

# EFEITO DE ALTAS CONCENTRAÇÕES DE TANINO CONDENSADO SOBRE PARÂMETROS RUMINAIS, COLONIZAÇÃO MICROBIANA E ATIVIDADE ENDOGLUCANASE EM CAPRINOS<sup>1</sup>

## AUTORES

PATRICIA M. G. BEELEN<sup>2</sup>, TELMA T. BERCHIELLI<sup>3</sup>, SIMONE G. OLIVEIRA<sup>4</sup>, ARIOSVALDO N. MEDEIROS<sup>2</sup>, ADRIANA DE SOUSA MARTINS<sup>4</sup>, ROGER N. BEELEN<sup>5</sup>, JOÃO A. ARAÚJO FILHO<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Estudo financiado pela FAPESP

<sup>2</sup> Professora do Departamento de Zootecnia, CCA -UFPB, Areia-PB, pbeelen@cca.ufpb.br

<sup>3</sup> Professora do Departamento de Zootecnia, UFCAV-UNESP, Campus de Jaboticabal-SP, Pesquisadora do CNPq

<sup>4</sup> Doutoranda do programa de Pós-graduação em Zootecnia, UFCAV-UNESP, Campus de Jaboticabal-SP

<sup>5</sup> Professor do Departamento de Botânica Ecologia e Zoologia, Biociências-UFRN, Natal-RN

<sup>6</sup> Pesquisador da EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisas de Caprinos, Sobral-CE

7

8

9

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi determinar a influência dos taninos sobre a colonização microbiana, pH, N-NH<sub>3</sub> e atividade 1,4  $\beta$ -endoglucanase do conteúdo ruminal. Quatro caprinos Saanen (peso médio 60, 48 kg $\pm$ 8,99 kg) com cânulas ruminais receberam, em dois períodos experimentais, uma dieta a base de feno das forrageiras estudadas, tratado ou não com 90 g de PEG (peso molecular 4000 Daltons) em 300 mL de água/kg de MS. Polietilenoglicol (PEG) foi utilizado para reduzir a adstringência e concentração em tanino condensado solúvel. Foram avaliados a colonização de folhas das forrageiras tratadas ou não com PEG, assim como pH, N-NH<sub>3</sub> e atividade 1,4  $\beta$ -endoglucanase do conteúdo ruminal. O tratamento com PEG reduziu a adstringência e concentração de tanino condensado solúvel das espécies em aproximadamente 70 % e 50 %, respectivamente. Observações elétron-microscópicas das folhas incubadas mostraram que a colonização microbiana foi mais efetiva no material tratado com PEG em todas as espécies. Por fim, o pH baixou, a concentração em N-NH<sub>3</sub> e a atividade endoglucanase do conteúdo ruminal aumentaram em função do tratamento com PEG em todos os horários analisados.

## PALAVRAS-CHAVE

celulase leguminosas nativas fermentação PEG semi-árido

## TITLE

EFFECT OF HIGH CONCENTRATION OF CONDENSED TANNIN ON RUMINAL PARAMETERS, MICROBIAL COLONIZATION AND ENDOGLUCANASE ACTIVITY IN GOATS

## ABSTRACT

The goal of the present study was to determine the influence of condensed tannins of the legume species Jurema Preta (*Mimosa hostilis*), Sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*) and Mororó (*Bauhinia cheilantha*) on microorganism colonization, ruminal pH, N-NH<sub>3</sub> production and 1,4  $\beta$ -endoglucanase activity of ruminal content. Four Saanen goats weighing 60.48 kg  $\pm$  8.99 kg fitted with ruminal cannulae were used. Polyethylene glycol 4000 (PEG) was used to reduce condensed tannin astringency and concentration. The animals were fed a hay diet based on the legume species studied, which was treated or non-treated with PEG 4000. PEG treatment reduced soluble condensed tannin astringency and concentration of the three legume species studied in approximately 70 % and 50 %, respectively. Electron-microscope observations of ruminally-incubated leaves showed a more effective microbial colonization of PEG treated material. A decrease in pH, an increase in N-NH<sub>3</sub> production and in

?(versão 3)

endoglucanase activity of ruminal content was also observed in PEG treated diets at all sampling periods.

## **KEYWORDS**

cellulase, browse legumes, fermentation, PEG, semi-arid,

## **INTRODUÇÃO**

Taninos condensados são polifenóis com habilidade de se ligar e precipitar proteínas, carboidratos e outras moléculas, além de serem tóxicos para os microrganismos (SCALBERT, 1991).

