

ANÁLISE FITOQUÍMICA DE GENÓTIPOS DE *Panicum maximum* Jacq

Nilza Alves Oliveira¹; Evelyn Bernardino Mello¹; Rosemary Matias^{2,3}; Liana Jank⁴.

¹*Ciências Biológicas da Universidade Anhanguera – Uniderp, Campo Grande/MS. bionilza@hotmail.com*

²*Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais da Universidade Anhanguera/ Uniderp, Campo Grande/MS*

³*Centro de Pesquisa do Pantanal (CPP). Rua Alexandre Herculano, 1.400, Bairro Parque dos Poderes, CEP 79.037-280, Campo Grande/MS.*

⁴*Laboratório de Citogenética, Embrapa Gado de Corte. BR 262 - km 4, Bairro Popular, CEP 79002-970, Campo Grande/MS*

RESUMO

O valor nutritivo das cultivares forrageiras é definido pela degradabilidade ruminal, digestibilidade e composição química. Esse valor nutritivo pode ser prejudicado pela presença de metabólitos secundários presentes ou fatores antinutricionais que ocasionalmente resultam em baixa produção ou ainda podem estar relacionados com inúmeros casos de morte de eqüinos em pastagens desta espécie no norte do país. Devido à importância econômica da forrageira e utilização em pastagens, o objetivo nesse trabalho foi identificar a classe de metabólitos secundários de 10 genótipos de *P. maximum*. As folhas foram coletadas no Banco de Germoplasma da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande – MS, secas e trituradas. De cada amostra foi preparado o extrato etanólico (20%) e aquoso (20%). Esses extratos foram submetidos à análise fitoquímica, via úmida, para detecção dos metabólitos secundários. Nos dois extratos foi possível detectar a presença de cumarinas livres e compostos fenólicos em todas as amostras analisadas. No genótipo Mombaça no extrato aquoso foi observada a presença de saponinas que através do índice de saponificação foi obtido o valor 2100. Essa concentração significa que a cultivar pode causar intoxicações nos rebanhos. Os compostos fenólicos e cumarinas encontrados nas análises não afetam o valor nutritivo das cultivares, contudo as saponinas podem interferir no valor nutritivo; dificultando na digestibilidade do rúmen e ocasionando cólicas em eqüídeos.

Palavras-chave: eqüídeos; forrageiras; fatores antinutricionais; saponinas.

ABSTRACT**PHYTOCHEMICAL ANALYSIS OF *Panicum maximum* Jacq. GENOTYPES**

The nutritional value of pasture cultivars is defined by the ruminal degradation, digestibility and chemical composition. This nutritional value may be prejudiced by the presence of secondary metabolites or anti-nutritional factors that occasionally result in low production and it may be related to many death cases of equines in pastures formed by this species in the north of the country. Given the economic importance and pasture use, this work intends to identify the secondary metabolites classes from 10 *P. maximum* genotypes. The leaves were collected at Embrapa Gado de Corte's Germplasm Bank, in Campo Grande – MS, dried and ground. From each sample the etanolic extract (20%) and aqueous extract (20%) were prepared. These extracts were submitted to phytochemical analysis, humid way, to detect secondary metabolites. Both extracts presented free coumarins and phenolic compounds in all of the analyzed genotypes. In Mombaça's aqueous extract saponins were observed, which through saponification index, the value of 2100 was attained, concentration which may cause cattle intoxication. The phenolic compounds and coumarins found did not affect the cultivars' nutritional values, however, saponins may interfere in the nutritional value, troubling the ruminal digestibility and causing colics in equids.

Keywords: anti-Nutritional factors, equids, forages, saponins.

INTRODUÇÃO

No Brasil, segundo o IBGE (2006) as forrageiras cultivadas ocupam 101 milhões de hectares. Essas forrageiras constituem a base para bovinocultura de corte e de leite, bem como para ovinos e equideocultura no País (RESENDE *et al.*, 2008).

A gramínea de origem africana *Panicum maximum* Jacq. é uma espécie forrageira, propagada por sementes, apresenta boa qualidade de forragem, alta produtividade de matéria seca, é exigente em fertilidade do solo e adaptada a vários tipos de clima e solos (JANK *et al.* 2008).

