

UFRRJ
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DISSERTAÇÃO

**Fatores Antinutricionais em Três Espécies de Leguminosas
Forrageiras**

Delci de Deus Nepomuceno

2009



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**FATORES ANTINUTRICIONAIS EM TRÊS ESPÉCIES DE
LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS**

DELCI DE DEUS NEPOMUCENO

Sob a Orientação do Professor
João Carlos de Carvalho Almeida

e Co-orientação do Professor
Mário Geraldo de Carvalho

Dissertação submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**
no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia,
Área de Concentração em Produção Animal.

Seropédica, RJ
2009

616.015

N441f

T

Nepomuceno, Delci de Deus, 1978-
Fatores Antinutricionais em três
espécies de leguminosas forrageiras
/ Delci de Deus Nepomuceno - 2009.
76. : il.

Orientador: João Carlos de
Carvalho Almeida.

Dissertação (mestrado) -
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia.

Inclui bibliografia

1. Fungos - Teses. 2. leguminosa
- Teses. 3. Plantas forrageiras -
Teses. I. Almeida, João Carlos de
Carvalho, 1956-. II. Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

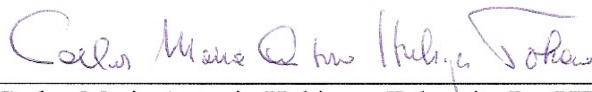
DELCI DE DEUS NEPOMUCENO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de Concentração em Produção Animal.

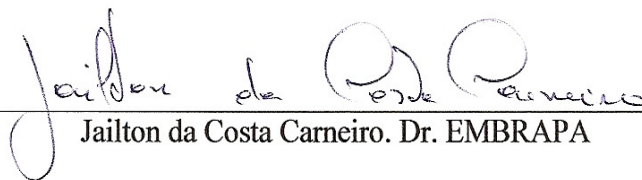
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 13/01/2009



João Carlos de Carvalho Almeida. Dr. UFRRJ
(Orientador)



Carlos Maria Antonio Hubinger Tokarnia. Dr. UFRRJ



Jailton da Costa Carneiro. Dr. EMBRAPA

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e ao Instituto de Zootecnia, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor João Carlos de Carvalho Almeida pela amizade, convívio pessoal e profissional, ensinamentos e orientação.

Ao professor Mário Geraldo de Carvalho pela amizade estabelecida, profissionalismo, ensinamentos e valiosa co-orientação.

Ao professor Roberto Carlos Costa Lelis e ao mestrando Michel Cardoso Vieira pela ajuda na análise de quantificação de tanino.

Ao professor Sérgio Gaspar de Campos pelas análises micológicas;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFRRJ pelos ensinamentos.

Aos funcionários do Instituto de Zootecnia pela ajuda prestada.

Aos colegas do Laboratório de Química de Produtos Naturais principalmente a Renata Duarte Fernandes e ao Francisco Eduardo Aragão Catunda Junior (Ceará) pela ajuda oferecida sempre que necessário na realização do trabalho.

Ao colega de curso Norberto Silva Rocha e aos estagiários do professor João Carlos pelo plantio das leguminosas

Aos técnicos, Maurício L. Matos do Laboratório de Química Orgânica Experimental e Eli B. Siqueira do Laboratório de Infravermelho pela realização das ressonâncias.

Aos colegas do quarto 426 (Carlos, Givanildo, Rodrigo e Rômulo).

A Empresa Sementes Matsuda e Sementes Selegram pela doação de sementes.

Aos meus familiares pelo incentivo e apoio.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Meu muito obrigado

BIOGRAFIA

DELICI DE DEUS NEPOMUCENO, nascido em 19 de fevereiro de 1978, na cidade de Santa Maria Madalena, RJ, ingressou em Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro-UFRRJ em 2000 graduando-se em 2005. De agosto/2005 a março/2006 atuou como Bolsista no projeto Sistema Integrado de Produção Agroecológica e de abril/2006 a março/2007, no projeto Agroecologia uma Estratégia Para Fortalecimento da Agricultura Familiar no Norte Fluminense, ambos no Laboratório de Fitotecnia do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuária da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, RJ. Ingressando no mestrado em 2006 na UFRRJ submetendo-se a defesa de dissertação em 13 de janeiro de 2009.

RESUMO GERAL

NEPOMUCENO, Delci de Deus. **Fatores Antinutricionais em Três Espécies de Leguminosas Forrageiras**. 2009. 66p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2009.

Este trabalho foi dividido em três capítulos, o primeiro realizou-se com o objetivo de identificar as classes de metabólitos secundários presentes em três leguminosas forrageiras *Pueraria phaseoloides* (kudzu tropical), *Macrotyloma axillare* (macrotiloma) e *Neonotonia wightii* (soja perene). Metabólitos estes, que quando presentes em plantas podem provocar efeitos adversos ao animal ocasionando diminuição na ingestão, digestão e biodisponibilidade de nutrientes os que lhes conferem a denominação de fatores antinutricionais, estes efeitos podem repercutir de forma sistêmica acarretando diminuição do desempenho animal ou rebanho. Para este estudo foi realizada a prospecção fitoquímica, análise de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) e Espectroscopia no Infravermelho (IV). Foram identificadas as seguintes classes de metabólitos secundários: ácidos orgânicos, açúcares redutores, depsídeos e depsidonas, derivados da cumarina, esteróides e triterpenóides, saponinas, glicosídeos cardíacos, sacarídeos e taninos nas três espécies estudadas. O kudzu tropical e soja perene apresentaram ainda sinais compatíveis para a presença de alcaloides. As classes de metabólitos secundários estudadas apresentam compostos com efeitos antinutricionais para os animais, alguns destes efeitos são dependentes da quantidade ingerida e da espécie animal como o caso dos sacarídeos e açúcares redutores que possuem efeitos antinutricionais em monogástricos segundo literaturas consultadas. O segundo capítulo deste trabalho teve como objetivo quantificar o teor de tanino condensado através da Reação de Stiasny e avaliar a estabilidade “*in vitro*” da espuma formada pelas leguminosas, kudzu tropical, macrotiloma e soja perene. Para a quantificação do tanino, foram tomados em separados as porções, planta inteira, folhas e haste, utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado com parcelas subdivididas alocando-se as leguminosas nas parcelas e as porções nas subparcelas. A média do resultado obtido foi submetida à análise de variância e comparadas pelo Teste de Tukey (P<0,05), os efeitos das interações entre leguminosas e porções foram desdobrados pelo teste de Tukey (P<0,05) a avaliação da produção e estabilidade da espuma “*in vitro*” foi realizada devido à espuma produzida por leguminosas ser referida como possível agente etiológico do meteorismo espumoso em ruminantes. Neste estudo utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em parcelas subdivididas com três repetições cada, onde as porções compostas por planta inteira, folhas, e haste e o extratos metanólico bruto foram consideradas as parcelas e o tempo de repouso (0, 5, 10, 30 e 60min) onde aferiu-se o volume as subparcelas. O resultado referente ao volume produzido e conservado durante o tempo de repouso foi submetido à análise de variância e as médias de cada porção dentro de cada tempo foram comparadas pelo teste de Tukey (P<0,05) o efeito do volume conservado durante o tempo e a interação entre leguminosas e tempo de aferição foi desdobrados pela análise de regressão e a interação da estabilidade da espuma formada foi avaliada em função da porcentagem de espuma remanescente. Como resultado deste estudo o teor de tanino condensado variou de 1 a 1,6%. Quanto à estabilidade da espuma produzida pelas porções planta inteira, folha, haste e extrato metanólico das leguminosas foi considerada estável para as porções referentes à soja perene e macrotiloma, entretanto o kudzu apresentou um resultado significativo para a estabilidade da espuma para as quatro porções em estudos, gerando as equações de regressão $y = -2,0111x + 44,984$ para a porção folha; $y = -2,4x + 37,957$ para a porção haste; $y = -2,9049x + 31,779$ para a porção planta inteira e para o extrato metanólico a equação $y = -15,383x + 125,31$. O objetivo da realização do terceiro capítulo deste estudo foi avaliar a associação de fungos com as leguminosas: *Pueraria phaseoloides* (kudzu tropical), *Neonotonia wightii* (soja perene), *Macrotyloma axillare*

(macrotiloma), *Calopogonium mucunoides* (calopogônio) e *Arachis pintoii* cv. amarillo (amendoim forrageiro) devido à presença de substâncias encontradas depositadas sobre as folhas das leguminosas as quais conferiram aspecto repugnante para inclusão na alimentação animal. Para esta avaliação foram utilizados os elementos de reprodução amorfas dos fungos de acordo com as metodologias de Barnett e Hunter, (1990) e Pitt e Hocking, (1997). Na identificação observaram-se a macroscopia e microscopia dos fungos utilizando Imprint com fitas adesivas ou lamínulas de vidro, NaOH e Azul de algodão, diretamente do material obtido das leguminosas e das colônias desenvolvidas em Agar Sabouraud Dextrose e Agar Simples, sendo identificados os fungos *Alternaria spp*, *Phytomyces chartarum*, *Nigrospora spp*, *Cladosporium spp*, *Mucor spp*, *Fusarium spp*, *Pseudomicrodochium spp*, *Tetraploa spp*, *Acremonium spp*, *Aspergillus niger*, *Curvularia spp* e *Micélia estéril*.

Palavras-chave: Fungos. Metabólitos secundários. Meteorismo espumoso.

ABSTRACT

NEPOMUCENO, Delci de Deus. **Antinutritional Factors in Three Forage Legumes Species**. 2009, 66p. Dissertation (Master Science in Animal Science). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

This work was divided into three chapters; the first one was carried out for identifying secondary metabolites classes on three forage legumes: *Pueraria phaseoloides* (puero), *Macrotyloma axillare* (archer) and *Neonotonia wightii* (perennial soybean). These sorts of metabolites when present in plants may cause to animal adverse effects resulting ingestion and digestion decrease and nutrients bioavailability named antinutritional factors as well as may systematically induce to animal or herd performance decrease. For this study, phytochemical prospecting, Nuclear Magnetic Resonance Analysis (NMRA) and Infrared Spectroscopy (IS) were performed. Following secondary metabolites classes: organic acids, reducing sugars, depsidians and depsidones, coumarine derivatives, steroids and triterpenoids, saponins, cardiac glycosides, saccharides and tannins on three forage legumes species were identified. Pueraria and perennial soybean for alkaloids presence were compatible. According bibliographic references, secondary metabolites classes have presented antinutritional effects compounds, some of totally dependent on intake and specie like reducing sugars and saccharides responsible for antinutritional effects on monogastric animals as well. The second chapter of this survey was carried out for quantifying condensed tannin content by Stiasny Reaction and for evaluating pueraria, archer and perennial soybean "in vitro" foam stability. For tannin quantification separated portions of entire plant, leaves, and stem by Simple Randomized Design with legumes allocated on subdivided parcels and portions on subparcels was used. By analysis of covariance, obtained result average, as well as interactions effects between legumes and portions by Tukey Test ($P < 0.05$) were achieved. "In vitro" foam stability and yielding evaluation due to produced foam by legumes considered ruminant foamy meteorism potential etiological agent was performed. Simple Randomized Design consisting by subdivided parcels with three replications each was carried out where portions were composed by entire plant, leaves and stem as well as crude methanol extract related to parcels and remaining time (0, 5, 10, 30 and 60 minutes) for monitoring volume to subparcels. By Tukey Test ($P < 0.05$) each portion averages within each time were compared and by analysis of variance results related to volume and remaining time were submitted to. By statistical analysis of Regression, saved volume effect during time and legumes interaction and checking time were evaluated as well as foam stability interaction in relation to remaining foam was estimated. Condensed tannin content ranged from 1 to 1.6%. In regard to perennial soybean and archer, foam stability produced by entire plant, leaves, stem and legumes methanol extract was considered constant, nevertheless pueraria showed significative result, creating the following regression equations $y = -2.0111x + 44.984$ for leaf; $y = -2.4x + 37.957$ for stem; $y = -2.9049x + 31.779$ for plant entire and $y = -15.383x + 125.31$ for methanol extract. The aim of third chapter was to evaluate fungi association to legumes: *Pueraria phaseoloides* (puero), *Neonotonia wightii* (perennial soybean), *Macrotyloma axillare* (archer), *Calopogonium mucunoides* (calopo) and *Arachis pintoi* cv Amarello (pinto), however, due to substances over legumes leaves presenting disgusting feature they have been considered inappropriate to animal feeding. According Barnett and hunter (1990) and Pitt and Hocking (1997) fungi amorphous reproduction elements were used. For fungi macroscopic and microscopic identification, Imprint tape technique, NaOH and blue cotton were used. The following fungi: *Alternaria spp*, *Phytomyces chartarum*, *Nigrospora spp*, *Cladosporium spp*, *Mucor spp*, *Fusarium spp*, *Pseudomicrodochium spp*, *Tetraploa spp*, *Acremonium spp*, *Aspergillus niger*, *Curvularia spp* and *Micelia sterilia* were reported, at all.

Key words: Fungi. Secondary metabolites. Foam meteorism.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	01
CAPÍTULO I - IDENTIFICAÇÃO DAS CLASSES DE FATORES ANTINUTRICIONAIS DE TRÊS ESPÉCIES DE LEGUMINOSAS	02
RESUMO	03
ABSTRACT	04
1 INTRODUÇÃO	05
2 REVISÃO DE LITERATURA	06
3 MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Cultivo das Leguminosas.....	12
3.2 Prospecção Fitoquímica.....	12
3.3 Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H (RMN ¹ H) e Infravermelho (IV).....	14
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4.1 Análise da Prospecção Fitoquímica e dos Espectros de RMN ¹ H e IV.....	15
4.2 Diferença entre Espécies.....	21
4.3 Considerações Sobre os Efeitos Metabólitos Secundários.....	21
5 CONCLUSÕES	24
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
CAPÍTULO II - QUANTIFICAÇÃO DE TANINOS E INVESTIGAÇÃO DA ESTABILIDADE DA ESPUMA CAUSADA POR LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS	28
RESUMO	29
ABSTRACT	30
1 INTRODUÇÃO	31
2 REVISÃO DE LITERATURA	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 Cultivos das Leguminosas e Obtenção do Extrato Metanólico.....	36
3.2 Preparo dos Extratos	36
3.2.1 Extrato aquoso.....	36
3.2.2 Extrato metanólico.....	36
3.3 Delineamento Experimental.....	37
3.4 Determinação dos teores de extrativos	37
3.5 Quantificação dos Polifenóis	37
3.6 Determinação do Teor de Tanino.....	38
3.7 Determinação do teor de Não tanino.....	38
3.8 Avaliação da quantidade de espuma.....	38
3.9 Análises Estatísticas.....	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 Teor de Extrativos e Número de Stiasny.....	40
4.2 Teor de Taninos e Não taninos.....	40
4.3 Estabilidade da Espuma.....	41
4.4 Considerações sobre o Volume de Espuma e Quantidade de Taninos.....	44
5. CONCLUSÕES	45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
CAPÍTULO III - ASSOCIAÇÃO DE FUNGOS A CINCO ESPÉCIES DE LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS	49
RESUMO	50
ABSTRACT	51
1 INTRODUÇÃO	52

2 REVISÃO DE LITERATURA.....	54
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	56
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5 CONCLUSÕES.....	59
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
CONCLUSÕES GERAIS.....	62
ANEXOS.....	63

INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de leguminosas em sistemas de pastagens vem aumentando nos últimos anos, seja pela necessidade de incremento na produção de forragens na época da seca e/ou pela melhoria ocasionada à dieta animal conferida pelo maior aporte de proteínas, seja pela necessidade de incremento de nitrogênio ao solo, o que reduz o custo com adubação nitrogenada melhorando a qualidade das pastagens. Mecanismos estes que permitem melhora ou manutenção dos índices produtivos e reprodutivos do rebanho ao longo do ano.

Dentre as vantagens da utilização das leguminosas em relação às gramíneas na alimentação animal pode ser citada a manutenção da qualidade bromatológica ao longo das estações do ano, o incremento e/ou manutenção de fonte de MS para período de escassez de gramíneas, o incremento de nitrogênio para o solo, melhora dos índices produtivos devido à melhora da dieta; [incremento de PTN e minerais (cálcio e magnésio)], aumento do consumo e digestibilidade de material fibroso de gramíneas devido ao maior aporte de PTN na seca, redução na pressão ambiental devido a menor utilização de fertilizantes químicos além das leguminosas contribuírem para impedir a degradação das pastagens pela melhoria física e química do solo. Entretanto os empecilhos da adoção do cultivo de leguminosas em pastagens têm sido atribuídos ao desconhecimento dos produtores quanto aos benefícios e às exigências de manejo diferenciado devido ao ciclo C₃ das leguminosas em relação ao ciclo C₄ das gramíneas tropicais, baixa persistência nas pastagens, suscetibilidade a doenças e principalmente o preço elevado das sementes ou material vegetativo.

Dentre os problemas relacionados à utilização de leguminosas pelos animais pode ser citada a aceitabilidade, a qual está relacionada com a presença de fatores antiqualitativos oriundos do metabolismo secundário da planta, designados neste caso de “fatores antinutricionais”. Alguns destes “fatores” são produtos do metabolismo secundário de fungos saprófitos ou parasitas de plantas que podem atuar de forma isolada ou em sinergismo com os fatores antinutricionais das forragens inibindo o consumo além de promover, facilitar ou ser a causa de doenças e/ou morte dos animais.

Devido ao exposto objetivou-se neste trabalho identificar as classes de metabólitos secundários de três espécies de leguminosas (*Macrotyloma axillare*, *Pueraria phaseoloides* e *Neonotonia wightii*) com ênfase na quantificação de taninos condensados, verificação da estabilidade de espuma “*in vitro*”. Concomitantemente foi realizada a identificação dos gêneros de fungos presentes nessas três espécies e no *Calopogonium mucunoides* (calopogônio) e *Arachis pintoi cv.amarillo* (amendoim forrageiro).

CAPÍTULO I

IDENTIFICAÇÃO DAS CLASSES DE FATORES ANTINUTRICIONAIS DE TRÊS ESPÉCIES DE LEGUMINOSAS

RESUMO

Objetivou-se neste trabalho realizar a prospecção fitoquímica auxiliada pela análise de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e Espectroscopia no Infravermelho (IV) de três espécies de leguminosas forrageiras *Macrotyloma axillare*, *Pueraria phaseoloides* e *Neonotonia wightii* para detectar as classes de metabólitos secundários (metabólitos especiais) conhecidas como fatores antinutricionais ou antiqualitativos e inclusive fazer uma comparação das classes de substâncias presentes nas três espécies de leguminosas estudadas. Buscou-se também identificar as diferenças quanto à presença de metabólitos no extrato metanólico bruto e nas partições hexânicas, acetato de etila e hidrometanólica. O extrato metanólico bruto foi obtido a partir de amostras de plantas seca e moída, submetida à extração com metanol através de maceração a frio e remoção do solvente, submetendo os extratos à destilação sob vácuo em aparelho rotavapor, colocando o resíduo para secar sob fluxo de ar até completar a evaporação do solvente. O resíduo do extrato metanólico foi dissolvido numa mistura metanol água (8:2) e submetido ao particionamento com hexano e acetato de etila, para obter as partições hexânicas, acetato de etila e hidrometanólica (resíduo remanescente no funil de separação) de cada extrato, que receberam o mesmo tratamento para secar conferido ao extrato metanólico bruto. O resíduo do extrato metanólico de cada leguminosa juntamente com o resíduo das partições obtidas foram submetidos a testes com reações cromogênicas específicas para detecção de 15 classes de metabólitos secundários, a saber: ácidos orgânicos, açúcares redutores, alcaloides, catequinas, depsídeos e depsidonas, derivado da cumarina, esteróides e triterpenóides, flavanóides, glicosídeos cardíacos, saponinas, sesquiterpenlactonas e outras lactonas, purinas, quinonas, sacarídeos e taninos. E com auxílio das imagens fornecidas pelas espectroscopias de RMN ^1H e IV foi possível a confirmação das classes de metabólitos especiais detectados pela prospecção química como: ácidos orgânicos, açúcares redutores, depsídeos e depsidonas, derivados da cumarina, esteróides e triterpenóides, glicosídeos cardíacos, saponina, sacarídeos, taninos nas três espécies estudadas. Entretanto foi detectado sinal compatível para a presença de alcalóides no kudzu tropical e na soja perene quando realizada a prospecção fitoquímica. O que sugere mais estudos e quantificação das substâncias contidas em cada classe encontradas para confirmação de seus efeitos antinutricionais.

Palavras-chave: Fator antiqualitativo. Metabólitos especiais de planta. Prospecção fitoquímica.

ABSTRACT

This work aimed performing phytochemical prospection by Nuclear Magnetic Resonance Analysis (NMRA) and Infrared Spectroscopy (IS) of Three forage legumes: species. *Macrotiloma axillare* (archer), *Pueraria phaseoloides* (puero) and *Neonotonia wightii* (perennial soybean) for detecting secondary metabolites classes (special metabolites) named antinutritional factors as well as antiqualitative ones and comparing legumes substance, at all. Differences in relation to crude methanol extract and hexanic partitionings, ethyl acetate and hidromethanol were also identified. Crude methanol extract was obtained from dry and ground plants samples under methanol extraction by maceration at room temperature and solvent removal submitting the extracts to destilation under vacuum rotavapor drying the residue under air flow tiell total solvent evaporation. For obtaining hexanic partitionings, ethyl acetate and hidromethanol (remaining residue on separation funnel) from each extract under the same crude methanol extract under the same crude methanol extract drying method, methanol residue into methanol: water (8:2) was dissolved. Methanol extract residue from each legume jointly to partitionings residues by cromogenic reactions tests were performed for detecting 15 secondary metabolites classes: organic acids, reducing sugars, alkaloids, catechins, depsidians and depsidones, coumarine derivatives, steroids and triterpenoids, flavanoids, cardiac glycosides, saponins, sesquiterpenlactones and other lactones, purines, quinones, saccharides and tannins. By Infrared Spectroscopy (IS) and Nuclear Magnetic Resonance Analysis(NMRA) secondary metabolites classes, such as organic acids, reducing sugars, depsidians and depsidians and depsidones, coumarine derivatives, steroids and triterpenoids cardiac glycosides, saponins, saccharides and tannins on three forage legumes were possibly corroborated. However, by phytochemical prospection, alkaloids presence on puero and perennial soybean was significative. It might be suggested further studies for corroborating antinutritional effects on forage legumes, at all.

Key words: Antiqualitative factor. Phytochemical prospection. Special metabolite.

1 INTRODUÇÃO

As duas principais estratégias empregadas pelas plantas para sobreviver são armazenamento de nutrientes e defesa contra ameaças externas, o que influencia diretamente seu valor nutritivo. No primeiro caso a planta armazena substâncias como carboidratos e amidos, durante seu crescimento vegetativo para serem utilizadas em períodos de frio ou de seca e para rebrotar após um corte ou pastejo. São substâncias altamente digestíveis. No segundo caso, a planta sintetiza compostos como: saponinas, fenóis, terpenóides e alcalóides e outros compostos químicos para conferir-lhe resistência ao vento, doenças, desfolhação, predadores, etc.

Os compostos produzidos no segundo caso, de forma geral, são de baixo valor nutritivo e estão relacionados com a diminuição da aceitabilidade das plantas forrageiras consumidas por animais, fato este que lhes confere a denominação de fatores “antinutricionais” ou “antiquantitativos” generalização dada a diversos compostos químicos que ocasionam uma diminuição do consumo, digestão e absorção do alimento pelo animal, causando uma diminuição do aproveitamento da forragem, repercutindo com a queda do desempenho produtivo e perdas econômicas para o produtor, além do envolvimento com patologias de ordem sistêmica comprometendo ainda mais o desempenho dos animais.

