

**JOSÉ MARIA GALIANO CASACA LEITÃO HENRIQUES**

**TAXA DE SUCESSO DE TRATAMENTO EM  
INTOXICAÇÃO POR TANINOS EM RUMINANTES**

Orientadora: Doutora Ângela Dâmaso

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias**

**Faculdade de Medicina Veterinária**

**Lisboa**

**2014**

**JOSÉ MARIA GALIANO CASACA LEITÃO HENRIQUES**

**TAXA DE SUCESSO DE TRATAMENTO EM  
INTOXICAÇÃO POR TANINOS EM RUMINANTES**

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

Orientadora: Doutora Ângela Dâmaso

Co-orientadora: Dra. Catarina Figueiredo

Responsável externo: Dr. Dário Guerreiro

**Universidade Lusófona de Humanidades e tecnologias**

**Faculdade de Medicina Veterinária**

**Lisboa**

**2014**

## **Agradecimentos**

À Dra. Ângela Dâmaso, por ter aceite ser orientadora deste trabalho, por me ajudar a descomplicar a tese e por responder com prontidão às minhas questões. Por ter-me sempre orientado e guiado na tese incansavelmente, apresentando ideias e perspectivas diferentes que enriqueceram o trabalho.

À Dra. Catarina Figueiredo, minha co-orientadora, um agradecimento pela disponibilidade em ajudar no que fosse necessário para a elaboração desta tese.

Ao Dr. Dário Guerreiro, por todos os ensinamentos durante o decorrer do estágio, que muito elevaram os meus conhecimentos científicos e, sem dúvida, muito estimularam o meu desejo de querer, sempre, saber mais e a vontade constante de querer fazer melhor. Pela sincera amizade e pela total disponibilidade que sempre revelou para comigo. O seu apoio foi determinante na elaboração desta Tese.

A todos os Professores da FMV-ULHT por todos os ensinamentos.

Aos meus pais e irmãos, que sempre me acompanharam e ajudaram ao longo destes anos, e sempre acreditaram em mim. Espero que esta etapa, que agora termino, possa, de alguma forma, retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação que constantemente me oferecem. Um agradecimento aos meus tios, particularmente aos tios Moura, que muito me ajudaram no decorrer deste percurso.

À Clarisse Breda, minha namorada, por todo o apoio e amizade ao longo do curso, principalmente nesta última fase.

A todos os meus colegas e amigos, em especial à Inês Sousa e ao Miguel Varelas, pela grande entreatajuda, amizade, e boémia ao longo destes anos.

Ao Martinho Coutinho, por todo o apoio e incentivo que me deu ao longo de todo este meu percurso académico.

À Vetalcácer, em especial ao Dr. Dário Guerreiro e Dr. Hugo Ferreira, pela disponibilidade em ajudar, sempre que necessário.

## Resumo

O tema abordado neste trabalho incide sobre a intoxicação por taninos dos bovinos, que ocorre após a ingestão de um elevado número de bolotas, levando à perda anual de um elevado número de animais, e consequentemente com perdas económicas relevantes junto do produtor.

Uma vez que o tratamento desta doença é bastante complexo e encontra-se pouco descrito, o objectivo deste trabalho é contribuir para um melhor esclarecimento sobre a mesma, bem como, determinar a taxa de sucesso dos diferentes tratamentos.

Foram realizados cinco tratamentos diferentes, numa amostra de trinta e cinco animais afectados, pertencentes a uma população de 440 animais, e foram determinadas as taxas de mortalidade e morbilidade. Níveis sanguíneos de ureia foram determinados em alguns dos animais afectados. Foi realizada a comparação da taxa de sucesso dos tratamentos e relacionada com os sinais clínicos apresentados.

Os resultados do trabalho comprovaram que esta doença tem níveis de mortalidade e morbilidade significativos. O tratamento pode ser complexo e dispendioso, e é aplicado apenas a nível sintomatológico.

Deste modo, concluiu-se que, em relação aos tratamentos efectuados, aquele que obteve a maior taxa de sucesso baseou-se na administração de Biorúmen®, tendo atingido uma taxa de 47%, em animais com sintomatologia ligeira, e a segunda melhor taxa de sucesso foi obtida com Biorúmen®, Sulfato de Magnésio, Indigest® e Diurizone®, em animais com sintomatologia severa.

**Palavras-Chave:** Bovinos, Bolotas, Taninos, Intoxicação, Protocolos de tratamento.

## **Abstract**

This work addresses the cattle poisoning by tannins, an event that occurs after the ingestion of a large number of acorns, potentially leading to the loss of a large number of animals, and consequently carrying significant economic losses to the producer.

Since this disease's treatment is highly complex and is not well documented in the literature, the aim of this work is to contribute for a better clarification about this topic, as well as determine the success rate of the different treatments.

Five different treatments were carried out in this study, on a sample of thirty-five infected animals out of a population of 440 animals, and the respective mortality and morbidity rates were calculated. Urea blood levels were determined in some of the affected animals. A comparison of the treatments' successful rate was performed and related to the clinical signs of the disease.

The results obtained in the work proved that this disease has significant mortality and morbidity levels. The treatment can be complex and expensive and administered only at a symptomatic level.

Thus, it was concluded that, amongst the treatments carried out, the one with the highest success rate was the administration of Biorúmen®, reaching a rate of 47% in animals with mild clinical signs, and second highest success rate of 40% was a combination of Biorúmen®, Magnesium Sulphate, Indigest® and Diurizone® in animals with severe clinical signs.