Considerando que a degradação da parede celular e liberação do conteúdo celular no rúmen depende da atividade do ecossistema microbiano, onde a população aderida às partículas alimentares é predominante e diretamente responsável pela digestão das mesmas, os taninos condensados podem acarretar importantes conseqüências nutricionais para ruminantes ingerindo grandes quantidades desses compostos.

Diversos trabalhos (RAMÍREZ et al., 2000; BABA et al., 2002) sugerem que altas concentrações de tanino condensado em forrageiras tropicais estão associadas à diminuição da ingestão, digestibilidade in vivo e degradabilidade in situ e in vitro dos nutrientes.

A aspersão de polietilenoglicol (PEG) sobre as plantas a serem estudadas é um artifício usado para entender melhor como os taninos afetam a digestão e o aproveitamento da forragem pelos ruminantes. O PEG se liga aos taninos com maior afinidade que as proteínas e com isso irá substituí-las nos complexos tanino-proteína, inclusive os pré-formados (LASCANO e CARULLA, 1992), sem ser degradado ou absorvido pelos animais (BEN SALEM et al., 1999).

Considerando a escassez de estudos investigando os efeitos dos taninos presentes em forrageiras do semi-árido sobre a degradabilidade ruminal, adesão e atividade de enzimas microbianas, o presente trabalho teve como objetivos avaliar a influência dos taninos presentes nas espécies Sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*), Jurema preta (*Mimosa hostilis*) e Mororó (*Bauhinia cheilantha*) a atividade da enzima 1,4  $\beta$ -endoglucanase do conteúdo ruminal e a colonização microbiana das forrageiras em caprinos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram utilizados quatro caprinos machos castrados da raça Saanen, pesando em média 60, 48 kg  $\pm$  8,99 kg e consumindo 16,76 e 13,06 gms/kgpv/dia da dieta a base de feno tratado com PEG e não tratado, respectivamente.

Foi utilizado como volumoso uma mistura de fenos, produzidos à sombra, composto de folhas das forrageiras estudadas, colhidas na fase de vegetação plena (fevereiro-março de 2000). Os fenos foram homogeneizados em igual proporção e tratados ou não com polietilenoglicol (PEG) para redução dos teores de tanino.

O tratamento com PEG constou de aspersão de uma solução composta de 90 g de PEG (peso molecular 4000 Daltons) em 300 mL de água por kg de matéria seca de feno ou folhas liofilizadas (BEN SALEM et al., 1999), efetuada no momento da preparação da ração e dos sacos para incubação, respectivamente.

O experimento foi composto de dois períodos experimentais sendo os 10 primeiros dias para adaptação a cada dieta e os quatro últimos dias para coleta de dados.

Foi avaliado o padrão de fermentação ruminal, através do monitoramento do pH e determinação do nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>). Para isso foram colhidas três amostras diárias de fluido ruminal durante os quatro dias de cada período perfazendo um total de 12 amostras/animal/período. O pH foi medido utilizando-se um potenciômetro digital e o N-NH<sub>3</sub> foi determinado pela destilação de 5 mL de líquido ruminal em 2,5 g de hidróxido de sódio, utilizando-se ácido bórico como solução receptora e ácido clorídrico a 0,01 N na titulação.

A atividade da enzima 1,4  $\beta$ -endoglucanase (celulase) do conteúdo ruminal dos animais foi estimada em ensaio colorimétrico segundo protocolo descrito por MEGAZYME (2000). As amostras de conteúdo ruminal foram colhidas durante três dias do período experimental perfazendo um total de 9 amostras/animal. Uma vez colhidas, as amostras foram imediatamente congeladas e acondicionadas em nitrogênio líquido até o momento das análises.

Sacos de náilon (7 x 3,5 cm, 50 µm de porosidade) contendo aproximadamente 1 g das forrageiras, tratadas ou não com polietilenoglicol, foram incubados nos tempos 0, 6, 12, 24, 48 e 96 horas antes da distribuição da ração e posteriormente amostras dos resíduos foram analisadas por meio de elétron-micrografias de varredura (GRENET, 1997; GUIMARÃES et al., 2000).