O uso de leguminosas em pastagens tem sido relacionado à melhora da qualidade do solo, por favorecer o controle da erosão com a melhoria das condições físicas deste, o que facilita a penetração das raízes e melhorando a infiltração e retenção da água, incremento de nitrogênio nos sistemas de pastagens, além de garantir a melhora na qualidade da dieta para ruminantes a pasto devido às características bromatológicas e agronômicas inerentes às leguminosas.

Porém um dos fatores que limita a utilização de leguminosas em pastagens é a presença de fatores tóxicos e/ou antinutricionais que, quando consumidos, podem causar respostas adversas para os animais, levando à piora dos parâmetros zootécnicos por estarem relacionados com a presença de distúrbios digestivos e/ou sistêmicos, o que ocasiona perdas de ordem econômica com diminuição do desempenho, custo com diagnóstico e tratamento, além custos referentes à reposição de animais.

Devido ao exposto objetivou-se neste trabalho identificar os metabólitos secundários de três espécies de leguminosas forrageiras tropicais, *Macrotyloma axillare* (macrotiloma), *Neonotonia wightii* (soja perene) e *Pueraria phaseoloides* (kudzu tropical), identificados como fatores antinutricionais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A produção de ruminantes no Brasil é essencialmente baseada no uso de pastagens. Portanto, o aumento da competitividade da pecuária passa pelo seu melhoramento quantitativo e qualitativo. A disponibilidade de gramíneas forrageiras com elevado potencial de produção de massa, vem contribuindo para esta finalidade devido ao aumento da produção e da capacidade de suporte das pastagens. Essas mesmas forrageiras, face ao seu elevado potencial de resposta à adubação, principalmente a nitrogenada, devido o nitrogênio (N) ser constituinte essencial das proteínas e por interferir diretamente no processo fotossintético, por meio de sua participação na molécula de clorofila, vem possibilitando o uso mais intensivo das pastagens e a obtenção de produtividades e rendimentos econômicos competitivos frente aos demais setores do agronegócio. Portanto, se o nitrogênio não for disponibilizado em quantidade suficiente, acarreta redução na produção de forragens e inicia o processo de degradação das pastagens (MEIRELLES, 1993 citado por SILVA e SALIBA, 2007).

Mesmo com a adoção de gramíneas mais produtivas persistem os fatores que influenciam e/ou limitam o desenvolvimento das pastagens, tais como aqueles referentes ao solo e clima, refletindo diretamente na sua disponibilidade. Ao contrário dos fatores do solo, não se pode modificar a maioria dos fatores climáticos, devendo-se adaptar a eles os sistemas de produção. O crescimento das forrageiras tropicais (ciclo C₄) é desuniforme ao longo do ano, com estacionalidade de produção da ordem de 80:20, isto é, 80% da produção concentra-se nos meses quentes e úmidos do ano (outubro a abril) e os 20% restantes no período de abril a outubro (HADDAD e ALVES, 2002).

Essa alternância de produção de forragem tem sido alvo de vários estudos, em decorrência de sua grande importância nos sistemas de produção animal baseados em pastejo. Isso dificulta o planejamento forrageiro ao longo do ano, tornando muito difícil o ajuste da taxa de lotação com base na capacidade de suporte, uma vez que a taxa de lotação é calculada com base na disponibilidade da forragem (SPAIN e PEREIRA, 1985). Os principais fatores envolvidos na estacionalidade são: características fisiológicas da planta forrageira, deficiência hídrica, radiação solar (qualidade e intensidade), fotoperíodo e temperatura do ar. Embora a radiação solar e a temperatura do ar sejam igualmente importantes para a produção de biomassa, esses atributos representam papéis diferentes na ecofisiologia vegetal. A radiação é a fonte da energia que é convertida em biomassa vegetal e a temperatura está associada à eficiência dos processos metabólicos envolvidos nessa conversão, alterando o desempenho de várias enzimas (COSTA et al., 2005).

Os fatores relacionados ao solo, dentre os quais se encontra sua composição química, podem ser corrigidos e/ou melhorados com aplicação de fertilizantes, sendo que o potencial produtivo das forrageiras em sistema de pastagem pode ser influenciado notadamente com a aplicação de fertilizantes nitrogenados (RESTLE et al., 2000; COSTA et al., 2006). Porém, sua utilização tem sido limitada pelo custo, em virtude da extensão das áreas envolvidas e da necessidade de aplicações freqüentes (DÖBEREINER, 1997).

A utilização de leguminosas forrageiras em consórcio com gramíneas apresenta-se como um fator de melhoramento da capacidade produtiva das pastagens o que é demonstrado por vários trabalhos (SPAIN e PEREIRA, 1985; CANTARUTTI e BODDEY, 1997; SILVA e SALIBA, 2007). Porém o plantio de leguminosas, seja em monocultivo seja em consórcio com gramíneas, é prática pouco adotada pelos produtores.

Os benefícios proporcionados à pastagem pelas leguminosas são inúmeros. Além de aumentarem, de forma econômica o aporte de nitrogênio, pela fixação biológica, contribui diretamente com o maior valor alimentício da dieta, e pelo maior consumo de forragem, comparado com pastagens exclusivas de gramíneas, isso porque os cultivares de gramíneas tropicais apresentam uma grande variação ao longo do ano na quantidade e no seu valor nutritivo,

em especial nos teores de proteína e digestibilidade o que, segundo Carvalho e Pires (2008) estão diretamente relacionados aos teores de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) que limitam diretamente o consumo e ocasionam diminuição do desempenho animal.

Na época seca, o teor de proteína bruta (PB) das gramíneas situa-se bem abaixo do valor crítico para o crescimento dos microorganismos do rúmen (6-8% de PB na MS) assim, o déficit de proteína na dieta, manifesta-se inicialmente como déficit de energia uma vez que compromete a degradação da forragem, afetando o desempenho animal. Neste caso, as leguminosas na pastagem consorciada, por apresentarem maiores teores de PB e menores magnitudes nas variações dos caracteres nutricionais ao longo do ano, exercem papel importante na suplementação protéica de baixo custo (PACIULLO et al., 2003) apresentando-se como uma alternativa viável aos sistemas de produção animal a pasto.

A aceitabilidade das leguminosas está relacionada diretamente à presença de metabólitos secundários na forragem que, dependendo da sua estrutura química e concentração, podem constituir para os herbívoros que as consomem “fator antinutricional” termo utilizado por (GONTZEA e SUTZESCU, 1968 citado por CASSO e MONTERO, 2008) para designar substâncias naturais não fibrosas produzidas pelo metabolismo secundário de plantas, como mecanismo de defesa ao ataque de fungos, bactérias, insetos e pássaros, ou em alguns casos, produtos do metabolismo das plantas submetidas a condições de estresses (GOBBO-NETO e LOPES, 2007) que estando contido em ingredientes utilizados na alimentação animal exercem efeito contrários a sua ótima nutrição, reduzindo o consumo e impedindo a digestão, absorção e a utilização de nutrientes pelo animal.

Os metabólitos apresentam natureza, mecanismo de ação, potência e efeito variado, além de ampla distribuição no reino vegetal. E se ingeridos em altas concentrações, podem acarretar em efeitos danosos à saúde (SANTOS, 2006). Esses metabólitos diferenciam dos metabólitos primários, devido a sua função e atividade na planta, não possuindo nenhuma função direta com seu crescimento, desenvolvimento, relacionamento com a fotossíntese, respiração, transporte de soluto, translocação, síntese de proteínas, assimilação de nutrientes, diferenciação ou síntese de carboidrato, proteínas e lipídios, além de possuírem distribuições restritas a uma espécie vegetal ou a um grupo de espécies relacionadas, enquanto os metabólitos primários são encontrados em todo o reino vegetal. Sua função nos vegetais esta relacionada à proteção contra os herbívoros (herbivoria) e infecção por microorganismos patogênicos além de atuar como atrativos para animais polinizadores e dispersores de sementes, bem como agente de competição entre plantas.

No entanto, os compostos secundários são partes integrantes das interações nas comunidades de espécies de plantas e animais. Pesquisas sobre compostos secundários de plantas em forragens tem se concentrado em seus efeitos tóxicos e antinutricional para o gado. Givens et al., (2000) classificaram estes metabólitos em dois grupos de acordo com seus efeitos. Assim tem-se:

- Compostos tóxicos que estão presentes em baixa concentração (geralmente menos que 20g kg⁻¹ da matéria seca) e tem efeitos fisiológicos negativos quando absorvido tais como problemas neurológicos, falência reprodutiva, bócio, gangrena, outras doenças e morte do animal. Como exemplo tem os alcalóides, glicosídeos cianogênicos, aminoácidos tóxicos, saponinas, isoflavonas e muitos outros.
- Compostos não tóxicos que estão presentes em altas concentrações (em quantidade maior que 20g kg⁻¹) seus efeitos relacionam-se com a diminuição da digestibilidade e palatabilidade das plantas e estão envolvidos com efeitos negativos em sítios de atividades digestivas primárias no trato digestivo ou em todos os órgãos sensoriais associados com comportamento alimentar, nesta classe estão incluídos: lignina, tanino, cutina, sílica biogênica e terpenóides voláteis. Enquanto a lignina, sílica e cutina são compostos que têm função estrutural nas plantas e que diminuem a extensão da degradabilidade microbiana da parede polissacarídica, a função primária dos taninos e terpenóides está relacionada à defesa contra predadores.

A divisão entre estes grupos não é bem definida. Por exemplo, taninos hidrolisáveis são potencialmente tóxicos para ruminantes, porque as tanases microbianas que hidrolisam éster gálico estão presentes no rúmen. O ácido gálico liberado é rapidamente metabolizado para fenóis potencialmente tóxicos que são absorvidos no rúmen.

No entanto, compostos secundários em forragens são também associados com melhoras nos valores nutritivos e podem ter efeitos benéficos na saúde e desempenho do animal. Exemplo: o tanino condensado que na literatura sobre nutrição animal está correlacionado com benefício como aumento na quantidade de proteínas que chegam ao intestino para ser degradadas, proteção contra timpanismo espumoso causado por leguminosas e proteção dos ruminantes contra helmintíases.

Na medicina humana e animal tem ocorrido um crescente interesse pelos efeitos na promoção de saúde ocasionados pelos metabólitos secundários. O que tem induzido pesquisas para avaliar o potencial de cada metabólito na prevenção ou tratamento de câncer, além de distúrbio circulatório e infecção viral. Os mecanismos que os metabólitos secundários induzem efeitos benéficos à saúde são provavelmente os mesmos dos seus efeitos tóxicos, e a diferença entre toxicidade e efeito benéfico são provavelmente doses dependentes.

Outro benefício promovido pelos metabólitos secundários é a mitigação do metano produzido por ruminantes, onde a metanogênese ruminal representa perdas de 2 a 12% da energia consumida pelo animal durante o dia e as leguminosas taníferas tem mostrado contribuição na diminuição de metano produzido por ruminantes, o que contribui ainda mais com o aproveitamento da energia conferida pelo alimento (REIS et al., 2006; LONGO, 2007).

A alimentação com leguminosas que contêm taninos condensados aumenta o fluxo de passagem de aminoácidos essenciais para o duodeno, digestibilidade aparente da proteína verdadeira, apresentando diminuição das perdas urinária de N suficiente para compensar a grande perda de N nas fezes, redução da concentração de amônio e perdas da energia devido à produção de metano (WAGHORN, 2008). Mostrando que a inclusão de taninos condensados de leguminosas pode melhorar a utilização de proteínas. Os taninos de algumas plantas forrageiras podem produzir efeitos benéficos quando utilizados em quantidades de 30-40g.kg⁻¹ de MS na dieta, já em quantidades acima de 50g.kg⁻¹ de MS são tóxicas para os animais e níveis acima de 90g.kg⁻¹ MS podem levá-los à morte (PINEDO et al, 2008).

Apesar dos efeitos benéficos proporcionados pela ingestão de metabólitos secundários sobre a nutrição e atividade antiparasitária, estes nem sempre ocasionam necessariamente efeitos positivos em animais parasitados. O consumo excessivo de metabólitos secundários pode afetar negativamente o bom estado e sobrevivência dos herbívoros, através das suas propriedades antinutricionais, sugere-se então que as propriedades antiparasitárias dos metabólitos secundários devam ser avaliadas ao mesmo tempo com o desempenho animal. Assim, o benefício do efeito antiparasitário dos metabólitos secundários de plantas, beneficiaria os herbívoros apenas se os custos com medicamentos antiparasitários superassem os custos para opor os efeitos antinutricionais conferidos pelos metabólitos secundários (ATHANASIADOU e KYRIAZAKIS, 2004).

Em monogástricos níveis maiores que 1% de taninos condensados na dieta podem trazer prejuízos para produção, afetando principalmente o consumo, digestibilidade de proteína e dos aminoácidos essenciais. Porém, os ruminantes são mais tolerantes aos taninos, pois a ação dos microorganismos do rúmen diminui os efeitos negativos destes compostos tóxicos, transformando-os em substâncias inócuas, desta forma o rúmen funciona como primeira barreira de defesa contra substâncias tóxicas (RIET-CORREA e MEDEIROS, 2001; AGUDELO, 2007).

Por outro lado os microorganismos podem converter substâncias inócuas em substâncias potencialmente tóxicas para o organismo. Além do mais, a microbiota do rúmen tem capacidade de adaptar-se de forma gradual a ingestão prolongada de certos compostos dando origem a substâncias intermediárias ou finais que são absorvidas pelo trato gastrointestinal ou eliminadas pela matéria fecal, sendo que, o efeito que estes compostos podem exercer sobre o próprio rúmen ou animal

dependerá do tipo e quantidade de metabólito produzido e da absorção intestinal do composto original e dos metabólitos ruminais (AGUDELO, 2007). Exemplo do que ocorre com o metabólito secundário formononetina (um fitoestrógeno) que possui um efeito estrogênico menor que outras isoflavonas, porém quando metabolizado pela microbiota ruminal em equol, transforma-se em um potente estrógeno (GIVENS et al., 2000).

À medida que, os metabólitos secundários exercem efeitos sistêmicos além dos efeitos sobre o consumo, a digestão e a absorção funcionam como fatores antiqualitativos devido a sua relação com a diminuição no desempenho produtivo ou reprodutivo do animal.

Assim, como as plantas possuem mecanismos de defesa em resposta ao ataque de herbívoro e patógenos, os animais possuem vários mecanismos para anular ou restringir o efeito tóxico ou negativo dos compostos secundários de plantas uma vez ingeridos. A necessidade de eliminação rápida da toxina faz com que ovinos, caprinos e bovinos induzem vômito em resposta a ingestão de toxinas, mas isto raramente é observado. Cavalos provavelmente não vomitam, exceto quando perto da morte, mas comumente padecem de diarreia. A diarreia ajuda na rápida eliminação de toxinas a partir da flora intestinal que pode reduzir a absorção. Em alguns episódios de diarreia, há uma diminuição da motilidade intestinal, reduzindo ainda mais a absorção de toxinas (LAUNCHBAUGH, 2001). Caprinos particularmente, possuem defesas fisiológicas tais como secreção bucal de salivas com elevadas proporções de prolina e hidroxiprolina, adaptação das bactérias ruminais para degradar compostos nitrogenados não protéicos, conjugação dos cianetos com o enxofre endógeno e a hidrólise ácida dos glicosídeos saponínicos como mecanismos para contrapor as elevadas doses de fenóis, alcalóides, cianeto e saponinas, respectivamente (GARCÍA, 2004 citado por BALDIZÁN, et al., 2006).

As leguminosas kudzu tropical (*Pueraria phaseoloides*), soja perene (*Neonotonia wightii*) e macrotiloma (*Macrotyloma axillare*) estão relacionadas com uma notável produção de matéria seca e proteína bruta, conforme citados por Pádua et al., (2006) que encontraram uma produção de 6,03; 4,6 e 6,82 toneladas de matéria seca em apenas um corte e teores de proteína bruta de 15,42; 16,46 e 15,15 para o macrotiloma, soja perene e kudzu tropical respectivamente o que propicia seu consorciamento com gramíneas.

A caracterização química integral de leguminosas, assim como o conhecimento dos fatores antinutricionais associados, facilitará um maior e/ou melhor, aproveitamento dos benefícios da adoção de leguminosas em sistemas de pastagens.

A prospecção fitoquímica pode ser utilizada para verificar a classe dos compostos secundários presente em plantas de uma maneira geral, porém o resultado pode ser mascarado pela cor do sistema formado durante a análise química, daí a importância da utilização de métodos físicos como a Ressonância Magnética Nuclear ^1H (RMN ^1H) e Espectrometria no infravermelho (IV) que, em muitos casos pode-se confirmar a ou excluir a presença de determinada classe de metabólitos secundários detectada quimicamente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Setor de Forragicultura do Departamento de Nutrição Animal e Pastagens do Instituto de Zootecnia e nas dependências dos Laboratórios de Química de Produto Naturais, Ressonância Magnética de Hidrogênio e Infravermelho do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

3.1 Cultivo das Leguminosas.

As leguminosas estudadas foram plantadas em janeiro de 2006. A adubação realizada nos canteiros seguiu-se as recomendações do Boletim Técnico 100, IAC (1996), onde foram aplicados 250kg de P_2O_5 e 100kg.ha⁻¹ de KCl, nas linhas de plantio. Nos meses de junho e julho de 2007 passaram por um corte de uniformização e uma adubação de cobertura consistindo de aplicação de 100kg.ha⁻¹ de P_2O_5 e 100kg.ha⁻¹ de KCl.

3.2 Prospecção Fitoquímica.

As partes aéreas das leguminosas forrageiras [*Pueraria phaseoloides*, (kudzu tropical), *Neonotonia wightii* (soja perene) e *Macrotyloma axillare* (macrotiloma)] foram colhidas em setembro de 2007 sendo posta para secar ao sol até atingir o ponto de feno. Devido alto teor de umidade do *Macrotiloma*, este foi posto para completar a secagem em estufa ventilada sob temperatura de 55°C por 16h. As amostras foram moídas em moinho tipo willey em partículas de 1mm e levadas ao Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN) para preparo dos extratos e partições.

O material moído das três leguminosas foram acondicionados em recipiente de vidro nas seguintes quantidades de 2,296kg de kudzu tropical, 2,206kg de macrotiloma e 1,758kg de soja perene, utilizando metanol como solvente até cobertura total do material durante 7 dias para início da extração. Foram feitas extrações sucessivas a cada 7 dias até exaustão do material.

A solução obtida, após filtração, foi concentrada em rotavapor sob pressão reduzida e o resíduo do balão foi colocado em recipiente aberto sob secador com fluxo de ar contínuo, para completar a remoção do solvente. Deste procedimento foram obtidos os resíduos correspondentes aos extratos metanólico bruto: do kudzu tropical (KtM, 114,13g); do macrotiloma (MaM, 228,16g) e da soja perene (SpM, 131,1g). Onde KtM, MaM e SpM, significam respectivamente extrato metanólico bruto do kudzu tropical, extrato metanólico bruto do macrotiloma e extrato metanólico bruto da soja perene.

Porém o extrato bruto de plantas, mesmo quando se utilizam solventes pouco polares, podem ser muitos complexos e ricos em diversos componentes, de modo geral, dificilmente separáveis. Sua análise cromatográfica direta, via de regra, torna-se extremamente trabalhosa. Quando o extrato total é feito utilizando solventes polares, maior ainda é sua complexidade, cuja separação é complicada pela presença de resinas e outros polímeros. O uso prévio de coluna filtrante ou outro meio adequado permite conseguir, com relativa facilidade, seu fracionamento em misturas menos complexas e mais facilmente trabalháveis. Neste processo, as lavagens com solventes de polaridades diferentes, retiram da mistura, em etapas sucessivas, grupos de substâncias cujas propriedades são relativamente próximas, além de facilitar as observações cromatográficas (MATOS, 1988) e, por conseguinte as análises pelos métodos químicos e físicos. Daí a justificativa da realização do fracionamento ou particionamento dos extratos metanólicos das leguminosas.

Para particionamento dos extratos de cada leguminosa foram utilizados respectivamente, 66,49g do KtM; 89,59g do MaM e 102,12g do SpM, por partição líquido-líquido em funil de separação, lavando-se o extrato diluído em metanol água (8:2) com hexano e em seguida com

acetato de etila. O filtrado foi recolhido e posteriormente concentrado. Obtendo-se nesta ordem os rendimentos das partições: 19,62g para a partição hexânica do kudzu tropical (KtMH), 10,08g para a partição hexânica do macrotiloma (MaMH), 29,9g para a partição hexânica da soja perene (SpMH). 14,17g para a partição acetato de etila do kudzu tropical (KtMAC); 34,98g correspondendo a partição acetato de etila do macrotiloma (MaMAC) e 10,22g para a partição acetato de etila da soja perene (SpMAC).

O resíduo remanescente no funil de separação correspondeu à partição hidrometanólica de cada leguminosa, onde após concentração forneceu 11,65g para partição hidrometanólica do kudzu tropical (KtMM), 17,99g para a partição hidrometanólica do macrotiloma (MaMM) e 19,4g correspondente a partição hidrometanólica da soja perene (SpMM).

Os extratos e as partições de cada extrato das leguminosas foram submetidos à prospecção fitoquímica visando à identificação das classes de metabólitos secundários presentes, de acordo com as metodologias citadas por Barbosa (2001) (Anexo A). Os métodos físicos de análise orgânica, Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN ^1H) e Espectroscopia no Infravermelho (IV) foram utilizados para auxiliar nas conclusões observadas nos testes realizados em tubos de ensaio (reações químicas).

Os resultados foram qualificados por sistema de cruces onde: (+++) = presença grande, (++) = presença notável, (+) = presença leve, (-) = ausência ou resultado inconclusivo para cada classe de metabólito secundário avaliada. A interpretação das colorações e/ou precipitado foi realizada por dois avaliadores.

3.3 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN ^1H) e Infravermelho (IV)

Para a obtenção dos espectros de RMN ^1H cerca de 10mg das amostras (extrato bruto e partições) foram dissolvidas em clorofórmio deuterado (CDCl_3), metanol deuterado (D_3COD) ou dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-D_6), de acordo com a polaridade do material, colocadas em seguida em um tubo de vidro especial (15x5mm) e colocado no probe do equipamento para registro dos espectros, cuja escala foi expressa em ppm(\square). Para obter os espectros de IV, as amostras (cerca de 2mg) foram misturadas com brometo de potássio (KBr), triturados e submetidas a pressão para obter a pastilha transparente, que foi posicionada para receber o feixe de luz da região entre $600\text{--}4000\text{Cm}^{-1}$ em aparelho IVTF marca NICOLET-modelo-6700.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise da Prospecção Fitoquímica e dos Espectros de RMN ¹H e IV

A presença das classes dos metabólitos secundários do extrato metanólico e das partições hexânicas, acetato de etila e hidrometanólica foi analisada em conjunto com a RMN¹H e IV, para cada leguminosa.