A intensificação de trabalhos em melhoramento genético na Embrapa Gado de Corte foi responsável pelo lançamento de três cultivares: Tanzânia - em 1990, Mombaça - em 1993 e Massai - em 2000. Devido a qualidade as cultivares as áreas de cultivo foram aumentando e atualmente é utilizada em grande amplitude pelos agropecuaristas no país.

A cv. Tanzânia é uma gramínea de até 1,3 m de altura; as folhas e bainhas não apresentam pilosidade nem cerosidade. Os colmos são suavemente arroxeados e as inflorescências são panículas com espiguetas arroxeadas, sem pilosidade e semelhantes às do capim-colonião comum (SAVIDAN *et al.*, 1990).

O capim-Mombaça (cv. Mombaça) é uma forrageira cultivada em cerca de 5 milhões de hectares, forma touceiras com até 1,65 m de altura, possui colmos levemente arroxeados, folhas decumbentes e bainhas sem pilosidade ou cerosidade. A inflorescência é do tipo panícula semelhante à do capim-colonião comum (EMBRAPA, 2010).

A cv. Massai é um híbrido espontâneo entre *P. maximum* e *P. infestum* BRA-7102, coletado na Tanzânia em 1969. É uma planta cespitosa, de porte baixo até 60 cm, com folhas finas, quebradiças, sem cerosidade e de largura de 9 mm. É característico o grande número de perfilhos formados, maior do que qualquer outra cultivar conhecida de *P. maximum*. As lâminas apresentam densidade média de pêlos curtos e duros na face adaxial (SAVIDAN *et al.*, 1990).

A partir de 2001, no norte do Brasil, vem sendo observado casos de cólica em equídeos que pastejam essas cultivares, levando-os até a morte (EMBRAPA GADO DE CORTE, 2009). Há indícios de que cerca de 6.000 animais tenham morrido nos últimos anos. Contudo não se têm observado casos similares, em outras regiões, associados à ingestão dessas cultivares.

Até o presente momento, não se sabe quais fatores estariam causando essas intoxicações, entretanto fatores de antiquidade presente nas plantas podem ser apontados como uma causa. Na literatura, entretanto, não há um levantamento fitoquímico com essa forrageira.

As forrageiras são fontes de energia e proteína para os ruminantes em pastagem, porém ocasionalmente a presença de compostos secundários ou fatores antinutricionais, prejudicam a degradabilidade do vegetal no rúmen do animal (JERBA, 2004). Existem vários fatores limitantes das forrageiras, entre os quais se encontram os fatores químicos, como; alcalóides, compostos fenólicos e substâncias terpênicas.

De acordo com Euclides (2000), o valor nutricional de uma forrageira está ligado a sua composição química e sua digestibilidade. As causas do baixo valor nutritivo estão associadas ao reduzido conteúdo de proteína e minerais, ao conteúdo de fibra e à baixa digestibilidade. Em algumas situações, o fator limitante podem ser os componentes chamados antinutricionais, raramente incluídos nas análises de rotina, tais como alcalóides, tanino, cumarinas, saponinas dentre outros.

Os alcalóides e compostos fenólicos são agentes antimicrobianos que em altas concentrações inibem a atividade dos microrganismos no rúmen, dificultando a digestibilidade do vegetal. Os taninos em elevadas concentrações podem prejudicar a aceitabilidade pelos animais e esses compostos podem formar pontes de

hidrogênio com proteínas salivares (VAN SOEST, 1994), inibindo estas enzimas, afetando a utilização de vitaminas e minerais (MONTEIRO *et al.*, 2005).

As saponinas compõem a classe dos terpenos, sendo classificadas como lactonas sesquiterpênicas (TAIZ; ZEIGER, 2004), causam hemólise em hemácias nos mamíferos herbívoros, além de inibir o crescimento e a atividade dos microorganismos do rúmen. Segundo Jerba (2004) algumas saponinas são triterpenos e causam aborto e morte fetal em ruminantes e monogástricos.

