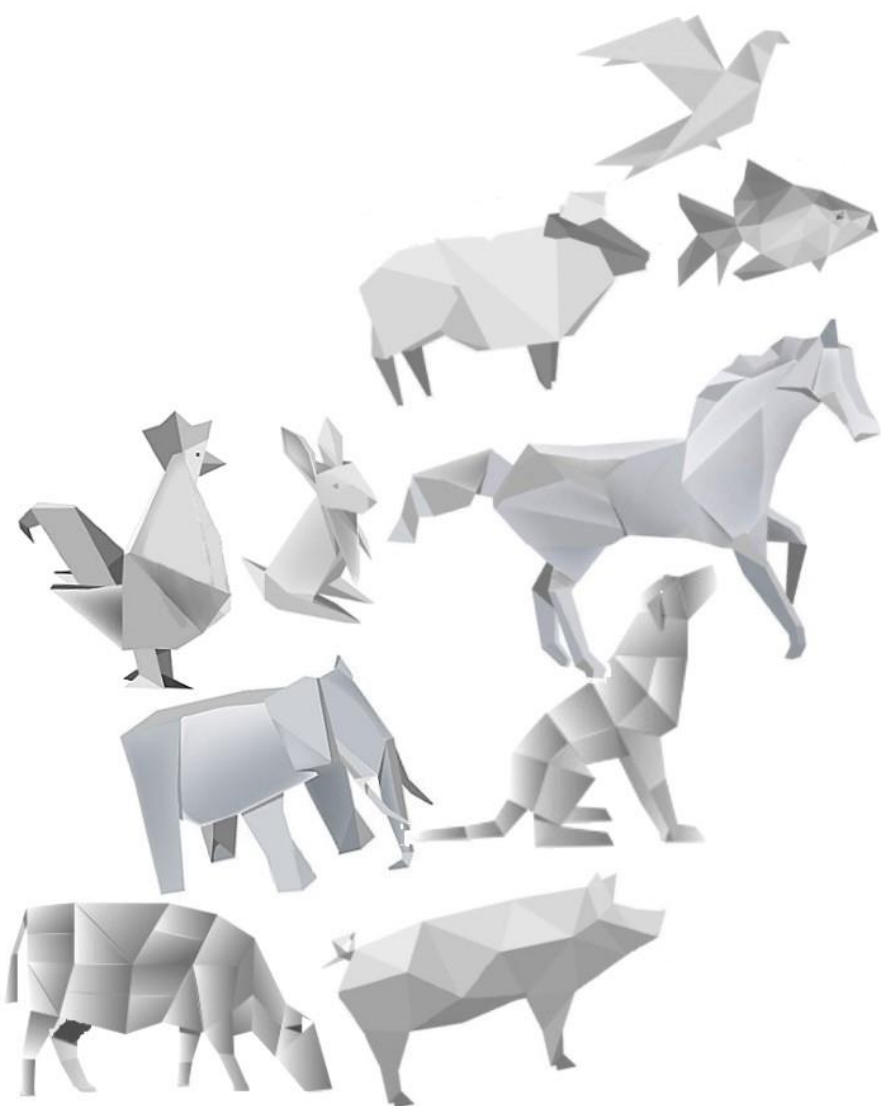


Ano III, Nº1 - 2018

ISSN: 0872 - 7098

Revista Portuguesa de Zootecnia



Associação Portuguesa de Engenharia Zootécnica



Ficha Técnica

Director:

Divanildo Outor Monteiro

Editor:

Ana Sofia Santos

Editor adjunto:

Mariana Almeida

Propriedade:

Associação Portuguesa de Engenharia
Zootécnica (APEZ)

Apartado 60, 5001-909 Vila Real

Composição e Montagem:

Telma Pinto

Design Gráfico:

Mariana Almeida e Telma Pinto

Contactos:

Apartado 60,
5001-909 Vila Real

rpz@apez.pt

912 239 527



A publicação deste número foi possível graças ao apoio da Comissão Científica do XX ZOOTECH – 20º Congresso Nacional de Zootecnia.