Na Tabela 1 na primeira coluna, estão relacionadas às classes de metabólitos secundários presentes no extrato metanólico, e nas partições hexânicas, acetato de etila e hidrometanólica do kudzu tropical onde, o extrato metanólico do kudzu tropical (KtM) apresentou informações químicas que puderam ser usadas como indicativas da presença de ácidos orgânicos, açúcares redutores, depsídeos e depsidonas, derivados da cumarina, esteróides e triterpenóides, glicosídeos cardíacos, saponina, sacarídeos e taninos. A partição hexânica (KtMH) apresentou ácidos orgânicos, açúcares redutores, depsídeos e depsidonas, esteróides e triterpenóides, saponinas, sacarídeos. Enquanto a partição acetato de etila (KtMAC) apresentou ácidos orgânicos, açúcares redutores, depsídeos e depsidonas, derivado da cumarina, saponinas, sacarídeos e taninos. A partição hidrometanólica (KtMM) apresentou sinais compatíveis para a presença de ácidos orgânicos, açúcares redutores, alcalóides, depsídeos e depsidonas, derivado da cumarina, esteróides e triterpenóides, glicosídeos cardíacos saponinas, sacarídeos e taninos. Apesar dessas confirmações deve-se considerar as informações obtidas com os espectros de RMN figuras 1, 2, 3 e 4 anexo B (colunas 2) e espectros de IV figuras 1, 2, 3 e 4. anexo C (coluna 3) de cada material cujas informações podem ser consideradas com maior segurança, uma vez que durante a realização da prospecção fitoquímica podem obter resultados com aspectos de difícil interpretação ou mascaramento de colorações.

Tabela-1 Resultado dos ensaios qualitativos da Prospecção fitoquímica (Prosp.) com auxílio da Ressonância Magnética Nuclear ^1H (RMN ^1H) e Infravermelho (IV) do extrato e partições do kudzu tropical (*Pueraria phaseoloides*).

Metabólito	KtM			KtMH			KtMAC			KtMM		
	Prosp.	RMN ^1H	IV	Prosp.	RMN ^1H	IV	Prosp.	RMN ^1H	IV	Prosp.	RMN ^1H	IV
Ácidos orgânicos	+++	-	+++	+	+++	-	-	-	++	-	-	++
Açúcares redutores	+++	+	+++	++	+	++	++	++	+	+++	+	+
Alcalóides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catequinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Depsídeos e depsídonas	+	-	-	++	-	-	+	+	-	++	-	-
Derivados da cumarina	++	-	+	-	-	-	++	-	-	+	-	-
Esteróides e triterpenóides	+++	-	++	+++	+++	+	-	-	-	+++	-	-
Flavanóides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicosídeos cardíacos	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-
Saponina	+++	-	+	+++	+++	+	+++	+	+	+++	-	+
Sesquiterpenlactonas e outras lactonas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Purinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Quinonas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarídeos	-	+	+	-	+	+	+++	++	+	-	++	+
Taninos	++	-	+	-	-	-	++	+	+	++	-	+

Respectivamente (++++) presença grande, (+++) presença notável, (+) presença leve e (-) ausência ou resultado inconclusivo. KtM= extrato metanólico do kudzu tropical, KtMH= partição hexânica do extrato metanólico do kudzu tropical, KtMAC= partição acetato de etila do extrato metanólico do kudzu tropical, KtMM= partição hidrometanólica do extrato metanólico do kudzu tropical.

Na Tabela 2 na primeira coluna, estão relacionadas às classes de metabólitos secundários presentes no extrato metanólico, e nas partições hexânicas, acetato de etila e hidrometanólica do macrotiloma onde o extrato metanólico (MaM) apresentou informações químicas que puderam ser usadas como indicativas da presença de ácidos orgânicos, açúcares redutores, depsídios e depsidonas, derivados da cumarina, esteróides e triterpenóides, saponina, sacarídeos e taninos. A partição hexânica (MaMH) apresentou ácidos orgânicos, açúcares redutores, depsídios e depsidonas, esteróides e triterpenóides, saponinas, sacarídeos. Enquanto a partição acetato de etila (MaMAC) apresentou ácidos orgânicos, açúcares redutores, depsídios e depsidonas, derivados da cumarina, esteróides e triterpenóides, saponinas, sacarídeos e taninos, a partição hidrometanólica (MaMM) apresentou sinais compatíveis para a presença de ácidos orgânicos, açúcares redutores, depsídios e depsidonas, derivado da cumarina, esteróides e triterpenóides, glicosídeos cardíacos saponinas, sacarídeos e taninos. Os espectros de RMN ^1H (coluna 2), Figuras 5, 6, 7 e 8 anexo B e IV (Figuras 5, 6, 7, 8 anexo C (coluna 3) foram usados para reavaliar as conclusões relacionadas na coluna 1, pelas mesmas razões citadas para o kudzu tropical.

Tabela-2 Resultado dos ensaios qualitativos da Prospecção fitoquímica (Prosp.) com auxílio da Ressonância Magnética Nuclear ^1H (RMN ^1H) e Infravermelho (IV) do extrato e partições do macrofitoma (*Macrotyloma axillare*).

Metabólito Secundário	MaM			MaMH			MaMAC			MaMM		
	Prosp.	RMN ^1H	IV	Prosp.	RMN ^1H	IV	Prosp.	RMN ^1H	IV	Prosp.	RMN ^1H	IV
Ácidos orgânicos	+++	+++	+++	-	-	++	-	-	+++	-	-	+++
Açúcares redutores	+++	+	++	+++	++	+	-	++	++	+++	+	+
Alcalóides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catequinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Depsídeos e Depsídonas	++	-	-	++	-	-	+++	-	++	++	-	-
Derivados da cumarina	+	-	-	+	-	-	+++	-	-	+	+	-
Esteróides e triterpenóides	+++	+++	+	++	-	+	-	-	++	++	-	-
Flavanóides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicosídeos cardíacos	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+++	++	-
Saponina	+++	+++	+++	+++	-	++	+++	-	++	+++	-	++
Sesquiterpenlactonas e outras lactonas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Purinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Quinonas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarídeos	+	+	+	+	+	+	+++	+	++	+++	+	++
Taninos	+++	-	-	-	-	-	+++	-	+	+++	-	-

Respectivamente (+++) presença grande, (++) presença notável, (+) presença leve e (-) ausência ou resultado inconclusivo.

MaM = extrato metanólico do macrofitoma, MaMH= partição hexânica do extrato metanólico do macrofitoma, MaMAC = partição acetato de etila do extrato metanólico do macrofitoma e MaMM = partição hidrometanólica do extrato metanólico do macrofitoma

Na Tabela 3 na primeira coluna, estão relacionadas às classes de metabólitos secundários presente no extrato metanólico, e nas partições hexânicas, acetato de etila e hidrometanólica da soja perene onde o extrato metanólico (SpM) apresentou informações químicas que puderam ser usadas como indicativas da presença de ácidos orgânicos, açúcares redutores, depsídios e depsidonas, derivados da cumarina, esteróides e triterpenóides, glicosídeos cardíacos, saponina, sacarídeos e taninos. A partição hexânica (SpMH) apresentou ácidos orgânicos, açúcares redutores, alcalóides, depsídios e depsidonas, esteróides e triterpenóides, saponinas, sacarídeos e taninos. Enquanto a partição acetato de etila (SpMAC) apresentou ácidos orgânicos, açúcares redutores, depsídios e depsidonas, derivados da cumarina, esteróides e triterpenóides, glicosídeos cardíacos, saponinas, sacarídeos e taninos, a partição hidrometanólica (SpMM) apresentou sinais compatíveis para a presença de ácidos orgânicos, açúcares redutores, depsídios e depsidonas, derivados da cumarina, esteróides e triterpenóides, glicosídeos cardíacos, saponinas, sacarídeos e taninos. Considerando as razões relacionadas para os casos anteriores, sobre a segurança de interpretações dos resultados nas análises químicas, fez-se análises com espectros de RMN ^1H , Figuras 9, 10, 11 e 12 anexo B, (coluna 2, Tabela 3) e IV, Figuras 9, 10, 11 e 12 anexo C (coluna 3, Tabela 3).

Tabela-3 Resultado dos ensaios qualitativos da Prospecção fitoquímica (Prosp.) com auxílio da Ressonância Magnética Nuclear ^1H (RMN ^1H) e Infravermelho (IV) do extrato e partições da Soja perene (*Neonotoma wightii*).

Metabólito Secundário	SpM			SpMH			SpMAC			SpMM		
	Prosp.	RMN ^1H	IV	Prosp.	RMN ^1H	IV	Prosp.	RMN ^1H	IV	Prosp.	RMN ^1H	IV
Ácidos orgânicos	+	-	+++	-	++	-	-	++	++	-	-	++
Açúcares redutores	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Alcalóides	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
Catequinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Depsídeos e	++	-	-	+++	-	+	++	-	+	+	-	-
Depsidonas												
Derivados da cumarina	+	-	-	-	-	-	++	-	-	+	-	-
Esteróides e triterpenóides	+++	-	++	+++	+++	++	-	+	+	+	-	+
Flavanóides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicosídeos cardíacos	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+++	-	+++
Saponina	++	-	+	++	+++	+	+++	++	+	+++	-	+++
Sesquiterpenlactonas e outras lactonas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Purinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Quinonas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarídeos	-	+	+	+++	++	-	-	++	+	-	+++	+
Taninos	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+

Respectivamente (++++) presença grande, (+++) presença notável, (+) presença leve e (-) ausência ou resultado inconclusivo.

SpM= extrato metanólico da soja perene, SpMH= partição hexânica do extrato metanólico da soja perene, SpMAC= partição acetato de etila do extrato metanólico da soja perene e SpMM= partição hidrometanólica do extrato metanólico da soja perene

4.2 Diferença entre as espécies

Na Tabela 4 estão representadas as classes de metabólitos secundários presentes nas três espécies estudadas revelando a presença de ácidos orgânicos, açúcares redutores, depsídeos e depsídonas, derivados da cumarina, esteróides e triterpenóides, glicosídeos cardíacos, saponinas, sacarídeos e taninos, enquanto que alcalóide foi confirmado apenas no kudzu tropical e soja perene.

As classes de metabólitos estudadas como catequinas, flavanóides, sesquiterpenlactonas e outras lactonas, purinas e quinonas obteve-se resultado negativo ou inconclusivo (-) estando este resultado relacionado com a dificuldade de interpretação ou devido ao mascaramento das reações formadas pela coloração adquirida pela reação durante as análises químicas e/ou interpolação das substâncias com mesma função química durante as análises dos testes físicos.

Tabela 4 Resultado final dos ensaios qualitativos da Prospecção fitoquímica, Ressonância Magnética Nuclear ^1H (RMN ^1H) e Infravermelho (IV) dos extratos e partições do kudzu tropical macrotiloma e soja perene.

Metabólito Secundário	leguminosas		
	Kudzu tropical	Macrotiloma	Soja perene
Ácidos orgânicos	+++	+++	++
Açúcares redutores	+++	+++	+++
Alcalóides	+	-	+
Catequinas	-	-	-
Depsídeos e Depsídonas	+	++	++
Derivados da cumarina	+	+	+
Esteróides e triterpenóides	++	++	+++
Flavanóides	-	-	-
Glicosídeos cardíacos	+	+	+
Saponina	+++	+++	+++
Sesquiterpenlactonas e outras lactonas	-	-	-
Purinas	-	-	-
Quinonas	-	-	-
Sacarídeos	++	+++	++
Taninos	++	++	+

Respectivamente (+++) presença grande, (++) presença notável, (+) presença leve e (-) ausência ou resultado inconclusivo para a classe de substância estudada.

4.3 Considerações Sobre os Efeitos dos Metabólitos Secundários.

A presença de metabólitos secundários que atuam como fatores antinutricionais e/ou antiqualitativos em forrageiras, à medida que provocam os efeitos negativos, seja individual seja em rebanho, ocasionam perda na produção, reprodução, morbidade ou mortalidade gerando prejuízos, dependente do valor do animal ou do rebanho.

Os taninos têm sido apontados como o principal fator que diferencia as leguminosas quanto à aceitabilidade pelos animais (REED, 1995; BEELEN, 2002;) além da redução da atividade fibrolítica e influência sobre a microbiota ruminal (BEELEN, et al., 2006; LEMPP, 2007). Já as saponinas formam espumas estáveis ao entrarem em contato com a água conferindo um poder timpânico, reduzindo a fermentação além de estarem envolvidas com o quadro de fotossensibilização hepatógena e conferirem sabor amargo, o qual reduz a aceitabilidade e consumo voluntário da forrageira (RAMOS et al, 1998).

Quanto à detecção de depsídeos e depsidonas nestas leguminosas estes constituintes químicos são conhecidos por serem responsáveis pelo sabor amargo que conferem às plantas (BARAÚNA e ROCHA, 2006) o que podem estar relacionado com a seletividade destas forragens ou atuar em conjunto com taninos e saponinas.

A presença de esteróides e triterpenóides nessas leguminosas pode estar relacionada ao baixo desempenho reprodutivo do rebanho devido estes metabólitos serem reconhecidos pelo seu efeito anticonceptivo o que influencia diretamente a reprodução animal (FRACARO, 2004), mas, entretanto, sem segurança nessa hipótese. Efeito também conferido pelas cumarinas, que teve presença confirmada nestas espécies de leguminosas que além da propriedade estrogênica ainda possui atividade antifúngica (AGUDELO, 2007).

Os ácidos orgânicos nestas leguminosas podem estar relacionados com a formação de cálculos renais e inibição da absorção do cálcio (PROSPERO et al, 1999). Já os alcalóides podem confirmar alterações na apreensão e mastigação do alimento, presença transitória de fezes pastosas ou amolecidas, além de sintomatologia nervosa e morte súbita (SOUSA e IRIGOYEN, 1999).

A presença de alguns sacarídeos em forrageiras pode ter efeito negativo pronunciado em monogástricos. Como exemplo pode-se citar o efeito dos sacarídeos (rafinose, estaquiase e verbascose) envolvidos com flatulência, cólica e desconforto intestinal em monogástricos e humanos (OLIVEIRA et al., 2001).

Os açúcares redutores tornam problemas principalmente para equinos alimentados com grandes quantidades de concentrados onde os carboidratos não estruturais são consumidos em grandes quantidades, escapam à hidrólise no intestino delgado e passam para o intestino grosso onde irão fermentar rapidamente, produzindo excesso de gases e ácido láctico. A alta concentração de ácido láctico retém água e reduz o pH luminal para valores inferiores a seis, aumentando o risco de desordens digestivas, como diarreia osmótica, e cólicas associadas à distensão intestinal por gases e fluidos (COHEN et al., 1999).

O teor de nutrientes dos alimentos confere o seu valor nutritivo, mas sofrem interferência com a presença de fatores antinutricionais cujas análises nem sempre são consideradas. Um exemplo disso é a complexação de proteínas por compostos fenólicos. Em outras situações, esses compostos indesejáveis, podem não interferir diretamente no valor nutritivo, mas provocar inibição do consumo da forragem pelo animal.

5 CONCLUSÕES

Considerando as classes de metabólitos secundários citadas como fatores antinutricionais, e a presença confirmada de algumas dessas classes no kudzu tropical, soja perene e macrotiloma, nossas análises permitem sugerir que estas leguminosas são passíveis de produzirem esses efeitos antinutricionais quando consumidas pelo animal. Pois detectamos a presença de taninos, saponinas que são considerados os mais significativos para esses efeitos.

As demais classes de metabólitos secundários (ácidos orgânicos, açúcares redutores, derivados da cumarina, depsídeos e depsidonas, alcalóides, esteróides e triterpenioides e glicosídeos cardíacos) por estarem fora das classes de nutrientes tradicionais (aminoácidos, lipídios, vitaminas, minerais, carboidratos) podem causar efeitos adversos, entretanto para serem considerados como fatores antinutricionais teriam que se fazer uma análise quantitativa mais detalhada com monitoramento usando animais. Além da identificação das substâncias encontradas em cada classe.

Considerando os espectros RMN ^1H e IV do extrato metanólico do macrotiloma, e das partições hexânica e acetato de etila da soja perene e do kudzu tropical, estes sugerem estudos mais detalhados como Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN ^{13}C) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando padrões para identificação mais minuciosa das substâncias presentes em cada classe de composto visualizada.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUDELO, J. C. C. Efecto de la utilización de arbóreas y arbustivas forrajeras sobre a dinâmica digestiva em bovinos. *Revista Lassalista de Invetigación*. v. 4, n. 1, p. 39-50, 2007.
- ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I. Plant secondary metabolites: antiparasitic effects and their role in ruminant production systems. *Proceedings of the Nutrition Society*. v. 63, p. 631–639, 2004.
- BALDIZÁN, A; CARLOS DOMÍNGUEZ, C.; GARCÍA, D. E.; EDUARDO CHACÓN, E.; L. AGUILAR, L. Metabolitos secundarios y patrón de selección de dietas en el bosque decido tropical de los llanos centrales venezolanos. *Zootecnia Tropical*. v. 24, n. 3, p 213-232, 2006.
- BARAÚNA, R. A.; ROCHA, J. C. S. *Avaliação fitoquímica, toxicológica, anti-edematogênci e analgésica de plantas medicinais nativas da região amazônica*. Relatório Técnico Científico. Universidade Federal do Pará, 2006.
- BARBOSA FILHO, J. M. *Triagem fitoquímica*. UFPB: Departamento de Ciências Farmacêuticas, 2001. 10p (Apostila).
- BEELEN, P.M.G. *Taninos condensados de leguminosas nativas do semi-árido nordestino*. 2002. 71f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP. 2002.
- BEELEN, P. M. G.; BERCHIELLI, T. T.; BUDDINGTON, R.; BEELEN. R. Efeito dos taninos condensados de forrageiras nativas do semi-árido nordestino sobre o crescimento e atividade celulolítica de *Ruminococcus flavefaciens* FD1. *Arquivo Brasileira de Medcina Veterinária e Zootecnia*. v. 58, n. 5, p. 910-917, 2006.
- CANTARUTTI, R. B.; BODDEY, R. M. Transferência de nitrogênio das leguminosas para as gramíneas. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO ANIMAL EM PASTEJO, 1997, Viçosa. *Anais...* Viçosa:Universidade Federal de Viçosa. p. 431-445. 1997.
- CARVALHO, G. G. P.; PIRES, A. J. V. Leguminosas tropicais herbáceas em associação com pastagens. *Archivos de Zootecnia*. v. 57, (R), p. 103-113, 2008.
- CASSO, R. B.; MONTERO, R. N. *Factores antinutricionales en la alimentación de animales monogástricos*. Disponível em http://www.avpa.ula.ve/eventos/viiiencuentro_monogastricos/curso_alimentacion_no_convencional/conferencia-5.pdf. Acesso em: 06 nov. 2008.
- COSTA, K. A. P.; OLIVEIRA, I. P.; FAQUIM, V. *Adubação nitrogenada para pastagens do gênero Brachiaria em solos do Cerrado*. Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, 60p, (Documento 162) 2006.
- COHEN, N.D.; GIBBS, P.G.; WOODS, A.M. Dietary and other management factors associated with colic in horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v. 215, p. 53-60, 1999.

COSTA, K. A. P.; ROSA, B.; OLIVEIRA, I. P.; CUSTÓDIO, D. P.; SILVA, D. C. Efeito da estacionalidade na produção de matéria seca e composição bromatológica da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. *Ciência Animal Brasileira*. v. 6, n. 3, p. 187-193, 2005.

DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. *Soil Biology & Biochemistry*. v. 29, n. 36, p. 771-774, 1997.

FRACARO, S. N. *Potencial de toxicidade reprodutiva do extrato de Tillandsia usneoides Linnaeus, 1762 (Barba-de-pau) em coelhos gestantes*. 2004. 71 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Setor de Ciências Agrária, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2004.

GIVENS, D. I.; OWEN, E.; AXFORD, R. F. E.; OMED, H. M. *Forage evaluation in ruminant nutrition*. Cabi Publishing, London. 480 p, 2000.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*. v. 30, n. 2, 2007.

HADDAD, C. M.; ALVES, F. V. *Alimentos orgânicos para a suplementação de bovinos I Conferência Virtual Global sobre Produção Orgânica de Bovinos de Corte*. Embrapa Pantanal - Corumba - MS – Brazil. 2002.

LAUNCHBAUGH, K. *Anti-quality factor in rangeland and pastureland forages*. Bulletin 73 of the Idaho forest. University of Idaho. 76p, 2001.

LEMPP, B. Avanços metodológicos da microscopia na avaliação de alimentos. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v. 36, supl., p. 316-319, 2007.

LONGO, C. *Avaliação in vitro de leguminosas taníferas tropicais para mitigação de metano entérico*. 2007. 154p. Tese (Doutorado - Programa de Pós-graduação em ciências). Universidade de São Paulo. Piracicaba. 2007.

MATOS, F. J. A. *Introdução a fitoquímica experimental*. Edições UFC, Fortaleza. 126p. 1988.

OLIVEIRA, A. C.; QUEIROZ, K.S.; HELBIG, E.; REIS, S. M. P. M.; CARRARO, F. O processamento doméstico do feijão-comum ocasionou uma redução nos fatores antinutricionais fitatos e taninos, no teor de amido e em fatores de flatulência rafinose, estaquiose e verbascose. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. v. 51, n. 3, 2001.

PACIULLO, D. S. C.; AROEIRA, L. J. M.; ALVIM, M. J.; CARVALHO, M. M. Características produtivas e qualitativas de pastagem de braquiária em monocultivo e consorciada com estilosantes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v. 38, n. 3, p. 421-426., 2003.

PÁDUA, F. B.; ALMEIDA, J. C.C. SILVA, T. O. ROCHA, N. S; NEPOMUCENO, D. D. Produção de matéria seca e composição químico-bromatológica do feno de três espécies de leguminosas forrageiras tropicais em dois sistemas de cultivo. *Revista Ciência Rural*. v. 36, n. 4, p.1253-1257, 2006.

PINEDO, L. A., CAMPOS, F. C., PEÇANHA, M. R. S. R. CASTILHO, L. A.; ABDALLA, A. L. Composição química e compostos fenólicos em diferentes frações da planta de feijão guandu

(*Cajanus cajan* (L.) Millsp). *Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia*. v. 2, n. 20, Art. 233, 2008.

PROSPERO, J. N.; FILHO, P, COSTA, C.; ARRIGONI, M. B.; SILVEIRA, A. C. Suplementação mineral e mobilização de cálcio nos ossos de eqüinos em pastagem de *Brachiaria humidicola*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 34, n.5, p. 873-878, 1999.

RAMOS, G., FRUTOS, P.; GIRÁLDES, F. J.; MANTECÓN, A. R. Los compuestos secundarios de las plantas en la nutrición de los herbívoros *Archivos de Zootecnia*. v. 47, n. 180, p. 597-620, 1998.

REED, J. D. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of Animal Science*. v. 73. p. 1516-1528. 1995.

REIS, R. A.; MORAIS, J. A. S.; SIQUEIRA, G. R. Aditivos alternativos para a alimentação de ruminantes. In...*Anais II Congresso Latino-Americano de Nutrição Animal (II CLANA)* São Paulo. SP. (Palestra Técnica 40p) 2006.

RESTLE, J.; ROSO, C, SOARES, A. B, LUPATINI, G. C. ALVES FILHO, D. C.; BRONDANI, I. L. Produtividade Animal e Retorno Econômico em Pastagem de Aveia Preta mais Azevém Adubada com Fontes de Nitrogênio em Cobertura. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v 29, n. 2, p. 357-364, 2000.

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v. 21,n.1p. 00-00, 2001.

SANTOS, M. A. T. Efeito do cozimento sobre alguns fatores antinutricionais em folhas de brócoli, couve-flor e couve. *Ciências Agrotécnicas*. v. 30, n. 2, p. 294-301, 2006.

SILVA, J. J.; SALIBA, E. O. S. Pastagens consorciadas: uma alternativa para sistemas extensivos e orgânicos. *Veterinária e Zootecnia*. v. 14, n. 1, p. 8-18, 2007.