Apesar dos programas de melhoramento genético, inferindo o valor nutritivo e o potencial forrageiro contribuir para a obtenção de variedades com maior produção e qualidade, há necessidade de estudos químicos para investigar a classe de metabólitos secundários presentes com vista a mitigar possíveis sinais de fotossensibilização ou intoxicação por animais alimentados com cultivares de *P. maximum*.

Objetivou-se com este trabalho analisar quimicamente 10 genótipos de *P. maximum*, com o intuito de identificar grupos de metabólitos secundários para poder subsidiar o programa de melhoramento genético da espécie como tentar elucidar o problema de morte de equídeos no norte do país.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento do trabalho foram coletadas, em dezembro de 2009, folhas de 10 genótipos de *P. maximum*, cultivados no campo de germoplasma da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande – MS. Os genótipos haviam sido transplantados em janeiro de 2000, em parcelas de 4 m x 4 m, com 1 m entre plantas e 2 m entre parcelas. A adubação foi de 2 ton/ha de calcário dolomítico, 800 kg/ha de super fosfato simples, 130 kg/ha de cloreto de potássio, e 40 kg de FTE BR12 / ha (uma mistura de micronutrientes), e mais 100 kg/ha de uréia após o corte de regularização em fevereiro de 2000.

Para a coleta, os genótipos encontravam-se em condições iguais de pH do solo (4,6), em campo aberto e todos em estágio vegetativo com aproximadamente 50 dias de crescimento, sendo coletadas folhas jovens e macias.

ANÁLISE FITOQUÍMICA

Para a análise fitoquímica, desenvolvida no laboratório de Química Orgânica da Universidade Anhanguera – Uniderp, as folhas secas em estufa circuladora de ar (MARCONI®, Modelo MA35), à 45°C, foram trituradas até obtenção de um pó homogêneo e armazenadas em frasco hermeticamente fechado protegido da luz e do calor e rotulados conforme o tipo de cultivar (Amostra 1: genótipo Massai; Amostra 2: genótipo Milênio; Amostra 3: genótipo Mombaça; Amostra 4: genótipo Tanzânia; Amostra 5: genótipo Tobiatã; Amostra 6: genótipo B7; Amostra

7: genótipo B19; Amostra 8: genótipo S8; Amostra 9: genótipo S10 e Amostra 10: genótipo S12). Os genótipos Massai, Tanzânia, Mombaça, Tobiata e Milênio são cultivares comerciais. Os genótipos B7 e B19 são a cultivar Colômbia coletadas na Bahia em Jequitinhonha, respectivamente. Os genótipos S8, S10 e S12 são plantas sexuais utilizadas no programa de melhoramento da Embrapa Gado de Corte nos cruzamentos com plantas comerciais e outros genótipos apomíticos.

OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

O extrato etanólico (20%) e aquoso (20%) foi obtido utilizando o processo de maceração seguido de banho de ultra-som (UNIDQUE®, 1450) por dois dias durante 60 minutos e em seqüência aquecido em banho-maria (MARCONI, MA – 156-6, Série - 06085418) a 50°C, por 30 minutos. O pH do extrato aquoso e etanólico foi medido com um potenciômetro digital (QUIMIS®, Q – 400A).

Cada amostra foi analisada quanto à presença de Compostos fenólicos, cumarinas livres, taninos, flavonóides, antraquinonas livres, antocianinas, esteroides e triterpenos livres, glicosídeos cianogênicos e saponinas. A análise fitoquímica ocorreu, via úmida, por meio de ensaios colorimétricos e/ou de precipitações seguindo metodologias adaptadas de Matos (1997) e Wagner e Bladt (1995), as quais tiveram caráter qualitativo.

ÍNDICE DE AFROSIMÉTRICO

Para estimar o índice de saponificação ou Índice Afrosimétrico (espuma) utilizou-se a metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira (1998), onde o Índice de saponificação ou Índice Afrosimétrico (espuma) I.A.2 = 100. Este índice é a determinação da maior diluição em que 1 g de droga (=material triturado) é capaz de formar 1 cm de espuma em determinadas condições, através dele pode-se estimar a quantidade de saponinas que se tem na droga.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para todos os genótipos analisados, o teste de compostos fenólicos e cumarinas livres foram positivos no extrato etanólico (Tabela 1).