**Keywords:** Cattle, Acorns, Tannins, Intoxication, Treatment protocols.

## Índice de Abreviaturas e Símbolos

CID	Coagulação Intravascular Disseminada
Da	Dalton
dL	Decilitro
g	Gramma
Kg	Quilograma
mg	Miligramma
mm	Milímetro
MS	Matéria seca
n	Número da amostra
PEG	Polietilenoglicol
pH	Concentração de iões de Hidrogénio
PRP	Protéínas Ricas em Prolina
PVP	Polivinil Pírolidona
PVPP	Polivinil Polipírolidona
TC	Taninos Condensados
%	Percentagem
>	Maior que
<	Menor que

## Índice

Agradecimentos.....	3
Resumo.....	4
Abstract.....	5
Índice de Abreviaturas e Símbolos.....	6
Índice de Tabelas.....	9
Índice de Figuras.....	10
1. Introdução.....	11
2. Revisão Bibliográfica.....	13
2.1. Taninos.....	13
2.1.1. Definição e Classificação.....	13
2.1.2. Taninos nas plantas.....	14
2.1.3. Modo de acção dos taninos.....	16
2.2. Adaptação dos Ruminantes aos taninos.....	21
2.3. Efeitos dos taninos nos ruminantes.....	23
2.4. Diagnóstico de Intoxicação por Taninos em Ruminantes.....	28
2.5. Tratamento e Prevenção.....	29
3. Objectivos.....	32
4. Material e Métodos.....	33
4.1. População e amostra do estudo.....	33
4.2. Diagnóstico de intoxicação por taninos.....	34
4.3. Protocolos de tratamento utilizados.....	34
4.4. Maneio.....	36
4.5. Cálculo da prevalência.....	36
4.6. Cálculo da Mortalidade.....	36
4.7. Cálculo da Morbilidade.....	36
5. Resultados.....	37
5.1. Prevalência da doença.....	37
5.2. Mortalidade.....	38
5.3. Morbilidade.....	40
5.4. Achados de necrópsia.....	42
5.5. Achados laboratoriais.....	44
5.6. Números de animais tratados com tratamento A / B / C / D / E.....	45

5.7. Relação entre animais tratados com diferentes tratamentos e taxa de sucesso .....	46
5.8. Relação entre severidade de sinais clínicos e taxa de sucesso do tratamento.....	47
6. Discussão .....	49
7. Conclusão.....	52
Bibliografia .....	53



## Índice de Tabelas

Tabela 1: Valores séricos de ureia, idade e sexo de dez animais afetados por intoxicação por taninos.....	44
---	----

## Índice de Figuras

Figura 1: Prevalência de Intoxicação por Taninos no total e individualmente em cada exploração expresso em valor absoluto e relativo.....	37
Figura 2: Mortalidade total por Intoxicação por Taninos nas três explorações. ....	38
Figura 3: Mortalidade total por Intoxicação por Taninos na exploração A. ....	38
Figura 4: Mortalidade total por Intoxicação por Taninos na exploração B. ....	39
Figura 5: Mortalidade total por Intoxicação por Taninos na exploração C. ....	39
Figura 6: Relação entre Mortalidade e Morbilidade nos animais intoxicados por taninos total das três explorações. ....	40
Figura 7: Relação entre Mortalidade e Morbilidade nos animais intoxicados por taninos na Exploração A. ....	40
Figura 8: Relação entre Mortalidade e Morbilidade nos animais intoxicados por taninos na Exploração B. ....	41
Figura 9: Relação entre Mortalidade e Morbilidade dos animais intoxicados por taninos na Exploração C. ....	41
Figura 10: Rim direito que apresenta petéquias (foto do autor).....	42
Figura 11: Rim direito que se apresenta pálido e edemaciado (foto do autor).....	42
Figura 12: Corte de rúmen que apresenta o seu conteúdo muito pastoso, com bastantes bolotas (foto do autor).....	43
Figura 13: Corte de intestino que apresenta um muco sanguinolento (foto do autor)..	43
Figura 14: Número de animais Intoxicados por Taninos tratados com os diversos tratamentos.....	45
Figura 15: Relação entre os diversos tratamentos efectuados e o número de mortes que ocorreu em cada um. ....	45
Figura 16: Taxa de sucesso dos diferentes tratamentos aplicados em animais Intoxicados por Taninos.....	46
Figura 17: Relação entre o tipo de fezes nos animais intoxicados por taninos e mortalidade.....	47
Figura 18: Relação entre a concentração da urina nos animais intoxicados por taninos e mortalidade.....	47
Figura 19: Taxa de mortalidade apresentada pelos bovinos Intoxicados por Taninos em relação ao tipo de urina.....	48

## 1. Introdução

Em sistema extensivo, os bovinos estão sujeitos a regimes alimentares descontínuos, em que a disponibilidade de nutrientes, tal como a energia e proteína, não é constante ao longo de todo o ano. Para além da disponibilidade alimentar variar, é igualmente importante salientar que as necessidades alimentares destes animais variam consoante a sua fase produtiva, designadamente nos períodos de gestação, lactação, conservação, ou até mesmo na fase de crescimento.

Em condições mediterrânicas, ambientes semelhantes ao de Portugal, considera-se que a pastagem só consegue cobrir 40% das necessidades de uma vacada (Reviglio *et al.*, 2004). As pastagens mediterrânicas caracterizam-se por terem uma grande variação ao longo do ano, no que respeita à quantidade e qualidade, estando assim relacionadas e dependentes da estação do ano e das condições climáticas. Durante o ano registam-se determinados picos que são críticos para a alimentação bovina pois, por um lado, na época de inverno, assiste-se ao rigor da estação climática, que produz pouca pastagem, embora com elevado valor nutricional e, por outro lado, no período de verão pode-se encontrar alguma pastagem, porém com reduzido valor nutricional.

Uma vez que não conseguem ingerir a alimentação necessária para satisfazer as suas carências básicas, os bovinos vão recorrendo às suas reservas corporais, tendo como natural consequência a perda da sua condição corporal, que conduz a um impacto muito negativo da sua vida produtiva, no seu dia-a-dia.