EFEITO DOS TANINOS DA ESTEVA NA PROTEÓLISE E NA DEGRADABILIDADE RUMINAL *IN SITU* DA SILAGEM DE LUZERNA

Maria Teresa. P. Dentinho^{1,2,*}, Kátia Paulos¹, Paula V. Portugal¹, Olga C. Moreira¹,
José Santos-Silva¹; Rui J. B. Bessa^{2,3}

¹ Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, IP - Estação Zootécnica
Nacional. Quinta da Fonte Boa, 2005-048 Vale de Santarém, Portugal

² CIISA, Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal

³ Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Avenida da Universidade
Técnica, 1300-477 Lisboa, Portugal

teresa.dentinho@niav.pt

INTRODUÇÃO

Durante o ensilamento, por ação das proteases da planta e pela atividade microbiana no silo a proteína das forragens é degradada em aminoácidos, péptidos, e azoto amoniacal (N-NH₃). Silagens com elevados teores de azoto não proteico dão origem a grandes quantidades de N-NH₃ no rúmen que, quando em excesso, não é utilizado pelos microrganismos e perde-se sob a forma de ureia na urina. Os taninos são compostos fenólicos que se complexam com a proteína. Quando adicionados às forragens na altura do ensilamento protegem a proteína da degradação durante o armazenamento no silo (Salawu et al., 1999). Também no rúmen os taninos reduzem a disponibilidade da proteína para os microrganismos, permitindo que maior quantidade de ácidos aminados essenciais de origem alimentar chegue ao intestino delgado e seja utilizada diretamente pelos animais. A esteva (*Cistus ladanifer* L.) é uma espécie arbustiva abundante em Portugal, rica em compostos fenólicos, principalmente taninos condensados (TC). O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de um extrato de taninos condensados de esteva, utilizado como aditivo, em silagem de luzerna, para reduzir a proteólise durante o ensilamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Os taninos foram extraídos de folhas e caules jovens de esteva, que foram secos, moídos e passados em crivo de 1 mm. Para a extração dos taninos utilizou-se uma solução de acetona:água (70:30) na proporção de 1:10 (1kg de esteva: 10l de solução de acetona:água). O extrato aquoso foi lavado com éter de petróleo em ampola de decantação para remoção das gorduras e pigmentos (Terrill et al., 1990). A solução contendo os TC foi congelada a -20°C e liofilizada.

Utilizou-se luzerna com um teor de MS de 18% que se secou em condições naturais até atingir 30% de MS. A luzerna foi cortada em pequenos troços (\pm 2cm), regada com o extrato de TC diluído em 60 ml de água de forma a dosear 0, 40, 80 e 120 g de TC/ kg de MS da luzerna e ensilada em silos experimentais com 3,5 l de capacidade (3 réplicas por tratamento).

Após 35 dias de ensilamento, amostras de extrato, luzerna fresca e das silagens foram recolhidas e analisadas para determinação da matéria seca (MS) (ISO 6496, 1999), proteína bruta (PB) (ISO 5983, 1997), cinza (ISO 5984, 2002), açúcar total (Clegg, 1956), NDF e ADF (Van Soest et al. 1991). O extrato foi analisado para determinação dos compostos fenólicos totais (FT) (Julkunen-Tiito, 1985) e dos TC (Porter et al., 1986). Nas silagens foi avaliado o pH, o N-NH₃ (Conway, 1957) o N-solúvel (Dulphy e Demarquilly, 1981), o N no resíduo do NDF (N-NDF) ((ISO, 5983, 1997) e a proteína verdadeira (Licitra et al. 1996). Os ácidos acético, láctico, propiónico e butírico foram determinados por cromatografia gasosa de acordo com a metodologia descrita por Alves et. al (2011). A digestibilidade da matéria orgânica (DMO) foi determinada *in vitro* pelo método de Tilley e Terry modificado por Alexander e McGowan (1961).

A degradabilidade ruminal *in situ* foi determinada em 3 carneiros Merinos, com peso de 60 \pm 2 kg, com cânulas ruminais permanentes, alimentados diariamente com 900g de feno (MS = 910g/kg; PB = 52,9 g/kg MS e NDF = 715 g/kg MS) e 600g de um alimento concentrado composto (PB = 171 g/kg MS). A dieta foi distribuída em duas porções iguais, às 09,30 h e 17,30 h.