Tabela 1: Análises fitoquímicas do extrato etanólico de 10 genótipos de *Panicum maximum*.

Metabólitos secundários	Amostras dos 10 genótipos de <i>P. maximum</i>									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Compostos fenólicos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Taninos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavonóides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Antraquinonas livres	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Antocianinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cumarinas	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esteroides e triterpenos livres	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicosídeos Cianogênicos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saponinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Os compostos fenólicos encontrados nos extratos são metabólitos secundários que compreendem o grupo dos fenóis que fazem ligação a uma hidroxila funcional (TAIZ; ZEIGER., 2004). Quando em pastagens são responsáveis pela defesa das plantas contra herbívoros e patógenos.

Dentre os principais fatores antinutricionais dos compostos fenólicos encontra-se a lignina e os taninos. A lignina possui dupla função contra ações bióticas e abióticas, pois age quimicamente como bloqueio enzimático e fisicamente proporciona rigidez à parede celular (TAIZ; ZEIGER., 2004).

Os taninos quando em baixas concentrações produzem efeitos benéficos ao metabolismo animal, como aumento na absorção de aminoácidos no intestino, redução de parasitoides (MIN *et al.*, 2003), porém em altas concentrações os taninos prejudicam a palatabilidade do animal devido as ligações de pontes de hidrogênio com proteínas salivares, que resultam na adstringência diminuindo o consumo voluntário (BROOKER., 2000).

No teste para cumarinas livres, todos os genótipos apresentaram reação positiva após a adição de KoH, revelado sob luz UV no comprimento de onda de 365 mn. As cumarinas são derivadas do metabolismo da fenilalanina, conhecidos por sua ação antifúngica. Este metabólito dá origem ao dicumarol durante o processo de fermentação em ruminantes (AGUDELO, 2007). Porém estudos revelam a ação da umbeliferona com função antibiótica frente a brucella (BRUNETON, 1991).

Pelas análises do extrato aquoso onde foram obtidos os mesmos resultados encontrados no extrato etanólico (Tabela 2). Entretanto, as saponinas foram confirmadas apenas no extrato aquoso da cv. Mombaça.

Tabela 2: Análises fitoquímicas do extrato aquoso de 10 genótipos de *Panicum maximum*.

Metabólitos secundários	Amostras dos 10 genótipos de <i>P. maximum</i>									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Compostos fenólicos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Taninos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavonóides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Antraquinonas livres	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Antocianinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cumarinas	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esteroides e triterpenos livres	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicosídeos Cianogênicos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saponinas	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

Por meio do índice de saponificação, foi obtido o valor de 2100, que foi considerado acima da média, entretanto abaixo do alto teor de saponinas 2500 (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1959), o significa que a cultivar pode causar intoxicações esporádicas nos rebanhos a partir do aumento dessa concentração por fatores abióticos.

Segundo Jerba (2004), alguns tipos de saponinas podem promover aborto e morte fetal em ruminantes e monogástricos. Algumas têm grande atividade como surfactantes, estimulam a resposta, inibem a absorção de colesterol no intestino, além de sua utilização contra leishmaniose canina e murina (SANTOS, 2007).

Esse metabolito secundário pode sofrer associações com proteínas salivares, promovendo a diminuição da degradabilidade ruminal, inibindo a ação das celulasas ruminais e hidrolizando as enzimas digestivas, podendo interferir também com o próprio trato digestivo, como por exemplo, causando irritação da mucosa (TAIZ; ZEIGER., 2004).

A coleta das amostras ocorreu no período de chuvas, 50 dias após o corte de uniformização. No trabalho de Lima *et al* (2009), foi observado uma teor elevado de saponinas em pastagem de *B. decumbens* durante o período de crescimento, significando neste trabalho o período de rebrota dos genótipos.

Embora as saponinas tenham sido encontradas apenas na cv. Mombaça, o estresse por falta de precipitação pode ter ligação com a diminuição da concentração desse metabólito (OLESZEK, 2002), correlacionando com os surtos de cólicas esporádicas em equídeos no norte do país, embora estes casos tenham sido foram relatados no período de chuva e no período de crescimento das pastagens, as cvs. Tanzânia, Massai e Mombaça.

