

**EFEITOS DA *LEUCAENA LEUCOCEPHALA*
(LAM.) DE WIT SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE
PROTOZOÁRIOS CILIADOS NO RUMEN
DE OVINOS**

RAUL FRANZOLIN NETO
Professor Assistente
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da USP

MARIA HELENA TIEGHI FRANZOLIN
Zootecnista

LICIO VELLOSO
Professor Titular
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da USP

CESAR GONÇALVES DE LIMA
Auxiliar de Ensino
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da USP

FRANZOLIN NETO, R.; FRANZOLIN, M.H.T.;
VELLOSO, L.; LIMA, C.G. Efeitos da
Leucaena leucocephala (Lam.) de Wit
sobre a concentração de protozoários
ciliados no rúmen de ovinos. *Rev.*
Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Pau-
lo, 25(2):267-273, 1988.

RESUMO: Foram realizadas contagens totais e de cinco principais gêneros de protozoários ciliados do rúmen: *Entodinium* spp., *Diplodinium* spp., *Epidinium* spp., *Dasytricha* spp. e *Isotricha* spp., por ml de líquido ruminal em carneiros submetidos a dois experimentos inteiramente casualizados. No Exp. 1, cinco animais receberam apenas feno de leucena [*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit] duas vezes ao dia (7:00 e 18:00 horas) e cinco foram alimentados quatro vezes ao dia (7:00; 13:00; 18:00 e 01:00 horas). No Exp. 2, nove destes animais foram sorteados em três tratamentos, com três repetições por tratamento, sendo: a) somente feno de capim de Rhodes (*Chloris gayana* Kunth); b) 30:70% e c) 60:40% de feno de leucena mais feno de Rhodes, respectivamente. O aumento na frequência de alimentação de duas para quatro vezes ao dia reduziu significativamente o número dos ciliados estudados, exceto para o gênero *Epidinium* spp., que não foi encontrado em nenhum animal. A substituição parcial do feno de capim de Rhodes pelo feno de leucena nos dois níveis 30 e 60% da M.S.

não produziu diferenças significativas nas contagens total e diferencial dos protozoários, exceto para o gênero *Dasytricha* spp. que mostrou diminuição significativa ($P < 0,05$). Houve predominância do gênero *Entodinium* spp., (cerca de 90,0%) quando os animais receberam exclusivamente feno de leucena. Estes dados permitem levantar a hipótese de uma ação "protozoocida" da mimosina ou DHP de "per si" ou dos seus produtos intermediários do metabolismo, facilitado pela frequência de alimentação. A diminuição do número de protozoários pode ser uma adaptação dos microorganismos do rúmen, com aumento do número de bactérias degradativas desses compostos, devido à redução de bactérias engolfadas pelos protozoários.

UNITERMOS: *Leucaena*; Protozoa; Mimosina; Rúmen, microbiologia; Ovinos

INTRODUÇÃO

A leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit) é uma leguminosa arbustiva, adaptada às condições tropicais, que apresenta grande potencial na alimentação de ruminantes devido ao fato de possuir algumas características importantes como planta forrageira, tais como: elevado teor de proteína, boa aceitabilidade pelos ruminantes, boa resistência à seca, mantendo-se verde nesse período, boa produção de matéria seca, entre outras (JONES, 14, 1979).

A leucena tem sido amplamente utilizada com sucesso como "banco de proteína" para suplementação proteica de ruminantes, principalmente no período de estiagem (PARTRIDGE & RANACOU, 17, 1974; SOBALE et alii, 19, 1978; PATERSON et alii, 18, 1982). Entretanto, a presença do aminoácido tóxico denominado mimosina, tem provocado queda no ganho de peso e outros efeitos tóxicos, à medida que os animais aumentam a sua quantidade ingerida (BLUNT & JONES, 4, 1977; ALVAREZ et alii, 1, 1977; JONES, 14, 1979). Desta forma, estudos das alterações microbianas ao nível de rúmen de animais submetidos a dietas à base de leucena, se fazem necessários, a fim de procurar esclarecer os processos biológicos implicados na ação da mimosina sobre os microrganismos do rúmen.