O consumo excessivo de bolota está normalmente associado à escassez de outro tipo de alimentação disponível, originada, conforme já referido, pelas condições climáticas adversas. Está descrito que os ruminantes podem alterar a selecção da sua dieta e consumir pontualmente determinadas espécies vegetais tóxicas para cobrir as suas necessidades nutritivas (Tayler, 1959; Provenza, 1995; Villalba *et al.*, 2006). Shaw *et al.* (2006) observaram que os animais, uma vez tendo satisfeitas as suas necessidades nutricionais, não consomem qualquer outro tipo de alimento. Caso as condições nutricionais não estejam suficientemente cobertas, os animais podem comer plantas ou outro tipo de alimentos, mesmo que resultem em intoxicações, o que demonstra que a dieta é directamente influenciada pelo estado nutricional do animal (Villalba e Provenza, 1999).

De acordo com a literatura científica, as bolotas mais jovens contêm um elevado número de taninos hidrolisáveis (Salminen *et al.*, 2004), que parecem ser os

principais responsáveis pelas intoxicações que as vacas sofrem e que podem levar a grandes perdas económicas por parte do produtor (Spier *et al.*, 1987)

O montado português está coberto em grande parte por árvores do género *Quercus*, que são as árvores produtoras de bolota. Por ano ocorrem inúmeros casos de intoxicações por taninos nos bovinos, derivado à elevada ingestão de bolotas, que naturalmente conduzem à morte de diversos animais, tendo como principal consequência a perda económica por parte dos produtores.

A ideia de realizar um estudo sobre a taxa de sucesso de tratamento de intoxicação por taninos, surgiu devido ao crescente número de casos que têm ocorrido anualmente em Portugal, contribuindo esta doença para o aumento significativo da taxa de mortalidade dos bovinos, com consequências económicas nefastas para as explorações. Esta doença leva à morte súbita dos animais e o seu tratamento encontra-se pouco descrito e evidenciado face à sua importância, sendo fundamentalmente sintomatológico. Para o contributo deste trabalho sobre a intoxicação de bovinos por taninos, foram realizados cinco tratamentos diferentes e analisadas as taxas de sucesso para cada um deles, bem como as taxas de mortalidade e morbidade associados a esta doença.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. Taninos

#### 2.1.1. Definição e Classificação

Tanino é uma palavra que provém da língua francesa «tan», que remete para a casca da azinheira e para outras árvores usadas no curtimento. Fazem parte do grupo dos flavonóides, que é a designação dada a um grupo de metabólitos secundários da classe dos polifenóis, e estão largamente distribuído em plantas. São usados pelo Homem há séculos, devido às capacidades terapêuticas e antioxidantes.

Podem ser definidos como um grupo heterogéneo de elevado peso molecular, constituído por compostos fenólicos com capacidade para formar complexos reversíveis e irreversíveis, principalmente com proteínas, mas também com polissacarídeos como por exemplo a celulose, hemicelulose e pectina; alcalóides; ácidos nucleicos e minerais (McLeod, 1974; Mole e Waterman, 1987; Mangan, 1988; Mueller-Harvey e McAllan, 1992; Van Soest, 1994; Giner-Chavez, 1996; Schofield *et al.*, 2001).

Segundo a definição de Bate-Smith e Swain (1989), taninos são compostos fenólicos solúveis em água, com pesos moleculares entre 500 e 3000 Da e habilidade para precipitar proteínas. Mais concretamente, podem ser definidos como compostos de alto peso molecular, que contêm suficientes grupos de hidroxila fenólica, para permitir a formação de ligações cruzadas estáveis com proteínas (Deshpande *et al.*, 1986).

Normalmente, em quantidades e condições normais, os fenóis comuns nas plantas não são considerados tóxicos, com excepção dos fenóis poliméricos denominados taninos, que possuem a capacidade de complexar e precipitar proteínas de soluções aquosas (Salunkhe *et al.*, 1990).

Nas plantas têm-se distinguido, habitualmente, dois grupos de taninos estruturais e biogeneticamente diferentes: taninos hidrolisáveis e não hidrolisáveis (Singleton e Kratzer, 1973).

Os taninos hidrolisáveis possuem um núcleo composto por um álcool polihídrico que esterifica ácidos polifenólicos que o envolvem. Podem ser galotaninos, caso seja um polímero de ácido gálico, ou elargitaninos, caso seja um polímero de

ácido hexa-hidroxi-difénico. Estes encontram-se normalmente presentes em baixas concentrações nas plantas, sendo que podem sofrer facilmente hidrólise por bases, ácidos e ou até mesmo certas enzimas (Price e Butler, 1980).

Quanto aos taninos não hidrolisáveis ou condensados, são polímeros dos flavonóides (Sgarbieri, 1996), flavan-3-óis ou flavan-3,4-óis ligados por ligações de carbono-carbono que não são susceptíveis de quebra por hidrólise, logo não são absorvidos pelo tracto gastrointestinal (Cannas, 2001). Geralmente têm um peso molecular mais elevado do que os taninos hidrolisáveis (1000-20000 Da em comparação com 500-3000 Da; McLeod, 1974; Mueller-Harvey e McAllan, 1992; Mueller-Harvey, 1999). Este tipo de taninos pode ser encontrado na fracção fibra alimentar de diversos alimentos, e podem ser considerados indigeríveis ou pobremente digeríveis (Bartolomé *et al.*, 1995), bem como possuírem características de adstringência e precipitação de proteínas. Estas características advêm do facto de possuírem a capacidade de proteger as proteínas ingeridas da degradação ruminal (by pass). Caso sejam ingeridos em grandes concentrações (acima de 5% da MS), apresentam importante acção antinutricional.

Na forma não oxidada, os taninos reagem com proteínas através de pontes de hidrogénio e/ou ligações hidrofóbicas, enquanto na forma oxidada, estes transformam-se em quinonas, que vão formar ligações covalentes com alguns grupos funcionais das proteínas, principalmente os grupos sulfídrico da cisteína e  $\omega$ -amino da lisina (Sgarbieri, 1996).