As espécies de *Panicum* spp., possuem plantas produtoras de fotossensibilização (aumento da suscetibilidade à luz ultra-violeta) por saponinas esteroidais em sua composição (MILES et al., 1993), que após a hidrólise dos açúcares por meio da metabolização pela microbiota no trato digestivo formam cristais biliares. Contudo, há controversas sobre a intoxicação desses animais alimentados por essas forrageiras. Alguns estudiosos acreditam que as saponinas não são a única fonte causadora da doença, e que algumas micotoxinas hepatotóxicas produzem efeitos semelhantes (CHEEKE, 1995.; FLAOYEN et al., 1991 e 1993).

A ausência de saponinas nos nove genótipos avaliados, o genótipo Milênio; Tobiata; B7; B19 S8; S10 e S12, principalmente as cultivares Tanzânia e Massai, que estão em processo de avaliação devido os equídeos ingerirem essas forrageiras e conseqüentemente causar cólica, é de extrema importância, pois descarta a possibilidade de intoxicação por esse metabólito, e a hipótese mais provável, é que seja causada por uma micotoxina.

Na Embrapa Gado de Corte há um programa de melhoramento genético utilizando plantas genitoras sexuais femininas e as cultivares comerciais apomíticas como masculinas. Os resultados destas análises obtidos com os genótipos sexuais (S10 e S12), são importantes para assegurar que a capacidade de produzir saponina não seja transmitida aos descendentes obtidos pelos cruzamentos com estas plantas, grandemente utilizadas no programa de melhoramento. É de grande importância, também, a verificação das saponinas e demais metabólitos que possam causar intoxicações, antes dos genótipos serem lançados no mercado, pois evitariam problemas como a fotossensibilização.

Este resultado obtido com a cv. Mombaça é importante para orientar na inclusão da determinação da quantidade de saponina, no programa de melhoramento genético da espécie, pois atualmente existem 173 híbridos do cruzamento entre S10 x cv. Mombaça em avaliação para futuros lançamentos. Devem-se remover os híbridos que apresentam saponinas do programa de melhoramento, visando selecionar apenas híbridos de alta produtividade e valor nutricional, e que não apresentem saponinas.

CONCLUSÃO

1 - As cultivares Tanzânia, Massai, Tobiata, Milênio e Colômbio, que não apresentaram em suas análises saponinas esteroidais, foram classificadas nesse estudo como aptas para o consumo dos rebanhos sem causar intoxicações.

2 - Os compostos fenólicos e cumarinas encontrados nas análises não afetam o valor nutritivo das cultivares.

3 - Os genótipos sexuais S8, S10 e S12 podem ser utilizados nos cruzamentos no programa de melhoramento, por não apresentarem saponinas.

4 - A cv. Mombaça deve ser utilizada com cautela frente a estação das chuvas e em períodos de rebrota, pois apresentou saponinas em elevadas concentrações.

5 - São necessários mais estudos relacionados aos ciclos de vida de todas as cultivares frente à época do ano e as concentrações desses metabolitos presente em cada estágio.

AGRADECIMENTOS

A Embrapa Gado de Corte pela Bolsa de IC. Ao Ministério de Ciência e Tecnologia (MCT); Centro de Pesquisa do Pantanal (CPP); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); FUNDECT; INAU e Universidade Anhanguera – Uniderp pelo apoio financeiro do projeto.

REFERÊNCIAS

AGUDELO, J. C. C. Efecto de la utilización de arbóreas y arbustivas forrajeras sobre a dinâmica digestiva em bovinos. **Revista Llassalista de Investigación**. v. 4. n. 1. p. 39-50, 2007.

BROOKER, J.D.; O'DONOVAN, L; SKENE, I. BLACKALL, L.; MUSLERA, P. Mechanisms of tannin resistance and detoxification in the rumen. In: TANNINS IN LIVESTOCK AND HUMAN NUTRITION, 2000, Adelaide. **Resumos ...** Adelaide: ACIAR, 2000. p.117-122.