Pesaram-se 3 g de cada silagem moída e passada por crivo de 3 mm para sacos de nylon (50 mm x 100 mm; ANKOM Technology, Espanha) com porosidade de 50 μ m de diâmetro. No rúmen de cada carneiro colocaram-se, simultaneamente, 4 sacos de cada silagem antes da refeição da manhã ou da tarde durante 2, 4, 6, 8, 16, 24, 48, e 72 h. Após

incubação, os sacos foram lavados em água corrente e secos em estufa a 60°C até peso constante. As perdas à hora 0 foram estimadas por lavagem de 3 sacos de cada silagem em água corrente e secos em estufa a 60 °C até peso constante. Os resíduos dos sacos foram analisados para determinação da MS e da PB. Os valores de desaparecimento da MS e da PB dos sacos foram ajustados à curva de Ørskov e McDonald (1979) ‘ $p = a + b(1 - e^{-ct})$ ’ usando o GraphPad Prism software, (Motulsky & Christopoulos, 2003) em que p representa o desaparecimento da MS e da PB, “a” a fração rapidamente solúvel ou degradável, “b” a fração lentamente degradável e “c” a taxa de degradação de “b” por unidade de tempo. A degradabilidade efetiva ($DE_{0,08}$) foi calculada através da equação $DE_{0,08} = a + [bc / (c + k)]$ (Ørskov e McDonald, 1979) assumindo-se uma taxa de passagem ruminal (k) de 0,08 h⁻¹.

A proteína não degradada no rúmen ($PNDR_{0,08}$) foi calculada por diferença entre 100 e a $DE_{0,08}$. O efeito do extrato de esteva nos parâmetros químicos e fermentativos das silagens e nos parâmetros de degradação ruminal a, b, c e DE foram analisados com o modelo misto (PROC MIXED) do SAS (SAS, 2004) e utilizaram-se contrastes polinomiais ortogonais para testar os efeitos lineares e quadráticos dos tratamentos sobre os parâmetros químicos, fermentativos e da cinética ruminal.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato de esteva utilizado foi um extrato bruto que continha 590 g de TC /kg de MS, 57,8 g de PB /kg MS e 154 g de açúcar /kg de MS. A luzerna foi ensilada com elevado teor de humidade (70%) e de proteína (230 g/kg MS) e baixos teores de açúcar (53,3 g/kg de MS). Estas características estão normalmente associadas a uma elevada capacidade tampão (Douglas, 1986), que não permite uma rápida redução do pH no silo, que é necessária para inibir a atividade enzimática e microbiana. Assim, as silagens obtidas não são de elevada qualidade (Quadro 1). As quantidades de N-NH₃ e N-solúvel em todas as silagens, parâmetros que caracterizam a degradação da proteína (Fijalkowska et al. 2015) foram elevadas e bastante superiores às encontradas na luzerna fresca (44,1 e 2,75% do N total, respetivamente) indicando a ocorrência de atividade proteolítica no silo. Com a inclusão do extrato de TC, os teores em N-solúvel e N-NH₃ diminuíram linearmente (P<0.01) e a proteína verdadeira e o N-NDF aumentaram linearmente (P<0.001). Estas alterações sugerem uma clara redução da proteólise durante a ensilagem. A DMO diminuiu

linearmente ($P=0.02$) com a inclusão de extrato, sendo 5, 13 e 22% inferior à da silagem controlo, nas silagens L40, L80 e L120, respetivamente.

A $DE_{0,08}$ da MS não sofreu alterações significativas ($P>0.05$) com a inclusão do extrato de TC apesar da fração “a” ter diminuído linearmente ($P=0.02$). Relativamente à PB, observou-se uma diminuição da $DE_{0,08}$ com o aumento do nível de taninos nas silagens, devido a uma forte redução da fração solúvel ou rapidamente degradável “a”.