### **2.1.2. Taninos nas plantas**

Os taninos estão amplamente distribuídos por todo o reino vegetal, especialmente nas árvores, arbustos e plantas leguminosas. O conteúdo de taninos presente na planta, pode variar consoante as condições geográficas ou climáticas, bem como pelo processo de maturação, factores sazonais e ambientais como altas temperaturas, stress hídrico, intensidades elevadas de luz ou má qualidade do solo. Sendo que podem apresentar uma composição química variada, é difícil definir uma planta quanto à quantidade de taninos.

Actualmente existem inúmeros trabalhos relatados na literatura científica que evidenciam a ampla distribuição que os taninos possuem o reino vegetal (Russell, 1935; Burrit *et al.*, 1987; Bhat *et al.*, 1998; Yanagida *et al.*, 2002; Frutos *et al.*, 2004a;

Mutabaruka *et al.*, 2007). De facto, estes compostos fenólicos são considerados os metabólitos secundários mais comuns nas plantas (Hernes e Hedges, 2004).

Os taninos condensados e taninos hidrolisáveis não estão distribuídos da mesma forma no reino vegetal (Swain, 1979). Enquanto os primeiros estão amplamente localizados nas plantas, os taninos hidrolisáveis têm uma distribuição mais limitada (Bruyne *et al.*, 1999; Schoonhoven *et al.*, 2006).

Muitas plantas possuem a capacidade de produzir taninos em condições de stress. Estes constituem um meio de defesa das plantas contra bactérias, vírus, fungos, stress ambiental e ataque por herbívoros. Podem ainda proporcionar à planta características como odor repulsivo, sabor amargo e provocar intoxicações nos predadores (Giver-Chaves, 1996). Para além de reduzirem a palatabilidade e deprimirem a ingestão, afectam a digestibilidade, inibindo a reabsorção, uma vez que se complexam com proteínas e outros componentes alimentares.

Segundo Singleton (1981), a produção de altos níveis de fenóis na planta está relacionada com o processo de cicatrização, no qual os fenóis são oxidados e formam quinonas e complexos polímeros de fitomelanina marron, que são frequentemente mais tóxicos aos invasores que os fenóis.

Os bovinos podem ser intoxicados pelos taninos em qualquer momento que tenham à disposição folhas, frutos ou até mesmo ramagens de Carvalhos, porém no Outono, que é a fase de queda das bolotas, é a altura em que estão mais susceptíveis a serem intoxicados. A mudança de cor das folhas no Outono, é reflexo da formação de taninos condensados (Cooper-Driver *et al.*, 1977), já os taninos hidrolisáveis possuem uma relação inversa, visto que estão mais elevados nas fases mais jovens (Peng *et al.*, 1991; Riipi *et al.*, 2002; Salminen *et al.*, 2004). Apesar de esta ser a altura propícia a intoxicações, é na Primavera, durante a fase de brotação, que o teor em taninos é mais elevado.

Estudos que foram desenvolvidos em espécies de carvalho, demonstram o padrão de variação acima descrito. Deste modo, ocorreu uma concentração de taninos hidrolisáveis maior nas primeiras fases da planta, e aumento dos taninos condensados durante o período de Verão (Faeth, 1986; Rossiter *et al.*, 1988; Mauffette e Oechel, 1989; Tikkanen e Julkunen-Tiitto, 2003).

Feeny e Bostock (1968), realizaram um estudo em que mediram o teor de taninos nas folhas de *Quercus robur* em Abril e Setembro, onde observaram

significativas variações. Foi demonstrado neste estudo, que a presença de taninos condensados nas folhas até ao final de Maio, aumentava progressivamente com a maturidade desta mesma folha. Quanto aos taninos hidrolisáveis, estes estiveram presentes durante toda a temporada e com uma concentração relativamente constante. Para além deste estudo, Salminen *et al.* (2004), demonstrou que nesta mesma árvore, *Quercus robur*, a maioria dos taninos em folhas jovens eram hidrolisáveis, sendo que a sua concentração reduzia em 54% desde Maio até Setembro. Em contraste, a concentração de taninos condensados foi indetectável em folhas jovens, sendo que começaram a aparecer no início de Junho.

A produção de bolotas não é constante de um ano para outro, e a ocorrência de tempestades ou ventos fortes podem provocar uma queda repentina destas, sendo por isso factores predisponentes a considerar.

### **2.1.3. Modo de acção dos taninos**

O destino dos taninos após ingestão pode variar consoante o seu tipo. As proteínas que mostram mais afinidade por taninos são relativamente grandes e hidrofóbicas, têm uma estrutura aberta, flexível e são ricas em prolina (Kumar e Singh, 1984; Hagerman e Butler, 1991;. Hagerman *et al*, 1992; Mueller-Harvey e McAllan,1992). O alto teor de prolina presente na proteína salivar de alguns mamíferos pode ser considerado um processo de inactivação, já que diminui a quantidade de taninos disponíveis para se complexarem com os nutrientes. Desta forma, os efeitos antinutricionais são reduzidos (Austin *et al*, 1989), contudo, estas proteínas são escassas a inexistentes em ruminantes domésticos (Barry e McNabb, 1999; Makkar, 2003). Os outros taninos vão formar complexos no rúmen.

Taninos hidrolisáveis sofrem hidrólise no rúmen, libertando proteínas, aminoácidos, e pequenas unidades de compostos fenólicos, que possivelmente passam para a urina (Bressani *et al.*, 1982). Os efeitos dos taninos condensados sobre a digestão de proteínas são geralmente mais negativos, comparativamente aos taninos hidrolisáveis.

Os taninos condensados têm nas suas características mais marcantes, o facto de formarem complexos insolúveis com proteínas. A formação destes complexos, explica as suas propriedades biológicas e antinutricionais (Jean-Bain, 1998), podendo



também formar complexos com celulose, pectinas, amido, alcalóides, outros polifenóis e sais de metal pesado (Giner-Chaves, 1996).

