



Instituto Politécnico de Santarém

Escola Superior Agrária

Utilização de Taninos Vegetais como Aditivos em Silagem

**Dissertação para a obtenção do grau de Mestre na área
de Sistemas de Prevenção e Controlo Alimentar**

**Sónia Cristina
Mendes Duarte**

Orientador

Paulo Branco Reis Parda

Co-Orientador

Maria Teresa Vacas de Carvalho Ponce Dentinho

2012

Outubro

*À minha família
a minha profunda gratidão*

Resumo

O objectivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição de taninos extraídos da esteva (*Cistus ladanifer*) e da casca do pinheiro como aditivos em silagem de azevém (*Lolium multiflorum*), como inibidores da proteólise durante a ensilagem. Os extractos obtidos foram adicionados à silagem em 4 níveis de tratamento (0, 3, 6 e 9%) e ensilados durante 9 semanas.

A conservação por ensilagem resultou na diminuição do teor de matéria seca e de açúcares solúveis e, simultaneamente, num aumento do azoto solúvel.

A adição de taninos ao ensilado provocou um aumento significativo na concentração de ácido láctico, contudo não afectou os teores de proteína bruta o que pode apontar para um potencial efeito protector dos taninos relativamente às proteínas da forragem.

Palavras-Chave

Aditivo, azevém, composição química, ensilagem, fenólicos totais, fermentação, proteína, tanino

Abstract

The aim of this work was to study the effect of the tannins extracted from cistus (*Cistus ladanifer*) and from the pine bark as additives in ryegrass silage (*Lolium multiflorum*), as inhibitors of the proteolysis during the ensiling. The extracts obtained was added to the silage in 4 treatment levels (0, 3, 6 and 9%) and ensiled for 9 weeks.

The ryegrass used presented contents of DM and sugar of 32,5, 8,7 and 12,05 (% in DM) respectively.

The conservation by silage resulted in a decrease of dry matter content and soluble sugars and simultaneously an increase in soluble nitrogen.

The addition of tannins to the silage caused a significant increase in the lactic acid concentration, but it didn't affect the CP which may point to a potential effect of tannins towards the proteins of forage.

Key words:

Additive, ryegrass, chemical composition, ensiling, total phenolics, fermentation, protein, tannin

Agradecimentos

Agradeço reconhecidamente ...

A Deus cuja força me permitiu vacilar mas nunca desistir. Sem a Sua intervenção nada teria sido possível

À Escola Superior Agrária e respectiva direcção pelo suporte financeiro que me concedeu

Ao Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) pelos meios físicos e materiais disponibilizados para a realização de todo o projecto

À engenheira Teresa Dentinho pela disponibilidade manifestada e por ter sempre apontado a direcção e o caminho a seguir

Ao doutor Paulo Pardal por ter aceite ser meu orientador e me ter dado o apoio necessário

A todos os técnicos do laboratório do departamento de Nutrição e Alimentação Animal do INIAV, em especial aos que trabalharam directamente comigo, sr. José Batista, Nulita Álvaro, Ilda Gonçalves, Ana Sá e Isabel Silvano, um agradecimento especial pela total colaboração, disponibilidade e profissionalismo demonstrado e por terem sido, acima de tudo bons amigos

A todo o pessoal docente da Escola Superior Agrária, especialmente a doutora Marília Henriques, por todos os conhecimentos transmitidos e pelo apoio incondicional ao longo deste percurso, nem sempre fácil

Aos meus amigos, a todos o meu obrigado por terem compreendido que nem sempre é fácil estar presente

Aos meus pais que me incentivaram e ensinaram o caminho do trabalho, da dedicação e da persistência. Para eles o maior e mais importante agradecimento

Ao meu irmão por ter sido sempre o meu confidente nos momentos em que a coragem e a determinação insistiram em afastar-se

Ao meu marido, por todos os momentos sacrificados em prol deste projecto e por em cada instante ter sido sempre um incentivo e um porto de abrigo. Obrigado por teres um coração tão disponível.

Lista de Abreviaturas

µg	micrograma
µL	microlitro
>	maior que
<	menor que
A	absorvância
a.g.	ácido gordo
aç.	açúcar
ADF	fibra insolúvel em detergente ácido
ADL	lenhina bruta
atm	atmosfera
C	carbono
Ca	cálcio
cm	centímetro
CO₂	dióxido de carbono
cz	cinza
DMO	digestibilidade matéria orgânica
DMS	digestibilidade matéria seca
DPR	desvio padrão residual
EB	energia bruta
EP	erro padrão
ESAS	Escola Superior Agrária de Santarém
FT	fenólicos totais
g	grama
GB	gordura bruta
h	hora
H	hidrogénio
H₂O	água
HCl	ácido clorídrico
INIAV	Instituto Nacional Investigação Agrária e Veterinária

kg	quilograma
kJ	quiloJoule
L	litro
m	massa
M	concentração em molaridade
mg	miligrama
min.	minuto
MJ	megaJoule
mL	mililitro
mm	milímetro
m/m	massa/massa
MO	matéria orgânica
MS	matéria seca
m/v	massa/volume
N	azoto
N	concentração em normalidade
n	número de observações
nm	nanómetro
NDF	fibra insolúvel em detergente neutro
N-NH₃	azoto amoniacal
N_{solúvel}	azoto solúvel
N_{total}	azoto total
NP	norma portuguesa
O₂	oxigénio
°C	grau Celsius
P	fósforo
P	pressão
PB	proteína bruta
pH	simétrico do logaritmo decimal da concentração hidrogeniónica
rpm	rotação por minuto

SAS	<i>Statistical analysis systems</i> ®
sig.	significância
T	temperatura
t	tempo
TC	tanino condensado ou taninos condensados
TH	tanino hidrolisável
UV-vis.	ultra violeta-visível
v/v	volume/volume

Índice de Figuras e Quadros

Figura 1. Evolução da produção mundial de feno e silagem, entre 2001 e 2011 ...	6
Figura 2. Resumo das diferentes fases do processo de ensilagem ao longo do tempo	9
Figura 3. Vias metabólicas da fermentação de açúcar pelas bactérias lácticas	10
Figura 4. Distribuição relativa das perdas associadas ao processo de ensilagem .	11
Figura 5. Aditivos mais comuns no processo de ensilagem	13
Figura 6. Estruturas químicas de taninos hidrolisáveis	16
Figura 7. Estrutura química de flavonóides e de sub-unidades (flavano-3-ol) de taninos	17
Figura 8. Ligações tanino-proteína que se estabelecem ao longo do sistema digestivo dos ruminantes	19
Figura 9. Química do ensaio da vanilina para determinação de TC	43
Quadro 1. Padrões usados na obtenção da curva de calibração referente à determinação do teor em fenólicos totais	26
Quadro 2. Teor de compostos fenólicos totais (FT) e de taninos condensados (TC) dos extractos de casca de pinheiro e de esteva	37
Quadro 3. Composição química e nutritiva do azevém	38
Quadro 4. Composição química da silagem de azevém com diferentes níveis de tratamento	40
Quadro 5. Parâmetros fermentativos das silagens de azevém com quatro níveis de fenólicos totais extraídos da casca do pinheiro e da esteva	41
Quadro 6. Solução de macroelementos	61
Quadro 7. Solução microelementos	61
Quadro 8. Composição química do azevém e da silagem de azevém com diferentes níveis de tratamento (g/100g MS)	62
Quadro 9. Parâmetros fermentativos de silagem de azevém e de silagem de azevém aditivadas com diferentes níveis de compostos fenólicos	63

Índice de conteúdos

Resumo	i
<i>Abstract</i>	ii
Agradecimentos	iii
Lista de Abreviaturas	iv
Índice de Figuras e Quadros	vii
Índice de Conteúdos	viii
PARTE I – INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. Introdução	2
1.2. Objectivos	3
PARTE II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Conservação de Forragens	5
2.2. Ensilagem	7
2.2.1. Alterações e perdas durante a ensilagem	8
2.2.1.1. Alterações físicas na fase de pré-ensilagem	8
2.2.1.2. Alterações e perdas enzimáticas	9
2.2.1.3. Perdas por efluentes.....	11
2.2.2. Aditivos	12
2.2.2.1. Estimulantes	13
2.2.2.2. Inibidores	13
2.3. Taninos	15
2.3.1. Estrutura e propriedades	16
2.3.2. Taninos na alimentação de ruminantes	19
2.3.3. Taninos em silagens	22

PARTE III - MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Preparação da amostra	24
3.2. Extracção de compostos fenólicos	25
3.3. Determinação do teor em taninos	25
3.3.1. Compostos fenólicos totais	25
3.3.2. Taninos condensados – ensaio vanilina	26
3.4. Determinações analíticas	27
3.4.1. Humidade	27
3.4.2. Cinza	28
3.4.3. Proteína bruta	28
3.4.4. Azoto total	28
3.4.5. Azoto amoniacal	29
3.4.6. Azoto solúvel	29
3.4.7. Fibra bruta	30
3.4.8. Gordura bruta	30
3.4.9. Constituintes parietais	31
3.4.10. Açúcares e amido	31
3.4.11. Cálcio	32
3.4.12. Fósforo total	32
3.4.13. Energia bruta	32
3.4.14. Digestibilidade	33
3.4.15. Ácidos gordos	34
3.5. Análise estatística.....	34

PARTE IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1. Resultados	37
4.2. Discussão	43
4.3. Conclusão	50
PARTE V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
PARTE VI – ANEXOS	60

Parte I

Introdução Geral:

1.1 Introdução

As pastagens e as forragens são os alimentos naturais mais económicos para alimentação dos ruminantes, permitindo um elevado grau de saúde e bem-estar aos animais assim como elevada qualidade dos produtos pecuários, garantindo simultaneamente uma boa preservação do ambiente.

Em Portugal continental as condições climáticas que se fazem sentir, caracterizadas por uma distribuição bastante irregular de chuva e temperatura ao longo do ano, determinam uma produção de pastagem extremamente sazonal, com cerca de 60% obtida apenas durante os três meses de Primavera. Durante o Verão e nas épocas Outono/Inverno as pastagens são pouco produtivas ou quase inexistentes e de baixo valor nutritivo. Nestes períodos de escassez alimentar os agricultores recorrem à utilização de forragens conservadas e a alimentos concentrados que são de elevado custo e importados na sua quase totalidade.

A fenação e a ensilagem são os métodos de conservação de forragens mais utilizados em Portugal. O princípio de qualquer destes métodos de conservação é transformar o mais rapidamente e com menor número de perdas possível uma forragem verde e instável, numa forragem estável de forma a permitir a sua conservação por tempo prolongado sem que se verifiquem alterações significativas de qualidade. As perdas mais significativas associadas aos métodos de conservação são diminuição de matéria seca e diminuição de valor nutritivo, no entanto, no que respeita à ensilagem, a extensa proteólise que ocorre nos primeiros dias de ensilagem é a transformação que origina maiores perdas.

Os taninos são compostos fenólicos que se complexam com a proteína e com outras macromoléculas (polissacarídeos, ácidos nucleicos e minerais). A capacidade que os taninos têm para formar complexos estáveis com a proteína tem sido desde há alguns anos estudada para aplicação em alimentação animal. Estudos recentes têm mostrado que os taninos podem ser utilizados como aditivos de silagem com o objectivo de reduzir a proteólise que ocorre durante o corte e armazenamento da forragem.

1.2. Objectivos

É objectivo deste trabalho estudar os taninos extraídos da esteva (*Cistus ladanifer* L.) e da casca do pinheiro como aditivos de uma silagem de azevém (*Lolium multiflorum* L.) de forma a inibirem a proteólise durante a ensilagem.

Para alcançar este objectivo extraíram-se os taninos da esteva e da casca de pinheiro. Estes extractos foram adicionados ao azevém em quatro níveis de tratamento diferentes (0, 3, 6 e 9 % de taninos condensados na matéria seca). Após adição dos diferentes tratamentos o azevém foi ensilado em silos experimentais, para avaliação do efeito da inclusão de taninos na qualidade fermentativa da silagem e selecção, para cada extracto, do melhor nível de taninos a adicionar à forragem.

Parte II

Revisão Bibliográfica

2.1. Conservação de forragens

O pastoreio é o sistema de produção que envolve menores custo, contudo, não é necessariamente o mais rentável uma vez que a escassez sazonal diminui a quantidade e/ou a qualidade dos alimentos disponíveis, limitando a produção. A conservação de forragens pode preencher essa lacuna, através do armazenamento de alimentos de alta qualidade, produzidos em períodos em que haja abundância e que podem ser utilizados nos períodos de escassez alimentar (Akmal *et al*, 2004; Sampoux *et al*, 2011).

A fenação e a ensilagem são os métodos de conservação mais utilizados pelos agricultores quando pretendem conservar forragem em grande escala (Buxadé, 1995; Charmley, 2001; Kaiser *et al*, 2003).

A fenação é um processo de secagem em condições naturais durante o qual a percentagem de água das forragens é reduzida de 80 a 85% na forragem original para 15% pelo que este método depende fortemente das condições climáticas (temperaturas elevadas e baixa humidade do ar). A ensilagem é um método de conservação sob a forma húmida em que a forragem é armazenada em silos, em condições anaeróbias (Kellems e Church, 2010).

Relativamente à fenação, a ensilagem é um método mais adequado à mecanização, de rápida execução, que necessita de menor capacidade de armazenamento. Por ser independente das condições climatéricas permite o corte da forragem na melhor fase de desenvolvimento da planta: início do espigamento nas gramíneas e início da floração nas leguminosas que, em Portugal, coincide com o início da Primavera quando as temperaturas ainda não são altas e ainda se regista alguma pluviosidade (Março/Abril) (Charmley, 2001; Kaiser *et al*, 2003).

As maiores desvantagens da silagem relativamente ao feno são a necessidade de maior investimento em infra estruturas (maquinaria e silos), o conhecimento técnico necessário (*know-how*) e maiores perdas associadas se as condições de armazenamento não forem as ideais. Além disso, a ensilagem tem, em geral, teores de vitamina D inferiores (Logan e Lister, 1971, citado por Dentinho, 1998).

Mundialmente a conservação de forragem por ensilagem é superior à conservação por fenação (figura 1).

A maior dependência das condições climatéricas e de mão-de-obra, bem como as elevadas perdas que se verificam no processo de fenação são os factores

responsáveis pela preferência da produção de silagem relativamente ao feno (Buxadé, 1995; Kellems e Church, 1998).



Figura 1. Evolução da produção mundial de feno e silagem, entre 2001 e 2011. Adaptado de <http://www.scotland.gov.uk/Publications/2012/03/7513/3>. Consultado a 20 de Abril de 2012

2.2. Ensilagem

A ensilagem é um método de conservação de forragens verdes com elevado teor de humidade, protegido do ar, da luz e da humidade exterior, cujas perdas de matéria seca e de valor nutritivo, quando bem conservada, são mínimas. Neste processo a forragem é mantida num estado semelhante ao que tinha no momento da colheita embora se verifiquem alterações químicas resultantes dos processos fermentativos que vão ocorrendo, até serem atingidas as condições necessárias para estabilização do meio e conservação da planta por períodos prolongados de tempo. Quase todas as culturas forrageiras podem ser conservadas segundo este método embora as mais comuns sejam gramíneas e leguminosas (Buxadé, 1995; McDonald *et al*, 1995).

Para se conservar culturas por ensilagem é primordial: i) criar condições de anaerobiose de forma a impedir a respiração da planta por tempo prolongado e inibir o desenvolvimento da flora aeróbia (fungos e bactérias) cuja actividade provoca a putrefacção da material vegetal e ii) criar um ambiente ácido com vista à inibição ou redução da actividade das enzimas proteolíticas da planta e impedir o crescimento de microrganismos indesejáveis.

As condições anaeróbias são conseguidas pelo armazenamento da forragem em silos, cortada em pequenos troços, fortemente compactados, o que facilita a eliminação do oxigénio. O enchimento do silo deve ser o mais rápido possível e este deverá ser hermeticamente fechado de forma a minimizar a entrada de ar cuja presença potencia a actividade microbiana aeróbia que facilmente converte a massa num produto sem utilidade, não comestível e geralmente tóxico. A acidificação do meio é conseguida à custa da actividade de bactérias lácticas, naturalmente presentes no material vegetal e que, em condições anaeróbias, utilizam os hidratos de carbono solúveis da planta dando origem a ácido láctico (McDonald *et al*, 1995).