O trabalho teve por objetivo deter-

minar a concentração dos principais gêneros de protozoários ciliados no rúmen de ovinos alimentados exclusivamente com leucena e em dois níveis de associação com o capim de Rhodes (*Chloris gayana* Kunth).

MATERIAL E METODOS

O trabalho foi desenvolvido no Centro Intraunidade de Zootecnia e Indústrias Pecuárias "Fernando Costa" (CIZIP), pertencente à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, localizado no município de Pirassununga - SP. Foram realizados dois experimentos inteiramente casualizados, com ovinos adultos, machos inteiros, da raça Ideal, pesando em média 43 kg. No Exp. 1, dez carneiros foram alimentados exclusivamente com *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit cv. Peru, fenada ao sol, (somente folhas e pequenos caules), sendo que cinco deles receberam-na numa frequência diária de duas vezes, às 7:00 e 18:00 horas (Tratamento A), e os outros cinco em quatro vezes, às 7:00; 13:00; 18:00 e 01:00 horas (Tratamento B). Após o término deste experimento, iniciou-se o Exp. 2, com nove destes carneiros sorteados em três tratamentos com três repetições por tratamento, a saber: a) dieta exclusiva com feno de capim de Rhodes (*Chloris gayana* Kunth); b) 30:70% e c) 50:40% de fenos de leucena e de Rhodes, respectivamente, com base na matéria seca. Todos os animais receberam 10 g diárias de sal mineral. Cada experimento teve a duração de 21 dias, sendo que nos últimos 7 dias a alimentação foi restrita a 85% do consumo volun-

tário e no último dia de ambos os experimentos, foram colhidas amostras dos conteúdos ruminais dos animais através de sonda esofageana. As amostras foram colhidas pela manhã, em jejum, sendo em seguida filtradas em gaze e 10 ml foram colocados em tubos de ensaios e adicionado igual volume de solução de formol 1:2. Depois de coradas com verde brilhante, cada amostra foi submetida a duas contagens dos principais gêneros de protozoários ciliados: *Entodinium* spp.; *Diplodinium* spp.; *Epidinium* spp.; *Dasytricha* spp. e *Isotricha* spp., e foram considerados os números médios das duas contagens, conforme técnica descrita por DEHORITY, 8 (1977). As análises bromatológicas dos fenos utilizados foram determinadas segundo normas da Association of Official Agricultural Chemists, 2 (1975).

Os dados obtidos foram transformados em-raiz quadrada mais meia unidade, por serem mais apropriados à análise de dados de contagens, conforme GOMES, 11 (1984) e analisados estatisticamente segundo GOMES, 10 (1981).

RESULTADOS

As composições químicas bromatológicas dos fenos de leucena (Exp. 1 e 2) e de capim de Rhodes podem ser observados na Tab. 1.

As concentrações médias com o desvio padrão, coeficiente de variação e o teste F, aplicados aos valores numéricos dos gêneros de protozoários ciliados no rúmen dos ovinos submetidos aos Exp. 1 e 2, encontram-se nas Tab. 2 e 3, respectivamente.

TABELA 1 - Composições químicas bromatológicas dos fenos de leucena *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit) e de capim de Rhodes (*Chloris gayana* Kunth) com base na matéria seca.

NUTRIENTES BRUTOS	FENO DE LEUCENA (Experimento 1) %	FENO DE LEUCENA (Experimento 2) %	FENO DE RHODES %
Matéria seca	90,41	90,58	92,06
Proteína Bruta	18,06	19,69	5,56
Fibra Bruta	22,01	18,86	39,68
Extrato Etéreo	3,87	5,69	2,72
Extr. não Nitrogenado	49,74	48,41	46,38
Cinzas	6,32	7,35	5,56
Ca	1,78	1,72	0,40
P	0,20	0,15	0,17

TABELA 2 - Número médio de protozoários $\times 10^3$ por ml de líquido ruminal de ovinos alimentados com leucena 2 vezes ao dia (Tratamento A) e 4 vezes ao dia (Tratamento B) (Exp. 1).