SOUSA, R. S.; IRIGOYEN, L. F. Intoxicação experimental por *Phalaris angusta* (Gramineae) em bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 19(3/4) p. 116-122, 1999.

SPAIN, J. M.; PEREIRA, J. M. *Sistemas de manejo flexible para evaluar germoplasma bajo pastoreo*: Una propuesta. In: LASCANO, C.; PIZARRO, E. (eds.) *Evaluación de pastos com animales*. Alternativas metodologias-RIEPT, Cali, 1985. Cali, Colômbia: CIAT 1985 p. 85-97.

WAGHORN, G. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production—Progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology*. v. 147, p. 116–139, 2008.

CAPÍTULO II

QUANTIFICAÇÃO DE TANINOS E INVESTIGAÇÃO DA ESTABILIDADE DA ESPUMA CAUSADA POR LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS

RESUMO

Objetivou-se neste trabalho quantificar através da Reação de Stiasny o teor de tanino condensado total e avaliar a estabilidade “*in vitro*” da espuma formada pelas leguminosas, *Macrotyloma axillare* (macrotiloma), *Pueraria phaseoloides* (kudzu tropical) e *Neonotonia wightii* (soja perene). As leguminosa foram divididas em três porções (planta inteira, folha e haste), secas a 55°C por 72h em estufa ventilada e moídas em moinho tipo Willey em partículas de 1mm. A média do resultado obtido de cada porção foi submetida à análise de variância e comparada pelo Teste de Tukey (P<0,05). O teor de tanino condensado total variou de 1 a 1,66% para as porções das leguminosas. Considerando a planta inteira, o macrotiloma e a soja perene obtiveram um teor de tanino condensado que não diferiram estatisticamente entre si, porém, o teor de tanino do macrotiloma diferiu do teor obtido pelo kudzu tropical. Em relação ao teor deste metabólito na matéria seca da porção folha, o teor de tanino foi maior para o macrotiloma que diferiu estatisticamente do teor obtido pelo kudzu tropical e soja perene, sendo que o teor de tanino obtido para estas duas leguminosas não apresentou resultados diferentes entre si. Para a porção haste, a soja perene obteve um teor de tanino que diferiu do teor obtido pelo kudzu tropical e macrotiloma. Ao comparar o teor de tanino entre as porções da mesma leguminosa, o teor de tanino da porção haste do macrotiloma diferiu dos teores obtidos pela planta inteira e folhas, entre as porções da soja perene houve diferença somente entre os teores de tanino entre as porções folha e haste. Para análise da estabilidade de espuma utilizaram-se amostras das porções acima incluindo nesta avaliação amostra do extrato metanólico bruto da planta inteira das três leguminosas citadas. A média do volume de espuma produzido pelas porções da soja perene e do macrotiloma mostraram-se estáveis durante o tempo de avaliação quando submetidas à análise de variância e comparadas pelo Teste de Tukey (P<0,05) o que sugere estudos “*in vivo*” para observar seu relacionamento com a produção do meteorismo espumoso. No entanto, o kudzu apresentou um resultado significativo para a estabilidade da espuma para as quatro porções estudadas, revelando uma redução do volume da espuma formada o que gerou as seguintes equações de regressão $y=-2,011x+44,984$ para folha, $y=-2,4x+37,957$ para planta inteira e $y=-2,9049x+31,779$ para haste e $y=-15,383x+125,31$ para o extrato metanólico bruto.

Palavras-chave: Meteorismo. Reação de Stiasny. Tanino condensado.

ABSTRACT

This survey was carried out for quantifying total condensed tannin content by Stiasny Reaction and for evaluating *Macrotyloma axillare* (archer), *Pueraria phaseoloides* (puero) and *Neonotonia wightii* (perennial soybean) “in vitro” foam stability. Legumes were divided into three fraction (entire plant, leaf and stem) dried at 55°C for 72h at air stove and ground on 1mm particles by Willey mill. By analysis of variance and Tukey Test (P<0.05) obtained result average from each fraction was performed and compared, as well condensed tannin content for legumes ranged from 1 to 1.66%. In relation to entire plant archer and perennial soybean showed considered tannin content no statistically differing between themselves, however, archer tannin content differed from that one obtained by puero. In regard to tannin content on leaf dry matter, this metabolite content was greatest to archer, statistically differing from those ones by puero and perennial soybean, although no different results by these two legumes were presented. For stem fraction, perennial soybean showed different tannin content comparing to puero and archer. Comparing tannin content among same legume fractions archer stem fraction tannin content differed from those ones obtained by entire plant and leaves; just perennial soybean leaf and stem for tannin content showed difference. For foam stability analysis samples from fractions above mentioned as well as three legumes entire plant crude methanol extract sample were used. Foam volume average produced by perennial soybean and archer showed to be constant during evaluation time by variance analyses and Tukey Test (P<0.05) suggesting “in vivo” further studies for better observing their correlation in regard to foamy meteorism yielding significative result for fractions foam stability by puero was estimated. Foam volume decreasement by puero was showed through following regression equations: $y = -2.0111 x + 44.984$ for leaf, $y = -2.4 x + 37.957$ for entire plant, $y = -2.9949 x + 31.779$ for stem and $y = -15.383 x + 125.31$ for crude methanol extract, at all.

Key words: Meteorism. Stiasny Reaction. Condensed tannin.

1 INTRODUÇÃO

Os taninos são amplamente distribuídos dentro do reino vegetal, sendo comuns tanto em espécies de gimnospermas como de angiospermas. Dentro das angiospermas, os taninos são mais comuns nas dicotiledôneas do que nas monocotiledôneas. Os taninos são encontrados principalmente nos vacúolos das plantas, distribuídos em diversas partes como raízes, caules, folhas, frutos e sementes, variando de uma espécie para outra e entre as partes de um mesmo vegetal.

Os taninos são estruturalmente divididos em dois subgrupos: taninos condensados (TC) e taninos hidrolisáveis (TH). Os TC ou proantocianidinas são polímeros de flavanóis, que se encontram presentes nos ramos, nas folhas e inflorescências de diversas espécies forrageiras. Estes grupos de taninos interagem com as proteínas formando complexos. Em geral, estas interações são muito restritas tendo especial afinidade por aquelas de cadeias maiores e proteínas ricas em prolina. O produto da interação tanino-proteína precipita em um pH ao redor ponto isoelétrico da prolina. A facilidade dos TC em formar estes complexos é a mais importante dentro de seu efeito nutricional e toxicológico. A proteína não é degradada no rúmen, porém passa a ser disponível no abomaso e intestino delgado. Em uma faixa de pH entre 5 e 7,5, no rúmen a proteína permanece ligada com tanino, porém em pH abaixo de 3,5 esses complexos são desfeitos e as proteínas liberadas.

Em várias publicações sobre tanino em plantas forrageiras, é notória a preocupação dos pesquisadores em observar o efeito dos taninos condensados sobre a solubilidade da proteína, ora verificando efeitos positivos, como no controle de formação de espuma no rúmen e conseqüentemente o controle do timpanismo (MIN et al., 2006); controle de endoparasitas; redução da degradação da proteína exógena no rúmen, aumento da degradação de proteínas no intestino delgado, diminuição da produção de metano ruminal ora avaliando os efeitos negativos na formação de complexos diminuindo, assim, a disponibilidade da proteína para o animal. (LANDAU et al, 2000; MIN e HART, 2003; PEDREIRA, et al., 2005).

Intoxicações por taninos hidrolisáveis são caracterizadas por anorexia, depressão, atonia ruminal, falência hepática e renal, úlcera ao longo do trato digestivo e gastroenterites. A intensidade da lesão parece ser dependente da dose e estrutura de taninos consumidos, no entanto a maioria destes trabalhos são descrições de intoxicações que ocorrem naturalmente e, por conseguinte dificulta conhecer qual tanino e quanto deste foi envolvido (REED, 1995; FRUTOS et al, 2004).

A presença simultânea de vários fatores antinutricionais, biologicamente ativos, é que estes podem agir em sinergismo ou atuar como antagonistas dos efeitos adversos individuais de cada um. Daí a importância de estudá-los em conjunto. Exemplo deste efeito sinérgico dos metabólitos tem-se a redução da degradação da proteína que chega ao rúmen quando estão presentes simultaneamente saponinas e taninos. Nessas condições a síntese de proteína microbiana é maior (devido redução do engolfamento de bactérias pelos protozoários ruminais) e ocorre o aumento de proteína by pass (proteínas de passagem). Outro efeito positivo da associação entre metabólitos ocorre na diminuição do meteorismo espumoso causado por leguminosas (VIEIRA et al., 2001).

Objetivou-se neste trabalho quantificar o teor de taninos condensados totais nas diferentes partes da planta, considerando as porções planta inteira, folha e haste e avaliar a estabilidade da espuma produzida pelas três porções mais a inclusão do extrato metanólico bruto das leguminosas em estudo. O arranjo foi disposto em um Delineamento Inteiramente Casualizado sendo as médias submetidas a análise de variância sendo comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

2 REVISÃO DE LITERATURA

A nutrição de ruminantes pode ser considerada mais complexa que a nutrição de monogástricos devido à anatomia do trato digestivo e presença de microorganismos fermentadores, que sintetizam nutrientes, principalmente proteína e algumas vitaminas a partir de alimentos fibrosos. Este processo sofre interferência de determinadas substâncias dos alimentos que reduzem a capacidade dos microorganismos em transformar material fibroso, em nutrientes aproveitáveis. Sob esse aspecto, é importante conhecer as características nutricionais dos alimentos que utilizará, para conciliar associações ótimas para os microorganismos do rúmen, neste caso os alimentos que possuem fatores que podem interferir no processo fermentativo deve ser utilizado com cautela ou restrição, para não afetar o metabolismo ruminal (BARCELOS et al., 2001).

Leguminosas forrageiras são geralmente boa fonte de energia e proteína para ruminantes em pastagens, porém ocasionalmente a presença de compostos secundários ou fatores antinutricionais nestes alimentos, tais como glicosinolatos, taninos, saponinas, lecitinas, alcalóides ou gossipol resultam numa produção animal menor que a esperada. Alguns destes fatores podem causar adversidade aguda em ruminantes (BALOYI et al., 2001). O efeito dos teores de polifenóis de leguminosas na nutrição de ruminantes dá-se por meio da modificação da microbiota do rúmen além de complexar com proteínas, carboidratos e minerais. Assim reduzem ou precedem sua disponibilidade no rúmen e pós-rúmen.

Os polifenóis livres inibem várias enzimas digestivas em sistemas “*in vitro*”. Esses compostos estão envolvidos nas ligações da lignina com os carboidratos da parede celular e essa associação reduz a digestibilidade. Há também o fato dos fenóis simples precipitarem as proteínas pela formação de um revestimento hidrofóbico, semelhante à complexação taninos-proteínas (LOPES, 1990).

Em leguminosas, os taninos são os polifenóis de maior importância, pois além de possíveis efeitos sobre a biodisponibilidade de minerais, a sua importância nutricional, está também associada à sua influência sobre a digestão das proteínas (MENDONÇA et al, 2003). O aumento da concentração de tanino influencia negativamente a degradabilidade da matéria seca e mais intensamente a degradação da proteína bruta. Esse efeito se torna mais intenso quanto menor for o tempo de permanência do alimento no rúmen (PEREIRA FILHO, 2005).

O complexo formado entre taninos e proteínas ou outros compostos são geralmente instáveis e as ligações são continuamente quebradas e refeitas. Os complexos formados entre proteínas e taninos são divididos de acordo com o tipo de ligação: 1) ligação de hidrogênio (reversível e dependente de pH) entre o radical hidroxila do grupo fenol e o oxigênio do grupo amida nas ligações de proteína, 2) por ligações hidrofóbicas (reversível e dependente do pH) entre o anel aromático e a região hidrofóbica da proteína, 3) por ligações iônicas (reversível) entre o íon fenolato e o sítio catiônico da proteína (exclusivo para taninos hidrolisáveis) e 4) por ligações covalente (irreversíveis) devido a oxidação de polifenóis para quinonas e sua subsequente condensação com grupos nucleofílicos de proteínas (FRUTOS et al., 2004). Por longo tempo foi aceito que a formação de complexo tanino proteína seria devido à ligação de hidrogênio, mas as interações hidrofóbicas são também importantes.

Em animais cujas dietas são ricas em taninos existem dois mecanismos de adaptações. Onde pode ser citados: 1) a capacidade da microbiota como o caso dos *Streptococcus caprinus* habitante específico do rúmen de caprinos que tem habilidade de degradar taninos complexados com proteínas, e 2) a maior produção de saliva rica em prolina, o que aparece como a mais proeminente adaptação para dietas contendo tanino condensado (BROOKER et al., 1994), a exemplo pode se demonstrado o trabalho de Makkar et al., (1995) que não conseguiram fazer com que microrganismos isolados do rúmen de bovinos (não portadores de enzimas capazes de degradar taninos condensados) e sem acesso a dietas com taninos adquirissem a capacidade de degradar taninos devido a indução da produção de enzimas (com capacidade de degradar) com exposição

desses microrganismos aos taninos condensados por oito dias em simulador das condições ruminais.

São vários os estudos para determinar a importância dos efeitos dos taninos na nutrição e toxicologia de leguminosas devido ao benefício da manipulação de dietas contendo proteína, porém estes dados são inconsistentes com o conceito de proteína de escape. Conhecimento entre as relações das estruturas dos taninos e sua função são necessárias para manipular a produção direta de leguminosas forrageiras taníferas e sua seleção através da engenharia genética, o que permitirá relacionar o potencial efeito positivo dos taninos com seus efeitos negativos na digestão e desempenho animal (REED, 1995; GONZÁLEZ et al, 2002; FRUTOS et al., 2004).

O consumo de taninos por ruminantes pode ainda estar relacionado a efeitos positivos associados à concentração por volta de 3-4% da MS, onde destacam-se: a) proteção da proteína alimentar contra a excessiva degradação ruminal; b) diminuição do desperdício de amônia; c) o aumento da absorção de aminoácidos provenientes da dieta no intestino delgado, d) prevenção do timpanismo (CRUZ et al., 2007) e e) efeito anti-helmíntico, em faixa entre 2-4% segundo Otero e Hidalgo (2004).

Diferente com o que ocorrem com os taninos os principais atributos conferidos às saponinas é a indução do meteorismo espumoso em ruminante devido sua capacidade de produzir espuma em meio aquoso (VIEIRA et al., 2001) e, envolvimento em casos de fotossensibilização hepatógena em animais (BARBOSA et al. 2006).

Klita et al. (1996) apresentaram dois mecanismos na produção de timpanismo em ruminantes relacionados com saponinas: a) redução na tensão superficial do conteúdo ruminal, que causa a formação de espuma, interfere com a eructação, contribuindo também para a acumulação excessiva de gás no rúmen e a eventual morte do animal por asfixia (compressão do diafragma) b) redução na motilidade ruminal, contribuindo para dificultar a evacuação da ingesta pela cárdia, embora as saponinas possam afetar aparentemente a digestibilidade a possibilidade de efeito benéfico não pode ser eliminada, por que saponinas são agentes tensoativos ativos e podem estar associadas com a redução da população de protozoários e com o aumento da quantidade de proteína de escape que passa ao duodeno.

Os métodos tradicionais de análise de alimentos não incluem medidas quantitativas dos taninos e, em razão disso, pouco se sabe a respeito da natureza desses compostos nas espécies tropicais, (BEELLEN, 2002).

Porém, existem vários métodos de determinação do teor de taninos em espécies vegetais. Com destaque para os métodos, Folin-Denis, Folin-Ciocalteu, butanol-HCl e vanilina (MONTEIRO, et al, 2005). Face às dificuldades laboratoriais e o objetivo do trabalho, optou-se pelo método de extração de taninos condensados pela Reação de Stiasny, utilizado de forma corriqueira para extração de taninos em espécies florestais, mas que pode ser útil à avaliação de taninos condensados em forragem devido menor custo com reagente e equipamentos utilizados.

O tanino pode ser retirado dos vegetais por diferentes solventes tais como água, acetona, etanol ou por soluções aquosas com alguns sais como sulfito de sódio, carbonato de sódio, entre outros. Os taninos condensados têm grande poder de ligação e podem condensar com formaldeído, produzindo um polímero de estrutura tridimensional, reticulada e com alto peso molecular (resina) (GONÇALVES e LELIS, 2001) de fácil quantificação em laboratório convencional de bromatologia.

A importância da avaliação da estabilidade do volume de espuma produzida por leguminosas, mantida por um determinado período reflete na possibilidade deste apresentar-se como possível agente etiológico do meteorismo espumoso em ruminantes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Setor de Forragicultura do Departamento de Nutrição Animal e Pastagens do Instituto de Zootecnia, nas dependências dos Laboratórios de Química de Produtos Naturais e no Laboratório de Taninos do Departamento de Produtos Florestais do Instituto de Floresta da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

3.1. Cultivos das Leguminosas e Obtenção do Extrato Metanólico

As leguminosas estudadas foram plantadas em janeiro de 2006. A adubação realizada nos canteiros seguiu-se as recomendações do Boletim Técnico 100, IAC (1996), onde foram aplicados 250kg de P_2O_5 e 100kg.ha⁻¹ de KCl, nas linhas de plantio. Nos meses de junho e julho de 2007 passaram por um corte de uniformização e uma adubação de cobertura consistindo de aplicação de 100kg.ha⁻¹ de P_2O_5 e 100kg.ha⁻¹ de KCl.

3.2 Preparação dos Extratos

3.2.1 Extrato aquoso

As leguminosas macrotiloma, kudzu tropical e soja perene foram separadas em três partes; constituindo-se as porções: planta inteira, folha e haste. Em seguida foram secas em estufas a 55°C durante 72h e moídas em moinho tipo Willey com peneira de 1mm para posterior extração dos constituintes fenólicos. Amostra de 10g de cada porção foi colocada em balão volumétrico, para aumentar o rendimento da extração e a precisão da quantificação dos polifenóis adicionou-se 500mg de sulfito de sódio (Na_2SO_3) sobre a mistura ao qual foi adicionada água destilada numa proporção 15:1, ou seja, 15 parte de água para 1 do material totalizando 150ml de água. A emulsão foi encaminhada para extração em aparelho soxhlet sob refluxo por 2 horas à temperatura de 100°C. Após a extração, o material foi filtrado sob vácuo utilizando cadinho de vidro sinterizado, obtendo-se assim o extrato aquoso de cada amostra.

3.2.2 Extrato metanólico

Para obtenção do extrato metanólico seguiu a metodologia adotada no capítulo 1 onde, as leguminosas kudzu tropical, macrotiloma e soja perene foram secas até ponto de feno, moídas em moinhos tipo willey com peneiras de 1mm e acondicionados em recipiente de vidro, utilizando metanol como solvente até cobertura total do material durante 7 dias para início da extração. A concentração da solução obtida deu-se em aparelho rotavapor sob pressão reduzida e sob fluxo de ar constante para término da remoção do solvente.

3.3 Delineamento Experimental

Em relação aos teores de extrativos, número de Stiasny taninos condensados e extrativos não tânicos foram utilizado o delineamento inteiramente casualizado em parcelas subdivididas com 3 repetições, onde as leguminosas foram alocadas nas parcelas e as porções, planta inteira, folha e haste, nas subparcelas.

Em relação à estabilidade de espuma, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em parcelas subdivididas com 3 repetições cada, onde cada porção das leguminosas, incluindo o extrato metanólico bruto, foi considerada a parcela e o tempo em que foi aferido o volume de espuma conservado, a subparcela.

3.4 Determinação dos Teores de Extrativos

Após cada extração, foi separada uma alíquota de 25ml para determinação da massa de extrativos totais. Esta alíquota foi colocada em uma placa de petri, previamente tarada, em estufa a $103^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, até peso constante. Da diferença entre a massa da placa de petri antes e depois de ser levada à estufa com a alíquota do extrato aquoso, obteve-se a massa (g) de extrativos totais contidos nos 25ml do extrato aquoso. Considerando-se a quantidade de amostras (base seca) e o volume inicial empregados na extração, calculou-se o teor de extrativos em percentagem para cada material.

3.5 Quantificação dos Polifenóis

Dos extratos foi determinado o teor de polifenóis contido em cada amostra através da reação de Stiasny segundo Wissing, (1955) e Lelis, (1995). Onde após cada extração foi separada uma alíquota de 50ml e colocada em um balão redondo de 250ml. À alíquota foi adicionado 5ml de ácido clorídrico e 10ml de formaldeído concentrados. Esse material foi então colocado em refluxo por 30 minutos, sendo filtrado em cadinho sinterizado de peso previamente conhecido e em seguida lavado com água destilada quente obtendo-se um resíduo (tanino) que foi colocado juntamente com o cadinho em estufa a $105 \pm 3^{\circ}\text{C}$ até estabilização do peso seco. Esse material é referido como “Número de precipitado em formaldeído”, e indica os compostos polifenólicos contidos no material que reagiram com o formaldeído. A seguir o percentual de polifenóis contidos nos extratos (Número de Stiasny- NS) foi determinado pela razão entre a massa de polifenóis totais e a massa total de extrato, de acordo com a equação.

$$NS = \frac{MT}{MET} \times 100$$

Onde: NS= número de Stiasny

MT= massa de tanino

MET= massa de extratos totais em (50ml)

3.6 Determinação do Teor de Tanino

O percentual de tanino condensado contido nos extratos foi determinado pelo produto entre o Número de Stiasny (NS) e a massa dos extrativos totais (MET) em percentagem extrapolada para 50ml, de acordo com a equação.

$$\text{Teor de tanino (\%)} = NS \times MET (\%)$$

3.7 Determinação do Teor de Não Tanino.

A obtenção de extrativos não tânicos deu-se através da diferença entre o teor de extrativo total e o teor de taninos seguindo a equação.

$$\text{Teor de não tanino (\%)} = \text{Teor de extrativo} - \text{Teor de tanino}$$

3.8 Avaliação da Quantidade de Espuma

Para avaliação do teor de espuma foram utilizados dois tipos de amostras seguindo a metodologia de Phillips et al., (1987).

1: Extrato metanólico bruto das espécies de leguminosas macrotiloma, kudzu tropical e soja perene.

2: Partes separadas das três espécies de leguminosas estudadas; constituindo-se de planta inteira, folhas e hastes. As amostras foram secas em estufas (55°C) e moídas em moinho tipo Wiley com peneira de 1 mm.

Onde foram utilizados cinco gramas de amostras de cada leguminosa agitados em 100ml de água destilada durante 5 minutos usando-se máxima rotação em “mixer”, marca Walita-modelo HL3252. O volume aumentado foi medido em uma proveta de 500ml logo após o líquido batido ser transferido para a proveta (tempo 0min) sendo a porcentagem do aumento de espuma calculado pela expressão:

$$\%AV = \frac{B - A}{A} \times 100$$

Onde: % AV=% do aumento do volume

A= volume antes da agitação (ml)

B= volume após agitação (ml)

O estudo da estabilidade da espuma foi feito através do repouso das amostras à temperatura ambiente (22-25°C) com leitura do volume total após intervalos de 1; 5; 10; 30 e 60 minutos.

3.9 Análises Estatísticas

Os resultados dos percentuais de extrativos totais, Número de Stiasny, taninos e não taninos foram submetidos à análise de variância onde as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (P<0,05). O efeito da interação entre leguminosas e as porções, planta inteira, folha e haste foram desdobradas pelo teste de Tukey (P<0.05) através do programa SAEG (2007).