A composição da forragem no momento do corte é o factor de maior influência na qualidade da silagem obtida sendo os parâmetros mais importantes o teor em matéria seca, a quantidade de compostos facilmente fermentescíveis disponíveis (hidratos de carbono) e a respectiva capacidade tampão. Quanto menor o teor de matéria seca mais difícil é a estabilização do meio: em plantas com 15% de matéria seca o pH deverá atingir valores inferiores a 4 para que a silagem se conserve, no entanto, em plantas com 50% de matéria seca na altura do corte a estabilização do meio é conseguida a pH 5 (Wilkins, 1988, citado por Dentinho, 1998).

A quantidade de efluentes produzida durante a ensilagem é tanto maior quanto maior o teor de humidade das plantas, no entanto, factores como o tipo de silo, o pré-tratamento e o grau de compactação da forragem no silo também são importantes. Através dos efluentes são arrastados compostos importantes tais como açúcares, proteínas e minerais, que são perdas importantes e que diminuem o valor nutritivo do produto final e que por isso devem ser evitadas (Buxadé, 1995; Kaiser *et al*, 2003)..

A presença de hidratos de carbono solúveis no meio é fundamental para se conseguir um ensilado de elevada qualidade. Sem hidratos de carbono não ocorre fermentação e, conseqüentemente não se verifica produção de ácido láctico bem diminuição do valor de pH. O teor de hidratos de carbono é dependente do estado de maturação da planta e da espécie em causa (Butler e Bailey, 1973).

2.2.1. Alterações e perdas durante a ensilagem

À ensilagem estão associadas alterações e perdas, essencialmente de matéria seca e de valor nutritivo, que ocorrem ao longo de todo o processo e que se iniciam no momento do corte da erva. O tipo de cultura e a respectiva forma de colheita, as condições ambientais e o manejo são factores que determinam a dimensão das perdas (Kaiser *et al*, 2003).

2.2.1.1. Alterações físicas na fase de pré ensilagem

Na fase de pré ensilagem verificam-se alterações e perdas de matéria seca e valor nutritivo, comparativamente com a forragem inicial. Em culturas cortadas e ensiladas no mesmo dia, as perdas de matéria seca são negligenciáveis, não ultrapassando 2% de matéria seca e, resultam da actividade fotossintética e das operações de colheita e transporte da forragem. Se a forragem for sujeita a uma secagem prolongada antes do ensilamento, por período superior a 48h, as perdas podem ser significativas, superiores a 10%, dependendo das condições de secagem e do teor de humidade da planta no momento do corte (Kaiser *et al*, 2003; McDonald *et al*, 1995).

2.2.1.2. Alterações e perdas enzimáticas

Após o corte, e ainda na presença de oxigênio, a forragem continua a respirar, utilizando açúcares da planta e libertando dióxido de carbono (CO₂) e calor. Durante esta fase e, principalmente em plantas com elevado teor de humidade, verifica-se uma extensa proteólise das proteínas da planta. Nas primeiras 12 a 24 horas o teor de azoto não proteico pode aumentar de 20 para 40% do azoto total, podendo ainda ocorrer a descarboxilação e desaminação dos aminoácidos. O teor de matéria seca da planta, o corte adequado da forragem, uma boa compactação e o rápido enchimento do silo reduzem a duração desta fase, aumentando a probabilidade de sucesso da ensilagem (McDonald *et al*, 1995).

A figura 2 resume o processo de ensilagem, evidenciando algumas das principais alterações ocorridas no silo.

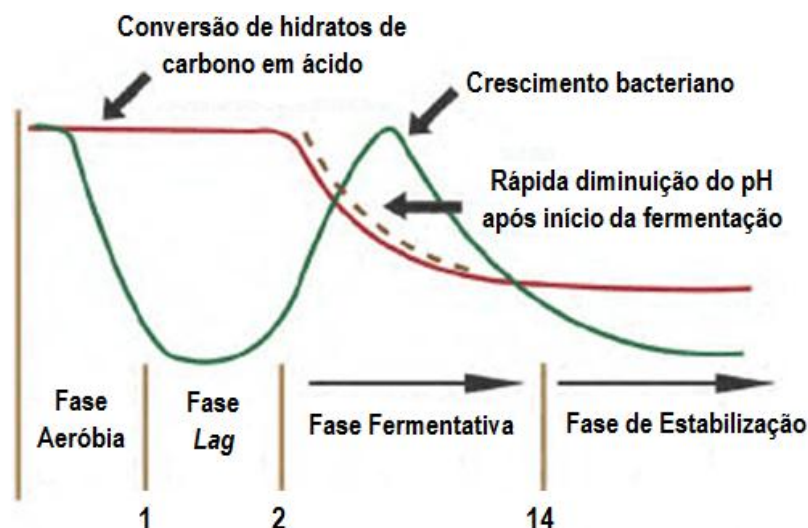


Figura 2. Resumo das diferentes fases do processo de ensilagem ao longo do tempo (dias) (adaptado de Kaiser *et al*, 2003)

A fase fermentativa inicia-se quando cessa o processo respiratório e se estabelecem condições anaeróbias no silo. A fermentação acética é a primeira a desenvolver-se através de bactérias do grupo coliformes (anaeróbias facultativas), que transformam açúcares em ácido acético e dióxido de carbono e têm a capacidade de desaminar e descarboxilar os aminoácidos, com produção de grandes quantidades de amoníaco. O pH ótimo para o crescimento destas bactérias é, aproximadamente 7, estando activas apenas nas fases iniciais da fermentação, quando o pH ainda é favorável à sua multiplicação. Nos ensilados, as enterobactérias mais comuns são

Escherichia coli e *Erwinia herbicola*. Esta primeira fermentação é rápida e termina quando o pH baixa de 4,5 sendo as bactérias coliformes substituídas por bactérias lácticas (Butler e Bailey, 1973; Kaiser *et al*, 2003).

As bactérias ácido lácticas, anaeróbias facultativas, encontram-se nas culturas em pequena quantidade, multiplicando-se no silo depois da colheita. Estes microrganismos podem dividir-se em dois grupos: bactérias homofermentativas, apenas produzem ácido láctico (*Lactobacillus casei*, *Pediococcus acidilactici* e *Enterococcus faecalis*) e heterofermentativas, além de ácido láctico produzem ácido acético, álcool e dióxido de carbono (*Lactobacillus brevis* e *Leuconostoc mesenteroids*) (figura 3). Se a fermentação for predominantemente homofermentativa, os hidratos de carbono solúveis são utilizados de forma mais eficiente, o valor de pH decresce rapidamente e são menores as perdas de matéria seca e energia (Buxadé, 1995; Kaiser *et al*, 2003; McDonald *et al*, 1995).

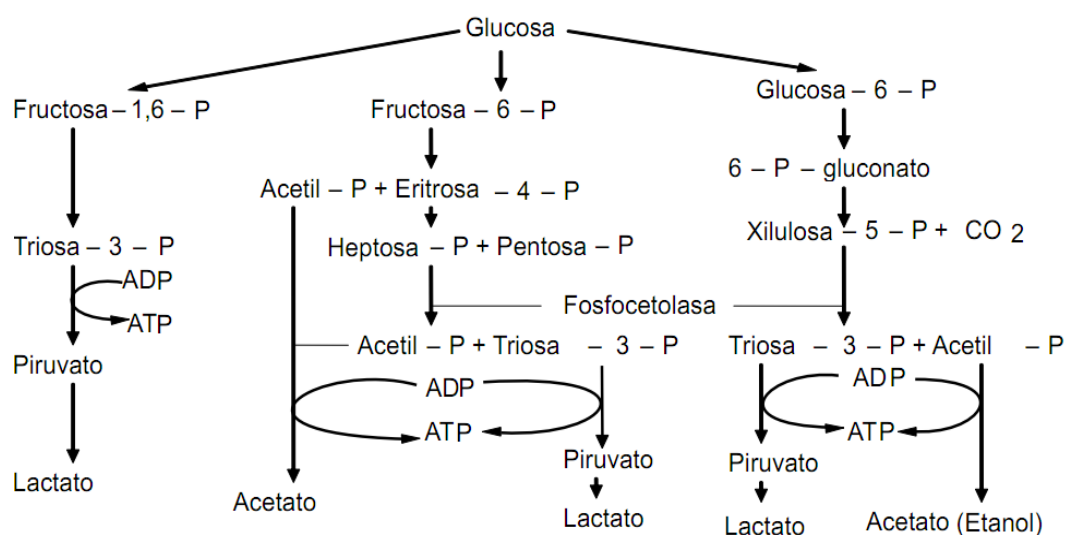


Figura 3. Vias metabólicas da fermentação de açúcar pelas bactérias lácticas (Kandler, 1983, citado por Estela *et al*, 2007)

Em poucos dias as bactérias lácticas são a maioria na massa de ensilado, no entanto, quando o ácido láctico formado é suficiente para fazer descer o pH até próximo de 4 a actividade microbiana é inibida e a silagem estabiliza permitindo a sua conservação, em condições anaeróbias, por prolongados períodos de tempo (Buxadé, 1995; McDonald *et al*, 1995).

Se a acidificação do meio não for suficientemente rápida ocorre o desenvolvimento de bactérias do género *Clostridium*. Os clostrídios encontram-se nas

culturas forrageiras sob a forma de esporos e só se multiplicam em condições anaeróbias estritas. Estes microrganismos podem dividir-se em dois grupos: clostrídios sacarolíticos e proteolíticos, consoante o substrato preferencial seja açúcar e ácido láctico ou proteína. As bactérias sacarolíticas como *Clostridium butyricum* fermentam o ácido láctico e os hidratos de carbono residuais, originando ácido butírico, com a consequente subida do pH. Os clostrídios proteolíticos (*Clostridium sporogenes*) catabolizam os aminoácidos, originando aminas, amoníaco e ácido cetónico. Os clostrídios são especialmente sensíveis à falta de água, necessitando de elevado teor de humidade para se multiplicar pelo que, em culturas com muita humidade, embora se consiga um pH adequado (≈ 4) pode não se conseguir impedir a sua actividade (Kaiser *et al*, 2003; McDonald *et al*, 1995).

Um outro grupo de microrganismos que pode ocorrer nas silagens é o dos fungos. Embora não contribuam para a conservação da silagem os fungos são responsáveis pelo apodrecimento durante as fases iniciais quando ainda existe oxigénio disponível, uma vez que permanecem metabolicamente activos nas zonas superficiais do ensilado. A maioria destes microrganismos requer oxigénio para crescer e se multiplicar contudo, algumas leveduras são anaeróbias, conseguindo sobreviver numa gama ampla de pH (3 - 8) e temperatura (0°C - 40°C). As leveduras mais frequentes nos ensilados incluem espécies de *Candida* spp., *Saccharomyces* spp. e *Torulopsis* spp. A multiplicação destes microrganismos deve ser evitada uma vez que muitos têm a capacidade de produzir micotoxinas que podem ser extremamente tóxicas para os animais. Entre as espécies mais prejudiciais associadas à deterioração dos ensilados podem destacar-se *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. (Kellems e Church, 2010; McDonald *et al*, 1995).

2.2.1.3. Perdas por efluentes

Durante o processo de ensilagem podem verificar-se elevadas perdas de nutrientes através dos efluentes. A maioria dos silos permite a saída de líquidos, arrastando nutrientes solúveis (açúcares, compostos azotados, minerais e ácidos). A quantidade de efluentes produzida é tanto maior quanto maior for o teor de humidade inicial da forragem, no entanto factores como o tipo de silo, o pré-tratamento e o (Buxadé, 1995; Kaiser *et al*, 2003).

O conhecimento intrínseco do processo permite optimizá-lo, minimizar as perdas associadas e melhorar a qualidade do produto final o que resulta em carne e leite em maior quantidade e de qualidade superior e, simultaneamente, reduz as perdas associadas.

A figura 4 esquematiza as proporções relativas das perdas em cada fase do processo de ensilagem.

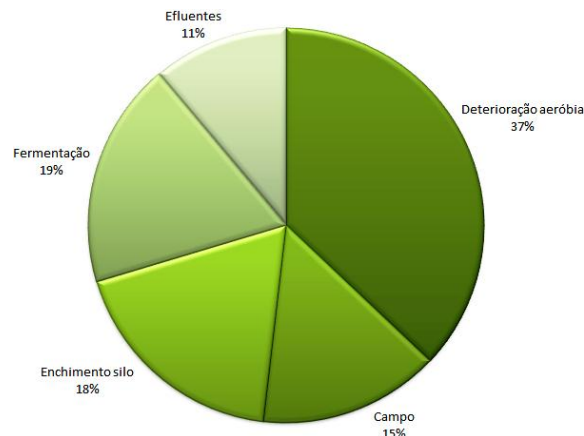


Figura 4. Distribuição relativa das perdas associadas ao processo de ensilagem. Adaptado de <http://www.dow.com/silage/tools/experts/improving.htm>. Consultado a 17 de Março de 2012

2.2.2. Aditivos

No processo de ensilagem são vulgarmente utilizados aditivos e conservantes que actuam quer como estimulantes da fermentação láctica (produtos ricos em açúcares, enzimas e/ou bactérias lácticas) quer como inibidores químicos da actividade microbiana (ácidos e formaldeído) (figura 5) (Kellems e Church, 2010).

A adição de conservantes supõe uma alternativa aos casos em que não se reúnam as condições óptimas para se obter um bom ensilado, sendo tanto mais úteis quanto menor for o teor em matéria seca e em hidratos de carbono solúveis da planta. Um conservante ideal além de potenciar a acidificação deve ser de fácil utilização e distribuição, ser de baixo custo, não ser tóxico nem permitir produção de substâncias indesejáveis (Buxadé, 1995).

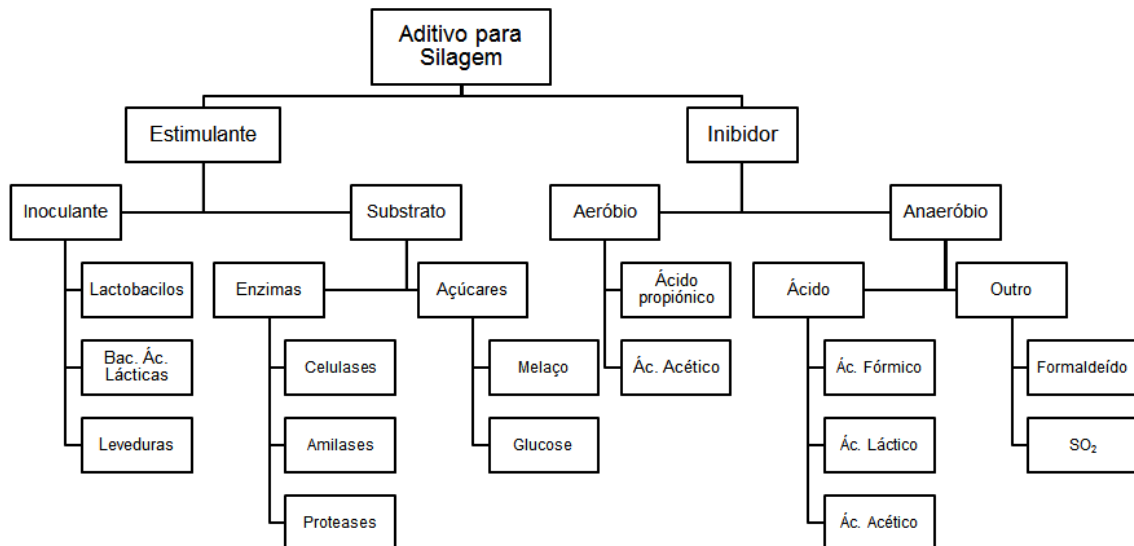


Figura 5. Aditivos mais comuns no processo de ensilagem. Adaptação do esquema disponível em: <http://forages.oregonstate.edu/nfgc/eo/onlineforagecurriculum/instructormaterials/available-topics/mechanicalharvest/silage>. Consultado a 25 de Fevereiro de 2012

2.2.2.1. Estimulantes

A flora microbiana láctica presente nas culturas na maioria dos casos não é suficiente para se obter a fermentação desejável pelo que se pode adicionar inóculos de culturas puras de bactérias lácticas liofilizadas de modo a estimular este tipo de fermentação. Além dos inóculos liofilizados pode também adicionar-se açúcares e enzimas. Os açúcares permitem uma maior actividade das bactérias lácticas, uma maior produção de ácido láctico e consequentemente uma mais rápida descida do pH do meio. As enzimas (celulases e hemicelulases) degradam a celulose e a hemicelulose, compostos das paredes celulares das plantas, libertando açúcares simples que ficam disponíveis para ser fermentados pelas bactérias lácticas (McDonald *et al*, 1995).