GENÉROS	TRATAMENTOS		MÉDIA GERAL	TESTE F	
	A	B			
	Nº REPETIÇÕES	S	S	10	
Entodinium spp		11,71	3,55	7,63	**
s		2,97	2,10	2,88	
C.V. (%)		25,40	59,06	37,73	
Diplodinium spp		0,81	0,26	0,54	*
s		0,41	0,25	0,38	
C.V. (%)		50,56	36,04	71,02	
Dasytricha spp		0,27	0,050	0,16	**
s		0,15	0,009	0,12	
C.V. (%)		58,58	18,47	78,18	
Isotricha spp		0,29	0,023	0,16	
s		0,37	0,022	0,29	
C.V. (%)		125,64	97,43	184,61	
Total		13,08	3,89	8,48	**
s		3,53	2,22	3,30	
C.V. (%)		27,01	57,17	38,90	

s = Desvio padrão

C.V. = Coeficiente de variação

** = $P < 0,01$

* = $P < 0,05$

TABELA 3 - Número de protozoários $\times 10^3$ por ml de líquido ruminal de ovinos alimentados somente com feno de Rhodes (Tratamento A); 30:70% (Tratamento B) e 60:40% (Tratamento C) de feno de leucena e feno de Rhodes, respectivamente. (Exp. 2)

GÊNEROS ^a	TRATAMENTOS			TESTE F
	A	B	C	
	Nº REPETIÇÕES	3	3	3
Entodinium spp	5,00	5,46	7,89	
^s	0,53	1,35	2,07	
C.V. (%)	10,75	20,98	25,93	
Diplodinium spp	3,71	5,89	3,72	
^s	0,79	2,50	2,36	
C.V. (%)	21,50	42,60	63,29	
Epidinium spp	0,025	0,044	0,044	
^s	0,009	0,050	0,031	
C.V. (%)	35,73	112,68	54,51	
Dasytricha spp	2,25	0,79	0,72	
^s	0,51	0,13	0,44	
C.V. (%)	22,98	17,23	60,74	
Isotricha spp	0,13	0,26	0,43	
^s	0,09	0,29	0,52	
C.V. (%)	70,71	111,76	120,26	
Total	11,12	13,44	12,90	
^s	0,94	3,97	4,04	
C.V. (%)	8,50	29,57	31,23	

^s = Desvio padrão

C.V. = Coeficiente de variação

bc = Dados médios com letras diferentes, diferem entre si (P < 0,05)

DISCUSSÃO

A alteração na frequência de alimentação de duas para quatro vezes ao dia reduziu, significativamente, o número total e diferencial dos principais gêneros de protozoários ciliados por ml de líquido ruminal dos ovinos alimentados com leucena (Tab. 2). Esses dados foram contraditórios com os observados por HUNGATE et alii, 13 (1971) em um grupo de ovinos alimentados com ração peletizada de alfafa, a cada duas horas e outro grupo duas vezes ao dia, os quais indicaram uma superioridade significativa da alimentação mais freqüente no total de protozoários ciliados do rúmen, enquanto que o número total de bactérias por ml de líquido foi maior nos alimentados na frequência menor. BRAGG et alii, 5 (1996) observaram, em novilhos, que os ciliados foram mais numerosos

imediatamente após a alimentação, assim, os animais alimentados oito vezes ao dia mantiveram níveis mais elevados de protozoários que aqueles alimentados duas vezes ao dia.