Os resultados obtidos sugerem que os TC de esteva podem ser utilizados como aditivos de silagens para reduzir a proteólise de forragens com elevado teor proteico durante o ensilamento. A silagem L120 é a que apresenta menores concentrações de produtos de degradação da proteína (N-NH₃ e N-solúvel). Porém, um nível de inclusão de 120g/kg de TC é demasiado elevado para ser utilizado na prática e está associado a uma forte redução da DMO. Também, o ganho em $PNDR_{0,08}$ entre as silagens L40 e L120 é muito pequeno relativamente ao ganho que se obtém entre a silagem controlo e a silagem L40. Assim, um nível de TC de 40 g/kg de MS aplicado à luzerna antes do ensilamento parece ser adequado para reduzir a proteólise no silo e melhorar a utilização da proteína, sem comprometer a digestão e absorção nos compartimentos posteriores ao rúmen.

AGRADECIMENTOS: Este estudo foi cofinanciado pelo Alentejo 2020 através do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional, no âmbito da operação ALT20-03-0145-FEDER -000023 CistusRumen– Utilização Sustentável de Esteva (Cistus Ladanifer L.) em pequenos ruminantes– Aumento da competitividade e redução do impacto ambiental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander, RH e McGowan, M, 1961. Grass Forage Sci 16: 275–276.
- Alves, SP, Cabrita, ARJ, Jerónimo, E, Bessa, RJB e Fonseca, AJM, 2011. J Anim Sci 89: 2537–2545.
- Clegg, KM, 1956. J. Sci. Food Agric 7: 40-44.
- Conway, EJ, 1957. Crosby Lockwood and Son, Ltd. London, UK, 465 pp
- Douglas, JA, 1986. Grass Forage Sci 41: 81–128.

- Dulphy, JP e Demarquilly, C, 1981. In: Demarquilly C. (Ed), *Prévision de la Valeur Nutritive des Aliments des Ruminants*, pp. 81–10. Versailles, France: INRA Publications.
- Fijalkowska, M, Pysera, B, Lipinski, K e Strusinska, D, 2015. *Ann Anim Sci* 15:289-305.
- ISO 6496. 1999. Int Org Stand Geneva, Switzerland.
- ISO 5983. 1997. Int. Org. Stand. Geneva, Switzerland.
- ISO 5984, 2002. Int. Org. Stand. Geneva, Switzerland.
- Julkunen-Tiitto, R, 1985. *J Agric Food Chem* 33: 213-217.
- Licitra, G, Hernandez, TM e Van Soest, PJ, 1996. *Anim Feed Sci Technol* 57: 347-358.
- Motulsky, HJ e Christopoulos, A, 2003. GraphPad Software Inc., San Diego CA. 351 pp.
- Ørskov, ER., McDonald I, 1979. *J. Agric. Sci.* 92: 499-503.
- Porter, LJ, Hrstich, LN e Chang, BG, 1986. *Phytochemistry* 25: 223-230.
- Salawu, MB, Acamovic, T, Stewart, CS, Hvelplund, T e Weisbjerg, MR, 1999. *Anim Feed Sci. Technol*, 82: 243-259.
- SAS Institute Inc., 2004. User's Guide, SAS Inst., Cary, NC, USA.
- Terrill, TH, Windham, WR, Evans, JJ, e Hoveland, CS, 1990. *Crop Sci.* 30, 219-224.
- Van Soest, P J., Robertson, J B. e Lewis, B A, 1991. *J Dairy Sci.* 74: 3583-3597.

Quadro 1 – Composição química e parâmetros fermentativos da silagem de luzerna tratada com 0 (Controle), 40 (L40), 80 (L80) e 120 g/kg (L120) de taninos condensados de *Cistus ladanifer* (n = 3).