2.2.2.2. Inibidores

A rápida acidificação da forragem é uma forma de impedir fermentações indesejáveis que poderiam destabilizar o ensilado. A utilização de aditivos químicos (ácido clorídrico e sulfúrico) provoca uma rápida acidificação do meio, no entanto, esta metodologia é difícil de aplicar devido à dificuldade em manipular os ácidos e à possibilidade destes corroerem o plástico protector do silo. Actualmente o formaldeído

e a formalina têm vindo a substituir os ácidos inorgânicos (sulfúrico e clorídrico) principalmente por serem menos corrosivos (Buxadé, 1995; McDonald *et al*, 1995).

A formalina (solução aquosa com 40% de formaldeído) pode ser utilizada como aditivo devido ao seu poder acidificante e, simultaneamente pela capacidade que tem de se combinar com as proteínas da planta, protegendo-a da degradação ruminal e permitindo a sua absorção no intestino delgado.

O formaldeído é um composto comum, potencialmente cancerígeno, que, como outros produtos químicos pode libertar fumos tóxicos e causar irritações oculares, respiratórias e da pele. A ligação do formaldeído às proteínas ou aos aminoácidos livres torna as proteínas da forragem indisponíveis para a degradação proteolítica. Além da sua acção antimicrobiana, o formaldeído por estabelecer ligações com as proteínas da planta, protege-as durante o período de ensilagem e, mais tarde, no rúmen, o que permite aumentar o fornecimento de proteína ao animal. O formaldeído, quando adicionado ao ensilado, limita a extensão da fermentação microbiana o que reduz a produção de ácido láctico. Quando presente em elevadas concentrações, o formaldeído pode ligar-se forma irreversível às proteínas tornando-as indisponíveis para o animal (Buxadé, 1995; McDonald *et al*, 1995; Salawu *et al*, 1999; Wina e Abdurohman, 2005).

Os taninos aparecem como alternativas a estes compostos.

2.3. Taninos

Os taninos são um grupo de compostos secundários das plantas, conhecido e utilizado pelo Homem há muitos séculos. O termo tanino deriva da palavra francesa *tan* que significa casca de carvalho ou de outras árvores usadas no curtimento das peles. Estes compostos encontram-se amplamente distribuídos na natureza, especialmente em árvores, arbustos e culturas forrageiras e são, com frequência, associados ao paladar adstringente de algumas frutas. O teor de taninos nas plantas depende principalmente de factores ambientais e do estado de maturação da planta e é potenciado por temperaturas elevadas, *stress* hídrico, elevada intensidade luminosa e baixa fertilidade do solo. Segundo Iason *et al* (citado por Frutos *et al*, 2004), a variação sazonal (que está directamente relacionada com o estado fenológico) deve-se à diferente demanda de nutrientes: durante o crescimento, as plantas produzem elevadas quantidades de biomassa, restando poucos recursos para síntese de compostos fenólicos, no entanto, durante a floração, quando a taxa de crescimento é reduzida, o excesso de carbono pode ser disponibilizado para a síntese de taninos (Frazier *et al*, 2010; Frutos *et al*, 2004).

Os mecanismos evolutivos desenvolvidos pelas plantas envolvem estratégias de protecção contra a predação através da produção de metabolitos secundários que afectam a palatabilidade da planta, interferem no processo digestivo e/ou têm efeitos tóxicos directos nos animais. Os taninos são, devido às suas propriedades biológicas, metabolitos associados à defesa das plantas contra os predadores bem como à protecção contra certas doenças. Estes metabolitos ocorrem naturalmente nas plantas e, quando presentes em quantidades suficientes, podem diminuir disponibilidade de proteínas e sais minerais, limitando assim o seu valor nutritivo, podendo até ser tóxicos para os ruminantes (Chavan *et al*, 2001; Hervás *et al*, 2003; McSweeney *et al*, 2008; Osborne e McNeill, 2001).

Os taninos são compostos descritos como inibidores da digestão de proteína e de fibra em humanos e em animais não ruminantes, ligando-se, no tracto digestivo, às proteínas da dieta. Além dos efeitos anti nutricionais têm demonstrado inúmeras propriedades biológicas e farmacológicas com potencial interesse médico e veterinário, nomeadamente acção antimicrobiana, antiviral, anti-tumoral e antioxidante (Frazier *et al*, 2010; Lorenz, 2011).

2.3.1. Estrutura e propriedades

Os taninos são polifenóis hidrossolúveis, de elevado peso molecular (500 - 3000 g/mol) que, na natureza existem sob duas formas: condensados e hidrolisáveis (Schofield *et al*, 2001).

Os taninos hidrolisáveis, geralmente mais prejudiciais para os animais que os condensados, são polímeros de ácido gálico ligados através de uma ligação éster a um resíduo de açúcar, sendo a glucose e a xilose os açúcares mais comuns (figura 6). Como a sua designação indica são facilmente hidrolisáveis por via enzimática ou química (por acção de ácidos ou bases). Os ácidos fenólicos libertados são o ácido gálico ou o ácido elágico, daí se considerarem nos taninos hidrolisáveis duas subclasses: os taninos gálicos ou galotaninos e os taninos elágicos ou elagitaninos (Mueller-Harvey, 2001).

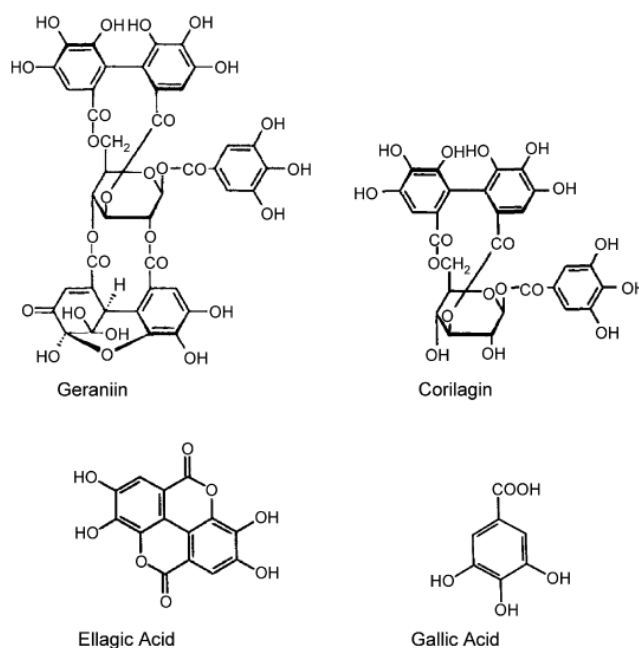


Figura 6. Estruturas químicas de taninos hidrolisáveis (adaptado de Markom *et al*, 2007)

Os taninos condensados ou proantocianidinas constituem o grupo de taninos mais comuns nas plantas; são armazenados nas células vegetais onde se podem encontrar “livres” ou ligados à proteína e/ou à fibra. São polímeros de unidades de flavano-3-ol ligados entre si por ligações carbono-carbono (C4-C8). Têm geralmente maior peso molecular que os taninos hidrolisáveis e os mais comuns são a catequina e epicatequina (figura 7) (Frutos *et al*, 2004; Muetzel e Becker, 2006; Osborne e McNeill, 2001; Sinclair *et al*, 2009).

Dada a elevada diversidade estrutural que os taninos podem apresentar, quimicamente não constituem um grupo homogêneo pois configuram estruturas bastante distintas que em comum têm o elevado peso molecular e a capacidade de formar complexos reversíveis e/ou irreversíveis com proteínas, polissacarídeos, alcalóides, ácidos nucleicos e minerais. Assim, as propriedades físicas e biológicas dos taninos variam muito entre espécies de plantas (Frutos *et al*, 2004).

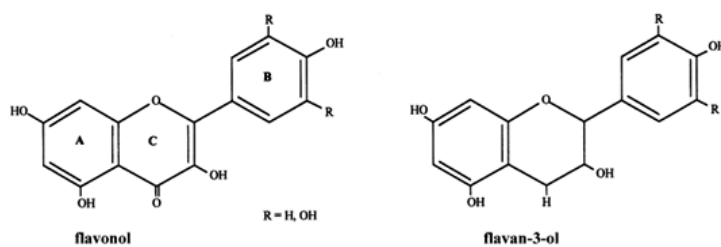


Figura 7. Estrutura química de flavonóides e de sub-unidades (flavano-3-ol) de taninos (adaptado de McSweeney *et al*, 2001)

A elevada afinidade dos taninos para as proteínas está relacionada com o elevado número de grupos fenólicos que fornecem inúmeros pontos de ligação aos grupos peptídicos das proteínas. De acordo com Wina e Abdurohman (2005), a quantidade de tanino necessária para formação de complexos depende do tipo de proteína e do tipo de tanino. Proteínas com estruturas mais abertas e flexíveis e com elevados teores em prolina têm maior afinidade para estes compostos.

Os taninos com grande número de grupos fenólicos podem formar fortes ligações de hidrogénio com as proteínas e com os hidratos de carbono. Apesar da estabilidade das ligações tanino-proteína depender do número de grupos fenólicos há um limite máximo a partir do qual as ligações se tornam mais débeis, uma vez que a molécula se torna demasiado extensa dificultando a aproximação ao local activo da proteína (Chavan *et al*, 2001; Wina e Abdurohman, 2005).

Segundo Frutos *et al* (2004), os complexos formados entre os taninos e as proteínas são, em geral, instáveis, devido às ligações químicas que se estabelecem, essencialmente pontes de hidrogénio e interações hidrofóbicas, que se quebram e reorganizam continuamente.

Muitos destes compostos são responsáveis por efeitos anti nutricionais ou mesmo tóxicos para os animais, no entanto, nem todos os compostos fenólicos são nutricionalmente preocupantes. Desta forma, não é possível estabelecer uma relação linear entre o teor de taninos na dieta e a qualidade nutricional da planta (Aganga e

Adogla-Bessa, 1999; Chavan *et al*, 2001; Frutos *et al*, 2004; Wina e Abdurohman,2005).

2.3.2. Taninos na alimentação de ruminantes

Os taninos formam complexos com as proteínas e com outros nutrientes e estabelecem interações com as enzimas digestivas do animal, inibindo a sua actividade (figura 8) (Krueger *et al*, 2010).

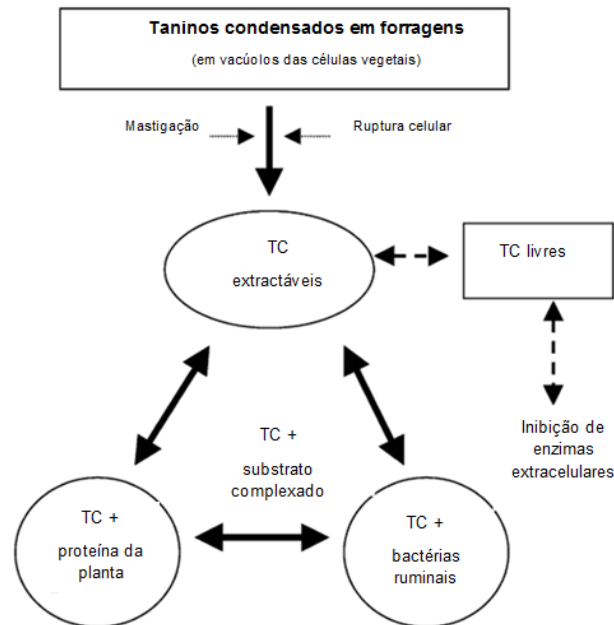


Figura 8. Ligações tanino-proteína que se estabelecem ao longo do sistema digestivo dos ruminantes (adaptado de Min *et al*, 2003)

Quando ingeridos pelos animais os taninos podem ter efeitos nefastos e benéficos, dependendo da sua quantidade e natureza, da espécie animal, do estado fisiológico e da composição da dieta (Sinclair *et al*, 2009).

Na cavidade oral os taninos ligam-se às proteínas da saliva diminuindo o seu poder lubrificante, resultando um sabor adstringente, o que torna as plantas menos apetecíveis pelos animais e, conseqüentemente, diminuído a sua ingestão (Ammara *et al*, 2011; Nguyen, *et al*, 2005).

No rúmen, os taninos têm a capacidade de diminuir a velocidade de degradação da matéria seca, limitando também a ingestão do alimento. As interações que se estabelecem com as moléculas proteicas da membrana do intestino diminuem a permeabilidade da parede intestinal, podendo perturbar a absorção dos alimentos.

Teores elevados de taninos podem provocar descamações do tubo digestivo que evoluem para úlceras ou irritações da mucosa e que alteram a absorção dos alimentos (Huang *et al*, 2011; Lorenz, 2011; Muetzel e Becker, 2006).

Segundo Wina e Abdurohman (2005) o maior benefício da presença de taninos na dieta de ruminantes está relacionado com a protecção que estes exercem sob a proteína da dieta, a nível ruminal, impedido a sua degradação microbiana excessiva, aumentando assim o fluxo de azoto proteico e de aminoácidos essenciais do rúmen para os compartimentos pós ruminais, onde são absorvidos e utilizados directamente pelo animal. Barry *et al* (1986) verificou que a pH ruminal entre 5,5 e 7 os taninos se ligam às proteínas da dieta. Estes complexos tanino-proteína não são degradados e passam ao abomaso e ao intestino delgado onde, devido ao pH ácido do abomaso (pH entre 2,5 e 3,5) e a pH alcalino do intestino delgado (pH \approx 7.5) são dissociados, libertando a proteína que é então digerida, absorvida e utilizada pelo animal.

Outra das vantagens referidas por vários autores relativamente à ingestão de pequenas quantidades de taninos é a sua acção anti-parasitária. Os parasitas gastrointestinais são uma das principais causas das perdas de produção no sector pecuário pois diminuem o crescimento dos animais, as suas capacidades reprodutivas e a produção de leite e lã. O controlo dos parasitas gastrointestinais em ruminantes é, normalmente, feito recorrendo ao uso de medicamentos, contudo, após algum tempo de utilização a eficiência destes medicamentos diminui devido à resistência desenvolvida pelos parasitas. Além disso, a opinião pública tem estimulado esforços no sentido de encontrar compostos anti-helmínticos naturais, que possam substituir os medicamentos, no sentido de minimizar os possíveis resíduos de medicamentos que ficam no produto animal. A utilização de taninos como anti-helmíntico tem sido estudada como alternativa aos medicamentos pois têm demonstrado efeitos directos e indirectos sobre os parasitas (Iqbal *et al*, 2002).

Como efeitos directos os taninos reduzem a viabilidade dos nematodes, a taxa de desenvolvimento das larvas e o número ovos viáveis. Indirectamente aumentam a resistência dos animais aos parasitas pois disponibilizam proteína de alto valor biológico para o animal, compensando as perdas de proteína causadas pelos parasitas estimulando ao mesmo tempo o sistema imunitário (Min e Hart,2003).

Estudos realizados por Niezen *et al* (2002) mostraram que carneiros parasitados a pastorear alimentos ricos em taninos (sula) têm maiores ganhos de peso vivo e menor excreção fecal de ovos que animais nas mesmas condições pastoreando alimentos com baixos teores em taninos (luzerna).