Após transcorridos os tempos de incubação, os sacos foram retirados e o material, amostrado aleatoriamente em diferentes regiões do resíduo segundo protocolo descrito por SANTOS (1996).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de pH ruminal sofreram influência do tipo de dieta ingerida, sendo superior nos animais consumindo feno não tratado. A amplitude de variação de pH ruminal nos animais consumindo a dieta a base de feno tratado com PEG foi baixa, sendo o ponto mínimo de 6,22.

A análise da concentração ruminal de N-NH<sub>3</sub> demonstrou que a redução dos taninos condensados pelo PEG aumentou os níveis de amônia no rúmen para uma concentração média de 10,5 mg N-NH<sub>3</sub>/dL, contra 6 mg N-NH<sub>3</sub>/dL de líquido ruminal, observado nos animais consumindo a dieta a base de feno não tratado.

Baixas concentrações de tanino protegem a proteína da dieta da degradação ruminal, disponibilizando-a no intestino delgado sem prejuízo da eficiência da digestão microbiana. Contudo, se em alta concentração, a proteção das proteínas no rúmen por taninos pode reduzir os níveis de amônia de forma crítica e comprometer a digestão do restante da dieta (McSWEENEY, et al. 2001). Esse fenômeno provavelmente ocorreu nos animais ingerindo a dieta não tratada com o PEG, onde foi observado sistematicamente o pH mais alto, indicando níveis reduzidos de fermentação e N-NH<sub>3</sub> mais baixos, se comparados aos dos animais recebendo a dieta tratada com o PEG. O menor valor de pH determinado nos animais consumindo a dieta com PEG foi 6,22, portanto, acima do limite de 6 proposto por RUSSELL e WILSON (1996), como inibitório à digestão da fibra.

O comportamento da atividade da enzima 1,4  $\beta$ -endoglucanase presente no conteúdo ruminal dos animais consumindo uma dieta a base de feno das forrageiras tratado ou não com polietilenoglicol está apresentado na Figura 1. A atividade enzimática do conteúdo ruminal proveniente de animais consumindo a dieta a base de feno das leguminosas tratado com PEG foi superior a da dieta sem tratamento, sugerindo que ocorreu inibição da atividade endoglucanase pelos taninos. MAKKAR et al. (1988) também relatam a capacidade inibitória dos taninos sobre enzimas ruminais que foi atribuída a formação de complexos tanino-enzima, com conseqüente inativação da mesma. Foram observados pontos máximos de atividade enzimática quatro e duas horas após o fornecimento da ração tratada e não tratada, respectivamente. Os pontos mínimos de atividade ocorreram, nos dois casos, logo após o fornecimento da ração e foram muito mais pronunciado nos animais consumindo forragem tratada, provavelmente devido a um efeito de diluição mais intenso, em função do maior nível de consumo apresentado por esses animais.

Os resultados das observações microscópicas dos resíduos de incubação são apresentados na Figura 2. Observações elétron-microscópicas de folhas de Jurema Preta, Sabiá e Mororó, após os diferentes tempos de incubação ruminal, atestaram que a colonização microbiana foi mais efetiva no material tratado com PEG se comparado ao sem tratamento, e isso para todas as espécies. CHIQUETTE et al. (1988) sugeriram que as bactérias aderentes penetram melhor nos tecidos contendo baixos teores de taninos. A localização das vesículas de tanino logo abaixo da epiderme e próximo aos estômatos inibiria a colonização microbiana.

## CONCLUSÕES

O potencial de degradação da parede celular e liberação do conteúdo celular no rúmen depende das condições de adesão, colonização e atividade enzimática do ecossistema microbiano. A presença de taninos condensados das espécies estudadas demonstrou influenciar esses fatores, indicando a

