNSON DE. Methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**. v.73, n.8, p.2483-92, 1995.

KARRI, S; TALLA, S. G; SIROHI, S. K. An overview of the role of rumen methanogens in methane emission and its reduction strategies. **African Journal of Biotechnology**. v.14, n.16, p.1427-1438, 2015.

LUCENA, R.M.; GAVAZZA, S.; FLORENCIO, L.; KATO, M.T.; MORAIS, M.A. Study of the microbial diversity in a full-scale UASB reactor treating domestic wastewater. **World Journal of Microbiology Biotechnology**. v.27, n.12, p.2893–2902, 2011.

MEZZOMO, R. **Farelo de soja tratados com taninos em dietas com alto concentrado para bovinos de corte**. 2013. Tese (Doutorado em Zootecnia). UFV, Viçosa-MG, 2013.

MORGAVI, D. P; FORANO, E; MARTIN, C; NEWBOLD, C. J. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. **Animal**. v.4, n.7, p.1024-36, 2010.

NAUMANN, H.D.; MUIR, J.P.; LAMBERT, B.D.; TEDESCHI, L.O.; KOTHMANN, M.M.

Condensed tannins in the ruminant environment: A perspective on biological activity. **Journal of Agricultural Sciences**, v.1, n.1, p.1-20, 2013.

NAUMANN, H.D.; TEDESCHI, L.O.; ZELLER W.E.; HUNTLEY. N.F. The role of condensed tannins in ruminant animal production: advances, limitations and future directions. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.46, n.12, p.929-949, 2017.

NOLLET L, DEMEYER D, VERSTRAETE W. Effect of 2-bromoethanesulfonic acid and Peptostreptococcus productus ATCC 35244 addition on stimulation of reductive acetogenesis in the ruminal ecosystem by selective inhibition of methanogenesis. **Applied Environment Microbiology**. v.63, n.1, p.194-200, 1997.

OLIVEIRA, L.M.B.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M. et al. Plantas taniníferas e o controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Ciência Rural**, v.41, n.11, p.1967-1974, 2011.

OLIVEIRA, L.M.B. **Atividade anti-helmíntica de plantas taniníferas do Semiárido nordestino sobre nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes**. 2012. Tese (Doutorado em Zootecnia), UFC, Fortaleza-CE, 2012.

PAES, J.B.; DINIZ, C.E.F.; LIMA, C.R.; BASTOS, P.M.; MEDEIROS NETO, P.N. Taninos condensados da casca de Angico-Vermelho (*Anadenanthera Colubrina* Var. Cebil) extraídos com soluções de hidróxido e sulfito de sódio. **Revista Caatinga**, v. 26, n. 3, p.22-27, 2013.

PAES, J.B.; SANTANA, G.M.; AZEVEDO, T.K.B.; MORAIS, R.M.; CALIXTO JÚNIOR, J.T. Substâncias tânicas presentes em várias partes da árvore angico-vermelho (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. var. cebil (Gris.) Alts.). **Scientia Forestalis**, v. 38, n. 87, p. 441-447, 2010.

PATRA A.K. Enteric methane mitigation technologies for ruminant livestock: a synthesis of current research and future direction. **Environmental Monitoring Assess.** v.184p.1929-1952, 2012.

PIZZI, A. Tannin-based adhesives. In: Pizzi, A. (Ed.). **Wood adhesives: chemistry and technology**. New York: Marcell Dekker, 1993. p.77-246

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

SOUZA, R.T.A. **Potencial taninífero da jurema preta e angico velho avaliado por diferentes métodos**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens), UFRPE, Garanhuns-PE, 2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Ed 3 – Porto Alegre: Artemed, 2006.

TEDESCHI, L. O.; SCHOFIELD, P.; PELL, A. N. 2008. Determining feed quality for ruminants using in vitro gas production technique. 1. Building an anaerobic fermentation chamber. In: 4<sup>th</sup> Workshop on modeling in ruminant nutrition. 16, 2008, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora-MG: Embrapa, n.2008, p.16.

TERRILL, T.H; ROWAN, A.M.; DOUGLAS, G.B; BARRY, T.N. Determination of

extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.58, p.321-329, 1992.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.10, p.3583-3597, 1991.

WALLACE, R.J; ROOKE, J.A; DUTHIE, C.A; HYSLOP, J. J; ROSS, D.W; MCKAIN N; SOUZA, S.M; SNELLING, T.J; WATERHOUSE, A; ROEHE, R. Archaeal abundance in post-mortem ruminal digesta may help predict methane emissions from beef cattle. **Science Reproduction**. v.31, n.4, p.5892, 2014.