Os complexos tanino-proteína podem ser formados por quatro tipos de ligações: pontes de hidrogénio, iónicas, covalentes, ou hidrofóbicas. Jean-Bain (1998) num estudo *in vitro* demonstrou que estes complexos são reversíveis e podem ser dissociados com modificações de pH. No entanto Van Sumere (1975) e Haslam (1977) descrevem que sob certas condições como pH alcalino ou presença de oxigénio, ocorre a oxidação dos taninos formando ligações covalentes com a proteína, tornando a reacção irreversível.

Deste modo, os taninos podem ter uma utilização digestiva e metabólica das proteínas completamente oposta. Ao diminuir a degradabilidade ruminal, aumentam a concentração de proteínas que fica disponível para ser absorvida no duodeno. Por outro lado, os taninos que estão livres, normalmente causam um efeito contraproducente sobre a digestão, ao inibir a fermentação.

Segundo Mangan (1988), a formação efectiva de complexo tanino-proteína, reversível no intestino delgado, depende da natureza das proteínas complexadas, do tipo e grau de polimerização dos taninos e do pH do rúmen.

As ligações de hidrogénio são estáveis entre pH 3,5 e 8, aproximadamente. Estes complexos estáveis no pH do rúmen dissociam-se quando o pH cai abaixo de 3,5, tal como no abomaso onde o pH 2,5-3, ou é superior a 8, como por exemplo no duodeno, onde pH 8, o que explica a actividade de taninos no tracto digestivo (McLeod, 1974; Mangan, 1988; Hagerman *et al*, 1992; Mueller-Harvey e McAllan, 1992).

Um estudo realizado por Martínez e Moyano (2003), demonstrou que com um pH 2-3 e 8-9, as proteínas se encontram na forma solubilizada, o que os levou a propor que na parte proximal do intestino delgado, onde o pH é mais elevado, a maior parte da proteína se encontra solubilizada, ou seja, livre para ser hidrolisada pelas enzimas, impedindo a formação de complexos com os taninos na parte distal, onde o pH é mais baixo.

É também de realçar um estudo de Perez-Maldonado (1995), que diz que as condições experimentais utilizadas *in vitro* para observar o pH são bastante diferentes daquelas que podemos encontrar no tracto gastrointestinal dos animais, o que torna difícil prever o comportamento *in vivo*.

Está descrito, por Goldstein e Swain (1965) que a ligação tanino-proteína é bastante influenciada pelo tipo de tampão utilizado, sendo que o polietilenglicol, embora não desloque todas, consegue deslocar as proteínas dos complexos já formados. Quanto mais recente for esta ligação e quando menor for a quantidade de tanino, mais sucesso o polietilenglicol tem (Jones e Mangan, 1977).

É de salientar também, que outras das grandes problemáticas dos taninos, está associada à inibição de enzimas digestivas, como a tripsina,  $\alpha$ -amilase ou pepsina. Segundo um estudo de Tamir e Alumot (1969) a tripsina é inibida em maior grau pelos taninos hidrolisáveis, ao contrário das outras em que não se notam diferenças significativas entre a inibição por parte dos hidrolisáveis e dos condensados.

### ***Fermentação ruminal***

O efeito dos taninos sobre o processo de fermentação ruminal, pode variar consideravelmente dependendo de vários factores, tais como o tipo de tanino (Frutos *et al.*, 2004b), a sua estrutura e peso molecular ou a quantidade consumida (Hervas *et al.*, 2003a), e até mesmo a espécie de ruminante que consome (Narjisse *et al.*, 1995; Frutos *et al.*, 2004b).

O tipo de tanino é muito importante, visto que os taninos hidrolisáveis podem ser hidrolisados pela flora microbiana ruminal, sendo posteriormente utilizados como fonte de energia (Bhat *et al.*, 1998, Odenyo *et al.*, 2001), vários autores têm argumentado que estes provocam um efeito negativo menos pronunciado do que os taninos condensados (Bento *et al.*, 2005; Getachew *et al.*, 2008). No entanto, esta afirmação contradiz aquilo que foi observado por outros autores (Martinez *et al.*, 2005; Mutarabuka *et al.*, 2007).

Como já foi anteriormente referido, o pH do rúmen favorece a formação dos complexos tanino-proteína. Esta redução da degradação das proteínas está associada a uma produção mais baixa de azoto amoniacal e a um maior fluxo de azoto não-amoniacal para o duodeno. Os efeitos directos na degradação reflectem-se na redução da fracção imediatamente degradável e na taxa fraccionada de degradação (Aharoni *et al.*, 1998; Frutos *et al.*, 2000; Hervás *et al.*, 2000).

Os mecanismos pelos quais os taninos reduzem a degradação ruminal de diferentes componentes alimentares não são totalmente claros, mas os mais aceites são a privação de substrato, a inibição da enzima e a acção directa sobre microrganismos ruminais.

Quanto à privação de substrato, esta pode ocorrer, visto que a formação de complexos com proteínas e hidratos de carbono fazem com que estes nutrientes fiquem inacessíveis para os microrganismos. Para além disso, sabe-se que os taninos previnem, ou pelo menos interferem, com a fixação dos microrganismos do rúmen à parede celular das plantas (Chiquette *et al.*, 1988; McAllister *et al.*, 1994).

Está também descrito por Scalbert (1991), que os taninos reduzem a disponibilidade de certos iões metálicos, necessários para o metabolismo de microrganismos no rúmen, visto serem agentes quelantes.