Os resultados referentes à estabilidade de espuma foram submetidos à análise de variância, onde as médias das leguminosas foram comparadas pelo teste de Tukey (P<0,05) através do programa SAEG (2007). O efeito do tempo de repouso (onde foi aferido o volume de espuma remanescente) e a interação entre leguminosas versus tempo de repouso foram desdobradas pela análise de regressão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos totais do material analisado forneceram uma quantidade de extrativos não fenólicos, especificados como extrativos não tânicos. Do extrato aquoso deste material foi retirado o tanino condensado através da Reação de Stiasny.

4.1 Teor de Extrativos e Número de Stiasny

O resultado apresentado na Tabela 1 permite verificar que o teor de extrativo total não apresentou diferença ao comparar as três espécies de leguminosas para as porções planta inteira e haste. Ao comparar os teores das porções folhas entre as três espécies o macrotiloma e a soja perene não apresentaram diferença significativa entre si, mas o teor de extrativo totais do macrotiloma diferiu do kudzu. Ao comparar os teores de extrativos totais entre as porções de cada espécie, o macrotiloma apresentou resultado que não diferiu entre as porções folha e planta inteira, mas que diferiu entre a porção folha e haste.

Quanto ao Numero de Stiasny (%) conforme resultados apresentados na Tabela 1 às três leguminosas não diferiram entre si, o mesmo aconteceu entre as porções de cada espécie quando comparado pelo teste Tukey ($p < 0.05$).

Tabela-1. Porcentagens de Extrativo e NS (número de Stiasny) obtidos das leguminosas, kudzu, macrotiloma e soja perene.

Espécie	Extrativos(%)			NS(%)		
	Planta	Folha	Haste	Planta	Folha	Haste
Kudzu	26.00Aa	26.00Ba	24.66Aa	4,33Aa	4.83Aa	4.00Aa
macrotiloma	29.00Aab	32.33Aa	24.00Ab	5.30Aa	5.00Aa	4.33Aa
Soja perene	30.00Aa	30.33ABa	26.33Aa	5.00Aa	4.00Aa	5.66Aa

Médias seguidas por letras minúsculas na mesma linha e por letras maiúsculas na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($P < 0.05$)

4.2 Teor de Taninos e Não Taninos

O resultado apresentado na Tabela 2 permite verificar que para a porção planta inteira o macrotiloma e a soja perene obtiveram um teor de taninos que não diferiram entre si, porém o macrotiloma obteve um teor de tanino que diferiu do kudzu. Para a porção folha o kudzu tropical e da soja perene obtiveram um teor de tanino que não diferiram entre si, porém diferiram do teor de tanino do macrotiloma. Para a porção haste a soja perene obteve um teor de tanino que diferiu dos teores do macrotiloma e kudzu, que obteram resultado semelhante para o teor de tanino. Ao comparar os teores de taninos entre as porções de cada espécie o kudzu obteve resultado que não diferiu entre as porções. Já o macrotiloma apresentou um teor de taninos que não diferiu para as porções planta e folha, teores estes que diferiram da porção haste. A soja perene obteve um teor de taninos que não diferiu entre a porção haste e planta inteira, porém o teor de taninos da porção haste diferiu do teor de da porção folha quando comparado pelo teste Tukey ($p < 0.05$).

O teor de não tanino contido nas porções das três espécies não diferiu entre si. Porém ao comparar o teor obtido entre as porções de cada espécie, o macrotiloma apresentou um teor que não diferiu entre as porções planta e folha, porém estes teores diferiram da porção haste. Quando comparado pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Tabela-2. Percentagens de tanino e não taninos obtidos das leguminosas kudzu, macrotiloma e soja perene.

Espécie	(%) Tanino			(%) de não tanino		
	Planta	Folha	Haste	Planta	Folha	Haste
kudzu	1.14Ba	1.24Ba	1.00Ba	24.46Aa	24.95Aa	23.60Aa
macrotiloma	1.51Aa	1.66Aa	1.00Bb	27.28Aab	30.54Aa	23.19Ab
Soja perene	1.40ABab	1.1Bb	1.49Aa	28.60Aa	29.30Aa	24.90Aa

Médias seguidas por letras minúsculas na mesma linha e por letras maiúsculas na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey (P<0.05).

A importância da avaliação da relação folha/haste Tabela 3 ocorre devido às folhas possuírem maiores valores nutricionais que a porção lenhosa da planta (haste) onde, predomina maior teor de fibra, em condições pratica os percentuais de tanino relatado para a porção folha das leguminosas não diferiria do teor de taninos da planta inteira Tabela 2 consumida pelo animal. Porém é importante ressaltar a seleção e quantidade de forragem consumida pelo animal que é direcionado para as folhas em oposição à haste.

Tabela 3. Relação folha haste das leguminosas kudzu tropical, macrotiloma e soja perene.

Espécie	Relação folha/ haste
Kudzu tropical	1,37
Macrotiloma	1,8
Soja perene	0,93

4.3 Estabilidade da Espuma

Na Tabela 4 e 5 estão representado os teores de espuma formado pelas porções planta inteira, folha e haste e do extrato metanólico bruto das espécies soja perene kudzu tropical, macrotiloma. As substâncias produtoras de espuma são as possíveis causadoras do timpanismo espumoso em ruminantes.

Ao analisar a estabilidade da espuma através do teste de Tukey (P<0.05) para o kudzu, soja perene e macrotiloma (considerando as partes e o extrato metanólico bruto) observou-se que o volume de espuma formado pelo macrotiloma e soja perene permaneceu estável durante o período analisado. Resultado semelhante foi obtido pelo extrato metanólico bruto de macrotiloma e soja perene.

As análises da estabilidade da espuma produzida pelas porções do kudzu tropical forneceram resultados que seguiram as equações de regressão: $y=-2,0111x+44,984$ para folha, $y=-2,4x+37,957$ para planta inteira e $y=-2,9049x+31,779$ para haste, enquanto a análise da estabilidade da espuma produzida pelo extrato metanólico bruto forneceu a equação de regressão $y=-15,383x+125,31$ para a diminuição do volume da espuma formada ao longo do tempo. Devido à estabilidade da espuma da soja perene e do macrotiloma estas espécies apresentam-se como propícios agentes causadores do meteorismo espumoso em ruminante, apesar do volume de espuma do kudzu tropical ter permanecido alto quando comparado com o volume do macrotiloma durante o período avaliado.

Tabela 4. Avaliação da estabilidade da espuma das espécies produzidas kudzu tropical macrotiloma e soja perene, possível causadora do timpanismo espumoso em ruminantes.

Espécie	Amostra	Estabilidade do volume da espuma % V/minuto						equação
		0	1	5	10	30	60	
Soja perene	Folha	79,7	79,7	77,3	73,7	63,0	57,7	Não significativo ¹
	Haste	55,3	55,3	50,0	47,3	42,3	42,3	
	Planta	45,0	43,3	42,0	33,3	32,7	27,3	
Kudzu	Folha	42,7	42,7	38,7	35,0	34,3	34,3	y=-2,0111x+44,984
	Haste	29,7	26,3	22,7	18,3	16,7	16,0	y=-2,4x+37,957
	Planta	35,0	35,0	30,7	26,7	25,0	25,0	y=2,9049x+31,779
Macro-tiloma	Folha	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,7	Não significativo ¹
	Haste	14,3	12,7	11,7	9,7	9,0	7,0	
	Planta	8,7	8,7	8,7	8,7	7,3	6,3	

¹ Diminuição do volume de espuma não significativo respectivamente para a soja e macrotiloma para o teste de Tukey (P<0.05)

Tabela 5. Avaliação da estabilidade da espuma do extrato metanólico bruto das leguminosas soja perene, kudzu e macrotiloma, possível causadora do timpanismo espumoso em ruminantes.

Amostra	Estabilidade do volume da espuma % V/minuto						equação
	0	1	5	10	30	60	
SpM	84	77.3	56	55.6	46.3	35	Não significativo ¹
KtM	109.3	96	73.3	71.6	47.6	31	y=-15,383x+125,31
MaM	30	30	28.3	28.3	25.6	25	Não significativo ¹

¹ Diminuição do volume de espuma não significativo os extratos metanólico bruto da soja e macrotiloma pelo Tukey(P<0.05).

SpM extrato metanólico da soja perene, KtM extrato metanólico do kudzu, MaM extrato metanólico do macrotiloma.

4.4 Considerações sobre Volume de Espuma e Quantidade de Taninos.

A diminuição da aceitabilidade das forrageiras também pode ser provocada pelo tanino, em função de sua adstringência. A adstringência é a sensação causada pela formação de complexos entre os taninos e as glicoproteínas salivares, o que pode aumentar a salivação e diminuir a aceitabilidade do alimento (REED, 1995). Quanto menor a aceitabilidade, menor a ingestão de alimento e, por consequência, a produtividade animal.

Os teores de taninos condensados variaram entre 1-1,66% estão situados próximos ao encontrados em algumas leguminosas de regiões de clima temperado como *Lolium perenne* 0,8-1,0%, *Plantago lanceolata* 0,8-1,0% e *Lotus corniculatus* 2,0-4,7% e maiores que os teores encontrados em *Cichorium intybus* <0,2%, *Holcus lanatus* <0,2%, *Trifolium repens* <0,2%, *Trifolium pratense* 0,17% e *Medicago sativa* 0,05% (OTERO e HIDALGO, 2004) e menor que o teor encontrado no *Arachis. Pintoii* leguminosa tropical que apresenta 2,5% de tanino (LASCANO, 1994) citado por (LADEIRA et al. 2002). Esses valores encontram-se abaixo dos níveis ideais para promoção de efeitos benéficos (como redução do timpanismo espumoso, aumento de proteína não degradada no rumem que chega ao intestino e atividade antihelmíntica) que segundo Otero e Hidalgo, (2004) oscila entre 2-4%. Porém estão abaixo do teor considerado prejudicial para animais conforme os citados por Cruz et al., (2007) que relataram que teores de taninos acima de 5% conforme encontrados em literatura passam ser prejudicial a saúde do animais. Segundo Min et al., (2006), não houve efeito negativo sobre a produção de proteína microbiana com níveis de taninos até 2% e que 1% de tanino condensado de quebracho (*Schinopsis* sp) citando trabalhos não publicados inibiu o crescimento específico do *Methanobrevibacter smithii* na proporção de 89%.

A inclusão da avaliação dos extratos metanólicos obtidos através da maceração do kudzu tropical, soja perene e macrotiloma, na avaliação da estabilidade “*in vitro*” da espuma foi que o macrotiloma apresentou resultado positivo para a presença de saponinas quando foi realizada a prospecção fitoquímica e as espectroscopias de Ressonância Magnética de Hidrogênio e Infravermelho. Porém após agitação por 5 minutos em Mixer de laboratório apresentou um volume reduzido de espuma formado ao contrário do kudzu tropical e soja perene.

5 CONCLUSÕES

Os teores de taninos encontrados nas três espécies de leguminosas e em suas porções (planta inteira, folha e haste) estão abaixo dos teores considerados benéficos e/ou tóxicos para os animais.

Houve diferença entre os teores de tanino entre as porções folha e haste das leguminosas macrotiloma e soja perene.

A espuma produzida “*in vitro*” pela soja perene e macrotiloma permaneceu-se estável no tempo decorrente de 1 hora, o que sugere ensaios “*in vivo*” utilizando animais para relacionar ou excluir a possibilidade destas leguminosas na etiologia do timpanismo produzido por leguminosas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALOYI J. J.; NGONGONI, N. T.; TOPPS, J. H.; ACAMOVIC, T.; HAMUDIKUWANDA, H. condensed tannin and saponin content of *Vigna unguiculata* (L.) Walp, *Desmodium uncinatum*, *Stylosanthes guianensis* and *Stylosanthes scabra* grown in Zimbabwe. *Tropical Animal Health and Production*. v. 33, p.57-66, 2001.
- BARBOSA, J. D.; OLIVEIRA, C. M. C.; TOKARNIA, C. H.; PEIXOTO, P. V. Fotossensibilização hepatógena em eqüinos pela ingestão de *Brachiaria humidicola* (Gramineae) no estado do Pará. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v. 26, n.3, p. 147-153, 2006.
- BARCELOS, A. F.; PAIVA, P. C. A.; PÉREZ, J. R. O.; SANTOS, V. B.; CARDOSO, R. M. Fatores antinutricionais da casca e da polpa desidratada de café (*Coffea arabica* L.) armazenadas em diferentes períodos. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v 30, n. 4, p.1325-1331, 2001.
- BEELEN, P.M.G. *Taninos condensados de leguminosas nativas do semi-árido nordestino*. 2002. 71f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP. 2002.
- BROOKER, J. D.; O'DONOVAN, L. A.; SKENE, I.; CLARKE, K.; BLACKALL, L.; MUSLERA, P. *Streptococcus caprinus* sp. nov., a tannin-resistant ruminal bacterium from feral goats. *Letters Applied Microbiology*. v. 18, p. 313–318, 1994.
- CRUZ, S. E. S. B. S.; BEELEN, P. M. G.; SILVA, D. S.; PEREIRA, W. E.; R. BEELEN, R.; F.S. BELTRÃO, F. S. Caracterização dos taninos condensados das espécies maniçoba (*Manihot pseudoglazovii*), flor-de-seda (*Calotropis procera*), feijão-bravo (*Capparis flexuosa*, L) e jureminha (*Desmanthus virgatus*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v. 59, n. 4, p. 1038-1044, 2007.
- FRUTOS, P.; MIGUEL RASO, M.; HERVÁS, G.; MANTECÓN A. R.; PÉREZ, V.; F. JAVIER GIRÁLDEZ, F. J. Is there any detrimental effect when a chestnut hydrolysable tannin extract is included in the diet of finishing lambs? *Animal Research*. v. 53, p.127–136, 2004.
- GONÇALVES, C. A.; LELIS, R. C. C. Teores de taninos da casca e da madeira de cinco leguminosas arbóreas. *Floresta e Ambiente*. v. 8, n. 1, p. 167-173, 2001.
- GONZÁLEZ, S.; PABÓN, M. L.; CARULLA, J. Effects of tannins on *in vitro* ammonia release and dry matter degradation of soybean meal. *Archivo Latinoamericano de Producción Animal*. v. 10, n. 2, p. 97-101, 2002.
- KLITA, P. T.; MATHISON, G. W.; T. FENTON, T. W.; HARDIN, R. T. Effects of alfalfa root saponins on digestive function in sheep. *Journal Animal Science*. v. 74, p 1144-1156, 1996.
- LADEIRA, M. M.; RODRIGUEZ, N. M.; BORGES, I.; GONÇALVES, L. C.; SALIBA, E. O. S.; BRITO, S. C.; SÁ, L. A. P. Avaliação do Feno de *Arachis pintoi* Utilizando o Ensaio de Digestibilidade *in Vivo*. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v. 31, n. 6, p.2350-2356, 2002.
- LANDAU, S.; SILANIKOVE, N.; NITSAN, Z.; BARKAI, D.; BARAM, H.; PROVENZA, F. D.; PEREVOLOTSKY, A. Short-term changes in eating patterns explain the effects of condensed tannins on feed intake in heifers. *Applied Animal Behaviour Science*. v. 69, p. 199–213, 2000.

LELIS, R.C.C. Zur Bedeutung der Kerninhaltsstoffe obligatorisch verkernter Nadelbaumarten bei der Herstellung von feuchtbeständigen und biologisch resistenten Holzspanplatten, am Beispiel der Douglasie (*Pseudotsuga menziesii* Mirb. Franco). Dissertation na der Forstlichen Fakultät der Universität Göttingen, 1995, (Tese de Doutorado).

LOPES, C. T. Digestibilidade “in situ” de bagaço de cana, palha de arroz, de feijão e capim Cameroon tratados termicamente. 1990. 33 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição de Ruminantes) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1990.

MAKKAR, H.P.S.; BLÜMEL, M.; BECKER, K. In vitro effect of and interactions between tannins and saponins and fate of tannins in the rumen. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. v. 69, p. 481-493, 1995.

MENDONÇA, C. V. C E.; ABREU, C. M. P.; CORRÊA, A. D.; SANTOS, C. D. MORAIS, A. R. Quantificação de polifenóis e digestibilidade protéica de famílias de feijoeiro comum. *Ciência Agrotécnica*. v. 27, n. 4, p.858-864, 2003.

MIN, B. R.; HART. S.P Tannins for suppression of internal parasites. *Journal Animal Science*. v. 81, p. 102-109, 2003.

MIN, B. R.; PINCHAK, W. E.; ANDERSON, R. C.; FULFORD, J. D.; PUCHALA, R. Effects of condensed tannins supplementation level on weight gain and in vitro and in vivo bloat precursors in steers grazing winter wheat. *Journal Animal Science*. v. 84, p. 2546–2554, 2006.

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

OTERO, M. J; HIDALGO, L. G. Taninos condensados en especies forrajeras de clima templado: efectos sobre la productividad de rumiantes afectados por parasitosis gastrointestinales (una revisión). *Livestok Research of Rural Developement*. v. 16, n.2, 2004.

PHILLIPS, L.G.; HAQUE, Z.; KINSELLA, J.E. A method for the measurement of foam formation and stability. *Journal of Food Science*, v. 52, n. 4, p. 1074-75, 1987.

PEDREIRA, M. S.; OLIVEIRA, S.G.; BERCHIELLI, T.T.; PRIMAVESI, O. Aspectos relacionados com a emissão de metano de origem ruminal em sistemas de produção de bovinos. *Archives of Veterinary Science*. v. 10, n. 3, p. 24-32, 2005.

PEREIRA FILHO, J.M.; VIEIRA, E. L.; KAMALAK, A.; SILVA, A. M A.; CEZAR, M. F.; BEELEN, P. M. G. Correlação entre o teor de tanino e a degradabilidade ruminal da matéria seca e proteína bruta do feno de jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* Wild) tratada com hidróxido de sódio. *Livestok Research of Rural Developement*. v. 17, n. 8. 2005.

REED, J. D. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of Animal Science*. v. 73. p. 1516-1528. 1995.

SAEG Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernades- UFV- Viçosa, 2007.

VIEIRA, M. E. Q.; COSTA, C.; SILVEIRA, A. C.; ARRIGONI, M. B Porcentagens de Saponinas e Taninos em Vinte e Oito Cultivares de Alfafa (*Medicago sativa* L.) em Duas Épocas de Corte - Botucatu – SP. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v. 30, n. 5, p. 1432-1438, 2001.

WISSING, A. The utilization of bark II: Investigation of the Stiasny-reaction for the precipitation of polyphenols in Pine bark extractives. *Svensk Papperstidning*. v. 58, n. 20, p. 745-750, 1955.

CAPÍTULO III

ASSOCIAÇÃO DE FUNGOS A CINCO ESPÉCIES DE LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS

RESUMO

Objetivou-se neste trabalho investigar a presença de fungos associados a cinco espécies de leguminosas forrageiras *Pueraria phaseoloides* (kudzu tropical), *Neonotonia wightii* (soja perene), *Macrotylloma axillare* (macrotiloma), *Calopogonium mucunoides* (calopogônio) e *Arachis pintoi cv.amarillo* (amendoim forrageiro) O experimento foi conduzido no setor de forragicultura e pastagem do Departamento de Nutrição Animal e Pastagem da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, Seropédica, RJ. Foram montadas laminas com fita adesiva utilizando azul de algodão e NaOH das amostras das folhas das leguminosas semeadas em Agar Sabouraud Dextrose e Agar simples montando-se lâminas com fita adesiva ou lamínulas de vidro das colônias de fungo desenvolvida. Na identificação observaram-se a macroscopia e microscopia das colônias desenvolvidas e identificando os gêneros dos fungos desenvolvido de acordo com Barnett e Hunter (1990) e Pitt e Hocking (1997) utilizando-se os elementos de reprodução amorfas dos fungos. As colônias desenvolvidas em Agar Sabouraud Dextrose e Agar Simples foram macroscopicamente e microscopicamente observadas sendo identificados os seguintes gêneros de fungos: *Alternaria spp*, *Phitomyces chartarum*, *Nigrospora spp*, *Cladosporium spp*, *Mucor spp*, *Fusarium spp*, *Pseudomicrodochium spp*, *Tetraploa spp*, *Acremonium spp*, *Aspergillus niger*, *Curvularia spp* e *Micélia sterília*.

Palavras-chave: Fitopatologia. Fixação biológica de nitrogênio. Saprofitismo.

ABSTRACT

This study was performed for researching fungi presence associated to five forage legumes species: *Pueraria phaseoloides* (puero), *Neonotonia wightii* (perennial soybean), *Macrotyloma axillare* (archer), *Calopogonium mucunoides* (calopo) and *Arachis pintoi* cv amarillo (pinto) the survey was carried out in Forage and Pasture area, Pasture and Animal Feeding Department from Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Brazil. From Sabouraud dextrose agar and simple agar fungi colonies adhesive tape slates, stained by Blue cotton and NaOH from legumes leaves samples were performed. According to Barnett and Hunter, 1990 and Pitt and Hocking, 1997, by fungi amorphous reproduction elements, fungi colonies were macroscopically and microscopically observed as well as fungi genero were identified the following fungi: *Alternaria spp*, *Phitomyces chartarum*, *Nigrospora spp*, *Cladosporium spp*, *Mucor spp*, *Fusarium spp*, *Pseudomicrodochium spp*, *Tetraploa spp*, *Acremonium spp*, *Aspergillus niger*, *Curvularia spp* and *Micelia sterilia* were reported at all.

Key words: Phytopathology, Biological nitrogen fixation. Saprophytism.

1 INTRODUÇÃO

A introdução de leguminosas forrageiras em sistemas de pastagens vem ganhando cada vez mais adeptos seja pela promoção de incrementos na produção animal, devido o aumento da qualidade e/ou da quantidade de forragem, resultante da participação direta da leguminosa na dieta animal ou pelos seus efeitos indiretos relacionados com a fixação biológica de nitrogênio e seu repasse ao ecossistema de pastagem o que reduz os custos com adubação nitrogenada.

Pesquisas com leguminosas forrageiras têm despertados interesses de vários pesquisadores, porém os trabalhos desenvolvidos têm sido em termo de produção, persistência e avaliação da quantidade de nitrogênio fixado por ha.ano⁻¹ e transferido para as gramíneas quando plantada em consórcio. Entre as espécies leguminosas forrageiras existentes no mercado destacam-se o *Calopogonium muconoides* (calopogônio), *Pueraria phaseoloides* (kudzu tropical), *Neotonia wightii* (soja perene) e *Leucaena leucocephala* (leucena) as quais correspondem o maior volume de sementes de leguminosas comercializadas no Brasil (PIZARRO e CARVALHO, 1992) citado por (PEREIRA, 2002).

A baixa persistência das leguminosas na pastagem tem sido citada como a principal limitação à sua inclusão nos sistemas de produção ou até mesmo à continuidade das pesquisas necessárias ao lançamento de novos materiais. Um dos fatores mais importantes para o uso de leguminosas é a sua aceitabilidade pelos animais decorrentes da existência de fatores antiqualitativos decorrente do metabolismo secundário da forrageira, que levam os animais a rejeitarem-nas na época das águas consumindo preferentemente as gramíneas. A produção de metabólitos secundários está envolvida com a resposta da forragem aos estímulos externos dentre os quais estão correlacionados à presença de fungos que podem estar envolvidos com fitopatologias apresentadas pelas forrageiras, bem como, pela produção de metabólitos secundários fúngicos que podem atuar unicamente como fatores antiqualitativos ou em sinergismo com os metabólitos secundários da forragem reduzindo ainda mais o consumo voluntário e o desempenho dos animais, além dessas situações os fungos podem atuar como parasitas oportunistas e provocar doenças diretamente aos animais e manipuladores de forrageiras que entrarão na dieta dos animais.