importância na redução da sua concentração para melhorar o aproveitamento dessas forrageiras pelos ruminantes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BABA, A. S. H.; CASTRO, F. B.; ØRSKOV, E. R.. Partitioning of energy and degradability of browse plants in vitro and the implications of blocking the effects of tannin by the addition of polyethylene glycol. *Anim. Feed Sci. Techn.*, v.95, n. 1-2, p.93-104, 2002.
2. BEN SALEM, H.; NEFZAUI, A.; BEN SALEM L. et al.. Intake, digestibility, urinary excretion of purine derivatives and growth by sheep given fresh, air-dried or polyethylene glycol-treated foliage of *Acacia cyanophylla* Lindl. *Anim. Feed Sci. Techn.*, v.78, n. 3-4, p.297-311, 1999.
3. CHIQUETTE, J.; CHENG, K. -J. ; COSTERTON, J. W. et al.. Effects of tannin content on the digestibility of two isosynthetic strains of birdfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) using in vitro and in sacco techniques. *Can. J. anim. Sci.*, v. 68, n. 5, p. 751-760, 1998.
4. GRENET, E.. Aspects microscopiques de la dégradation microbienne des tissus végétaux dans le rumen. *Prod. Anim.*, v. 10, n. 3, p. 241-249, 1997.
5. GUIMARÃES, P. M.; SANTOS, J.; MEDEIROS, A. N. et al.. Observações microscópicas de resíduos de milho submetidos à diferentes tempos de degradação ruminal. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37, Viçosa, 2000. Anais... Viçosa: SBZ, 2000. p. 468-470.
6. LASCANO, C. E.; CARULLA, J.. Quality evaluation of tropical leguminous trees and shrubs with tannins for acid soil. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE RUMINANTES, 1992, Lavras. Anais...Lavras: SBZ-ESAL,1992, p. 108-130.
7. MAKKAR, H. P. S.; SINGH, B.; DAWRA, R. K.. Effect of tannin-rich leaves of oak (*Quercus incana*) on various microbial enzyme activities of the bovine rumen. *Brit. J. Nutr.*, v. 60, n. 2, p. 287-296, 1988.
8. McSWEENEY, C. S.; PALMER, B.; BUNCH, R. et al.. Effect of the tropical forage calliandra on microbial protein synthesis and ecology in the rumen. *J. Applied. Microb.*, v. 90, p. 78-88, 2001.
9. MEGAZYME.. Assay of endo-1,4- $\beta$ -endoglucanase (Cellulase) using Azo-CM-cellulose. Megazyme, 2000. Disponível em: <[http://www.megazyme.com/s\\_methods.asp](http://www.megazyme.com/s_methods.asp)>. Acesso em: 12 jun 2001.
10. RAMÍREZ, R.G. ; NEIRA-MORALES, R.R. ; LEDEZMA R.A. et al.. Ruminal digestion characteristics and effective degradability of cell wall of browse species from northeastern Mexico. *Small Rum. Res.*, v. 36, n. 1, p. 40-55, 2000.
11. RUSSELL, J. B.; WILSON, D. B.. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *J. Dairy Sci.*, v. 79, n. 8, p. 1503-1509, 1996.
12. SANTOS J. M.. Microscopia de varredura aplicada às ciências biológicas. Jaboticabal:Funep, 1996, 56 p.
13. SCALBERT, A.. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry.*, v. 30, n. 12, p. 3875-3883, 1991.

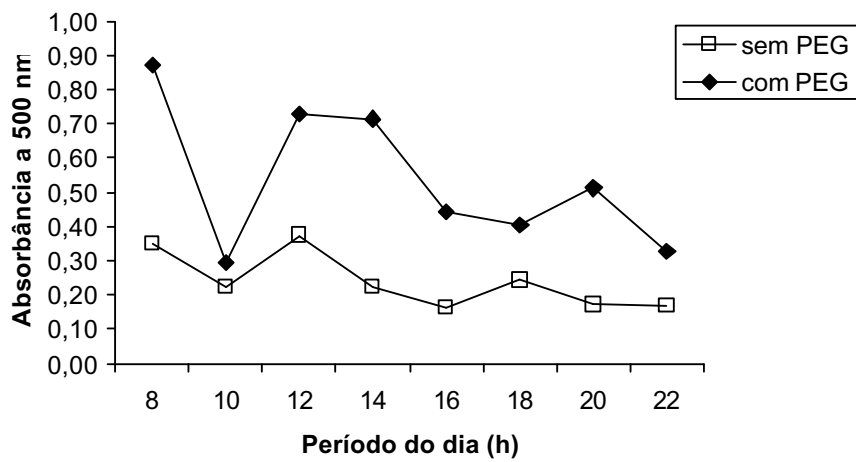


FIGURA 1. Atividade da enzima 1,4  $\beta$ -endoglucanase (celulase) do conteúdo ruminal de caprinos ingerindo uma dieta a base de feno de leguminosas nativas do semi-árido, tratado ou não com polietilenoglicol (PEG). As setas indicam os horários de arraçoamento