Segundo Makkar (2003), na presença de taninos a síntese de proteína microbiana pode aumentar porque, embora os taninos diminuam a disponibilidade de nutrientes, eles promovem alteração na forma de utilização de nutrientes sendo a energia canalizada para a síntese de massa microbiana e não para a formação de ácidos gordos de cadeia curta. A diminuição na taxa de digestão dos alimentos por taninos também pode ajudar a sincronizar a liberação de vários nutrientes que podem ser responsáveis pelo aumento da eficiência microbiana.

Os taninos têm também a vantagem minimizar o efeito anti-espumante no rúmen. Em dietas ricas em proteínas solúveis, a sua rápida degradação ruminal dá origem a uma elevada produção de gases que o animal não consegue eliminar e que se acumulam no rúmen provocando a sua distensão. A pressão dos gases faz-se sentir em todas as direcções, o animal pára a ingestão, o diafragma comprime não permitindo o alargamento do tórax, inibindo as funções cardíacas e pulmonares o que pode conduzir rapidamente à morte. A ligação do tanino à proteína impede a sua rápida degradação ruminal (acção anti-espumante), minimizando a produção excessiva de gases no rúmen (Frandsen, *et al*, 2011; Reece, 2009; Rochfort *et al*, 2008).

A nível ambiental a presença de taninos na dieta animal tem-se mostrado benéfica pois origina uma troca na forma de excreção do azoto, reduzindo os teores de azoto na urina (azoto que se volatiliza facilmente para a atmosfera) e aumentando o azoto nas fezes (azoto orgânico que irá beneficiar o teor de matéria orgânica do solo).

A formação de metano ruminal além de representar uma perda substancial de energia para o ruminante é um gás com impacto significativo em emissões com efeito de estufa sendo cerca de 20 vezes mais potente que o CO₂. A presença de taninos nas dietas está associada à redução de emissão de metano, resultando assim, em significativos benefícios ambientais e económicos (Deaville *et al*, 2010; Oliveira *et al*, 2007; Rochfort *et al*, 2008).

2.3.3. Taninos em silagens

A capacidade que os taninos têm para se ligar às proteínas sugerem a sua utilização como aditivos nas silagens, com o objectivo de reduzir a extensa proteólise que normalmente ocorre durante o armazenamento no silo e que transforma o azoto proteico em azoto não proteico (péptidos, aminoácidos, aminas, amidas e amónia).

Este processo de proteólise ocorre pela acção combinada das enzimas da planta e microbianas, as quais podem reduzir até cerca e 80% o teor da proteína verdadeira da planta. Como consequência deste processo o N da silagem é ineficientemente utilizado pelo animal (Broderick, 1995).

O tratamento de silagens com compostos químicos como o formaldeído tem sido utilizado com o objectivo de reduzir a degradabilidade da proteína no silo, sendo aditivos comuns nas silagens. Os taninos, tal como o formaldeído, têm a capacidade de formar ligações com as proteínas.

Vários estudos têm sido realizados com o objectivo de avaliar o seu potencial como aditivos das silagens, com o objectivo de reduzir a proteólise.

Salawu *et al* (1999) estudou o efeito da adição de extractos de taninos de mimosa e de quebracho, em dois níveis diferentes (5 e 50g/kg MS), numa silagem de azevém perene. Após ensilagem, verificou que o teor de azoto solúvel e de azoto amoniacal nas silagens com taninos era inferior ao encontrado nas silagens sem taninos.

Tabacco *et al* (2006) testou o efeito da inclusão de taninos nos parâmetros fermentativos da silagem e verificou que resultou em perdas de MS e em diminuição dos teores de amónia e de azoto não proteico, no entanto, não observou alterações no perfil de ácidos de fermentação. Além disso, a adição de taninos mostrou-se eficaz a reduzir a digestibilidade da matéria orgânica

Parte III

Material e Métodos

3.1. Preparação da amostra

O azevém (*Lolium multiflorum*) foi semeado no início de Outubro de 2010, na zona do Vale de Santarém. A cultura não recebeu qualquer adubação de cobertura, no entanto o terreno foi preparado previamente usando estrume de cavalo.

O corte do azevém, em início do espigamento, foi feito pela manhã, nos dias 4 e 9 de Maio de 2011, a cerca de 5 cm do solo, com uma tesoura, e trazido para o laboratório

Com o objectivo de avaliar o efeito de diferentes níveis de inclusão de compostos como conservantes de silagem foram preparados duas experiências paralelas. Na experiência 1, utilizou-se como aditivo o extracto de compostos fenólicos obtido da casca de pinheiro e na experiência 2 o aditivo utilizado foi o extracto fenólico da esteva. A preparação e quantificação dos referidos extractos foi feita tal como descrito em 3.2. e 3.3.

Após um período de pré-secagem de 24 horas, à temperatura ambiente e, antes de ensilar, a erva foi cortada manualmente, em troços de 2 cm. Utilizaram-se silos experimentais de PVC (cloreto de polivinilo), com 3,5 L de capacidade, opacos e equipados com uma pequena torneira para permitir escoamento de eventuais efluentes. Em cada um dos silos experimentais, utilizaram-se 1,5 kg de azevém, compactado manualmente, tendo sido estudados quatro níveis de tratamento: 0% (sem aditivos), 3%, 6% e 9% de fenólicos totais (FT). Na experiência 1, o extracto da casca de pinheiro foi diluído com 100 mL de água destilada e na experiência 2 utilizou-se 150 ml de água destilada para diluição do extracto de esteva. O controlo (0%) foi preparado com a quantidade de água destilada usada na diluição do extracto correspondente. Estes extractos foram adicionados ao azevém, por camadas, ao longo do processo de compactação. Todos os níveis de tratamento foram testados em duplicado.

Após enchimento os silos foram fechados com uma tampa do mesmo material e selados com parafina líquida para permitir a sua hermeticidade e consequente criação de condições anaeróbias necessárias para o êxito do processo de ensilagem. Por último colocou-se, sob cada tampa de PVC pesos de cimento, com cerca de 2 kg, para assegurar compactação. Os silos foram guardados no laboratório, num local abrigado e protegido do calor, a uma temperatura entre 20 a 23°C, durante aproximadamente 9 semanas. Semanalmente, as torneiras foram abertas para escoamento de eventuais efluentes (embora estes não tenham sido observados em quaisquer dos silos ao longo de todo o processo) e as tampas calcadas para manter compactação.

3.2. Extração compostos fenólicos

A casca de pinheiro utilizada foi obtida comercialmente, num distribuidor de produtos para jardinagem. No laboratório a amostra foi moída através de um crivo de 5 mm, seca em estufa a 65°C e novamente moída em crivo de 1 mm. A extração dos compostos de interesse foi feita juntando 100 g da moenda com 1L de álcool etílico 15% (Merck), homogeneizou-se manualmente a solução e autoclavou-se ($P = 0 \text{ atm}$, $T = 95^\circ\text{C}$, $t = 2\text{h}$). Filtrou-se grosseiramente com uma gaze e centrifugou-se durante 15 min., a 1500 rpm; o sobrenadante foi filtrado, por filtração simples, com papel de filtro $\varnothing 125 \text{ mm}$ (Macherey-Nagel), tapado e congelado a -18°C . Após completa congelação, o filtrado foi liofilizado conforme descrito em Dentinho *et al* (2007).

Os compostos fenólicos presentes na amostra foram extraídos de acordo com o método adaptado de Julkunen-Tiitto (1985). Pesou-se analiticamente 200 mg (Sartorius, $\pm 0,0001\text{g}$) da amostra liofilizada e adicionou-se 10 mL de uma solução aquosa de acetona 70% (Pronalab). A extração foi induzida num aparelho de ultrasons (Modelo 200 TH/2I, VWR International), em banho de gelo, durante 10 min. De seguida centrifugou-se (IKA MS1 Minishaker) a 3800 rpm, durante 30 min., a 4°C e recolheu-se o sobrenadante que foi guardado refrigerado e protegido da luz. O sobrenadante foi utilizado como “extracto de trabalho” para quantificação de fenólicos totais e de taninos condensados.

O extracto de esteva utilizado encontrava-se já disponível no laboratório, e foi obtido seguindo a metodologia de extração acima indicada.

3.3. Determinação do teor em taninos

Para a determinação do teor de taninos nos extractos de pinheiro e esteva foram seguidas diferentes metodologias, as quais foram realizadas em duplicado.

3.3.1. Compostos fenólicos totais

Os fenólicos totais foram quantificados com o reagente de Folin-Ciocalteu's de acordo com o método de Julkunen-Tiitto (1985), sendo a concentração medida como equivalentes de ácido tânico, utilizando ácido tânico puro (Merck) como padrão.

Foram medidos 30 μL de extracto original para cada réplica, em duplicado, aos quais se adicionou água milipore até perfazer 1000 μL ; juntou-se 500 μL de reagente de Folin Ciocalteu (Merck, 1N); agitou-se em *vórtex* e adicionou-se 2,5 mL de solução aquosa de carbonato sódio (Na_2CO_3 , 20%, Merck). Após nova agitação as amostras

ficaram em repouso, durante 35 min., ao abrigo da luz. Simultaneamente preparou-se uma solução padrão de ácido tânico em água milipore (0,5 mg/mL), a partir da qual, por diluição, se obtiveram os padrões indicados no quadro 1, que foram utilizados para obtenção da curva de calibração.

Quadro 1. Padrões usados na obtenção da curva de calibração referente à determinação do teor em fenólicos totais

Toma de solução padrão (μL)	0	5	10	20	30	40
Concentração de ácido tânico (μg)	0	10	20	40	60	80

Os padrões e o ensaio em branco sofreram o mesmo processamento que a amostra. No ensaio em branco o volume da amostra foi substituído por igual volume de água milipore. Foi lida a absorvância no espectrofotómetro UV-Vis. (HITACHI U-2001), a 725 nm, com base na curva de calibração padrão e corrigida com o ensaio em branco.

3.3.2. Taninos condensados – ensaio vanilina

A determinação destes compostos baseou-se na adaptação do método de Brodhurst e Jones (1978). Utilizaram-se 100 μL de extracto original para cada réplica aos quais se adicionou acetona (70%, Pronalab), até perfazer 250 μL . Adicionou-se 1,5 ml de solução de vanilina (4 %, Pronalab) em acetona (70%) e 750 μL de ácido clorídrico concentrado (HCl, 37% p.a., Merck). Agitou-se a solução em *vórtex* e deixou-se, em repouso, à temperatura ambiente durante 10 minutos.

A par da preparação dos extractos, preparou-se uma solução padrão de catequina (5mg/mL) (Merck), em acetona 70%, a qual foi diluída para obter diferentes concentrações (50 μg , 100 μg , 200 μg , 300 μg , 400 μg e 500 μg), de forma a estabelecer a curva de calibração. Os padrões e o ensaio em branco sofreram o mesmo procedimento da amostra, sendo que, no ensaio em branco o volume da amostra foi substituído por igual volume de acetona 70%. A absorvância das amostras foi lida a 550 nm e corrigida com o ensaio em branco, após determinação da curva padrão.

3.4. Determinações analíticas

As amostras do azevém, imediatamente após o corte e antes de ensilar, bem como as obtidas nos diferentes silos experimentais foram caracterizadas quimicamente através de análises realizadas em duplicado e em amostras para laboratório representativas do material em estudo. As amostras foram colhidas e preparadas segundo a metodologia descrita nas normas portuguesas, NP 3256 (1988) e NP 915 (1999), respectivamente.

3.4.1. Humidade

O teor de humidade inicial do azevém foi determinado, por amostragem aleatória, antes da ensilagem, com o objectivo de avaliar a necessidade de pré-secagem. As amostras da matéria verde foram secas em estufa a 65°C (Memmert) durante 24h, até obtenção de peso constante.

Para a determinação da humidade nas amostras de azevém utilizou-se o procedimento descrito na NP 875 (1994). A humidade foi determinada por pesagem em estufa (Memmert), a 103-105°C, até obtenção de peso constante. O teor de humidade foi calculado através da expressão:

$$\left[\frac{m_2 - m_3 \times m_1}{m_2} + m - m_1 \right] \times \frac{100}{m} = 100 \left(1 - \frac{m_1 - m_3}{m - m_2} \right)$$

m – massa (g) da toma

m₁ – massa (g) da toma após pré-secagem

m₂ – massa (g) da toma triturada ou moída, após pré-secagem

m₃ – massa (g) da toma, após secagem

Nas amostras de silagem, por conterem compostos voláteis que se perderiam facilmente na secagem em estufa, utilizou-se o método de Bidwell-Sterling (1925), um método azeotópico, no qual a água de hidratação é arrastada pelo vapor de um solvente puro (Tolueno, Riedel-de Hæn), com o qual, em fase gasosa, forma um azeotropo. Após condensação, e em estado líquido, a água separa-se do solvente que a arrastou podendo, desta forma quantificar-se o volume de água extraído da amostra em análise.

3.4.2. Cinza

A determinação do teor de cinza teve como base a carbonização e incineração das amostras a 550°C, tal como descrito na NP 872 (1983), sendo o respectivo teor dado pela expressão:

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{\text{massa da toma após incineração (g)}}{\text{massa da toma para análise (g)}} \times 100$$

3.4.3. Proteína bruta

A proteína bruta da amostra foi quantificada de acordo com a NP 2030 (1996), metodologia que se baseia na mineralização da matéria orgânica pelo ácido sulfúrico (1,84M, Merck), na presença de um catalisador (sulfato de cobre (II) penta hidratado (CuSO₄.5H₂O), com transformação do azoto combinado em sal de amónio; libertação de amoníaco em meio alcalino; destilação, recolha em meio ácido e titulação com solução de hidróxido de sódio (NaOH, Panreac). A quantidade de proteína bruta é dada pela expressão:

$$wp = wn \times fk$$

wp – teor de proteína bruta, expresso em percentagem de massa;

wn – teor de azoto total da amostra, expresso em percentagem de massa;

fk – factor de conversão do azoto de Kjeldahl em proteína. O factor *f* para limentos para animais e, assumindo que todas as proteínas contêm 16% de azoto, corresponde a 6,25.

3.4.4. Azoto total

O teor de azoto total foi determinado pelo método de Kjeldahl (ISO 5983-1, 2005) modificado. A metodologia utilizada tem como principio a mineralização da matéria orgânica pelo ácido sulfúrico (98% (m/m), Merck), na presença de um catalisador (pastilhas de catalisador Kjeldahl com 3,5g de sulfato de potássio e 0,4g de sulfato cobre (II), Kjeltabs Auto). É utilizado ácido sulfúrico concentrado para converter o azoto proteico em sulfato de amónio, a um ponto de ebulição elevado (420°C), pela adição de sulfato de potássio. Usou-se um catalisador de cobre para aumentar a velocidade da reacção e, de seguida, adicionou-se hidróxido de sódio em excesso (NaOH, 40% (m/m), Panreac), para libertar a amónia. A amónia livre é destilada e, posteriormente, titulada com uma solução de ácido clorídrico (0,1M, Merck). O teor de

azoto total (%) é determinado multiplicando o resultado por um factor convencional, tal como descrito na expressão:

$$N_{total} = \frac{1,4007 (V_1 - V_2) \times C}{m}$$

V_1 - volume, em ml, da solução de ácido clorídrico consumido na titulação da amostra;

V_2 - volume, em ml, da solução de ácido clorídrico consumido na titulação do ensaio em branco;

C - concentração, expressa em normalidade, da solução padrão de ácido clorídrico;

m - massa, em gramas, da toma de amostra para ensaio;

3.4.5. Azoto amoniacal

O azoto amoniacal (azoto básico volátil total) é extraído da amostra em meio aquoso e tem por base a NP 4038 (1990). Após purificação do extracto, por desproteínização, e filtração, procede-se à libertação do azoto volátil por acção de solução de carbonato de potássio (Merck). Efectua-se posteriormente a microdifusão e fixação do azoto volátil numa solução de ácido bórico (Panreac) e titulação por solução de ácido clorídrico (0,02N, Merck).