Entre os metabólitos secundários fúngicos estão as micotoxinas que ocasionam enfermidades aos animais, o que compromete o desempenho da produção animal e a saúde do homem. O efeito negativo de algumas micotoxinas sobre a ingestão de alimento, pode ser devido às alterações no odor ou aceitabilidade dos alimentos contaminados.

Segundo Mertens e Watt (1977) citados por Jouany (2001) o pó presente nas forragens secas associado com a presença de mofo e esporos pode estar envolvido no decréscimo da aceitabilidade, além disto, existem as desordens metabólicas e digestivas causadas pela presença de micotoxinas e que provavelmente estão envolvidas na redução da ingestão voluntária do alimento. Os fungos também estão relacionados com a depreciação do feno de forrageiras no comércio devido à rejeição por parte dos produtores devido ao aspecto repugnante da forragem, o que ocasiona prejuízo aos produtores de feno.

O cultivo de fungos em meio de cultura Agar simples e Agar Sabouraud além de propiciar meios de diagnósticos de fungos, são técnicas de produção de fungos para fins de obtenção de colônias puras para identificação mais precisa quanto à espécie e produção de micotoxinas. O conhecimento da microbiota fúngica das forrageiras serve tanto para adequar técnicas de manejo específicas de controle das fitopatologias causadas por fungos quanto à eliminação de risco com intoxicação com micotoxinas.

Objetivou-se neste trabalho investigar a presença de fungos em cinco espécies de leguminosas forrageiras, calopogônio, soja perene, kudzu tropical, macrotiloma e amendoim forrageiro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os fungos filamentosos produzem uma imensa diversidade de metabólitos secundários, como pigmentos, antibióticos, fitotoxinas além de compostos tóxicos denominados de micotoxinas. Quando produzidos em associação com os alimentos, ração animal e forragens, os metabólitos tóxicos podem ser ingeridos pelo homem e animais, e provocar as micotoxicoses (MOSS, 1991). Em forragicultura são encontrados dois grupos de fungos: i) fungos de campo, que infectam as forrageiras ainda no campo e ii) fungos de armazenamento, que colonizam as forragens um pouco antes ou durante o armazenamento, e normalmente são encontrados em grande número em armazéns, moinhos, silos, elevadores, equipamentos e lugares onde são armazenados, manuseados e processados produtos agrícolas.

As micotoxinas, metabólitos fúngicos secundários presentes numa grande parte de alimentos, além de provocarem grandes perdas econômicas para os produtores de cereais e processadores de alimentos, representam um sério risco para a saúde humana e animal. A microflora fúngica está estimada entre 200.000 e 300.000 espécies e identificadas mais de 400 micotoxinas (LINO et al., 2004).

A principal via de exposição dos animais a micotoxinas é através da ingestão de alimentos contaminados, apesar de existirem casos esporádicos de inalação. Porém, as pessoas envolvidas em atividades agrárias estão potencialmente expostas a vários agentes nocivos tais como: poeira inorgânica a partir do solo, poeira orgânica contendo microorganismos, micotoxinas ou alérgenos, gases de decomposição, pesticidas, etc. A exposição orgânica pode afetar as vias aéreas e resultar em processos obstrutivos ou síndromes tóxicas (VIEGAS, 2000).

As micotoxinas quando presentes em níveis elevados na dieta podem ocasionar problemas agudos de saúde e até a morte. Já a prolongada exposição a teores baixos pode levar manifestações ocultas e insidiosas de: depressão da imunidade, atrasos do crescimento, susceptibilidade a doenças, e a problemas crônicos de saúde, o que suscita preocupação por parte de diversas organizações internacionais.

A produção de micotoxinas está ligada ao crescimento do fungo sem o qual geralmente a produção não ocorre, entretanto, a presença do fungo produtor não indica a presença de micotoxina, especialmente se o crescimento não ocorre (GONÇALEZ et al., 2001). A síntese de micotoxinas é determinada geneticamente e intimamente relacionada às vias metabólicas principais (aminoácidos e ácidos graxos). A produção de toxina e o grau de contaminação de alimentos e gêneros alimentícios são regulados por fatores ambientais, composição e textura do substrato, umidade e temperatura (MINAMI et al., 2004).

De acordo com Speijers e Speijers (2004) citados por Lino et al. (2004) a presença de diferentes espécies de fungos sobre um mesmo substrato pode estar relacionada com a produção de diferente micotoxinas com efeito aditivo ou sinérgico.

Os levantamentos de fitodoenças são realizados com vários objetivos dentre eles, o desenvolvimento de trabalhos de pesquisa, além de ser uma fonte importante de dados sobre a ocorrência, frequência e a distribuição geográfica de doenças Pozza et al. (1999).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Setor de Forragicultura e Pastagens do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRRJ), no município de Seropédica, RJ (latitude: 22°46'59" S, longitude: 43°40'45" W e altitude de 33m).

As leguminosas utilizadas foram kudzu tropical (*Pueraria phaseoloides*), soja perene (*Neonotonia wightii*), macrotiloma (*Macrotylloma axillare*), calopogônio (*Calopogonium mucunoides*) e amendoim forrageiros (*Arachis pintoi cv.amarillo*) as quais foram cultivadas em canteiros de 3x2m, em delineamento em bloco ao acaso com quatro repetições.

O material (folhas) foi coletado a uma altura de 20cm do solo em pontos aleatórios dos canteiros das leguminosas e acondicionados em sacos de papel e encaminhado para análise microbiológica no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária do Instituto de Medicina Veterinária da UFRRJ para verificar a presença de fungos associados às leguminosas.

Para crescimento das colônias fúngicas, fragmentos de folhas das leguminosas estudadas foram inoculados em Agar Sabouraud Dextrose e Agar Simples permanecendo as placas em estufa com temperatura ambiente ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) por um período de setes dias.

Das folhas das leguminosas e das colônias de fungos desenvolvidas em meio Agar Sabouraud Dextrose e Agar Simples foram preparados lâminas utilizando Azul de algodão, fita adesiva e/ou lamínula de vidro. Para identificação foram utilizados os elementos de reprodução amorfos dos fungos de acordo com a chave taxonômica de Barnett e Hunter (1990) e Pitt e Hocking (1997).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão relacionados os fungos presentes em cada espécie de leguminosa, a qual apresenta resultados diferentes quanto à presença de fungos entre os métodos de identificação.

Tabela 1 Fungos presentes nas leguminosas: amendoim forrageiro, calopogônio, kudzu tropical, macrotiloma e soja perene.

Métodos de diagnóstico	leguminosas				
	Amendoim forrageiro	Calopogônio	Kudzu tropical	Macrotiloma	Soja perene
Imprint ¹	<i>Alternaria spp</i>	<i>Nigrospora spp</i>	<i>Alternaria spp</i>	-	<i>Nigrospora spp</i>
	<i>Phitomyces chartarum</i>	<i>Phitomyces chartarum</i>	<i>Tetraploa spp</i>		<i>Phitomyces chartarum</i>
	<i>Nigrospora spp</i>	<i>Cladosporium spp</i>	<i>Pseudomicrodochium spp</i>		<i>Alternaria spp</i>
	<i>Cladosporium spp</i>	<i>Aspergillus niger</i>			<i>Tetraploa spp</i>
Cultivo ²	<i>Fusarium spp</i>	<i>Mucor spp</i>	<i>Alternaria spp</i>	<i>Alternaria spp</i>	<i>Fusarium spp</i>
	<i>Curvularia spp</i>	<i>Fusarium spp</i>	<i>Micélia sterília</i>	<i>Fusarium spp</i>	<i>Cladosporium spp</i>
	<i>Micélia sterília</i>			<i>Acremonium spp</i>	

¹ Imprint utilizando fita adesiva/ou lamina de vidro e azul de algodão.

² Método de identificação em cultivo em Agar Sabouraud e Agar Simples.

No amendoim forrageiro foram identificados os fungos *Alternaria spp*, *Phitomyces chartarum*, *Nigrospora spp*, *Cladosporium spp*, foram identificados por imprint com fita adesivas enquanto que foi observado no cultivo em Agar sabouraud dextrose e Agar simples os fungos: *Fusarium spp*, *Curvularia spp* e *Micélia sterília*. No macrotiloma foram observados os fungos *Alternaria spp*, *Fusarium spp*, *Acremonium spp* não sendo observado fungo por imprint. No calopogônio foi identificado pelo método do imprint em lâmina de vidro *Phitomyces chartarum*, *Nigrospora spp*, *Cladosporium spp* e *Aspergillus niger*, e no cultivo em meio de culturas foram identificados os fungos *Mucor spp* e *Fusarium spp*. No kudzu foram identificados os fungos *Pseudomicrodochium spp*, *Tetraploa spp* e *Alternaria spp* no imprint, enquanto que no meio de culturas foram identificados os fungos *Alternaria spp* e *Micélia sterília*. Na soja perene foram observados os fungos *Phitomyces chartarum*, *Alternaria spp*, *Tetraploa spp* e *Nigrospora spp* pelo método do imprint com fita adesiva e lamínulas de vidro e no cultivo foram identificados os fungos *Fusarium spp* e *Cladosporium spp*.

Os fungos *Curvularia, spp*, *Aspergillus spp*, *Mucor spp*, *Cladosporium, spp*, são potencialmente patogênicos para animais e são comumente identificados a partir de vegetais e do solo, induzindo a crer na origem exógena de determinadas micoses, pressupondo-se que os mesmos são veiculados para os animais e para o homem através de aerossóis, pequenos ferimentos com estruturas vulnerantes de origem vegetal, dentre outros. O que sugere técnicas de segurança adequada de trabalho a campo (ZAMPRONHA et al., 2005).

Fungos oportunistas como dos gêneros: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Candida*, *Fusarium*, são responsáveis por doenças desde otites, micotoxicoses, infecções urinárias, onicomioses, infecções oculares até fungemias o que sugere a importância de medidas de manejo

específica para diminuição da presença destes fungos nas pastagens (CARMO et al. 2007). Nas fazendas os animais contaminados por micotoxinas tendem a apresentar grandes perdas econômicas devido aos menores desempenhos, imunossupressão, interferência na fertilidade e resíduos em produtos animais além das perdas com medicamentos, diagnóstico e custo de reposição dos animais mortos (PEREIRA et al., 2005).

É importante ressaltar que a presença do fungo toxigênico não implica necessariamente na produção de micotoxinas, que estão intimamente relacionadas à capacidade de biossíntese dependente do fungo e das condições ambientais predisponentes, como, em alguns casos, a alternância das temperaturas diurna e noturna (SANTIN et al., 2000). Entretanto, a associação fungo-forragem indica um meio potencial de produção de micotoxina.

E de acordo com Quinn et al., (2005) os fungos *Fusarium spp*, *Aspergillum niger*, *Phitomyces chartarum*, *Cladosporium spp*, *Alternaria spp*, *Acremonium spp* e *Mucor spp*, são potencialmente produtores de micotoxinas.

5 CONCLUSÕES

A presença de fungos no kudzu tropical, macrotiloma, calopogônio, amendoim forrageiro e soja perene é indicativa da necessidade de estudos para relacioná-los com a possível produção de doenças, micotoxinas, infecção de indivíduos imunocomprometidos e produção de fitodoeças.

A presença dos fungos *Mucor spp*, *Acremonium spp*, *Alternaria spp*, *Aspergillus niger*, *Curvularia spp*, *Fusarium spp*, *P. chartarum* potencialmente capazes de produzir micotoxinas sugere estudos sobre medidas de manejo específicas com a finalidade de evitar perdas ao utilizar estas leguminosas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARNETT H. L.; HUNTER B. B. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 3. ed. Minnesota: Burgess Publishing Company, 1990. 370p.
- CARMO, E. S.; BELÉM, L. F.; CATÃO, R. M. R.; LIMA, E. O.; SILVEIRA, I. L.; SOARES, L. H. M. Microbiota fúngica presente em diversos setores de um hospital público em Campina Grande – PB. *Revista Brasileira de Análise Clínica*. v. 39, n. 3, p. 213-216, 2007.
- GONÇALEZ, E.; PINTO, M. M.; FELICIO, J. D. Análise de micotoxinas no Instituto Biológico de 1989 a 1999. *O Biológico*, v. 63, n. 1/2, p. 15-19, 2001.
- JOUANY, J.P. 2001. The impact of mycotoxins on performance and health of dairy cattle. In: Alltech's 17th Annual Symposium, 2001. *Proceedings...*2001. p.191-222.
- LEMPP, B. Avanços metodológicos da microscopia na avaliação de alimentos. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v. 36, supl., p. 316-319, 2007.
- LINO, C. M.; SILVA, L. J. G.; PENA, A. S. Fumonisin: presença em alimentos, implicações na saúde e aspectos legislativos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. v. 99, n. 552, p. 181-192.
- MINAMI, L.; MEIRELLES, P. G.; HIROOKA, E. Y.; ONO, E. Y. S. Fumonisin: efeitos toxicológicos, mecanismo de ação e biomarcadores para avaliação da exposição *Semina: Ciências Agrárias*, v. 25, n. 3, p. 207-224, 2004.
- MOSS, M.O. Economic importance of mycotoxins-recent incidence in the United States. *Animal Science*, v.27, p. 3941- 3949, 1991.
- PEREIRA, J. M. Leguminosas forrageira em sistemas de produção de ruminantes: Onde estamos? Para onde vamos? In Simpósio sobre manejo estratégico da pastagem, 2002, Viçosa. *Anais...* Simpósio sobre manejo estratégico da pastagem. Viçosa - MG : UFV, 2002. v. Unico. p. 109-148.
- PEREIRA, M. M. G.; CARVALHO, E. P.; PRADO, G.; ROSA, C. A. R.; VELOSO, T.; SOUZA, L. A. F. e RIBEIRO, J. M. M. Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais – Brasil. *Ciência Agrotécnica*. v. 29, n. 1, p. 106-112, 2005.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. *Fungi and food spoilage*. Australia: CSIRO Division of Food Science and Technology Sydney Academic, Press, 1997. 920 p.
- POZZA, E. A.; SOUZA, P. E.; CASTRO, H. A.; POZZA, A. A. A. frequência da ocorrência de doenças da parte aérea de plantas na região de Lavras-MG. *Ciência e Agrotecnologia*. v. 23, n.4, p.1001-1005, 1999.
- QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, J. W.; LEONARD, F. C. *Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas*. Tradução WEISS, L. H. N e WEISS, R. D. N. Porto Alegre: ed. Artimed. p.512, 2005.

SANTIN, E.; MAIORKA, A.; ZANELLA, I.; MAGON, L. Micotoxinas do *fusarium* spp na avicultura comercial. *Ciência Rural*. v. 31, n. 1, p.185-190, 2000.

VIEGAS, C. A. A. Agravos respiratórios decorrente da atividade agrícola. *Jornal de Pneumonia*. v. 26, n. 2, 2000.

ZAMPRONHA, C. C. C.; OLIVEIRA, I. P.; MONTEIRO, M. S. R.; SANTOS, K. J G.; ARAUJO, A. A. Isolamento e identificação de dermatófitos de animais presentes no Campus II Da Universidade Católica de Goiás. *Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos*. v. 1, n.1, p. 22-36, 2005.

7 CONCLUSÕES GERAIS

A prospecção fitoquímica em conjunto com os métodos físicos de análise orgânica serviu para propor quais as classes de substâncias estão presentes nas leguminosas.

A presença de classes de metabólitos secundários e a aceitabilidade por animais propiciam estudos quanto a estruturas químicas dos compostos presentes em cada classe, relacionando-os com os efeitos nos animais.

A presença destes metabólitos deve ser relacionada com os benefícios proporcionados pelas leguminosas.

A seleção das leguminosas pelos animais deve ser levada em consideração quanto ao objetivo da utilização desta em sistemas de pastagens, ou seja, melhora das condições do pasto ocasionada pelo incremento de nitrogênio o que reduz custo com adubação química ou fonte de matéria seca e/ou proteína para a alimentação animal.

As classes de metabólitos detectadas nem sempre significam problemas nutricionais porque depende das estruturas das substâncias dentro de cada classe.

A estabilidade da espuma e o teor de tanino necessitam de estudos levando em consideração a fisiologia e microbiota ruminal.

A presença de fungos mostra a necessidade de manejo quanto a possíveis micotoxinas.

ANEXOS

A- PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

Triagem Fitoquímica ou Screening Fitoquímico é considerada mais precisamente a parte preliminar de um trabalho químico sobre uma planta. Sem chegar a detalhes, a triagem procura sistematizar, ou melhor, rastrear os principais grupos de constituintes químicos que compõem um extrato vegetal.

1. Alcalóides (WALL et al., 1954).

Redissolver alguns miligramas do resíduo em 4ml de ácido clorídrico a 1%. Filtrar se necessário. Separar duas porções de 2ml para tubos de ensaio diferentes e adicionar 5 gotas dos reagentes abaixo. A ocorrência de precipitado indica reação positiva.

• Dragendorff

Solução A	Subnitrato de bismuto	0,17g
	Ácido acético glacial	2ml
	Água destilada	8ml

Solução B	Iodeto de potássio	1,6g
	Água destilada	4ml

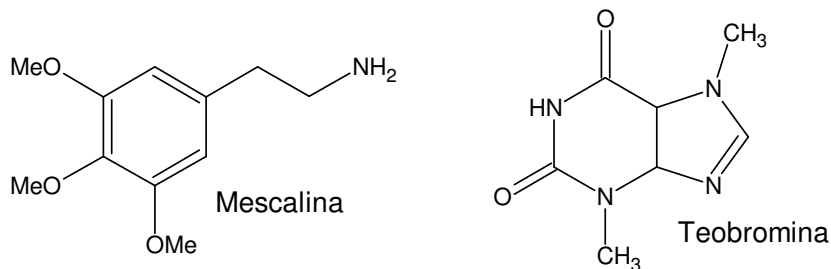
Mistura solução A com solução B. O precipitado tem vermelho tijolo.

• Mayer

Cloreto de mercúrio	280mg
Iodeto de potássio	1g
Água destilada	20ml

O precipitado tem coloração esbranquiçada

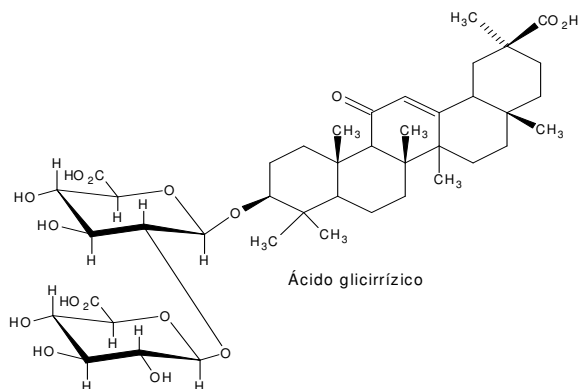
Ex.:



2 Saponinas (BARBOSA, 2001)

Redissolver alguns miligramas do resíduo em 3ml de água destilada. Agitar vigorosamente em tubo de ensaio por 5 segundos. Deverá formar espuma que permanecerá persistente pelo menos durante 20 minutos, indicando a presença de saponina.

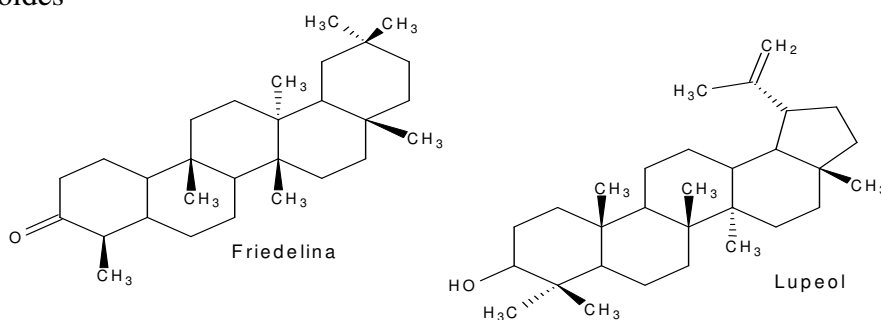
Ex.:



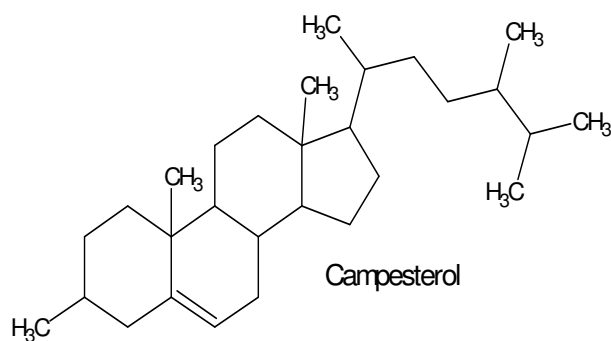
3 Esteróides e triterpenóides (WALL et al., 1954).

Redissolver alguns miligramas do resíduo em 3ml de clorofórmio. Filtrar se necessário. Juntar 2ml de anidrido acético ao extrato. Agitar suavemente. Pelas paredes do tubo adicionar 1ml de ácido sulfúrico concentrado. No caso de reação positiva, observar-se-á uma sucessão de cores, róseo ao azul e verde.

Ex: triterpenóides



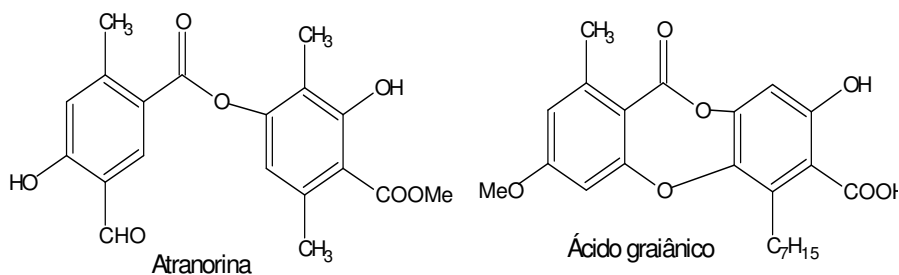
Ex. Esteróides



4 Depsídios e depsidonas (COSTA, 1972).

Redissolver alguns miligramas do resíduo em 5ml de éter etílico. Filtrar se necessário. Evaporar todo o éter em banho-maria. Juntar ao resíduo 3ml de metanol. Agitar e adicionar 3 gotas de solução de cloreto férrico a 1%. A coloração verde, azul ou cinza indica reação positiva.

Ex.:



5 Flavanóides (WALL et al., 1954).

Redissolver alguns miligramas do resíduo em 3ml de metanol. Filtrar se necessário. Adicionar 1ml de ácido clorídrico concentrado. Deixar esta solução reagir com uma fita de magnésio. O surgimento de uma coloração rósea na solução indica reação positiva.

6 Catequinas (COSTA, 1972)

Redissolver alguns miligramas do resíduo em 3ml de metanol. Filtrar se necessário. Juntar 1ml de solução de vanilina a 1% e 1ml de ácido clorídrico concentrado. Deixar esta solução reagir com uma fita de magnésio. O surgimento de uma coloração vermelha intensa indica reação positiva.

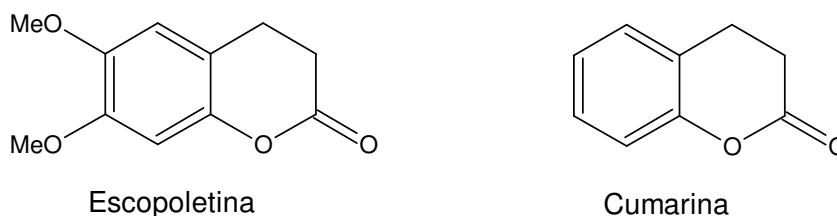
7. Quinonas (MATOS, 1988)

Redissolver alguns miligramas do resíduo em 5ml de éter etílico em um tubo de ensaio. Adicionar 2ml de solução de hidróxido de amônia 6N, agitar bem a mistura e deixar separar em duas fases. O surgimento de cor vermelha na camada aquosa alcalina indica a presença de quinonas.