Makkar *et al.* (1988) sugerem que a redução da digestibilidade no rúmen tem sido atribuída à inibição da actividade enzimática microbiana, tanto bacterianas como fúngicas, por taninos, com a formação dos complexos tanino-enzima. Desta inibição resulta uma redução na actividade de urease, carboximetilcelulase, glutamato desidrogenase a alanina transferase, segundo um estudo que foi feito com folhas de *Quercus incana*. Apesar de alguns autores como Leinmüller *et al.* (1991), O'Donovan e Brooker (2001), relatarem que os taninos alteram a actividade das bactérias proteolíticas, celulolíticas, e outras enzimas, é de realçar um estudo de Makkar *et al.* (1988) em que descrevem que esta ligação não implica necessariamente a inibição.

Foram descritas, por O'Donovan e Broker (2001) várias enzimas microbianas capazes de metabolizar taninos, especialmente os hidrolisáveis. A degradação dos taninos condensados através da clivagem de ligações carbono-carbono não está descrita, mesmo *in vitro*, e é muito pouco provável que tal evento possa ocorrer no ambiente anaeróbio do rúmen, segundo McSweeney *et al.* (2001). Entre as bactérias capazes de usar os taninos hidrolisáveis são os *Streptococcus caprinus* (*S. gallolyticus*), que produzem pirogallol, que é um produto de degradação do ácido tânico, quando há aumento da descarboxilase galato (O'Donovan e Brooker, 2001).

Apesar de os taninos serem considerados inibidores do crescimento microbiano, o seu mecanismo ainda não está bem definido. Segundo McSweeney *et al.* (2001), nas bactérias, o mecanismo tem sido associado a uma formação de complexos entre os taninos e a parede celular das bactérias ou enzimas extracelulares secretadas, fazendo com que ocorra a inibição do transporte de nutrientes para a célula, com conseqüente retardo do crescimento do organismo. Foi também observado, por BAE *et al.* (1993) e Jones *et al.* (1994) que na presença de taninos, algumas bactérias são submetidas a modificações morfológicas tais como alongação das células, presença de grande quantidade de material extracelular e formação de

micro-colónias aderentes. Segundo Leinmüller *et al.* (1991) e Scalbert (1991), os taninos podem também alterar a permeabilidade das membranas dos microrganismos ruminais.

Foi demonstrado que na presença de taninos condensados solúveis no meio, bactérias como os *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Fibrobacter Succinogenes*, são fortemente inibidas (BAE *et al.*, 1993; Nelson *et al.*, 1997; Beelen *et al.*, 2006). Estas bactérias são responsáveis por 91% da actividade de endoglucanase no rúmen, e aderem firmemente ao substrato.

Contudo, alguns microrganismos do rúmen podem tolerar os taninos, sendo que o grau de tolerância é específico para o microrganismo em questão, explicando a diferente sensibilidade de estirpes bacterianas. Pode também variar consoante o tipo de taninos dependendo se são hidrolisáveis ou condensados.

O efeito dos taninos na fauna ruminal, geralmente causa uma redução do número de protozoários (Wang *et al.*, 1994; Makkar *et al.*, 1995). Outros autores, no entanto, não encontraram nenhum efeito dos taninos sobre a contagem de protozoários (McSweeney *et al.*, 2001; Śliwiński *et al.*, 2002).

### ***Digestibilidade Intestinal***

Foi descrito, por McSweeney *et al.* (1988), que os taninos condensados podem aumentar a digestibilidade intestinal de matéria orgânica, porém sabe-se que os taninos exercem um efeito negativo na absorção de nutrientes no intestino delgado. Este efeito negativo advém do facto de os complexos tanino-proteína falharem a sua dissociação nas condições de pH do abomasso, ou a alterações na absorção intestinal, devido à interacção de taninos com a mucosa.

McNabb *et al.* (1998) sugerem que, apesar de os complexos se dissociarem com o pH < 3,5 característico do abomasso, estes poderão voltar a formar-se no início do intestino, onde o pH é  $\approx$  5,5, e impedir a sua digestão.

As alterações promovidas na permeabilidade da parede intestinal, causadas pela reacção entre os taninos e as proteínas da membrana das células da mucosa intestinal, e a redução resultante da absorção intestinal, também são factores a considerar na reduzida digestibilidade intestinal (McLeod, 1974; Silanikove *et al.*, 2001).

É de salientar que os estudos de taninos que foram realizados, relativamente à digestibilidade intestinal, foram feitos *in vitro*, logo não têm em conta outros factores

como a presença de sais biliares, que poderiam actuar como detergentes e impedir a ligação dos taninos com enzimas digestivas (Blytt *et al.*, 1988).

Outro factor importante, descrito por Kumar e Singh (1984), é a capacidade que os taninos têm para inibir as enzimas digestivas por formar complexos insolúveis, ou solúveis mais inactivos, com estas. Já Silanikove *et al.* (1994) descrevem que os taninos condensados possuem a capacidade de inibir enzimas digestivas como a tripsina ou a amilase. Esta ideia é questionada por diversos autores, visto que os taninos têm a oportunidade de formar complexos com uma vasta variedade de proteínas alimentares, antes de terem contacto com as enzimas digestivas (Mehansho *et al.*, 1987).

## **2.2. Adaptação dos Ruminantes aos taninos**

Os ruminantes que consomem regularmente taninos, em baixas quantidades, muitas vezes podem desenvolver mecanismos adaptativos de carácter fisiológico e etiológico que lhes permitam diminuir os efeitos negativos do consumo destes compostos (McArthur *et al.*, 1991; Clauss *et al.*, 2005; Mlambo *et al.*, 2007).

Quanto aos mecanismos etiológicos, estes incluem a regulação do ritmo de ingestão para evitar a sobrecarga dos sistemas de desintoxicação e o consumo combinado de outros compostos, visto que o consumo de outros vegetais, juntamente com os que são compostos por taninos, pode provocar uma diminuição, ou até mesmo inibição dos efeitos negativos.

No caso dos mecanismos fisiológicos desenvolvidos pelos ruminantes, estes incluem a secreção de proteínas salivares, mudanças nas proporções de populações microbianas ruminais e a produção microbiana de enzimas que degradam os taninos.