O teor de azoto amoniacal (ou azoto básico volátil total) da amostra, expresso em miligramas de amoníaco, na toma de amostra é dado por:

$$(V - V_1) \times 0,34$$

V - volume de ácido clorídrico (0,02N) (em mL) gasto na titulação da toma de amostra;

V_1 - volume (mL) da solução de ácido clorídrico (0,02N) gasto na titulação do ensaio em branco;

3.4.6. Azoto solúvel

A solubilidade da matéria azotada foi determinada com base na extracção de matérias azotadas solúveis da amostra com saliva sintética (composição em anexo) e respectiva separação por centrifugação (15 min., 2500-3000 rpm). O teor de azoto total é quantificado no sobrenadante, em paralelo com a determinação do azoto total da amostra e é calculado de acordo com a expressão:

$$\frac{N_s}{N_t} \times 100$$

N_s - o azoto solúvel da amostra (g/100g) de matéria seca;

N_t - azoto total da amostra (g/100g) de matéria seca;

3.4.7. Fibra bruta

A fibra bruta da amostra foi determinada com base na NP 2029 (1994), adaptada e tem como princípio o tratamento da amostra com uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄, 0,13M, Merck) em ebulição, separação do resíduo por filtração, lavagem e novo tratamento com uma solução de hidróxido de potássio (KOH, 0,32M, Panreac), em ebulição. A separação do resíduo depende de etapas sequenciais de filtração, lavagem, secagem e incineração e a perda de massa resultante das referidas etapas corresponde à massa de celulose bruta presente na amostra. Assim, o teor de fibra bruta, expresso em percentagem da amostra, é dado por:

$$[(m_1 - m_2) - m_3] \times \frac{100}{m}$$

m - massa da toma para análise (g);

m₁ - massa (g) do cadinho com o resíduo, antes da incineração;

m₂ - massa (g) do cadinho com o resíduo, após incineração;

m₃ - massa (g) do resíduo de ensaio em branco, depois de incineração

A determinação da Fibra Bruta embora tendo como base o princípio referido, foi efectuada com recurso a equipamento “Fibertec”, Tecator®.

3.4.8. Gordura bruta

A determinação da gordura bruta fez-se de acordo com o procedimento descrito na NP 876 (2001). A matéria gorda foi extraída da amostra com éter de petróleo (40-60°C, Scharlau) e separada por destilação. O teor de matéria gorda, expresso em percentagem da amostra, é calculado de acordo com a fórmula:

$$\frac{\text{massa (g) da toma para análise}}{\text{massa (g) do resíduo seco extraído}} \times 100$$

3.4.9. Constituintes parietais: ADF, NDF e ADL

Com vista à determinação do resíduo de detergente neutro (NDF) a amostra é hidrolisada a quente com uma solução de detergente neutro para extracção dos constituintes solúveis (proteínas, lípidos, açúcares, amidos e pectinas de fácil digestão que se encontram nos alimentos para animais). Estes componentes, nutritivamente disponíveis, são assim separados dos não disponíveis e dos dependentes da fermentação microbiana. O resíduo fibroso insolúvel é proveniente, essencialmente,

dos compostos da parede celular de plantas (celulose, hemicelulose e lenhina) e da matéria azotada não digestível em produtos animais

A hidrólise da amostra com detergente ácido permite extrair desta os constituintes solúveis. A matéria insolúvel constitui o resíduo de detergente ácido (ADF) que contem principalmente celulose e lenhina.

O cálculo do resíduo de detergente ácido e neutro é semelhante e é dado pela expressão:

$$NDF \text{ (ou ADF) (\%)} = \frac{\text{massa do resíduo após secagem (em gramas)}}{\text{massa da toma para o ensaio (gramas)}} \times 100$$

Na determinação da lenhina (ADL) utiliza-se o resíduo da determinação do ADF, removendo deste as substâncias interferentes. A fracção insolúvel foi tratada com ácido sulfúrico (72% (m/m), Merck) durante 3h e seco o resíduo que, após extraídas as cinzas, constitui a lenhina bruta (ADL) (apresenta também vestígios de cutina e complexos tanino-proteína).

A análise do fraccionamento dos constituintes parietais (NDF, ADF, ADL) realizou-se em “Fibertec”, Tecator® automático, utilizando o método das soluções detergentes de Van Soest *et al* (1991).

3.4.10. Açúcares e amido

A determinação do teor de açúcares totais e amido foi feita segundo adaptação do método de Clegg (1956) e tem por base a extracção dos açúcares presentes nas amostras com uma solução de etanol absoluto (80% (v/v), Panreac) e hidrólise do resíduo com ácido perclórico (60%, Scharlau) para extracção do amido. A quantificação de glúcidos na amostra depende da reacção destes com a antrona (0,1% (m/v), Carlo Erba) sendo o resultado obtido, após leitura espectrofotométrica ($\lambda=625\text{nm}$) do composto formado.

3.4.11. Cálcio

O teor de cálcio das amostras foi feito tendo por base a ISO 6869 (2000), modificada. A amostra foi calcinada por combustão seca, as cinzas são solubilizadas

em ácido clorídrico (1:3, Merck) e o resíduo insolúvel filtrado (filtro whatman, nº 540). O filtrado obtido constituiu a fracção solúvel de HCl na qual se dosearam os minerais, após estabelecimento da curva de calibração e obtenção da respectiva regressão linear.

$$y = a + bx$$

y – altura dos picos obtidos graficamente (mm);

a – ordenada na origem;

b – declive da recta;

x – concentração (ppm);

O valor de concentração (ppm) é determinado a partir das alturas (mm) das colunas obtidas graficamente, para cada uma das amostras.

3.4.12. Fosforo total

O teor de fósforo total da amostra foi determinado com base na NP 874 (2000) que se baseia na incineração da amostra (550°C) até obtenção de cinza branca ou cinzenta e solubilização por ácido clorídrico (6M, Merck). A reacção da solução da amostra com o reagente vanadomobíbdico (composição em anexo) origina uma coloração amarela, cuja absorvência é determinada espectrofotometricamente ($\lambda = 430$ nm).

3.4.13. Energia bruta

A energia bruta de uma amostra corresponde à quantidade de calor libertada quando a unidade de massa da amostra é queimada em atmosfera de oxigénio ($P=23\text{atm}$) numa bomba calorimétrica (Parr 1108), nas condições padrão. Após a combustão, os componentes da amostra transformam-se em oxigénio, dióxido de carbono, dióxido de enxofre e azoto no estado gasoso, água líquida em equilíbrio com o seu vapor e saturada com dióxido de carbono e cinza sólida. A determinação da energia bruta nas amostras foi feita por combustão das mesmas, em atmosfera de oxigénio, num calorímetro adiabático (Parr 1261), em condições padronizadas, segundo a metodologia descrita pela ISO 9831 (1998). A variação da temperatura permite calcular, com base na expressão abaixo, o valor da energia bruta das amostras em análise, expresso em quilojoules por 100 gramas de amostra (kJ/100g).

$$E.B. = \frac{C \times \Delta T - e1 - e2}{10m}$$

m - a massa da toma para ensaio (g);

C – a capacidade calórica efectiva do calorímetro (J/°C);

ΔT - a variação de temperatura (°C), calculada pela diferença entre a temperatura final observada (t_n) e a temperatura inicial do ensaio (t_0);

e₁ - o factor de correcção (J) para a combustão do fio de fusível (cm de fio de fusível consumidos no ensaio x 2,3 cal/cm x 4,185 J/cal);

e₂ - o factor de correcção (J) para a formação de ácido nítrico (ml de solução de carbonato de sódio consumidos na titulação x 1 cal/ml x 4,185 J/cal).

3.4.14. Digestibilidade

A digestibilidade dos alimentos é um processo afectado por factores intrínsecos, como espécie em causa e o tipo de nutrição, mas também por factores extrínsecos ao próprio animal, como sejam o tipo de alimento, a sua composição, o tipo de tratamento que a que a dieta é sujeita assim como a possível inclusão de enzimas exógenas. A digestibilidade das amostras em estudo determinou-se segundo o método em duas fases de Tilley e Terry, (1963) modificado. As amostras foram, em primeiro lugar, incubadas em condições de temperatura controlada e de anaerobiose (39°C, com injeção contínua de CO₂ no frasco), numa mistura de licor ruminal e de saliva artificial (quadros 5 e 6, em anexo), durante 48h, para simulação da digestão microbiana que ocorre a nível do retículo rúmen.

Numa segunda fase, após acidificação do meio (2 mL de HCl (5N), Merck) para paragem da digestão microbiana (pH 1,2 – 1,3), em condições de temperatura controlada (40°C), as amostras foram sujeitas à acção da pepsina ácida (1:10.000, Panreac), durante 48 horas, para simulação da digestão que ocorre a nível do abomaso. O resíduo é depois filtrado (porosidade G2), lavado e seco em estufa a 103°C até atingir peso constante e posteriormente incinerado (550°C, durante 2h) a fim de se determinarem as quantidades de matéria seca e de matéria orgânica.

A diferença entre a matéria seca e/ou matéria orgânica incubada e a recuperada após incubação e lavagem revelam a quantidade que foi digerida, tal como descrito nas expressões:

$$DMS(\%) = \frac{MS \text{ corrigida} - MS \text{ resíduo}}{MS \text{ incubada}} \times 100 \quad \text{e/ou} \quad DMO(\%) = \frac{MO \text{ corrigida} - MO \text{ resíduo}}{MO \text{ incubada}} \times 100$$

MS corrigida = MS incubada inicialmente + MS corrigida no ensaio em branco;

MO corrigida = MO incubada inicialmente + MO corrigida no ensaio em branco

3.4.15. Ácidos gordos

Para quantificação dos ácidos gordos voláteis presentes na amostra foi preparado um extracto com água desionizada (50mL) e silagem (10g). Adicionou-se 1mL de ácido fosfórico (H_3PO_4 , 25% (v/v), Merck), homogeneizou-se a solução em *vórtex* e centrifugou-se. O extracto líquido foi analisado por CGL com um HP6890 Agilent (Agilent Technologies) equipado com um detector de ionização de chama e uma coluna FFAP Permapond-semi-capilar (50 m, 0,25 mm ID, espessura de filme 0,25 μ m, Macherey-Nagel). As condições cromatográficas foram as seguintes: temperatura do injector, 230 ° C, temperatura do detector, 220 ° C; foi utilizado hélio a um caudal constante de 1,0 mL/min e a razão de separação foi de 1:50. O programa de temperatura do forno foi de 45 ° C (mantido durante 2 min), seguido de uma rampa de 10 °C/min até 220 °C (mantida durante 20 min). Os ácidos gordos voláteis e o ácido láctico foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos padrões conhecidos e quantificados por calibração externa.

3.5. Análise estatística

O efeito dos aditivos nos parâmetros químicos e fermentativos das silagens em estudo foi avaliado através de análise de variâncias, com recurso a um modelo linear simples do programa de análise *Statistical analysis systems* (SAS, 1989). Consideraram-se 9 tratamentos: planta verde, 4 tratamentos da silagem com extracto de esteva (0, 3, 6 e 9% de fenólicos totais do extracto de esteva), 4 tratamentos da silagem com estrato de casca de pinheiro (0, 3, 6 e 9% de fenólicos totais do extracto de casca de pinheiro). O modelo utilizado foi o seguinte:

$$Y_i = \mu + \alpha_i + \varepsilon_i,$$

em que:

Y_i = variável em estudo;

μ = Média geral;

α_i = efeito do tratamento ($i = 1, \dots, 9$);

ε_i = erro residual.

Sempre que os testes revelaram significância ($p < 0,05$) entre tratamentos, as médias individuais foram comparadas pelo método das médias dos mínimos quadrados (LSM). Como variáveis dependentes consideraram-se os diferentes constituintes químicos (MS, MO, N total, fracções NDF, ADF e ADL, e teor de fenólicos

totais), a digestibilidade *in vitro* da matéria seca e da matéria orgânica, a composição mineral (Ca, P) e os parâmetros fermentativos das silagens (pH, azoto solúvel, azoto amoniacal e ácidos gordos voláteis) da planta verde, na altura do corte, e após ensilada para os diferentes tratamentos. Como variáveis independentes consideraram-se os diferentes tratamentos acima referidos.

Parte IV

Resultados e Discussão

4. 1 Resultados

No quadro 2 são apresentados os resultados obtidos para a quantificação de compostos fenólicos totais e taninos condensados no extracto de casca de pinheiro e no extracto de esteva.

Quadro 2. Teor de compostos fenólicos totais (FT) e de taninos condensados (TC) dos extractos de casca de pinheiro e de esteva

	FT ⁽¹⁾ (g/100gMS)	TC ⁽²⁾ (g/100gMS)
Extracto casca pinheiro	73,74	58,62
Extracto esteva	44,32	39,68

Legenda:

⁽¹⁾ equivalentes de ácido tânico (%MS);

⁽²⁾ equivalentes de catequina (%MS)

Como não foram utilizados extractos purificados, para que as quantidade de FT no azevém fossem as pretendidas (3, 6 e 9% na MS), foi necessário adicionar, por 100g de MS de azevém, respectivamente, 4,1, 8,13, e 12,2 g de extracto fenólico de casca de pinheiro e 6,7, 13,4 e 19,4 g de extracto fenólico de esteva.

Os extractos foram adicionados no início do ensilamento.

Dos resultados obtidos verifica-se que o extracto de casca de pinheiro apresenta teores de FT e TC bastante superiores ao do extracto de esteva.

No quadro 3 é apresentada a composição química do azevém na altura do corte.

Quadro 3. Composição química e nutritiva do azevém

	Azevém
MS ⁽¹⁾	32,50
Cinzas ⁽²⁾	12,30 ^{bcd}
MO ⁽²⁾	87,70 ^{bcd}
PB ⁽²⁾	8,700
FB ⁽²⁾	30,20 ^b
GB ⁽²⁾	2,550 ^c
NDF ⁽²⁾	59,90
ADF ⁽²⁾	38,30 ^b
ADL ⁽²⁾	3,700
Açúcar ⁽²⁾	12,05 ^a
Fenólicos ⁽³⁾	1,065 [†]
Ca ⁽²⁾	0,745
P ⁽²⁾	0,305 ^{def}
N _{solúvel} ⁽⁴⁾	30,60
EB ⁽⁵⁾	18,02 ^d
DMS ⁽¹⁾	55,05
DMO ⁽¹⁾	55,05

Legenda:

- (1) %
- (2) %MS
- (3) equivalentes de ácido tânico (%)
- (4) % N total
- (5) MJ/kgMS

Na altura do corte, o azevém apresenta elevados teores de MS (32,5%), de açúcares totais (12,5% na MS), de FB (30,2% na MS) e de compostos parietais: NDF, ADF e ADL (respectivamente 59,9, 38,3 e 3,7% na MS) sendo o teor de hemicelulose (NDF-ADF) de 21,6% na MS e o teor de celulose (ADF-ADL) de 34,6% na MS. O teor de PB é de (8,7% na MS), valor normalmente encontrado no azevém no início do espigamento. Os teores de Ca e P são respectivamente 0,75 e 0,31% na MS e o teor de fenólicos totais do azevém é de 1,07% na MS.

No quadro 4 é apresentada a composição química das silagens tratadas com 0, 3, 6 e 9% de fenólicos totais de casca de pinheiro e de esteva.

Dos resultados obtidos podemos observar que os teores de FT recuperados nas silagens são bastante inferiores aqueles que foram adicionados ao azevém no início do ensilamento.

Entre silagens não se observaram diferenças significativas nos teores de MS, PB, Ca e DMO ($p > 0,05$), sendo os valores obtidos muito semelhantes aos do azevém na altura do corte.

As diferenças entre os teores de MS observadas entre os dois tratamentos controlo (P0 e E0) podem ser devidas à diferença na preparação uma vez que um dos controlos (P0) foi diluído em 100mL de água destilada e o outro (E0) em 150 mL do mesmo solvente.

A adição dos extractos teve um efeito significativo sobre o teor de cinzas das silagens que decresceu significativamente ($p = 0,0036$) com o teor de extractos adicionados, obtendo-se os menores valores nas silagens tratadas com os níveis de inclusão mais elevados. Como consequência, uma vez que a MO é determinada por diferença entre a MS e a cinza, os teores de MO aumentaram também, com a inclusão de extractos nas silagens (6 e 9% de FT).