8. Derivados da cumarina (COSTA, 1972).

Redissolver alguns miligramas do resíduo em 5ml de éter etílico. Concentrar em banho-maria até 0,5ml. Em papel de filtro, aplicar gotas da solução etérea de modo a formar manchas de 1cm de diâmetro cada. A uma destas manchas, juntar uma gota de hidróxido de sódio 1N. Cobrir a metade da mancha com um anteparo escuro e expor a luz ultravioleta. Retirar o anteparo e verificar a existência de fluorescência azul na parte descoberta da mancha, que indica reação positiva.

Ex.:



9. Sesquiterpenlactonas e outras lactonas (DOMINGUEZ, 1973).

Redissolver alguns miligramas do resíduo em 2ml de metanol. Adicionar duas gotas de cloridrato de hidroxilamina 10% e duas gotas de solução metanólica de hidróxido de potássio 10%. Aquecer suavemente em banho-maria durante dois minutos. Em seguida, esfriar e acidificar com ácido clorídrico 1N. Adicionar 1 gota de cloreto férrico 1%. A coloração violeta indica reação positiva.

10. Glicosídeos cardíacos (DOMINGUEZ, 1973).

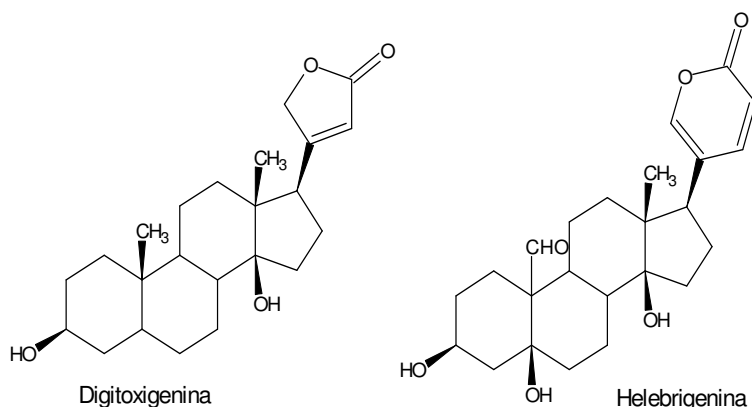
Redissolver alguns miligramas do resíduo em 4ml de metanol. Filtrar se necessário. Separar em 2 porções de 2ml cada e adicionar gotas aos reagentes a seguir:

Reativo de Kedde	Solução I	Acido 3,5-dinitrobenzóico	2g
		metanol	100g
	Solução II	Hidróxido de potássio	0,71g
		Água destilada	18,8ml

No momento da reação juntar partes iguais de I e II. A coloração azul ou violeta indica reação positiva.

Adicionar 3 gotas de solução recente a 5% de nitroprussionato de sódio em água e 3 gotas de hidróxido de sódio 2N. A coloração roxa intensa indica reação positiva.

Ex.:



11. Açúcares redutores (COSTA, 1972).

Teste A) Redissolver alguns miligramas do resíduo em 3ml de água destilada. Filtra se necessário. Adicionar 2ml do reativo de Fehling A e 2ml de reativo de Fehling B. aquecer em banho-maria até ebulição por 5 minutos. A formação de um precipitado vermelho-tijolo indica reação positiva. No caso de reação negativa executar o teste B.

Teste B) Redissolver alguns miligramas do resíduo em 3ml de água destilada. Adicionar 1ml de acido clorídrico concentrado e ferver em banho-maria por 10 minutos. Esfriar e neutralizar com hidróxido de ferro 20%. Filtrar se necessário. Adicionar 2ml do reativo de Fehling A e 2ml de reativo de Fehling B. aquecer em banho-maria por 5 minutos em ebulição. A formação de precipitado vermelho-tijolo indica reação positiva

Fehling	Solução A	Sulfato de cobre	1,44g
		Água destilada	20,8ml
	Solução B	Tartarato de sódio e l	7,2g
		Hidróxido de potássio	5,2g
		Água destilada	20,8ml

Na hora de usar, juntar partes iguais de A e de B.

12. Sacarídeos (BARBOSA, 2001).

Num tubo de ensaio, adicionar duas gotas de solução de bórax 1% e duas gotas de solução de fenolftaleína. Produz-se uma coloração rosa. A adição de alguns miligramas do material em estudo sobre esta solução deve ocasionar o desaparecimento da coloração rosa, que reaparece, ao se aquecer, e some novamente ao esfriar.

13. Purinas (COSTA, 1972).

Numa cápsula de porcelana, juntar alguns miligramas do resíduo, 3 gotas de ácido clorídrico 6N e duas gotas de peróxido de hidrogênio concentrado. Evaporar em banho-maria. Deve-se formar um resíduo vermelho. Juntar 3 gotas de hidróxido de amônia 6N. A coloração violeta indica reação positiva.

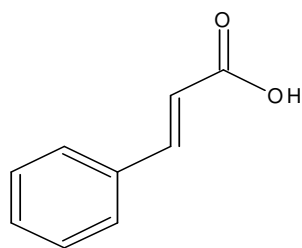
14. Ácidos orgânicos (MERCK, 1980).

Redissolver alguns miligramas do resíduo em 3ml de água destilada. Filtra se necessário. Se descorar gotas do reativo de Pasková, há reação positiva.

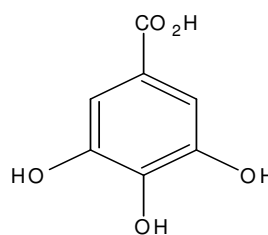
Pasková	Solução A	Verde de bromo cresol	15mg
		Azul de bromo fenol	5mg
		Etanol	20ml
	Solução B	Permanganato de potássio	0,05g
		Carbonato de sódio	0,1g
		Água destilada	20ml

Antes do uso, misturar nove partes de A com uma parte de B e utilizar a mistura imediatamente, pois a mistura é estável de 5 a 10 minutos.

Ex.:



Ácido cinâmico

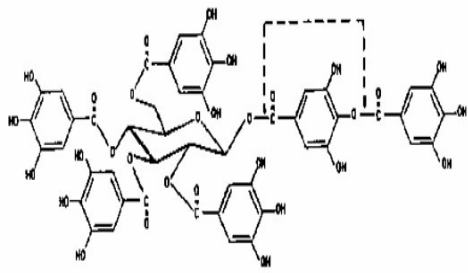


Ácido gálico

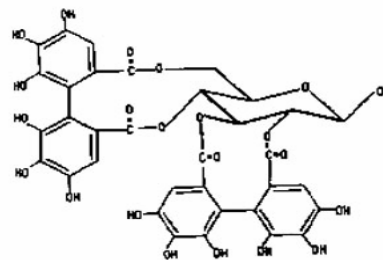
15. Testes para taninos

Redissolver alguns miligramas do resíduo em 5ml de água destilada. Filtrar se necessário. Adicionar 4gotas de solução de cloreto férrico a 1%. Aparecimento de uma coloração verde ou azul indica reação positiva.

Ex.:



GALOTANINO



ELAGITANINO

ANEXO B

Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio dos extratos e partições do kudzu tropical, macrotiloma e soja perene.

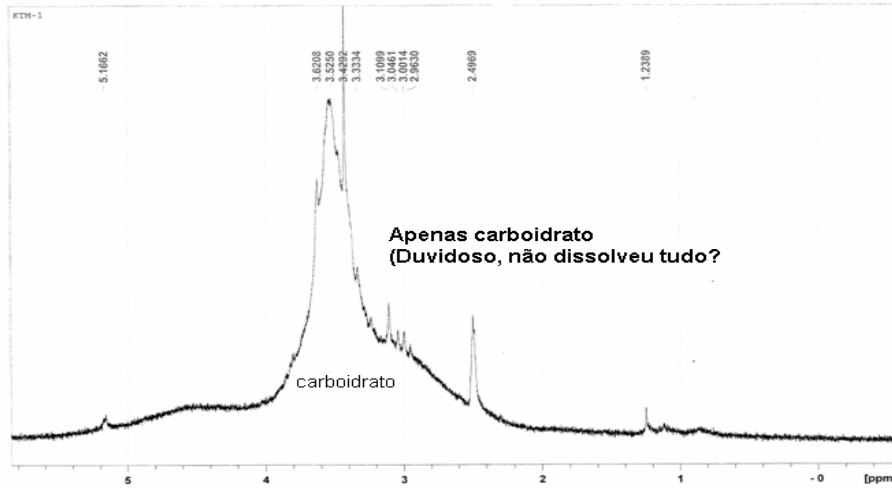


Figura-1 Espectro de RMN¹H do extrato metanólico do kudzu tropical (solvente DMSO deuterado).

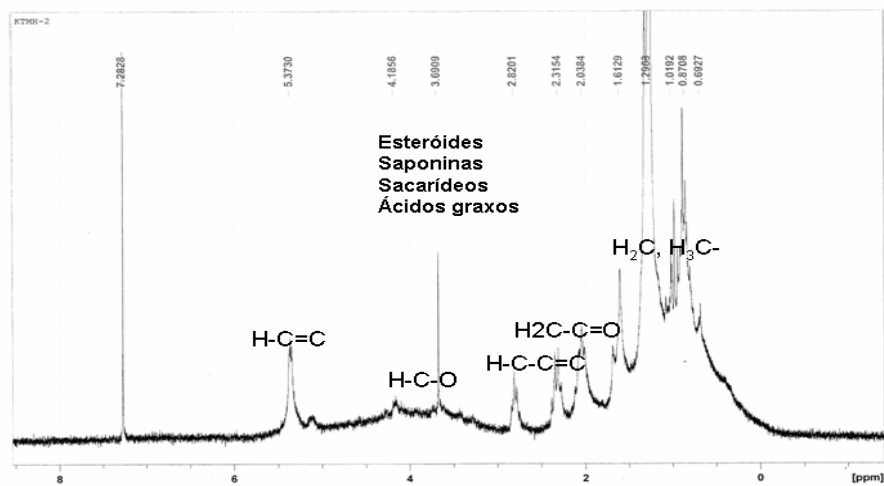


Figura-2 Espectro de RMN¹H da partição hexânica do kudzu tropical (solvente clorofórmio deuterado).

[Este espectro sugere um estudo adicional desta fração para isolar o (s) componente(s) principal(is).]

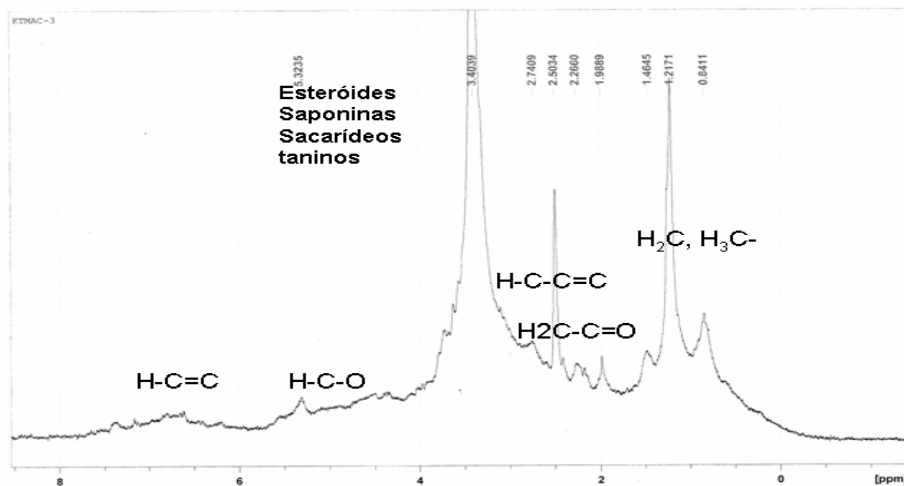


Figura-3 Espectro de RMN¹H da partição acetato de etila do kudzu tropical (solvente DMSO deuterado)

[Este espectro sugere um estudo adicional desta fração para isolar o (s) componente(s) principal(is).]

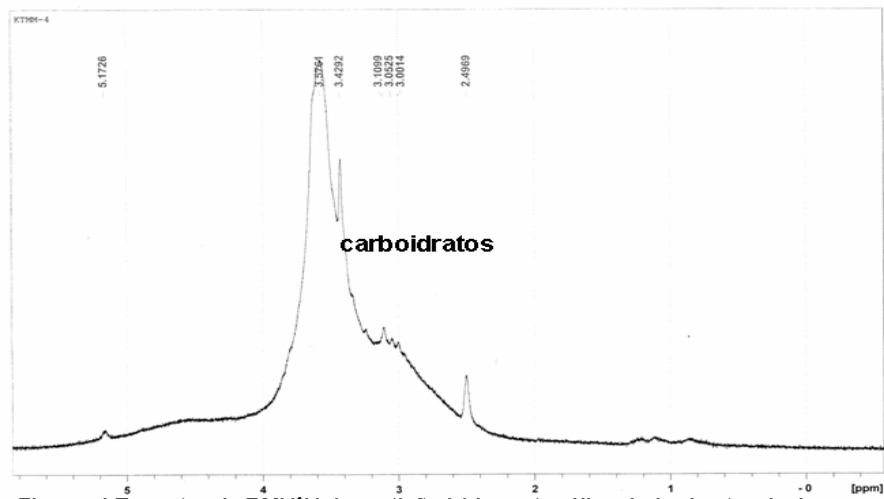


Figura-4 Espectro de RMN¹H da partição hidrometanólica do kudzu tropical (solvente DMSO deuterado).

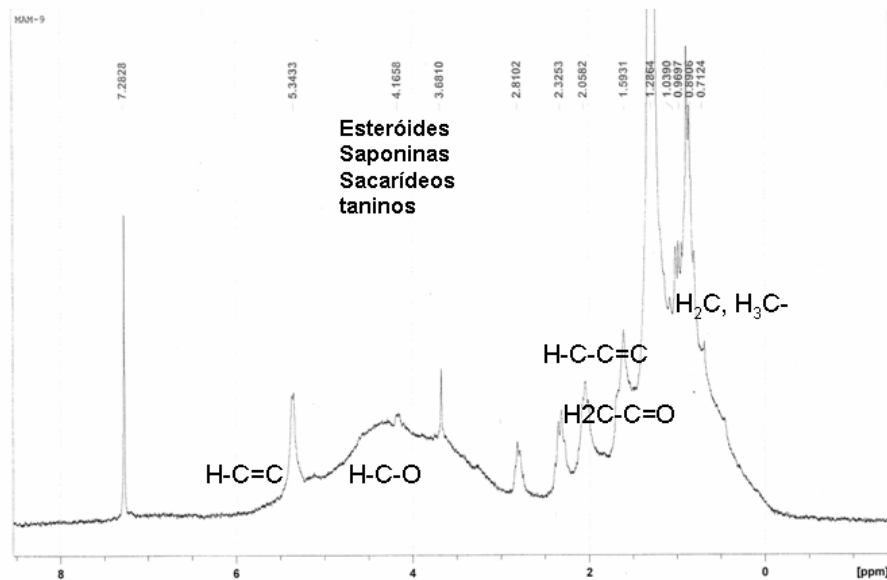


Figura-5 Espectro de RMN¹H do extrato metanólico do macrotiloma (solvente clorofórmio deuterado). [Este espectro sugere um estudo adicional desta fração para isolar o (s) componente(s) principal(is).]

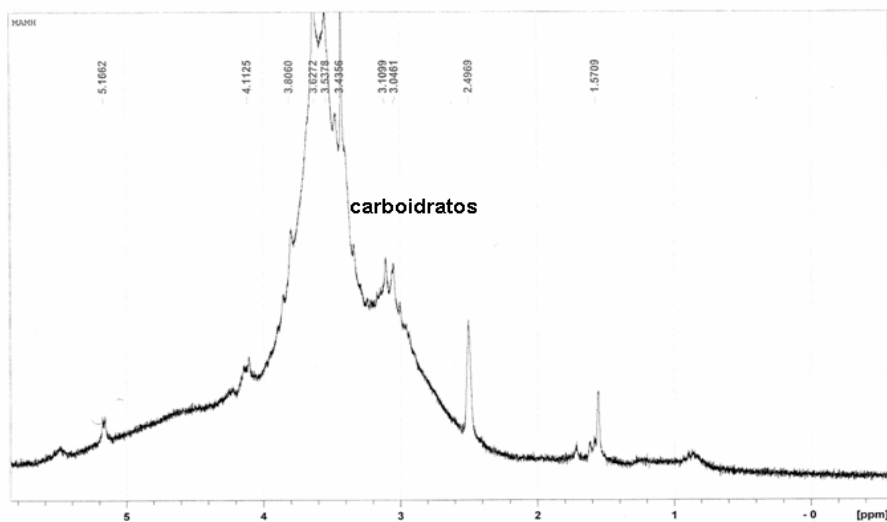


Figura-6 Espectro de RMN¹H da partição hexânica do macrotiloma (solvente DMSO deuterado).

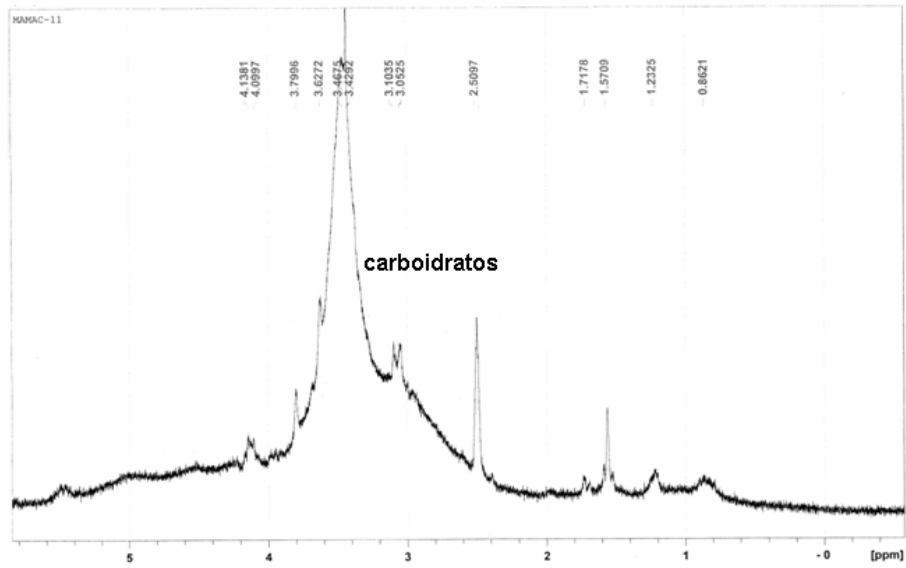


Figura-7 Espectro de RMN¹H da partição acetato de etila do macrotiloma (solvente DMSO deuterado).

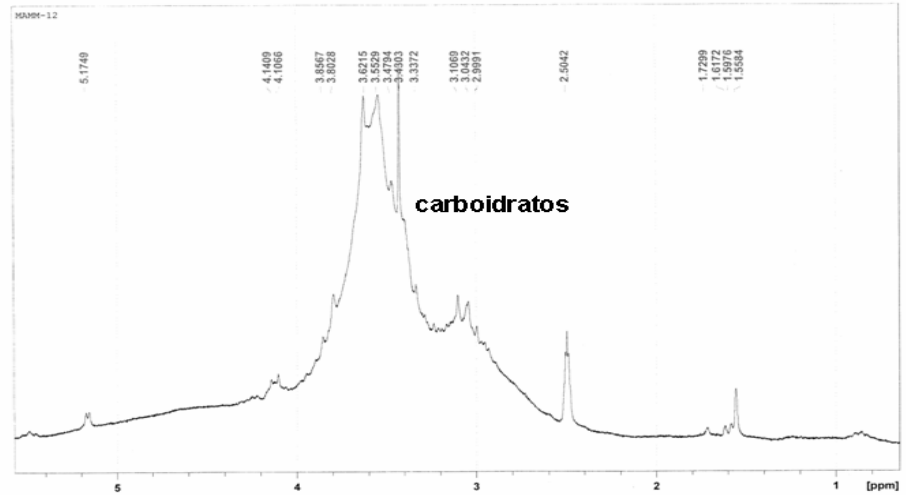


Figura-8 Espectro de RMN¹H da partição hidrometanólica do macrotiloma (solvente DMSO deuterado).

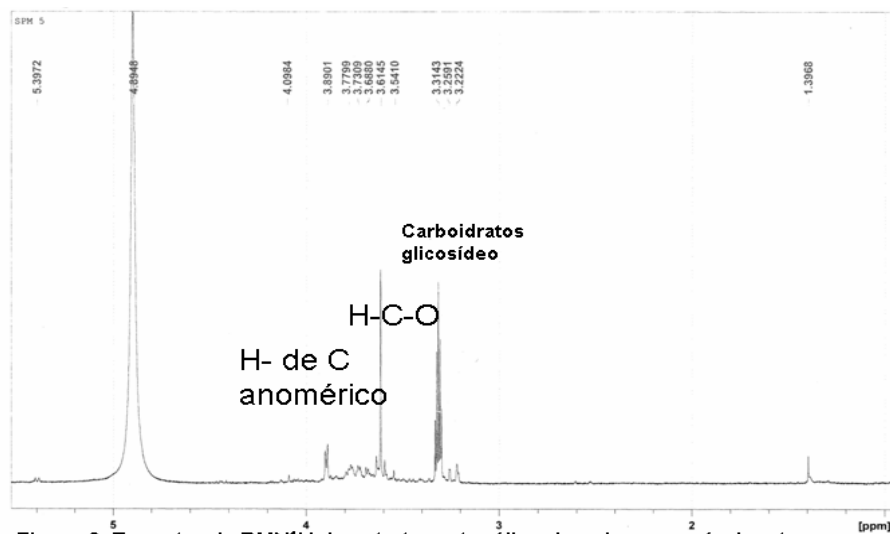


Figura-9. Espectro de RMN¹H do extrato metanólico da soja perene (solvente metanol deuterado)

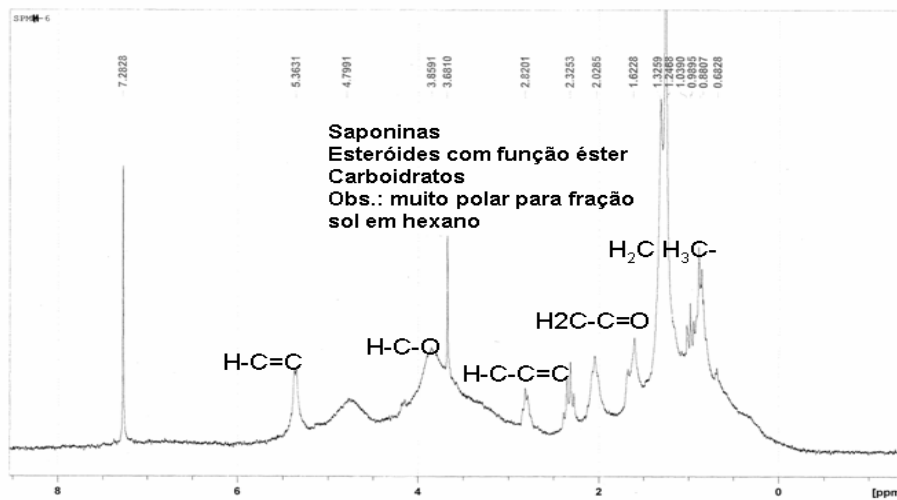


Figura- 10 Espectro de RMN¹H da partição hexânica da soja perene(solvente clorofórmio deuterado) [Este espectro sugere um estudo adicional desta fração para isolar o (s) componente(s) principal(is).]