### ***Proteínas específicas na saliva***

A produção de proteínas salivares com uma grande afinidade por taninos é um mecanismo de adaptação observado em alguns animais que consomem regularmente este composto (Mole *et al.*, 1990; Carlson, 1993). Este tipo de proteínas, devido às suas características moleculares e à sua composição aminoácida, tende a formar complexos com os taninos, evitando assim que estes se unam com as proteínas das dietas (Provenza e Malechek, 1984; Austin *et al.*, 1989). Esta ligação resiste ao longo do tracto gastrointestinal.

Como foi referido anteriormente, muitos trabalhos indicam que não há proteínas ricas em prolina (PRP) na saliva dos ruminantes domésticos (Barry e McNabb, 1999; Makkar, 2003). Contudo estes trabalhos não invalidam a hipótese de haver outras proteínas salivares com grande afinidade por taninos.

Austin *et al.* (1989) realizaram um estudo de análise da saliva do veado, ovelha e vaca, e observaram que as proteínas eram muito semelhantes às PRP observadas em outros animais, contudo a sua produção não aumentava com a exposição destas a taninos.

Existe um estudo que demonstra a existência de outras proteínas, de diferentes tamanhos moleculares e composição das PRP (Makkar e Becker, 1998; Shimada, 2006), que também demonstram uma grande afinidade por taninos. A produção dessas proteínas, encontradas na saliva de ruminantes como a cabra, ovelha e vaca, é constantemente induzida por dietas que contenham taninos (Austin *et al.*, 1989).

No seguimento destes estudos, Makkar e Becker (1998) afirmam que as proteínas na saliva do gado bovino que ingeria frequentemente taninos, ou mesmo naqueles que não ingeriam, concluíram que a sua secreção não podia ser um mecanismo de adaptação por parte dos ruminantes.

### ***Adaptação da flora ruminal***

Os animais que ingerem frequentemente taninos podem mostrar uma adaptação ao seu consumo, em parte devido à presença de microrganismos ruminais capazes de superar os seus efeitos negativos (Bernays *et al.*, 1989).

As bactérias são capazes de formar o glicocálice, que corresponde a açúcares ligados às proteínas, neste caso às glicoproteínas, que ajuda a proteger a superfície celular de lesões mecânicas e químicas, e deste modo, impedindo a ligação dos taninos às paredes bacterianas (Nicholson *et al.*, 1986; Chiquette *et al.*, 1988; O'Donovan e Brooker, 2001). Um estudo de Krause *et al.* (2005) demonstra que o *Streptococcus gallolyticus*, na presença de taninos forma a tal matriz extracelular, o glicocálice.

Para além deste mecanismo demonstrado pelas bactérias, sabe-se também que a tolerância apresentada por estas aos taninos varia bastante. Normalmente, as bactérias gram negativas como as *Selenomonas ruminantium*, o *Fibrobacter succinogenes*, a *Escherichia coli*, exibem uma maior resistência quando comparadas

às gram positivas como o *Clostridium proteoclasticum* (Nelson *et al.*, 1998; Odenyo *et al.*, 2001; Krause *et al.*, 2004), porém isto nem sempre se reflecte.

O terceiro mecanismo das bactérias da flora ruminal para atenuarem os efeitos dos taninos, é a degradação destes. Apesar de alguns autores demonstrarem a possibilidade das bactérias degradarem os taninos condensados (Deschamps e Lebeault, 1984; Mutabaruka *et al.*, 2007), visto que a flora ruminal demonstrou uma grande resistência na presença de elevadas concentrações destes, é impossível afirmar que o mecanismo de resistência tenha derivado da degradação. Por outro lado, é quase unânime na comunidade científica, que estas só conseguem degradar os taninos hidrolisáveis, o que já foi demonstrado várias vezes (Odenyo *et al.*, 1999; Wiryawan *et al.*, 2000; Odenyo *et al.*, 2001; Barman e Rai, 2008).

Um estudo de Odenyo *et al.* (2001) observou que as bactérias dos géneros *Selenomonas* e *Streptococcus* presentes no rúmen das ovelhas e cabras eram capazes de degradar os taninos hidrolisáveis.

### **2.3. Efeitos dos taninos nos ruminantes**

Os taninos podem ter uma acção benéfica ou prejudicial para os ruminantes, consoante o tipo de taninos, o peso molecular ou até mesmo a fisiologia das espécies que os consomem. A toxicidade dos taninos condensados deve-se sobretudo ao seu elevado tamanho e ao facto de possivelmente não serem degradados pela flora ruminal, não podendo ser absorvidos. Quanto aos taninos hidrolisáveis, as substâncias tóxicas, os galotaninos, vão ser hidrolisados no rúmen formando ácido tânico, ácido gálico e pirogalol, que são metabólitos tóxicos activos que, quando absorvidos, vão para a corrente sanguínea e causam um efeito tóxico sistémico e danos em vários órgãos como o fígado e os rins (McSweeney *et al.*, 1988; Garg *et al.*, 1992; Mazzuchelli *et al.*, 2000; Frutos *et al.*, 2005).

Recentemente, a maioria dos pesquisadores referia que a adstringência dos taninos, e os efeitos que eles causam nos animais, levavam a uma redução do consumo voluntário destes. No entanto, agora sabe-se que espécies de plantas com altos valores de taninos condensados (geralmente > 50g/kg de matéria seca) reduz significativamente o consumo voluntário, enquanto um consumo médio ou baixo (< 50g/kg de matéria seca) parece não afectar (Barry e Duncan, 1984; Barry e Manley, 1984; Waghorn *et al.*, 1994). Está estudado, também, que outro dos factores que

reduz a ingestão de taninos, é o facto de estes causarem o atraso do esvaziamento do tracto gastrointestinal, o que leva o animal a fornecer um feedback para os centros nervosos envolvidos no controlo interno (Waghorn *et al.*, 1994).