Relativamente aos compostos parietais, verificamos que apesar de não se observarem diferenças significativas entre os teores de NDF e ADL ($p > 0,05$), o teor de FB decresceu com a inclusão de ambos os extractos na silagem, o ADF, por sua vez, apenas decresceu nas silagens tratadas com 6 e 9% de FT de esteva.

Quadro 4. Composição química da silagem de azevém com diferentes níveis de tratamento

	Extracto de casca de pinheiro				Extracto de esteva				DPR	p
	P0	P3	P6	P9	E0	E3	E6	E9		
MS (%)	28,50	29,40	28,90	32,15	27,40	30,00	30,25	30,15	2,200	0,7906
Cinzas (% MS)	13,55 ^a	12,95 ^{ab}	12,55 ^{bcd}	12,25 ^{cde}	12,80 ^{bc}	12,40 ^{bcd}	11,90 ^{de}	11,60 ^e	0,213	0,0036
MO (% MS)	86,45 ^e	87,05 ^{de}	87,45 ^{bcd}	87,75 ^{abc}	87,20 ^{cd}	87,60 ^{bcd}	88,10 ^{ab}	88,40 ^a	0,213	0,0036
PB (% MS)	11,70	9,600	11,00	9,650	9,750	9,050	8,050	8,300	0,823	0,1398
FB (% MS)	33,80 ^a	31,20 ^b	30,55 ^b	31,75 ^{ab}	30,20 ^b	31,55 ^{ab}	30,40 ^b	27,05 ^c	0,736	0,0077
GB (% MS)	4,150 ^a	3,950 ^{ab}	3,850 ^{ab}	3,450 ^{ab}	4,000 ^{ab}	3,300 ^{bc}	3,800 ^{ab}	3,600 ^{ab}	0,239	0,0239
NDF (% MS)	58,90	60,95	61,20	59,20	58,20	60,80	59,30	57,85	0,799	0,1199
ADF (% MS)	41,55 ^a	41,65 ^a	40,30 ^{ab}	40,85 ^{ab}	40,20 ^a	40,30 ^{ab}	38,80 ^b	35,60 ^c	0,835	0,0117
ADL (% MS)	4,000	4,700	4,300	4,850	4,150	4,550	4,800	3,950	0,231	0,0518
Açúcar (% MS)	1,085 ^c	1,235 ^c	1,360 ^c	1,81 ^c	2,970 ^{bc}	1,490 ^c	2,200 ^{bc}	3,745 ^b	0,526	<0,0001
Fenólicos (% MS)	2,035 ^d	2,495 ^c	2,975 ^a	2,865 ^{ab}	1,610 ^e	1,920 ^d	2,350 ^c	2,765 ^b	0,060	<0,0001
Ca (% MS)	0,710	0,715	0,755	0,630	0,675	0,710	0,880	0,525	0,096	0,4932
P (% MS)	0,330 ^{ab}	0,325 ^{abc}	0,310 ^{cde}	0,300 ^{ef}	0,340 ^a	0,320 ^{bcd}	0,320 ^{bcd}	0,290 ^f	0,005	0,0018
EB (MJ/kg MS)	18,24 ^{cd}	18,47 ^{bc}	18,73 ^{ab}	18,97 ^a	18,02 ^d	18,72 ^{ab}	18,67 ^{ab}	18,80 ^a	0,103	0,0007
DMS (%)	55,75	60,90	60,60	57,10	58,15	53,10	56,55	52,25	3,472	0,6584
DMO (%)	54,70	60,05	59,60	55,35	57,45	51,35	55,55	50,75	3,811	0,6834

Legenda:

P0. Silagem de azevém com 0% de fenólicos totais extraídos da casca de pinheiro; **P3.** Silagem de azevém com 3% de fenólicos totais extraídos da casca de pinheiro; **P6.** Silagem de azevém com 6% de fenólicos totais extraídos da casca de pinheiro; **P9.** Silagem de azevém com 9% de fenólicos totais extraídos da casca de pinheiro; **E0.** Silagem de azevém com 0% de fenólicos totais extraídos da esteva; **E3.** Silagem de azevém com 3% de fenólicos totais extraídos da esteva; **E6.** Silagem de azevém com 6% de fenólicos totais extraídos da esteva; **E9.** Silagem de azevém com 9% de fenólicos totais extraídos da esteva; **a, b, c, d, e, f.** índices que, quando diferentes, indicam médias significativamente diferentes ($p < 0,05$)

No quadro 5 encontram-se apresentados os resultados relativos aos parâmetros fermentativos da silagem. Podemos verificar que a silagem controlo P0 tem características fermentativas diferentes das restantes silagens obtidas. A formação de ácido láctico nesta silagem foi reduzida e, os teores de ácido acético e butírico encontrados, apesar das diferenças entre tratamentos não serem significativas, são um pouco superiores aos encontrados nos restantes tratamentos.

Quadro 5. Parâmetros fermentativos das silagens de azevém com quatro níveis de fenólicos totais extraídos da casca do pinheiro e da esteva (0, 3, 6 e 9% na MS)

		pH	N _{solúvel} (% MS)	NH ₃ (% N _{total})	Acético	Propiónico	Butírico	Láctico
Casca pinheiro	P0	5,330 ^{ab}	37,20	9,839	7,315 ^a	1,555	16,46	5,640 ^c
	P3	5,445 ^{ab}	39,95	13,304	6,225 ^{ab}	0,820	12,00	33,07 ^b
	P6	5,465 ^a	40,85	9,270	6,735 ^a	0,765	6,365	33,31 ^b
	P9	5,320 ^{ab}	47,95	10,164	5,665 ^{abc}	0,775	5,375	34,31 ^{ab}
Esteva	E0	4,405 ^d	43,70	7,594	7,095 ^a	0,620	3,345	45,59 ^a
	E3	5,210 ^{abc}	40,55	9,816	4,110 ^{bc}	1,160	10,93	32,49 ^b
	E6	4,900 ^c	40,55	7,048	4,090 ^c	0,565	2,050	32,97 ^b
	E9	5,050 ^{bc}	35,15	6,780	4,030 ^c	0,515	1,390	30,02 ^b
DPR		0,126	3,378	1,319	0,652	0,352	5,099	3,613
p		0,0047	0,1371	0,1025	0,0235	0,5020	0,4391	0,0024

Legenda:

P0. Silagem de azevém com 0% de fenólicos totais extraídos da casca de pinheiro; **P3.** Silagem de azevém com 3% de fenólicos totais extraídos da casca de pinheiro; **P6.** Silagem de azevém com 6% de fenólicos totais extraídos da casca de pinheiro; **P9.** Silagem de azevém com 9% de fenólicos totais extraídos da casca de pinheiro; **E0.** Silagem de azevém com 0% de fenólicos totais extraídos da esteva; **E3.** Silagem de azevém com 3% de fenólicos totais extraídos da esteva; **E6.** Silagem de azevém com 6% de fenólicos totais extraídos da esteva; **E9.** Silagem de azevém com 9% de fenólicos totais extraídos da esteva; **a, b, c.** índices que, quando diferentes, indicam médias significativamente diferentes ($p < 0,05$)

O tipo de fermentação nas silagens tratadas com 3, 6 ou 9% de FT de extracto de pinheiro foi essencialmente láctica, com uma produção média de ácido láctico de 33,6 g/kg MS. Os teores de ácido acético, propiónico e butírico são reduzidos, não tendo sido encontrado diferenças significativas entre tratamentos ($p > 0,05$).

Não existem diferenças significativas entre o N solúvel e o NH₃ das silagens tratadas com os diferentes níveis de extracto de esteva.

Na silagem controlo (E0) a produção de ácido láctico foi bastante elevada (45,6 g/kg MS), superior à dos tratamentos E3, E6 e E9. A silagem E0 tem o mais baixo valor de pH de todas as silagens estudadas.

4.2. Discussão

A metodologia mais comum para determinação de fenólicos totais é o método descrito por Folin-Denis e modificado por Folin e Ciocalteu que se baseia na oxidação dos fenóis da amostra, entre os quais fenolato, e redução do reagente (ião $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$), com formação de um cromóforo azul (Mueller-Harvey, 2001).

O ensaio não permite distinguir entre grupos específicos de compostos fenólicos, uma vez que todos os taninos são fenólicos mas nem todos os fenólicos são taninos, no entanto, possibilita quantificar os compostos fenólicos totais. É quantificada a tirosina das proteínas das plantas e todos os compostos fenólicos que reagem com o ácido tânico sendo os resultados obtidos expressos em equivalentes de ácido tânico (Makkar, 2003).

O método da vanilina depende da reacção da vanilina com os TC para formação de um composto corado (figura 9). Os factores mais críticos para o sucesso desta metodologia são o tipo de solvente, a natureza e a concentração do ácido, o tempo de reacção, a temperatura, a concentração da vanilina e o tipo de padrões de referência usados (Schofield *et al* (2001).

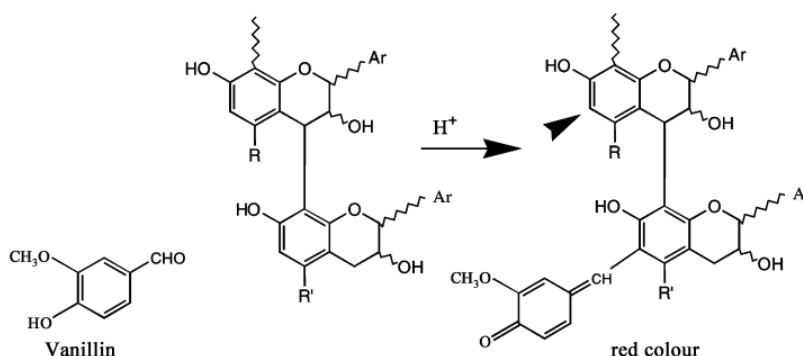


Figura 9. Química do ensaio da vanilina para determinação de TC. A seta assinalda o local de uma possível reacção secundária (adaptado de Schofield *et al*, 2001)

O ensaio da vanilina permite quantificar taninos condensados, contudo, este método não é sensível à diferença entre proantocianidinas e prodelfinidinas. O ácido sulfúrico é um catalisador mais eficaz que o ácido clorídrico, para a mesma normalidade. Esta diferença pode ser justificada pelo facto de, para a mesma normalidade, o HCl concentrado apresentar mais água que o H_2SO_4 . Além disso, o HCl é também referido como o que origina resultados com baixa reprodutibilidade. A temperatura é também um factor a ter em conta uma vez que, segundo Sum *et al* (1998) existe uma correlação entre a temperatura e a A_{500} . Um aumento de $1,4^\circ\text{C}$ resulta num aumento de 11% na absorvância. A acetona é também um interferente

que potencia a formação de cor e como tal poderá originar erros substanciais na determinação de taninos.

Neste estudo, a adição de taninos dos extractos ao azevém foi realizado com base no nível de fenólicos totais dos extractos de casca de pinheiro e de esteva. De acordo com Makkar (2003), existe uma elevada correlação entre a capacidade de precipitação da proteína e os compostos fenólicos extractáveis ou taninos ($r = 0,85$), enquanto que a correlação entre taninos condensados e a capacidade de precipitar a proteína é bastante inferior, apenas 0,41.

Comparando o teor de taninos no extracto de casca de pinheiro (58,62 g/100g) com os valores presentes nos extractos comerciais de casca de pinheiro (37,7%) verifica-se que, os extractos utilizados apresentaram valores mais elevados. Essa diferença pode ser justificada pelo facto da matéria-prima utilizada não ter sofrido qualquer tipo de tratamento de conservação (Seabra *et al*, 2007).

Em relação ao extracto de esteva, o teor de fenólicos totais presente na amostra (44,3% na MS) é bastante inferior ao obtido anteriormente pelo mesmo laboratório (64,0% na MS), enquanto que os TC determinados pelo método da vanilina (39,7% na MS) foram semelhantes aos ali quantificados (31,0% na MS) (Dentinho *et al*, 2007)

Os TC determinados pelo método da vanilina (396,8 g/kg MS) foram semelhantes aos quantificados no quebracho (390 g/kg MS) mas bastante inferiores aos quantificados em estudos anteriores na esteva (950 g/kgMS). A discrepância de valores pode ser explicada pelo facto do extracto utilizado ter sido extraído à bastante tempo (Dentinho, 2007).

Neste trabalho foi utilizado azevém no início do espigamento por ser a fase vegetativa das gramíneas em que o valor nutritivo é elevado e em que o teor de MS já não é demasiado baixo para pôr em risco o sucesso da ensilagem. Tomando como referência as características químicas ideais que, segundo Serrano (1985), uma forragem para ensilar deve ter (MS entre 25 e 40%, açúcares solúveis > 10% da MS e PB <15% na MS), podemos concluir que o azevém utilizado neste estudo tinha as características necessárias para obtenção de uma silagem de boa qualidade.

A qualidade de uma silagem depende essencialmente da eficiência do processo fermentativo. Os parâmetros mais comuns para avaliar a qualidade do ensilado são o conteúdo em MS cuja perda deverá ser negligenciável, o valor de pH

que não deverá sofrer grandes oscilações, o teor de azoto amoniacal (% N total) e os ácidos orgânicos produzidos durante o processo (Tomich *et al*, 2003).

Na composição química das silagens obtidas o efeito da adição dos extractos fez-se sentir principalmente na matéria orgânica que aumentou com o nível de inclusão de extractos, o que era expectável devido ao acréscimo da MO fornecida pelo extracto. Além de compostos fenólicos, outros compostos são veiculados pelos extractos, nomeadamente açúcares e proteína. Um extracto fenólico de esteva com 64% de FT, utilizado por Dentinho *et al* (2007), tinha na sua composição 16,3% de açúcar e 2,1% de PB na MS.

O teor de FB e ADF, contrariamente à MO é menor nas silagens tratadas com níveis de inclusão de extractos mais elevados. Sendo os compostos parietais provenientes exclusivamente do azevém verifica-se, nas silagens com níveis mais elevados de FT, um efeito de diluição dos compostos parietais.

Para a fracção NDF não se observaram diferenças significativas entre silagens. De acordo com Van Soest *et al* (1987) e Terrill *et al* (1990), quando há formação de complexos tanino-proteína, verifica-se que são recuperados nas fracções NDF e ADF. A não redução do NDF nas silagens com teores mais elevados de extractos sugere que houve formação de complexos tanino-proteína que terão sido recuperados na fracção NDF. A não recuperação destes complexos na fracção ADF sugere a sua solubilização no detergente ácido utilizado nesta determinação.

A relativa estabilidade observada nos constituintes parietais entre os vários tratamentos pode ser justificada pelo facto destes compostos serem, segundo Aufrère *et al* (1994) (citado por Dentinho, 1998) compostos pouco sensíveis às alterações enzimáticas que ocorrem durante a conservação, no interior do silo.

O teor de Ca na amostra é de aproximadamente 0,7% na MS, valores que, segundo Gueguen *et al* (1988), citado por Dentinho, 1998) são comuns em forragens nesta fase vegetativa. Entre os diferentes níveis de adição de taninos não se verificaram diferenças relevantes ($p > 0,05$).

A capacidade tampão das plantas, é um factor importante na ensilagem sendo que, para valores de pH entre 4-6, aproximadamente 68-80% desta capacidade é devida à presença de aniões (sais de ácidos orgânicos, ortofosfatos, nitratos e cloratos) e apenas 10-20% resulta da acção das proteínas das plantas (Butler e Bailey, 1973). Analisando os resultados obtidos verifica-se que o pH da massa não sofreu

grandes oscilações o que poderá ser explicado, em parte, pelos elevados teores de fósforo quer no azevém quer nos diferentes níveis de tratamento.

O pH depende muito do teor de MS inicial na silagem. O pH das silagens sem aditivos foi inferior ao que se obteve em silagens tratadas com taninos. Entre tratamentos verifica-se que, em silagens tratadas com casca de pinheiro o valor mais baixo se obteve em P9 enquanto que para a esteva foi em E6.