	Silagem de luzerna					Efeito	
	Control o	L40	L80	L120	EPM	Linear	Quadrático
Matéria seca (g/kg)	250	257	269	268	8,33	0,104	0,651
Cinza (g/kg MS)	104	104	101	105	1,72	0,907	0,244
Proteína Bruta (g/kg MS)	240	240	240	238	4,22	0,763	0,816
NDF (g/kg MS)	390	381	360	369	12,8	0,170	0,512
ADF (g/kg MS)	340	325	343	308	16,2	0,312	0,564
Açúcar (g/kg MS)	9,33	11,1	10,3	10,1	0,69	0,618	0,185
pH	5,82	5,75	5,82	5,90	0,33	0,834	0,822
Ac. láctico (g/kg MS)	4,02	3,68	4,34	4,09	0,53	0,724	0,942
Ac. acético (g/kg MS)	50,0	44,4	37,9	33,5	1,52	<,001	0,354
Ac. Propiónico (g/kg MS)	1,16	0,71	1,02	0,47	0,36	0,314	0,890
Ac. Butírico (g/kg MS)	0,00	0,05	0,08	0,00	0,05	0,945	0,132
N-NH ₃ (% N total)	27,8	24,5	15,1	16,8	2,50	0,005	0,340
						<0,00	
N-solúvel (%N total)	66,4	61,5	57,8	51,4	1,33	1	0,568
Proteína verd. (% N total)	24,5	29,9	34,5	38,1	2,83	<0,00	0,354
						1	
						<0,00	
N-NDF (%N total)	18,5	21,8	26,7	34,1	1,08	1	0,709
DMO (g/kg) ¹	677	644	589	526	25,0	0,002	0,553

¹DMO – digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica, EPM – erro padrão da média

Quadro 2 – Parâmetros de cinética ruminal da matéria seca e da proteína bruta da silagem de luzerna tratada com 0 (Controle), 40 (L40), 80 (L80) e 120 g/kg (L120) de taninos condensados de *Cistus ladanifer* (n = 3).

	Silagem de Luzerna				EPM	Efeito	
	Control o	L40	L80	L120		Linear	Quadrático
MS							
a	40,6	36,0	37,4	35,6	0,97	0,015	0,174
b	30,8	32,5	33,0	36,3	2,12	0,120	0,709
c (h-1)	0,08	0,12	0,10	0,07	0,020	0,418	0,145
DE _{0,08} (%)	56,6	54,8	55,6	52,4	1,27	0,073	0,627
PB							
a	83,0	72,7	71,1	68,7	1,03	<,001	<0,001
b	11,2	15,2	17,9	19,9	1,74	0,006	0,572
c (h-1)	0,33	0,13	0,11	0,08	0,138	0,242	0,555
DE _{0,08} (%)	90,5	81,9	81,5	78,1	2,00	0,003	0,227
PNDR _{0,08} (%)	9,48	18,0	18,4	21,8	2,00	0,003	0,227

a – fração solúvel ou rapidamente degradável, b- fração lentamente degradável, c- taxa de degradação da fração b (h⁻¹), DE_{0,08}- degradabilidade efetiva para uma taxa de passagem ruminal de 0,08 h⁻¹, PNDR_{0,08}- proteína não degradada no rúmen para uma taxa de passagem ruminal de 0,08 h⁻¹, EPM – erro padrão da média

EFFECT OF *CISTUS LADANIFER* TANNINS ON LUCERNE SILAGE PROTEOLYSIS AND ON *IN SITU* RUMINAL DEGRADABILITY

ABSTRACT: The effect of the inclusion of an extract of *Cistus ladanifer* condensed tannins (CT) on in silo fermentative parameters, *in vitro* organic matter digestibility (IVOMD) and on *in situ* rumen degradability of dry matter (DM) and crude protein (CP) of lucerne silage was studied. Lucerne forage was treated with 0 (control), 40 (L40), 80 (L80) and 120 g of CT/ kg of lucerne DM (L120) and was ensiled in lab scale-silos. After 35 days the silages were analyzed for chemical and nutritive composition and *in situ* ruminal degradability in rams. With the inclusion of CT the soluble N, and N-NH₃ reduced linearly (P <0.01) and the true protein content and NDF-N increased (P <0.01), indicating an effective proteolysis reduction during ensilage. Also the rumen

undegradable protein increased linearly ($P < 0.01$) with CT inclusion. However, a linear decrease ($P < 0.02$) of 5, 13 and 22% of IVOMD was observed for the silages L40, L80 and L120, respectively. The results obtained suggest that *C. ladanifer* CT can be used as silage additives to reduce proteolysis of high-protein forages during ensiling. A level of CT of 40 g/kg DM seems adequate to reduce proteolysis in silo, improving protein utilization, with a slight depression in OMD.

KEYWORDS: *cistus ladanifer*, condensed tannins, silage, proteolysis