TAGENDJAJA et alii, 20 (1985), na Indonésia, estudaram a degradação de mimosina e 3-hidroxi-4-(OH)-piridone (DHP) em cabras "in vivo" e "in vitro" e concluíram que o aumento observado na atividade degradativa de DHP no líquido ruminal após a defaunação e subsequente alimentação com leucena, durante 5 dias, é devido ao aumento no número de bactérias na ausência de protozoários, em virtude do processo de engolfamento de bactérias pelos protozoários, admitido por COLEMAN & SAMFORD, 7 (1979). A eliminação de toxicidade do DHP é assim, segundo TAGENDJAJA et alii, 20 (1985), um processo microbiano ruminal, devido à bactérias e não aos protozoários. A diminuição significativa do número dos protozoários estudados, com o aumento da

freqüência de alimentação parece ser o resultado da adaptação da microflora ruminal com conseqüente aumento no crescimento de bactérias degradativas de mimosina e DHP. Uma hipótese levantada sobre a redução do número de protozoários é a de uma ação "protozoocida" da mimosina e do DHP "per se" ou pelos metabólitos formados da degradação da mimosina em DHP, facilitada pelo aumento na freqüência de alimentação, possivelmente devido a uma ingestão mais constante de mimosina ao longo do dia. Isso parece concordar com as diferenças no "Modelo" de metabolismo da mimosina, observados em ovinos sob diferentes freqüências de alimentação com leucena, citadas por FRANZOLIN NETO & VELLOSO, 9 (1986). Essa hipótese pode ser reforçada, já que o número total dos ciliados por ml de líquido ruminal dos ovinos alimentados exclusivamente com leucena foi bastante reduzido ($13,1 \times 10^3$ para 2x/dia e $3,9 \times 10^3$ para 4x/dia) em relação aos dados obtidos por HUNGATE et alii, 13 (1971) em ovinos alimentados com ração peletizada de alfafa ($4,98 \times 10^5$ e $2,36 \times 10^5$ nas freqüências de alimentação a cada duas horas e duas vezes ao dia, respectivamente). BIRD et alii, 3 (1979) também encontraram populações de protozoários no rúmen de ovinos da ordem de 50×10^3 /ml. HUNGATE, 12 (1966) cita que o número total de protozoários oscila normalmente entre 2×10^5 a 2×10^5 /ml de líquido ruminal.

A substituição parcial do feno de capim de Rhodes pelo de leucena, nos dois níveis de 30% e 60% da M.S. (Exp. 2) não produziu diferenças significativas nos números dos protozoários, exceto para o gênero *Dasytricha* spp. que mostrou diminuição significativa ($P < 0,05$), conforme verificado na Tab. 3. KAPOOR et alii, 15 (1983) também não observaram diferença significativa na contagem total de protozoários no líquido ruminal de búfalos, quando a *Leucaena leucocephala* substituiu 20% da mistura concentrada da dieta.

Pela Tab. 3 observa-se que o consumo exclusivo de feno de Rhodes promoveu um número reduzido de protozoários ciliados no rúmen ($1,1 \times 10^4$ /ml), provavelmente em virtude do baixo teor de proteína bruta do feno (5,56%). Assim, a substituição de 30 e 60% do feno de Rhodes por leucena promoveu um aumento no teor de proteína das rações para 9,8% e 14,0%, respectivamente. Isso permitiu condições necessárias para o crescimento microbiano; entretanto, não houve aumento significativo do número de protozoários, como esperado de acordo com HUNGATE, 12 (1966).

Não houve alteração nas proporções dos diferentes gêneros de protozoários, quando os animais foram alimentados exclusivamente com leucena em relação às duas freqüências de alimentação estuda-

das. Contudo, houve acentuada alteração dessas proporções, quando se observam os dados dos dois experimentos, ou seja, no Exp. 1 *Entodinium* spp. compreenderam em média 90,0% do total de protozoários e no Exp. 2 compreenderam 44,97%, 48,05% e 61,78% para os tratamentos A, B e C, respectivamente.