Analisando separadamente as duas experiências verifica-se que nas silagens aditivadas com compostos fenólicos da casca de pinheiro não existem diferenças entre tratamentos embora o pH tenha aumentado para P3 e P6. Na silagens tratadas com FT da esteva a variação de pH foi superior, com bastantes diferenças entre as diferentes concentrações de taninos ($p < 0,05$).

Embora o valor de pH baixo seja um parâmetro crítico para se obter uma boa silagem, o ambiente ácido é, também propício à dissociação do complexo tanino-proteína. A dissociação deste complexo durante a ensilagem pode comprometer a formação de uma estrutura *by pass* e diminuir a utilização de proteína pelo ruminante (Deaville *et al*, 2010).

A redução do valor de pH durante o processo de ensilagem permite conservar o material ensilado uma vez que a actividade das enzimas proteolíticas da planta é diminuída e o crescimento de microrganismos indesejáveis como enterobactérias e clostrídios cessa (Tomich *et al*, 2003).

Segundo Demarquilly (1990) (citado por Dentinho, 1998) uma silagem estável e de boa qualidade deverá ter um pH próximo de 4, o teor de N-NH₃ deverá ser inferior a 5% do N total, o N solúvel deverá ser inferior a 50% de N total. As concentrações de ácido acético devem ser inferiores a 20g/Kg de MS e o ácido propiónico e butírico deverão estar ausentes ou apenas em quantidades vestigiais.

Imediatamente após o corte da forragem inicia-se uma extensa proteólise com o conseqüente aumento do teor de azoto não proteico para, aproximadamente, 40% do azoto total, nas primeiras horas do processo. Segundo Tomich *et al* (2003), a proteólise inicial é mediada, principalmente por enzimas da planta, enquanto que as degradações subseqüentes de aminoácidos são devidas à acção microbiana. Em forragens verdes, entre 75 e 90% do azoto total é proteico e o restante, azoto não proteico, engloba principalmente aminoácidos livres, aminas, nucleotídeos e nitratos (Tomich *et al*, 2003).

A inclusão de taninos como aditivos em silagem foi eficaz e mostrou-se útil como forma de proteger a proteína da proteólise o que pode ser verificado através da ausência de diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os teores de proteína bruta do azevém e os diferentes tratamentos com taninos. Assim, os taninos podem ser utilizados como alternativa aos métodos químicos existentes (Salawu *et al*, 1999).

Embora, de acordo com a análise estatística, não haja diferenças significativas nos níveis de N solúvel ($p > 0,05$), a diminuição verificada na experiência com fenólicos do extracto de esteva está de acordo com os dados obtidos por Albrecht e Muck (1991) (citado por Salawu *et al*, 1999), que também mostrou uma forte relação negativa entre as concentrações de taninos e concentrações N solúvel em silagens. Os taninos protegem as proteínas da hidrólise enzimática de modo análogo ao formaldeído, ligando-se às proteínas ou aminoácidos livres, tornando-os inacessíveis para a hidrólise (Salawu *et al*, 1999).

A quantidade de N volátil na silagem é indicador muito fiável da extensão da desaminação e está fortemente correlacionado com o valor de pH (Butler e Bailey, 1973). A amónia formada durante a proteólise altera a qualidade da fermentação, impedindo a rápida diminuição do valor de pH na massa do ensilado. Assim, em silagens bem conservadas, os aminoácidos constituem a maior fracção de azoto não proteico e a amónia está presente em baixas concentrações. A relação entre o azoto amoniacal ($N-NH_3$) e o azoto total (NT) nas silagens é um indicador da eficiência do processo fermentativo sendo que, em geral, silagens com menos de 10% de $N-NH_3/NT$ resultam de uma fermentação mais eficiente do que quando estes valores são superiores (Tomich *et al*, 2003). Analisando os resultados verifica-se que estes estão de acordo com o descrito na bibliografia como indicador de uma fermentação eficiente uma vez que os teores de $N-NH_3/NT$ são aproximadamente 10%, não se observando diferenças significativas entre as várias concentrações de taninos estudadas ($p > 0,05$).

Durante a ensilagem são produzidos vários ácidos orgânicos, no entanto, para avaliação da qualidade do produto final são analisados, os ácidos acético, láctico, propiónico e butírico. Apesar de todos os ácidos formados contribuírem para a redução do pH da massa ensilada, o ácido láctico tem um papel fundamental uma vez que a sua constante de dissociação é inferior à dos outros (Tomich *et al*, 2003).

Os elevados teores de MS e de HCS no momento da ensilagem permitiram o desenvolvimento de bactérias lácticas cujo metabolismo se reflectiu numa forte produção de ácido láctico, originando acidificação do meio e, conseqüentemente, limitando a actividade enzimática da planta e o desenvolvimento de fermentações

indesejáveis, principalmente por bactérias sacarolíticas e proteolíticas. Este facto é confirmado pelos baixos valores de ácido acético, propiónico e butírico, bem como os baixos teores de N-NH₃ e N solúvel (Dentinho, 1998).

Houve um efeito benéfico com a inclusão de ambos os extractos nas características fermentativas das silagens, sendo o efeito do extracto de esteva superior ao do extracto de pinheiro. Os resultados obtidos nas silagens com esteva estão de acordo com os descritos por Salawu *et al* (1999) e Tabacco *et al* (2006) (citado por Deaville *et al*, 2010) que verificaram uma diminuição das concentrações de ácido láctico com aumento de teor de taninos em silagens, sugerindo grau de inibição das bactérias fermentativas durante a ensilagem (Deaville *et al*, 2010), contudo, a discrepância de resultados é, de acordo com Kennedy e Charberlan (citado por Aksu *et al*, 2006) explicada pelo facto dos taninos utilizados serem extractos “brutos”, com grande mistura de compostos fenólicos.

Entre as silagens controlo (P0 e E0) verificaram-se grandes diferenças principalmente na produção de ácidos láctico, propiónico e butírico, verificando-se na silagem P0 uma menor concentração de ácido láctico (5,64 vs 45,6 g/kg MS) e, maiores concentrações de ácidos propiónico (1,56 vs 0,62 g/kg MS) e ácido butírico (16,46 vs 3,34g/kg MS). Como consequência o pH foi superior ao desejado. Uma explicação sugerida para as diferenças encontradas é a falta de rapidez na formação das condições anaeróbias desejadas no silo, ou por mau calcamento da forragem ou porque o encerramento do silo não se realizou nas melhores condições.

Nas silagens em que foi adicionado o extracto de casca de pinheiro, o ácido láctico parece não ter sido produzido em quantidade suficiente para permitir a acidificação desejável do meio. O mais baixo valor de pH obtido foi de 5,32 na silagem P9. Como consequência houve actividade de bactérias indesejáveis, tais com acéticas e butíricas que deram origem à formação de ácido acético e butírico e formação de NH₃.

Os teores de ácido butírico produzidos na silagem são indicativos da presença de bactérias sacarolíticas (principalmente clostrídios), contudo, verifica-se que à medida que a concentração de taninos adicionados à silagem aumenta, o teor de ácido butírico diminui o que pode ser justificado, segundo Alves *et al* (2011) pelo carácter inibidor que as bactérias lácticas têm nestes microrganismos, bem como pela capacidade inibitória que alguns taninos também revelam (Salawu *et al*, 1999). Apesar da diminuição verificada, as diferenças não são significativas ($p > 0,05$).

Os resultados obtidos relativamente ao conteúdo em ácido butírico estão de acordo com os descritos Salawu *et al* (1999) (citado por Tabacco *et al*, 2006) que verificou que a concentração de ácido butírico em silagens de azevém perene com um teor de MS de 18,5% foi reduzida em silagens tratadas com 0,5% e 5% (na MS) de taninos condensados, comparativamente com o controlo.

Comparando os resultados obtidos para butirato e N-NH₃ pode verificar-se que um aumento dos teores de butirato são, de uma maneira geral, acompanhados pelo aumento de N-NH₃, reflectindo a desaminação ocorrida no silo.

Analisando, comparativamente os teores de lactato e butirato entre os diferentes tratamentos em estudo, verifica-se que, regra geral, a diminuição do ácido láctico é acompanhada do aumento de ácido butírico. Esta alteração, a par da subida do pH, pode ser justificada, segundo descrito por Butler e Bailey (1973) pela possível conversão de ácido láctico em butírico por bactérias do género *Clostridium* (principais responsáveis pela subida de pH nos ensilados9)

Em relação à concentração de ácido acético e propiónico verificou-se que, nas duas experiências a concentração diminuiu com o aumento do teor de taninos adicionado, em relação aos respectivos controlos. As diferenças na concentração de ácido acético, embora com significativas diferenças ($p=0,0235$) são semelhantes entre cada uma das experiências, contudo, relativamente à produção de ácido propiónico essas diferenças não são relevantes ($p>0,05$), embora seja tendencialmente menor para concentrações superiores de taninos adicionados à silagem. O teor de ácido acético, tal como o de ácido butírico, está associado a decréscimos inferiores no valor de pH da massa ensilada, embora neste caso essa associação não tenha sido muito linear (Tomich *et al*, 2003).

Devido à sua capacidade de estabelecer ligações, os taninos podem interagir com os microrganismos e com os componentes da dieta como proteínas e HCS tendo sido descritos como capazes de inibir a degradação de HCS e proteínas em plantas (Barry e Manley, 1984, citado por Salawu *et al*, 1999). Elevados níveis de taninos são descritos como capazes de reduzir a actividades de bactérias e fungos, podendo reduzir a conversão de HCS em ácidos capazes de degradar a silagem, como o butírico e o propiónico (Tabacco *et al* (2006).

4.3. Conclusões

O extracto de pinheiro não melhorou as características fermentativas da silagem de azevém, não contribuindo para a redução de azoto solúvel e NH_3 .

No caso do extracto de esteva os valores encontrados sugerem que os dois níveis mais elevados de extracto (6 e 9%) têm efeito positivo sobre o processo fermentativo da silagem, reduzindo a extensão das fermentações e contribuindo para uma menor produção de azoto solúvel e amoniacal.

Parte V

Referências Bibliográficas

- Abdelhadi, L. et al** (2005). “Corn silage or high moisture corn supplements for beef heifers grazing temperate pastures: effects on performance, ruminal fermentation and in situ pasture digestion”. *Animal Feed Science and Technology*, **118**: 63–78
- Aganga, A., Adogla-Bessa, T.** (1999). “Dry matter degradation, tannins and crude protein contents of some indigenous browse plants of Botswana”. *Archivos Zootecnia*, **48**: 79-83
- Agricultural Survey** [A National Statistics Publication for Scotland]. 2012. Disponível em <http://www.scotland.gov.uk/Publications/2012/03/7513/3>. Consultado a 20 de Abril de 2012
- Akmal, M. et al** (2004). “Productivity and light use efficiency of perennial ryegrass with contrasting water and nitrogen supplies”. *Field Crops Research*, **88**: 143–155
- Aksu, T. et al** (2006). “Effects of formic acid, molasses and inoculant additives on corn silage composition, organic matter digestibility and microbial protein synthesis in sheep”. *Small Ruminant Research*, **61**:29–33
- Alipour, D., Rouzbehan, Y.** (2010). “Effects of several levels of extracted tannin from grape pomace on intestinal digestibility of soybean meal”. *Livestock Science*, **128**: 87–91
- Alves, S. et al** (2011). “Effect of ensiling and silage additives on fatty acid composition of ryegrass and corn experimental silages”. *Journal of Animal Science*, **89**: 2537-2545
- Ammar, H. et al** (2011). “Effect of saliva from sheep that have ingested quebracho tannins on the *in vitro* rumen fermentation activity to digest tannin-containing shrubs”. *Animal Feed Science and Technology*, **163**: 77–83
- Barry, T. et al** (1986). “The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 4. Sites of carbohydrate and protein digestion as influenced by dietary reactive tannin concentration.” *The British Journal of Nutrition*, **55**:123-37
- Bidwell, G., Sterling, W.** (1925). “Preliminary notes on the direct determination of moisture”. *Journal of the Franklin Institute*, **199**: 699–700
- Broadhurst, R., Jones, W.** (1978). “Analysis of condensed tannins using acidified vanillin”. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **29**: 788–794
- Broderick, G.** (1995). “Performance of lactating dairy cows fed either alfalfa silage or alfalfa hay as the sole forage”. *Journal of Dairy Science*, **78**:320–329.

- Butler, G., Bailey, R.** (1973). *Chemistry and biochemistry of herbage* – volume 3. Academic Press, London
- Buxadé, C.** (1995). *Alimentos y racionamento*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid
- Cavaco, M., Calouro, F.** (2006). “Produção integrada das culturas”. *Pastagens e Forragens*, Direcção Geral de Protecção de Culturas, Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas
- Charmley, E.** (2001). “Towards improved silage quality – A review”. *Canadian Journal of Animal Science*, **81**: 157-168
- Chavan, U. et al** (2001). “Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents”. *Food Chemistry*, **75**. 509–512
- Chung, K. et al** (1998). “Are tannins a double-edged sword in biology and health?”. *Trends in Food Science & Technology*, **9**: 168-175
- Clegg, K.** (1956). “The application of the anthrone reagent to the estimation of starch in cereals”. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **7**: 40–44
- Correia, A.** (1986). *Bioquímica nos solos, nas pastagens e forragens*. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa
- Deville, E. et al** (2010). “Chestnut and mimosa tannin silages: Effects in sheep differ for apparent digestibility, nitrogen utilisation and losses”. *Animal Feed Science and Technology*, **157**: 129–138
- Dentinho, M.** (1998). “Valor nutritivo da sula (*Hedysarum coronarium* L.)”. Santarém: Instituto Superior de Agronomia
- Dentinho, M. et al** (2007). “The use of tannin crude extract from *Cistus ladanifer* L. to protect soya-bean protein from degradation in the rumen”. *The Animal Consortium*: **1**: 645-650
- DOW** [Silage insights – improving silage quality and reducing CO₂ emissions]. 2012. Disponível em <http://www.dow.com/silage/tools/experts/improving.htm>. Consultado a 17 de Março de 2012
- Eichelberger, L. et al** (2002). “Composição química de sementes de azevém em resposta ao retardamento da secagem e ao armazenamento”. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **37**: 693-701

- Estela, W. et al** (2007). “Production of lactic acid by *Lactobacillus plantarum* L10 on batch and continuous cultivation”. *Revista Peruana de Biología*, **14**: 271-275
- Fernandes, A.** (1997). “Efeito da fertilização azotada no azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.) nas condições do entre Douro e Minho – Produção e valor nutritivo”. *Pastagens e Forragens*, vol. 18, pp. 85-97
- Frandsen, R. et al** (2011). *Anatomia e Fisiologia dos Animais de Fazenda*. 7ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro
- Frazier, R. et al** (2010). “Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **51**: 490–495
- Frutos, P. et al** (2004). “Review. Tannins and ruminant nutrition”. *Spanish Journal of Agricultural Research*, **2**: 191-202
- Hervás, G. et al** (2003). “Intoxication of sheep with quebracho tannin extract”. *Journal of Comparative Pathology*, **129**: 44-54
- Huang, X. et al** (2011) “Protein-binding affinity of *Leucaena* condensed tannins of differing molecular weights”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**: 10677–10682
- Iqbal, Z. et al** (2002). “Anthelmintic effects of condensed tannins”. *International Journal of Agriculture & Biology*, **4**: 438-440
- ISO 5983-1** (2005). Animal feeding stuffs -- Determination of nitrogen content and calculation of crude protein content -- Part 1: Kjeldahl method. International Organization for Standardization
- ISO 6869** (2000). Animal feeding stuffs -- Determination of the contents of calcium, copper, iron, magnesium, manganese, potassium, sodium and zinc -- Method using atomic absorption spectrometry. International Organization for Standardization
- ISO 9831** (1998). Animal feeding stuffs, animal products, and faeces or urine -- Determination of gross calorific value -- Bomb calorimeter method. International Organization for Standardization
- Julkunen-Tiitto, R.** (1985). “Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **33**: 213-217

Kaiser, A. et al (2003). *Successful silage*. Dairy Australia and New South Department of Primary Industries, Australia