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica e farmacognosia**. Zaragoza, Espanha: Ed. Acribia, p.107-353, 1991.

CHEEKE, P. R. Endogenous toxins and mycotoxins in forage grasses and their effects on livestock. **Journal Animal of Science**, Champaign, v. 73, n. 3, p. 909-18, 1995.

EMBRAPA GADO DE CORTE. **Cólica em equídeos sob pastejo em *Panicum maximum* na região Amazônica.** Nota técnica. 2009. Disponível em: http://www.cnpqg.embrapa.br/Nota_Tecnica_EquinosFinal.pdf. Acessado em: 24 de novembro de 2010.

EMBRAPA GADO DE CORTE. Pastagens, cv. Mombaça. Disponível em: <http://www.cnpqg.embrapa.br/index.php?pagina=produtoseservicos/capimmombaca.html>. Acessado em: 24 de novembro em 2010.

EUCLIDES, V.P.B. **Alternativas para intensificação da produção de carne bovina em pastagem.** Campo Grande, MS: Embrapa - CNPQ, 65p. 2000.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. São Paulo: Atheneu, V.1, 1998.

FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 2. ed. São Paulo: Siqueira, 1959.

FLAOYEN, A.; BORREBAEK, B.; NORDSTOGA, K. Glycogen accumulation and histological changes in the livers of lambs with alveld and experimental sporidesmin intoxication. **Veterinary Research Communications.** V.15. p. 443-453. 1991.

FLAOYEN, A.; SMITH, B.L.; MILES, C. O. An attempt to reproduce crystal-associated cholangitis in lambs by the experimental dosing of sarsasapogenin or diosgenin alone and in combination with sporidesmin, **New Zealand Veterinary Journal.**; v. 41, p.171-174, 1993.

IBGE. Banco de Dados Agregados. 2006. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=264&z=p&o=2&i=P>. Acessado em: 24 de Novembro de 2010.

JANK, L; RESENDE, R. M. S; VALLE, C. B; RESENDE, M. D. V; CHIARI, L; CANÇADO, L. J; SIMIONI, C. Melhoria de Forrageiras Tropicais. Campo Grande: Embrapa, 2008. 55 – 57p. Cap. 2: **Melhoramento Genético de *Panicum maximum*.**

JERBA, V. F.; MEDEIROS, S. R.; FERNANDES, C. D. **Forrageiras: Principais Fatores de Antiquidade.** Campo Grande, MS: EMBRAPA-CNPQ, 2004. 38p. (Documentos, 150).

LIMA, F. G.; RIBEIRO, C. S.; ANDRADE, D. D. F.; GUIMARÃES, V. Y.; WYSOCKI-JÚNIOR, H. L.; HARAGUCHI, M.; FIORAVANTI, M. C. S. Braquiária: fatores que interferem nos níveis de saponina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 8,. Anais... Belo Horizonte: UFMG, 2009.

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. Fortaleza: Edições UFC, p: 45-64, 1997.

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, p.3-19, 2003.

MITIDIERI, J. **Manual das gramíneas e leguminosas para pastos tropicais**. São Paulo: Nobel, 1983. 198p.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAUJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**. v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

OLESZEK, W. A. Chromatographic determination of plant saponins. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 967, p. 147-162, 2002.

RESENDE, R.M.S; VALLE, C. B. do; JANK, L. (Eds.) **Melhoramento de forrageiras tropicais**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2008.

SANTOS, F. N. **Imunoterapia contra a leishmaniose visceral experimental canina com a vacina Leishmune® enriquecida de saponina**. 97f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Microbiologia "Prof. Paulo de Góes", Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2007.

SAVIDAN; Y.H.; JANK, L.; COSTA, J. C. G. **Registro de 25 acessos selecionados de *Panicum maximum***. Campo Grande, MS: EMBRAPA-CNPQC, 1990. 68p. (Documentos, 44).

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2nd ed. New York: Cornell University Press, 1994. 476 p.

WAGNER H, BLADT S. 1995. **Plant Drug Analysis**. A Thin Layer Chromatography Atlas. Berlin: Springer.