Assim, observou-se aumento aparente dos protozoários do gênero *Entodinium* spp. à medida que aumentaram os níveis de leucena na ração. CHURCH, 6 (1974) afirma que os entodinomorfos utilizam muito pouco carboidratos solúveis, se é que utilizam algum, entretanto, quase todos eles digerem o amido granular e que o gênero mais freqüente é o *Entodinium* spp., principalmente em animais que consomem rações ricas em amido. LYLE et alii, 16 (1981) citam que as espécies de *Entodinium* predominam no rúmen quando, na dieta, forragem é substituída por grãos. Dessa forma, no presente trabalho, a leucena atuou como um concentrado com alto teor de amido devido à predominância dos protozoários do gênero *Entodinium* spp. Além disso, nos animais alimentados exclusivamente com leucena, não foram encontrados protozoários do gênero *Epidinium* spp. LYLE et alii, 16 (1981) observaram, em novilhas alimentadas exclusivamente com concentrados e monensina, que o primeiro gênero a sofrer a defaunação foi *Epidinium* spp., já após dois dias de adaptação à dieta.

CONCLUSOES

1. A freqüência de alimentação de 4 vezes ao dia provocou uma redução significativa no número total e diferencial dos principais gêneros de protozoários ciliados por ml de líquido ruminal, em ovinos alimentados exclusivamente com feno de leucena, em relação ao fornecimento do feno duas vezes diariamente.
2. Não houve diferenças significativas no número total e diferencial dos gêneros de ciliados estudados/ml de líquido ruminal dos ovinos, quando o feno de leucena foi associado ao de capim de Rhodes em dois níveis, 30 e 60%, com base na matéria seca, respectivamente, exceto para o gênero *Dasytricha* spp., que apresentou redução significativa ($P < 0,05$).

FRANZOLIN NETO, R.; FRANZOLIN, M.H.T.; VELLOSO, L.; LIMA, C.G. Effects of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit on concentration of ciliate protozoa in the rumen of sheep. Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo, 25(2):267-273, 1988.

SUMMARY: Two completely randomized trials with sheep were run to study the feeding *Leucaena leucocephala* on concentration of rumen ciliate protozoa. In trial 1, ten sheep were subjected to two frequencies (twice or four times daily) being the *Leucaena* hay fed as sole diet. In trial 2, nine sheep were subjected to three treatments: a) 100% Rhodes grass hay (*Chloris gayana* Kunth); b) 30:70%; c) 50:40% *Leucaena* hay and Rhodes grass hay, respectively. The animals were adapted for 21 day period, and after that, rumen fluid samples were taken from each sheep via stomach tube before first feeding. Increasing the feeding

frequencies from 2 to 4 times/day resulted in a decrease in total and differential numbers of protozoa, except for genus *Epidinium* spp. which was not present. The levels 30% and 50% of *Leucaena* hay in diet on dry matter bases did not result in a significant change in concentration of rumen ciliate protozoa, except the genus *Dasytricha* spp. which showed significant decrease ($P < .05$). Differential protozoa counts revealed that *Entodinia* species predominated when sheep were fed only *Leucaena* (90.0%). From those findings, it may be made an hypothesis of "protozoocid" action of mimosine or DHP "per se" or products of mimosine metabolism, facilitated for feeding frequencies of microorganisms in the rumen with increase in number of bacteria species breakdown these compounds due to the decrease of the engulfment process of bacteria by protozoa.