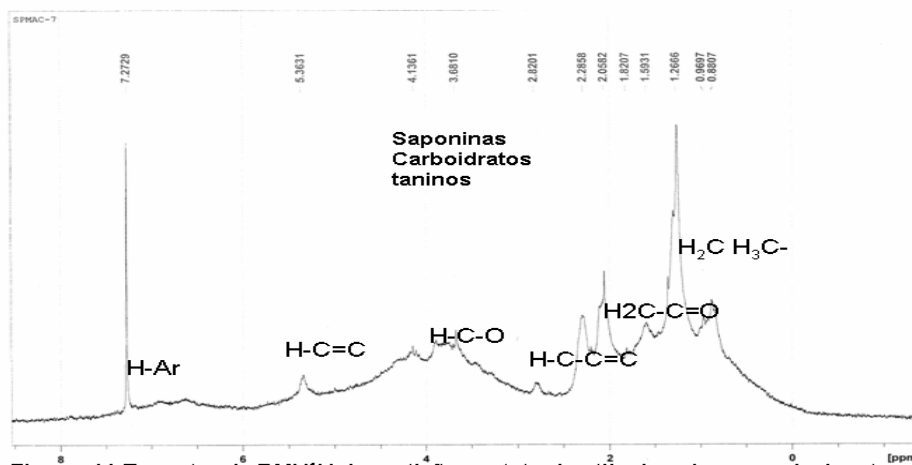


Figura- 11 Espectro de RMN¹H da partição acetato de etila da soja perene(solvente DMSO deuterado) [Este espectro sugere um estudo adicional desta fração para isolar o (s) componente(s) principal(is).]

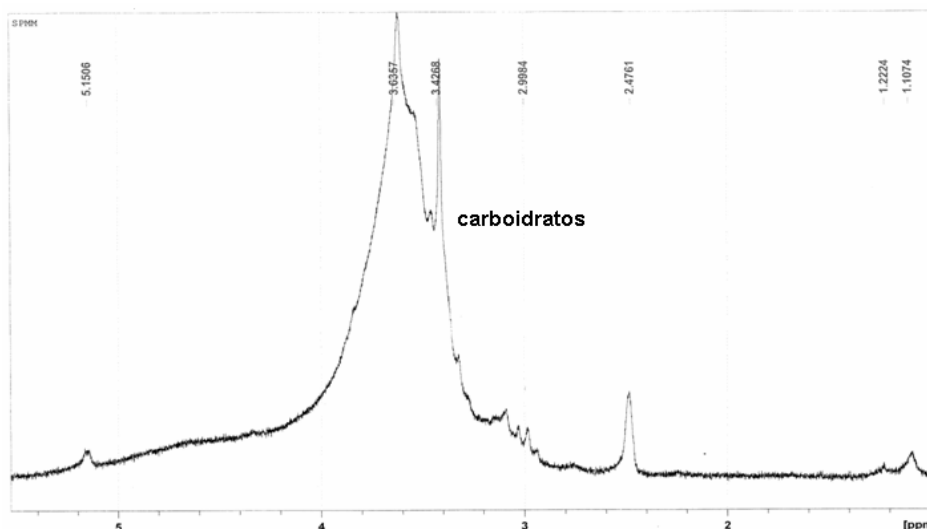


Figura- 12 Espectro de RMN¹H da partição hidrometanólica da soja perene (solvente DMSO deuterado).

Obs.: As propostas com as análises com os espectros acima não são seguras porque são muitos sinais coincidentes de diferentes classes de substâncias

ANEXO C

Espectro Infravermelho dos extratos e partições do kudzu tropical, macrotiloma e soja perene.

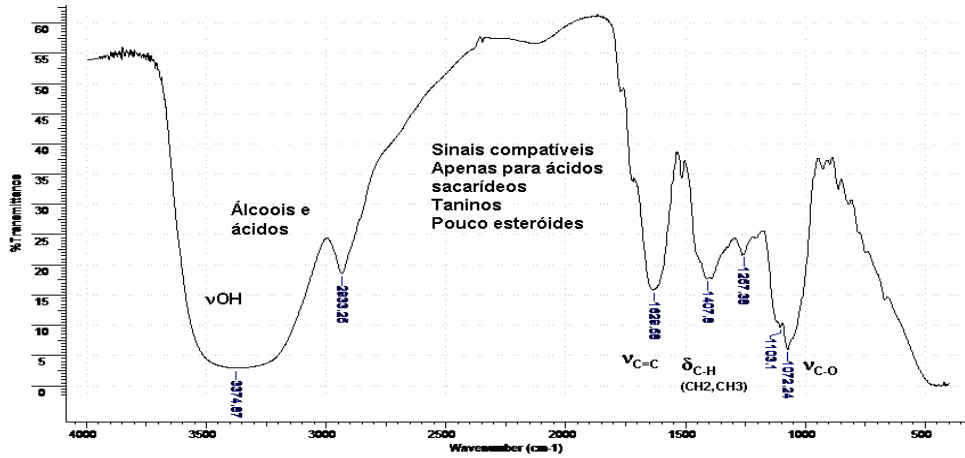


Figura-1. Espectro infravermelho do extrato metanólico do kudzu tropical (Pastilha de KBr).

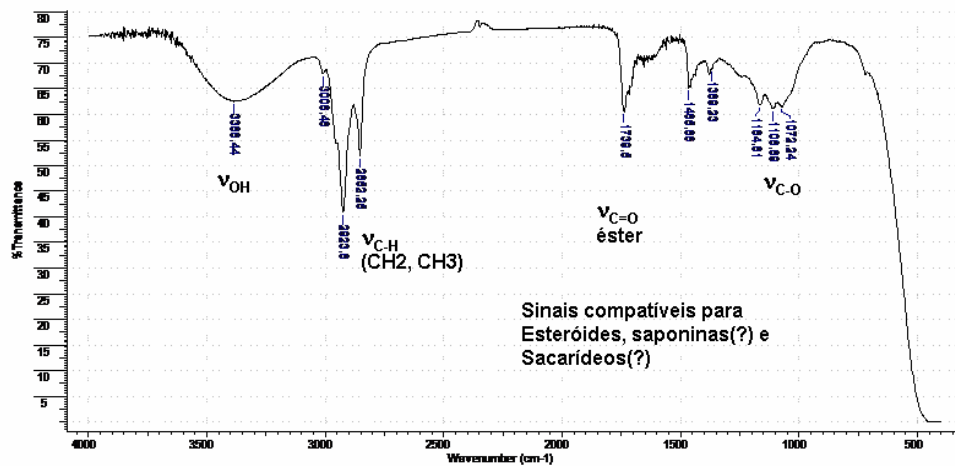


Figura-2. Espectro infravermelho da partição hexânica do kudzu tropical (Pastilha de KBr).

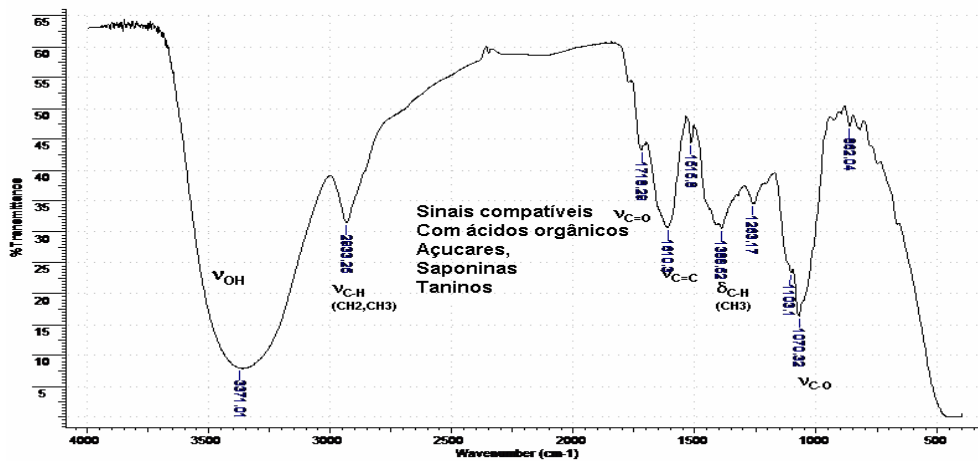


Figura-3. Espectro infravermelho da partição acetato de etila do kudzu tropical (Pastilha de KBr).

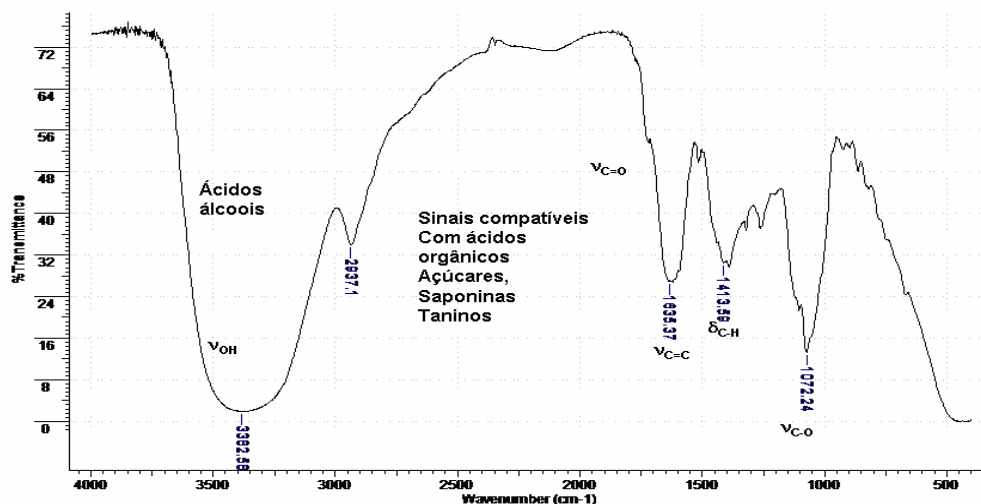


Figura-4. Espectro infravermelho da partição hidrometanólica do kudzu tropical (Pastilha de KBr).

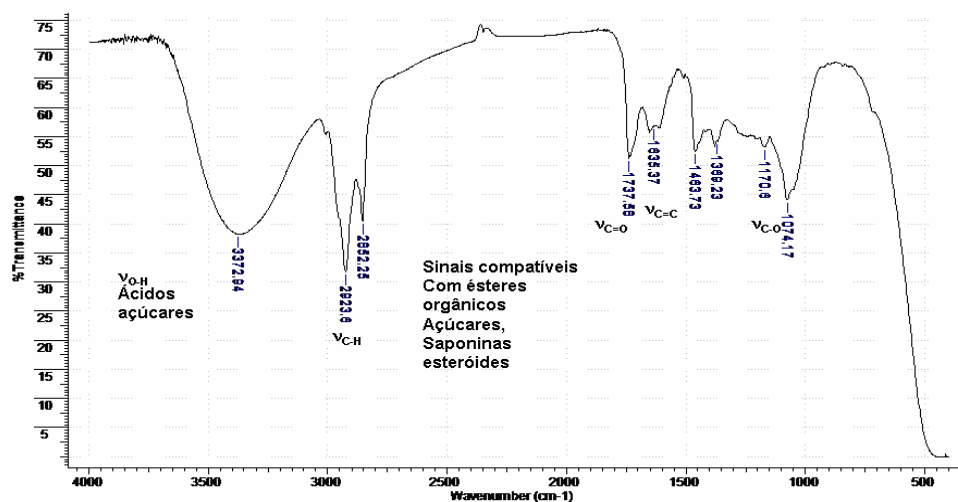


Figura-5. Espectro infravermelho do extrato metanólico do macrotiloma (Pastilha de KBr).

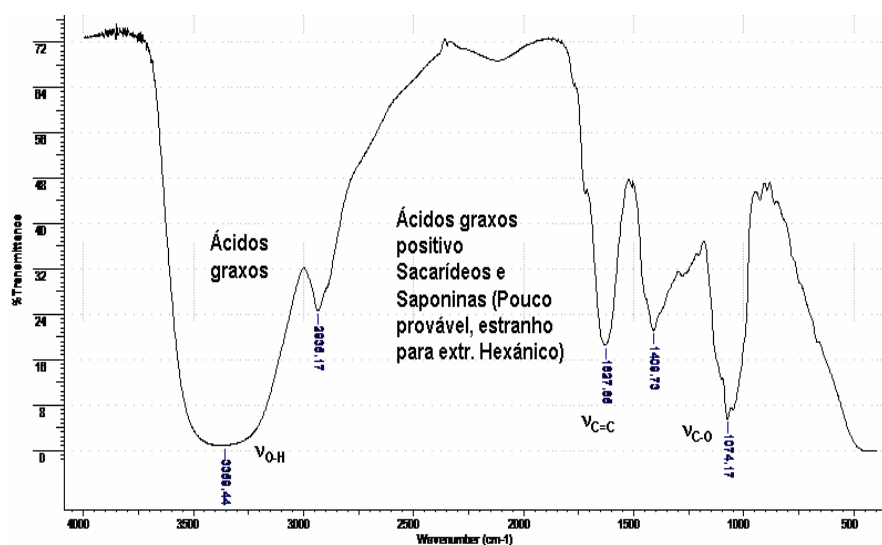


Figura-6. Espectro infravermelho da partição hexânica do macrotiloma (Pastilha de KBr).

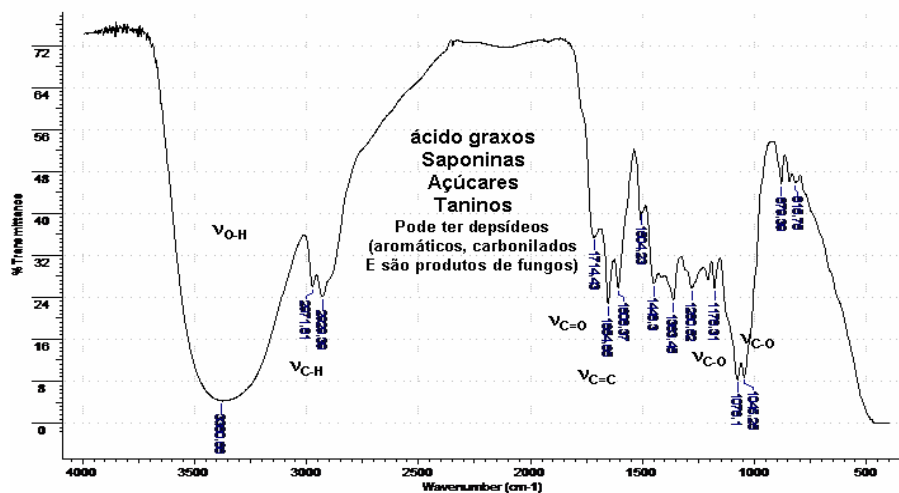


Figura-7. Espectro infravermelho da partição acetato de etila do macrotiloma (Pastilha de KBr).

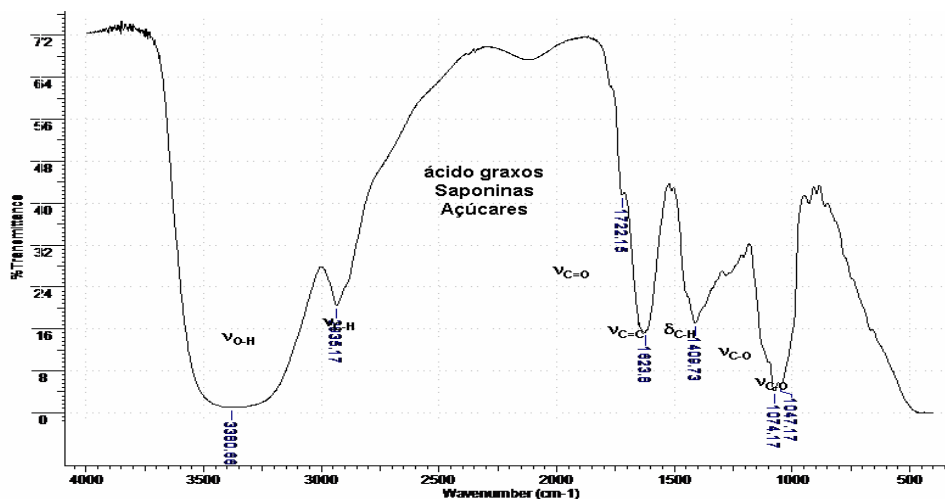


Figura-8. Espectro infravermelho da partição hidrometanólica do macrotiloma (Pastilha de KBr).

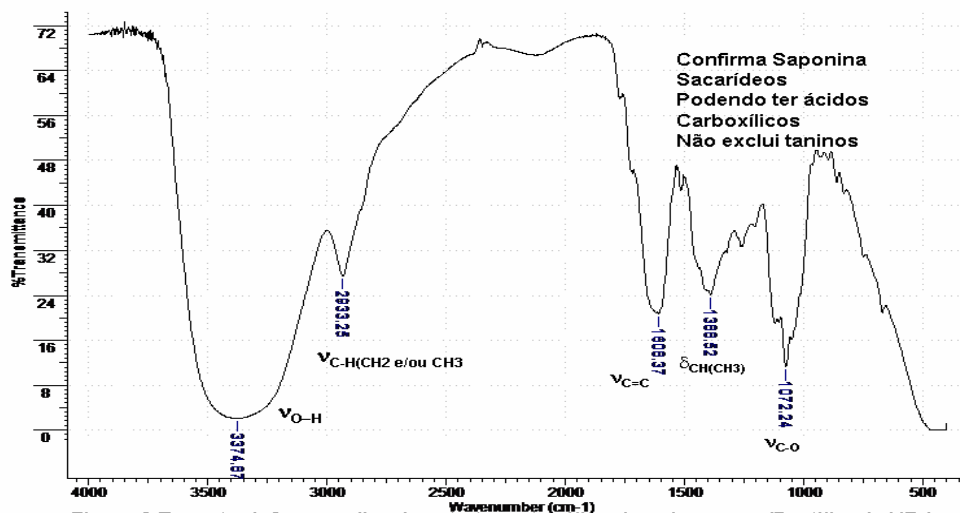


Figura-9. Espectro infravermelho do extrato metanólico da soja perene (Pastilha de KBr).

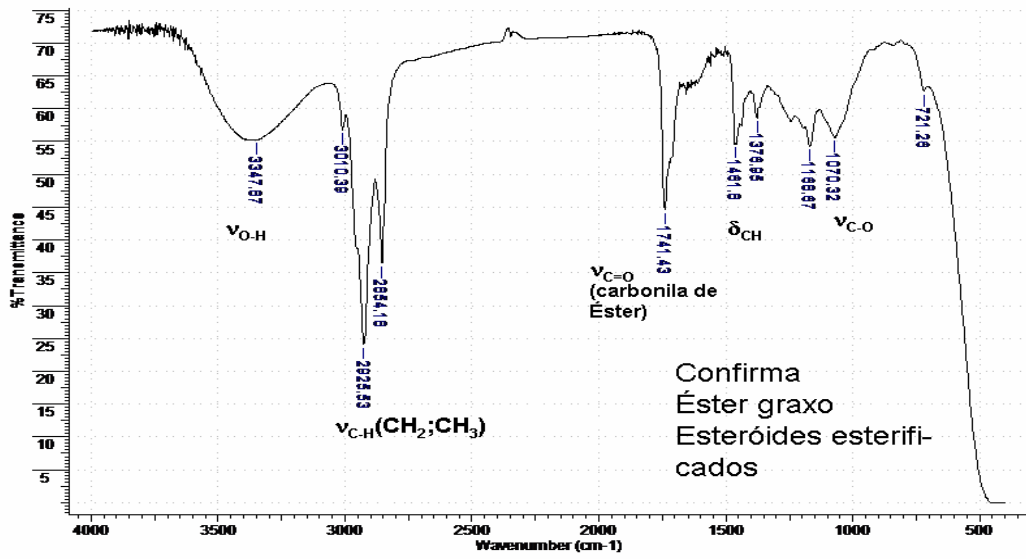


Figura-10. Espectro infravermelho da partição Hexânica da soja perene (Pastilha de KBr).

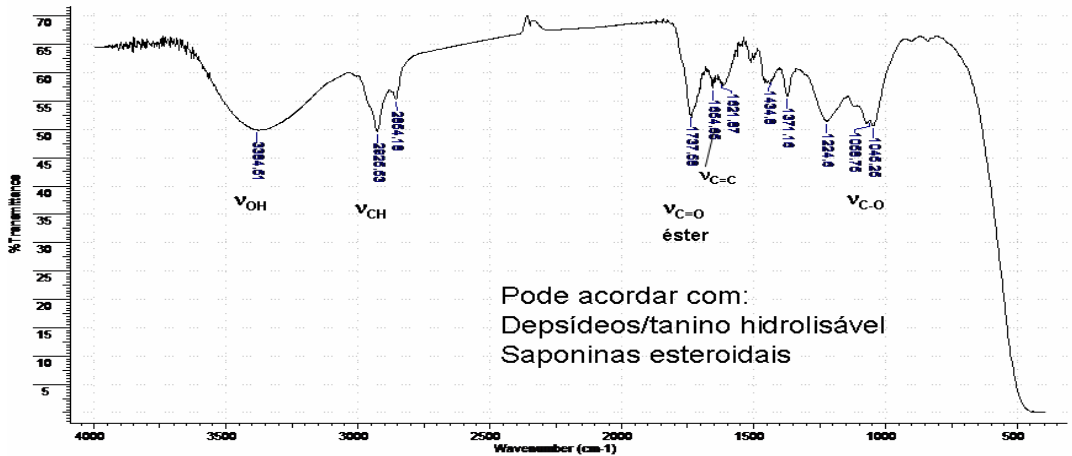


Figura-11. Espectro infravermelho da partição acetato de etila da soja perene (Pastilha de KBr).

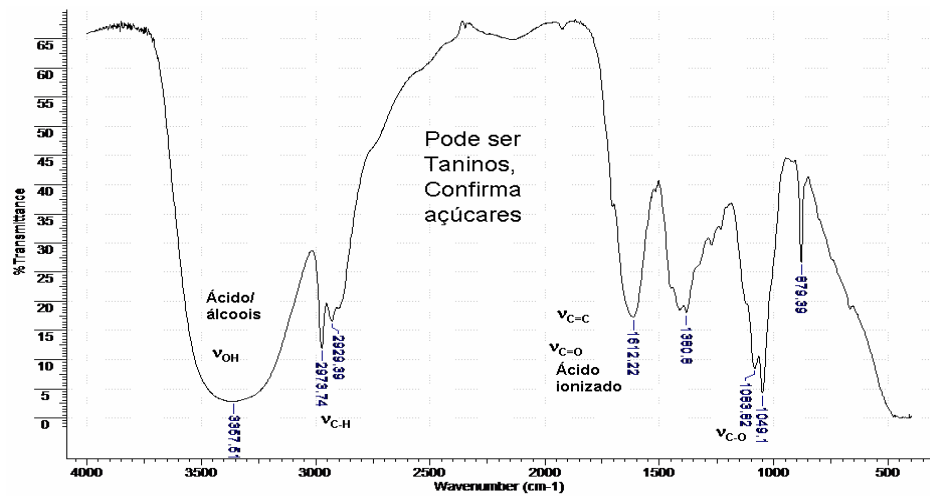


Figura-12. Espectro infravermelho da partição hidrometanólico de soja perene (Pastilha de KBr).