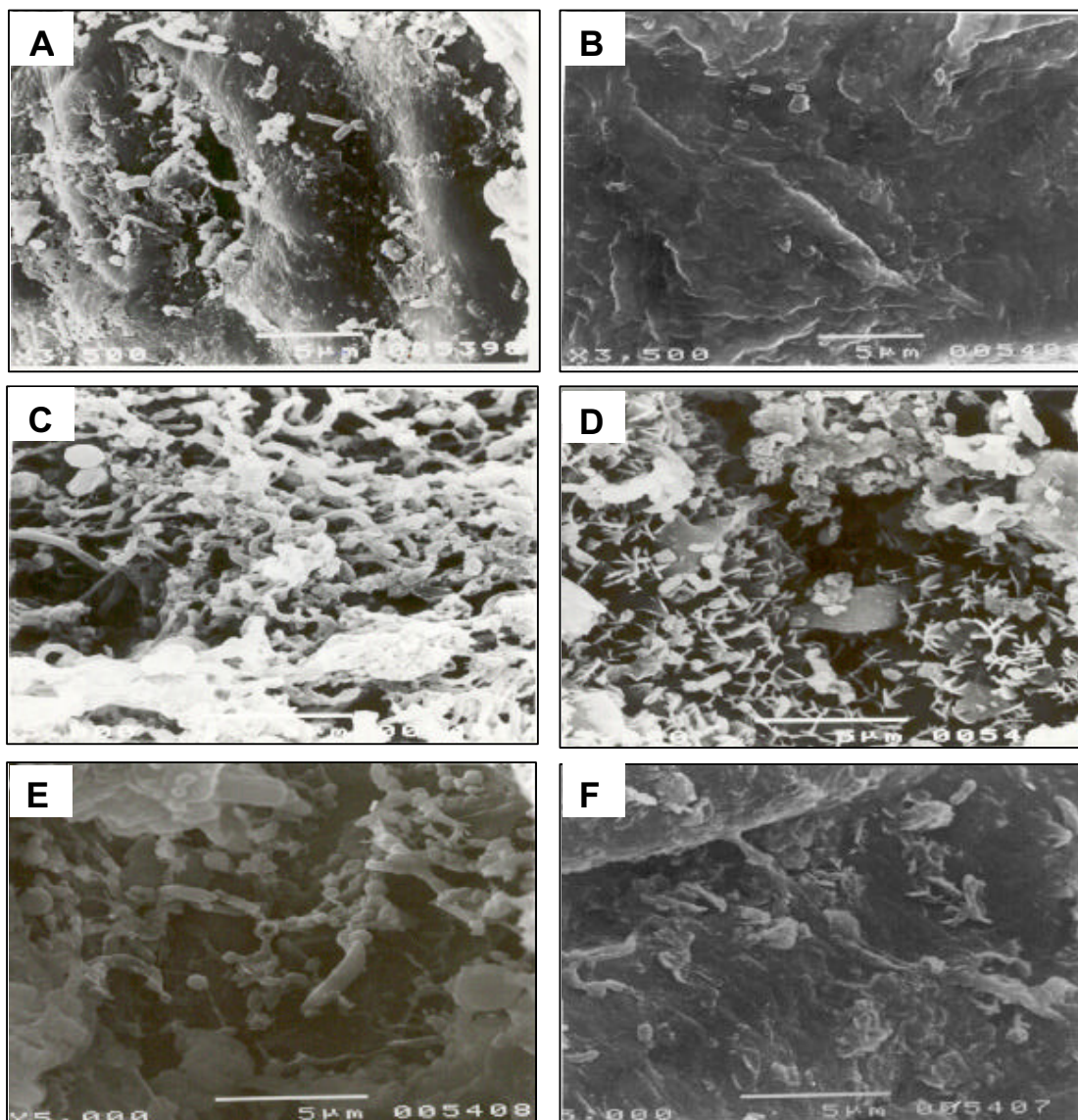


FIGURA 2. Elétron-micrografias de varredura de folhas de leguminosas nativas do semi-árido nordestino após incubação no rúmen de caprinos: A) Jurema-preta tratada com PEG após 12 h de incubação (escala: 5  $\mu\text{m}$ ); B) Jurema-preta sem tratamento após 24 h de incubação (escala: 5  $\mu\text{m}$ .); C) Sabiá tratada com PEG após 12 de incubação (escala: 5  $\mu\text{m}$ ); D) Sabiá sem tratamento após 12 horas de incubação (escala: 5  $\mu\text{m}$ ); E) Mororó tratado com PEG após 12 h de incubação (escala: 5  $\mu\text{m}$ ); F) Mororó sem tratamento após 12 h de incubação (escala: 5  $\mu\text{m}$ ).