UNITERMS: *Leucaena*; Protozoa; Mimosine; Rumen microbiology; Sheep

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 - ALVAREZ, F.J.; WILSON, A.; PRESTON, T.R. *Leucaena leucocephala* as a combined source of protein and roughage for steers fattened on molasses/urea. Trop. anim. Prod., 2:288-296, 1977.
- 2 - ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Official methods of analysis. 11 ed. Washington, 1975.
- 3 - BIRD, S.H.; HILL, M.K.; LENG, R.A. The effects of defaunation of the rumen on the growth of lambs on low-protein-high-energy diets. Brit. J. Nutr., 42:81-87, 1979.
- 4 - BLUNT, C.G. & JONES, R.J. Steer liveweight gains in relation to the proportion of time on *Leucaena leucocephala* pastures. Trop. Grasslds., 11:159-164, 1977.
- 5 - BRAGG, D.S.A.; MURPHY, M.R.; DAVIS, C.L. Effect of source of carbohydrate and frequency of feeding on rumen parameters in dairy steers. J. Dairy Sci., 69:392-402, 1986.
- 6 - CHURCH, D.C. Fisiología digestiva y nutrición de los rumiantes. Zaragoza, Acribia, 1974. v.1, p. 184-225.
- 7 - COLEMAN, G.S. & SAMFORD, D.C. The engulfment and digestion of mixed rumen bacteria and individual bacterial species by single and mixed species of rumen ciliate protozoa grown in vivo. J. Agric. Sci., 92:729-742, 1979.
- 8 - DEROHITY, B.A. Classification and morphology of rumen protozoa. Wooster, Ohio. Agriculture Research and Development Center, 1977. (Apostila)
- 9 - FRANZOLIN NETO, R. & VELLOSO, L. *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit em rações para ovinos. 2. Toxicidade. Rev. Soc. Bras. Zootec., 15:415-424, 1986.

- 10 - GOMES, F.P. Curso de estatística experimental. Piracicaba, Nobel, 1981.
- 11 - GOMES, F.P. A estatística moderna na pesquisa agropecuária. Piracicaba, Associação Brasileira para Pesquisa da Postassa e do Fosfato, 1984.
- 12 - HUNGATE, R.E. The rumen and its microbes. New York, Academic Press, 1966.
- 13 - HUNGATE, R.E.; REICHL, J.; PRINS, R. Parameters of rumen fermentation in a continuously fed sheep: evidence of a microbial rumination pool. *Appl. microbiol.*, 22:1104-1113, 1971.
- 14 - JONES, R.J. El valor de *Leucaena leucocephala* como pienso para rumiantes en los tropicos. *Rev. Mund. Zootec.*, 31:13-23, 1979.
- 15 - KAPOOR, P.D.; PURI, J.P.; DWARAKNATH, P.K. Effect of supplementation of *Leucaena leucocephala* on the rumen metabolism in buffaloes. *Indian J. anim. Sci.*, 53:461-464, 1983.
- 16 - LYLE, R.R.; JOHNSON, R.R.; WILHITE, J.V.; BACKUS, W.R. Ruminal characteristics in steers as affected by adaptation from forage to all-concentrate diet. *J. anim. Sci.*, 53:1383-1390, 1981.
- 17 - PARTRIDGE, I.S. & RANACOU, E. The effects of supplemental *Leucaena leucocephala* browse on steers grazing *Dichanthium caricosum* in Fiji. *Trop. Grasslds.*, 8:107-112, 1974.
- 18 - PATERSON, R.T.; SAMUR, C.; SAUNA, G. *Leucaena leucocephala* para la complementación de pastos existente. *Prod. anim. trop.*, 7:9-14, 1982.
- 19 - SOBALLE, B.N.; KHARAT, S.T.; PRASAD, V.L.; JOSHI, A.L.; RANGNEKAR, D.V.; DESHMUKH, S.S. Nutritive value of *Leucaena leucocephala* for growing bull calves. *Trop. anim. Hlth. prod.*, 10:237-241, 1978.
- 20 - TAGENDJAJA, B.; LOWRY, J.B.; WILLIS, R.B.H. Degradación de mimosina y 3-hidroxi-4 (OH) piridone (DHP) por cabras de Indonesia. *Prod. anim. trop.*, 10:41-45, 1985.

Recebido para publicação em 19/11/87
Aprovado para publicação em 06/07/88