Keady, T. et al (2000). "Prediction of silage feeding value from the analysis of the herbage at ensiling and effects of nitrogen fertilizer, date of harvest and additive treatment on grass silage composition". *Journal of Agricultural Science*, **134**: 353-368

Kellems, R., Church, D. (2010). *Livestock feeds and feeding*. 6ª ed., Pearson, U.S.A

Krueger, W. et al (2010). "Effects of dietary tannin source on performance, feed efficiency, ruminal fermentation, and carcass and non-carcass traits in steers fed a high-grain diet". *Animal Feed Science and Technology*, **159**: 1–9

Lee, J. et al (2009). "Influence of dietary condensed tannins from sericea lespedeza on bacterial loads in gastrointestinal tracts of meat goats". *Livestock Science*, **126**: 314-317

Lopes, V. et al (2006). "Cultura de azevém anual – Ficha técnica n.º 53". Direcção Regional de Agricultura de Entre Douro e Minho

Lorenz, M. (2011). "Sainfoin tannins and their impact on protein degradation during silage and rumen fermentation and testing of novel techniques". Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences

Makkar, H. (2003). "Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds". *Small Ruminant Research*, **49**: 241–256

Makkar, H. (2003). *Quantification of tannins in tree and shrub foliage – a laboratory manual*. Kluwer Academic Publishers, USA

Markom, M. et al (2007). "Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: effects of solvents and extraction methods". *Separation and Purification Technology*, **52**: 487-496

McDonald, P. et al (1995). *Nutrición animal*. 5ª ed., Editorial Acribia, S.A., Zaragoza

McSweeney, C. et al (2001). "Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants". *Animal Feed Science and Technology*, **91**: 83-93

McSweeney, C. et al (2008). "A review of anti-nutritive factors limiting potential use of *Acacia angustissima* as a ruminant feed". *Animal Feed Science and Technology*, **147**: 158–171

Min, B. et al (2003). “The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review”. *Animal Feed Science and Technology*, **106**: 3-19

Mueller-Harvey, I. (2001). “Analysis of hydrolysable tannins”. *Animal Feed Science and Technology*, **91**: 3-20

Muetzel, S., Becker, K. (2006). “Extractability and biological activity of tannins from various tree leaves determined by chemical and biological assays as affected by drying procedure”. *Animal Feed Science and Technology*, **125**: 139–149

National Forage & Grasslands Curriculum [Determine the characteristics of good silage and the steps in producing it]. 2012. Disponível em <http://forages.oregonstate.edu/nfgc/eo/onlineforagecurriculum/instructormaterials/availabletopics/mechanicalharvest/silage>. Consultado a 25 de Fevereiro de 2012

Niezen, J. et al (2002). “The effect of feeding sulla (*Hedysarum coronarium*) or lucerne (*Medicago sativa*) on lamb parasite burdens and development of immunity to gastrointestinal nematodes”. *Veterinary Parasitology*, **105**: 229–245

Norma Portuguesa 872 (1983). Alimentos para animais: Determinação do teor de cinza total. Direcção Geral da Qualidade, Lisboa

Norma Portuguesa 874 (2000). Alimentos para animais: Determinação do teor de fósforo total. Método espectrométrico.. Instituto Português da Qualidade, Monte da Caparica

Norma Portuguesa 875 (1994). Alimentos para animais: Determinação do teor de humidade. Instituto Português da Qualidade, Monte da Caparica

Norma Portuguesa 876 (2001). Alimentos para animais: Determinação do teor de matéria gorda. Instituto Português da Qualidade, Monte da Caparica

Norma Portuguesa 915 (1999). Alimentos para animais: Preparação das amostras para análise. Instituto Português da Qualidade, Monte da Caparica

Norma Portuguesa 2029 (1994). Alimentos para animais: Determinação do teor de celulose bruta. Instituto Português da Qualidade, Monte da Caparica

Norma Portuguesa 2030 (1996). Alimentos para animais: Determinação do teor de proteína bruta. Instituto Português da Qualidade, Monte da Caparica

Norma Portuguesa 3256 (1988). Alimentos para animais: Colheita de amostras. Instituto Português da Qualidade, Monte da Caparica

Norma Portuguesa 4038 (1990). Alimentos para animais: Determinação do teor de azoto básico volátil total (ABVT). Método por micro difusão. Instituto Português da Qualidade, Monte da Caparica

Oliveira, S. et al (2007). “Effect of tannin levels in sorghum silage and concentrate supplementation on apparent digestibility and methane emission in beef cattle”. *Animal Feed Science and Technology*, **135**: 236-248

Oliveira, S. et al (2009). “Fermentative characteristics and aerobic stability of sorghum silages containing different tannin levels”. *Animal Feed Science and Technology*, **154**: 1–8

Osborne, N., McNeill, D. (2001). “Characterization of *Leucaena* condensed tannins by size and protein precipitation capacity”. *Journal of Science of Food and Agriculture*, **81**: 1113-1119

Porter, L. et al (1986). “The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin”. *Phytochemistry*, **25**: 223–230

Reece, W. (2009). *Functional Anatomy and Physiology of Domestic Animals*. 4^a ed., Wiley-Blackwell, U.S.A.

Rochfort, S. et al (2008). “Plant bioactives for ruminant health and productivity”. *Phytochemistry*, **69**: 299-322

Salawu, M. et al (1999). “The use of tannins as silage additives: effects on silage composition and mobile bag disappearance of dry matter and protein”. *Animal Feed Science and Technology*, **82**: 243-259

Sampoux, J. et al (2011). “Breeding perennial grasses for forage usage: an experimental assessment of trait changes in diploid perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivars released in the last four decades”. *Field Crops Research*, **123**: 117–129

Schofield, P. et al (2001). “Analysis of condensed tannins: A review”. *Animal Feed Science and Technology*, **91**: 21-40

Seabra, I. et al (2007). “Extracção de taninos da casca de pinheiro (*Pinus pinaster*): influência de aditivos no solvente de extracção”. *Aplicaciones Industriales de los Taninos Vegetales – Programa CYTED, Coimbra*

- Sinclair, L. et al** (2009). “Effects of inclusion of whole-crop pea silages differing in their tannin content on the performance of dairy cows fed high or low protein concentrates”. *Livestock Science*, **124**: 306-313
- Skonieski, F. et al** (2011). “Composição botânica e estrutural e valor nutricional de pastagens de azevém consorciadas”. *Revista Brasileira de Zootecnia*, **40**: 550-556
- Sun, X. et al** (2010). “Cultivar and age of regrowth effects on physical, chemical and in sacco degradation kinetics of vegetative perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.)”. *Animal Feed Science and Technology*, **155**: 172–185
- Tabacco, E. et al** (2006). “Effect of Chestnut Tannin on Fermentation Quality, Proteolysis, and Protein Rumen Degradability of Alfalfa Silage”. *Journal of Dairy Science*, **89**: 4736–4746
- Terrill, T. et al** (1990). “Condensed tannin concentration in *Sericea lespedeza* as influenced by preservation method”. *Crop Science Journal*, **30**: 219-224.
- Tas, B. et al** (2006). “Rumen degradation characteristics of perennial ryegrass cultivars during the growing season”. *Animal Feed Science and Technology*, **131**: 102–119
- Tilley, J. e Terry, R.** (1963). “A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops”. *Journal British Grassland Society*, **18**: 104-111
- Tomich, T. et al** (2003). “Características químicas para avaliação do processo fermentativo de silagens: uma proposta para qualificação da fermentação”. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Corumbá
- Van Ranst, G. et al** (2009). “Influence of ensiling forages at different dry matters and silage additives on lipid metabolism and fatty acid composition”. *Animal Feed Science and Technology*, **150**: 62–74
- Van Soest, P. et al** (1987). Tannins in foods and feeds. In: Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers Proceedings. Cornell University. Ithaca, NY, 115-122.
- Van Soest, P. et al** (1991). “Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition”. *Journal of Dairy Science*, **74**: 3583-3597

Wina, E., Abdurrohman, D. (2005). “The formation of ‘ruminal bypass protein’ (*in vitro*) by adding tannins isolated from *Calliandra calothyrsus* leaves or formaldehyde”. *Journal of Animal Science and Veteriner*, **10**: 274-280

Parte VI

Anexos

Composição da solução tampão ruminal ou saliva sintética(determinação da digestibilidade *in vitro* segundo Tilley e Terry, 1963)**Quadro 6.** Solução de macroelementos

	g/L
Hidrogenocarbonato de sódio (NaHOC ₃)	9,8
Hidrogenofosfato disódico (Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O)	9,3
Cloreto de potássio (KCl)	0,57
Cloreto sódio (NaCl)	0,47
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0,12
Cloreto cálcio (CaCl ₂)	0,04

Quadro 7. Solução microelementos

	g/L
Sulfato de ferro (FeSO ₄ .7H ₂ O)	3,68
Sulfato de manganês (MnSO ₄ .H ₂ O)	1,9
Sulfato zinco (ZnSO ₄ .H ₂ O)	0,44
Cloreto de cobalto (CoCl ₂ .7H ₂ O)	0,12
Sulfato de cobre (CuSO ₄ .5H ₂ O)	0,098
Molibdato de amónia ((NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O)	0,0174

Composição do reagente vanadomolibdico

(quantificação do fósforo total segundo NP 874, 2000)

Solução de heptamolibdato de amónio

Dissolver, num balão volumétrico de 1000 mL, 100 g de molibdato de amónio tetrahidratado [NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O) em água quente. Juntar 100 mL de amónia e perfazer o volume com água;

Solução de monovanato de amónio

Dissolver a quente 2,35g de monovanadato de amónio [NH₄)VO₃] em 400 mL de água, para um balão volumétrico de 1000 mL. Juntar, lentamente, 7 mL de ácido nítrico. Completou-se o volume com água e homogeneizou-se

Reagente vanadomolibdico

Para um balão volumétrico de 1000mL, medir 200 mL da solução II.I, 200 mL da solução II.II e 135 mL de ácido nítrico. Completa-se o volume com água e homogeneiza-se a solução.

Quadro 8. Composição química do azevém e da silagem de azevém com diferentes níveis de tratamento (g/100g MS)

Tratamento	MS	cz	N _{total}	PB	FB	GB	NDF	ADF	ADL	Aç	Ca	P	N _{sol}	EB (kj/kg MS)	DMS (%)	DMO (%)
1	36,9	12,2	1,38	8,6	28,9	2,5	58,4	37,0	3,4	13,38	0,82	0,30	32,7	180,4	58,9	59,1
1	28,1	12,4	1,40	8,8	31,5	2,6	61,4	39,6	4,0	10,71	0,67	0,31	28,5	179,9	51,2	51,0
2	25,5	14,0	1,96	12,3	34,1	4,1	58,9	42,6	4,1	0,80	0,75	0,33	33,0	181,4	51,7	50,4
2	31,5	13,1	1,78	11,1	33,5	4,2	58,9	40,5	3,9	1,37	0,67	0,33	41,4	183,3	59,8	59,0
3	26,5	12,8	1,79	11,2	29,2	4,1	58,1	39,1	4,0	4,68	0,74	0,34	39,8	178,9	57,2	56,3
3	28,3	12,8	1,33	8,3	31,2	3,9	58,3	41,3	4,3	2,97	0,61	0,34	47,6	181,4	59,1	58,6
4	30,8	13,1	1,38	8,6	30,9	3,9	61,5	41,6	4,3	0,95	0,69	0,32	42,4	183,0	61,3	60,5
4	28,0	12,8	1,70	10,6	31,5	4,0	60,4	41,7	5,1	1,52	0,74	0,33	37,5	186,4	60,5	59,6
5	28,5	12,2	1,81	11,3	31,1	3,8	61,3	39,9	4,3	1,31	0,75	0,31	41,4	189,1	60,8	59,6
5	29,3	12,9	1,71	10,7	30,0	3,9	61,1	40,7	4,3	1,41	0,76	0,31	40,3	185,4	60,4	59,6
6	29,0	12,3	1,79	11,2	32,0	3,8	60,5	42,2	4,9	1,65	0,67	0,30	40,4	190,4	63,7	62,6
6	35,3	12,2	1,29	8,1	31,5	3,1	57,9	39,5	4,8	1,97	0,59	0,30	55,5	189,0	50,5	48,1
7	28,5	12,5	1,51	9,4	30,7	3,9	59,8	40,3	4,9	1,97	0,74	0,32	41,8	187,0	58,7	57,7
7	31,5	12,3	1,40	8,7	32,4	2,7	61,8	40,3	4,2	1,01	0,68	0,32	39,3	187,3	47,5	45,0
8	30,0	12,1	1,30	8,1	31,1	3,8	59,9	38,6	4,9	2,20	0,62	0,33	40,9	187,0	56,9	55,9
8	30,5	11,7	1,28	8,0	29,7	3,8	58,7	39,0	4,7	4,36	1,14	0,31	40,2	186,4	56,2	55,2
9	30,0	11,6	1,33	8,3	26,4	3,7	57,5	35,1	3,7	3,84	0,55	0,28	35,8	187,7	53,3	51,9
9	30,3	11,6	1,32	8,3	27,7	3,5	58,2	36,1	4,2	3,65	0,50	0,30	34,5	188,3	51,2	49,6

Legenda:

1. Azevém; **2.** Silagem de azevém (controlo para tratamento com extracto de casca de pinheiro); **3.** Silagem de azevém (controlo para tratamento com extracto de esteva); **4.** Silagem de azevém com 3% fenólicos totais (extraídos da casca pinheiro); **5.** Silagem de azevém com 6% fenólicos totais (extraídos da casca pinheiro); **6.** Silagem de azevém com 9% fenólicos totais (extraídos da casca pinheiro); **7.** Silagem de azevém com 3% fenólicos totais (extraídos da esteva); **8.** Silagem de azevém com 6% fenólicos totais (extraídos da esteva); **9.** Silagem de azevém com 9% fenólicos totais (extraídos da esteva);

Quadro 9. Parâmetros fermentativos de silagem de azevém e de silagem de azevém aditivadas com diferentes níveis de compostos fenólicos

Tratamento	pH	N _{total} (% MS)	N-NH ₃ (% N _{total})	Acético	Propiônico			Láctico
					Butírico	(g / kg MS)		
1	5,61	0,184	9,384	7,10	2,49	30,14	0,87	
1	5,05	0,183	10,294	7,53	0,62	2,78	10,41	
2	4,36	0,094	5,244	7,52	0,69	2,88	40,87	
2	4,45	0,132	9,944	6,67	0,55	3,81	50,30	
3	5,62	0,182	13,168	5,13	0,90	14,96	31,22	
3	5,27	0,228	13,440	7,32	0,74	9,03	34,91	
4	5,44	0,187	10,349	7,83	0,83	5,29	37,34	
4	5,49	0,140	8,190	5,64	0,70	7,44	29,27	
5	5,35	0,145	8,087	6,34	0,95	7,81	33,60	
5	5,29	0,158	12,241	4,99	0,60	2,94	35,01	
6	5,18	0,132	8,749	4,34	0,90	8,83	34,24	
6	5,24	0,152	10,882	3,88	1,42	13,03	30,73	
7	5,02	0,107	8,231	3,78	0,62	2,63	26,96	
7	4,78	0,075	5,865	4,40	0,51	1,47	38,97	
8	5,04	0,085	6,375	4,45	0,52	1,42	29,64	
8	5,06	0,095	7,184	3,61	0,51	1,36	30,39	

Legenda:

1. Silagem de azevém (controlo para tratamento com extracto de casca de pinheiro); **2.** Silagem de azevém (controlo para tratamento com extracto de esteva); **3.** Silagem de azevém com 3% fenólicos totais (extraídos da casca pinheiro); **4.** Silagem de azevém com 6% fenólicos totais (extraídos da casca pinheiro); **5.** Silagem de azevém com 9% fenólicos totais (extraídos da casca pinheiro); **6.** Silagem de azevém com 3% fenólicos totais (extraídos da esteva); **7.** Silagem de azevém com 6% fenólicos totais (extraídos da esteva); **8.** Silagem de azevém com 9% fenólicos totais (extraídos da esteva);