A ingestão de menos de 50 g/kg TC MS (10-40 g/kg MS) melhora a utilização digestiva dos alimentos pelos ruminantes, principalmente por causa de uma redução na degradação da proteína e, como consequência, uma maior disponibilidade, especialmente de aminoácidos essenciais, para absorção no intestino delgado.

Diversos estudos demonstram que uma ingestão continuada de taninos condensados pode formar afecções ao nível do aparelho digestivo, como por exemplo gastrite, edema intestinal e enterite, bem como formação de úlceras e aumento dos histiócitos da mucosa do jejuno e íleo (Dawson *et al.*, 1999). Por outro lado, foi observado que os taninos condensados apenas provocam lesões nos animais quando estes são submetidos a quantidades muito elevadas, dificilmente ingeridas na natureza (Hervás *et al.*, 2003b).

Contudo é importante salientar que, os taninos condensados, a menos que alterem gravemente o epitélio intestinal permitindo a sua absorção e tendo um desenvolvimento semelhante aos taninos hidrolisáveis, não provocam uma intoxicação sistémica (McLeod, 1974).

A ingestão de bolotas jovens, como já foi descrito anteriormente, que possuem grandes quantidades de taninos hidrolisáveis, leva a uma intoxicação pelos produtos de metabolismo destes taninos. Estes vão ser absorvidos pelas mucosas, principalmente a intestinal, e distribuem-se de forma sistémica pela corrente sanguínea (Zhu *et al.*, 1995). O desenvolvimento e nível de intoxicação podem variar consoante a quantidade de bolotas ingeridas, ou até mesmo quanto ao processo de amadurecimento da bolota. Está também descrito, que animais com condição corporal baixa, em condições de stress, ou com défice nutritivo, apresentam uma menor capacidade de degradar e até mesmo tolerar as toxinas. No seguimento deste pensamento, Illius e Jessop (1996) propuseram que os processos de desintoxicação e eliminação requerem nutrientes adicionais.

O quadro sintomatológico causado pelos taninos é muito variado, e normalmente ocorre muito repentinamente, levando à morte dos animais em poucos dias. Esta sintomatologia inicia-se 3 dias após o consumo dos taninos (Smith, 2008), e é caracterizada por atonia ruminal, anorexia, debilidade, letargia, desidratação, anemia, diarreia hemorrágica e hipomotilidade.



### ***Efeitos a nível gastrointestinal***

Como já foi referido e descrito anteriormente, os taninos formam os complexos insolúveis com as proteínas no rúmen, o que vai levar a estase ruminal. Geralmente, no início da doença observa-se constipação, frequentemente com tenesmo, por vezes acompanhado de ruídos e dor abdominal. Nesta fase é possível observar grânulos secos nas fezes (Andrews, 2008).

Posteriormente as fezes tornam-se escuras, ou ocorre diarreia com fezes que podem ser sanguinolentas, e o tenesmo pode ser persistente e intenso. A diarreia sanguinolenta deve-se aos danos que os taninos e a uremia causam na mucosa intestinal.

### ***Efeitos a nível renal***

Os taninos hidrolisáveis, ligam-se às proteínas no plasma e nos órgãos, o que provoca coagulação e necrose (Smith, 2008). Tal ligação vai levar a coagulação intravascular disseminada, que por sua vez origina isquémia do rim, provocando uma necrose tubular aguda. Outra das formas de degradação do rim são os próprios tóxicos resultantes do produto de degradação dos taninos. A isquémia é uma redução do fluxo sanguíneo renal resultante de uma falha circulatória geral, e pode ser causada por choque, desidratação, anemia hemorrágica aguda, insuficiência cardíaca aguda ou diarreia neonatal. A patogenia desta doença renal reflecte-se numa vasoconstrição compensatória em resposta à diminuição do débito cardíaco, que vai causar uma diminuição da pressão sanguínea, do filtrado glomerular da acumulação de metabolitos no sangue. Logo há um aumento da ureia, ou seja uma azotémia pré-renal, um aumento da reabsorção tubular, e uma diminuição do fluxo da urina. As lesões degenerativas tubulares causadas podem ser reversíveis ou irreversíveis. Os sinais mais característicos que esta doença causa são oligúria, proteinúria, e azotémia renal, e na análise histopatológica apresenta córtex pálido e tumefacto, linha de necrose córtico-medular, necrose do epitélio tubular, necrose glomérulas e cilindros hialinos caso haja hemoglobinúria. Estes cilindros hialinos, que são muito característicos de intoxicações por taninos, são compostos por proteína e resultam da agressão e consequente destruição do epitélio tubular. Estas proteínas normalmente não são filtradas pelos glomérulos, e, devido a lesões destes, ou anomalias no material circulante, são filtradas e incompletamente reabsorvidas acumulando-se deste modo no lúmen.

A isquémia provocada no rim vai causar uma nefrose, ou necrose tubular aguda. Esta lesão renal é, não só causada pela isquémia, mas também pela agressão por parte das próprias toxinas da bolota, e vai conduzir à degenerescência tubular,

inflamação e por vezes nefrite intersticial. Etiologicamente a nefrose pode ser causada por resposta fisiológica a uma isquemia renal em doenças gastrointestinais, em qualquer patologia que reduza a perfusão renal e filtração glomerular, e é muito frequente em animais desidratados. A patogenia desta doença está intimamente ligada à obstrução do filtrado glomerular através dos túbulos devido a edema intersticial e cilindros hialinos, que vai causar uma lesão tubular com retorno do filtrado glomerular para o interstício. É também de realçar que os tóxicos vão provocar efeitos directos nos glomérulos, com diminuição do filtrado. Os sinais clínicos causados pela nefrose não são específicos da doença, como por exemplo depressão, anorexia, desidratação ligeira e aguda. Os sinais associados a intoxicação por metais como os taninos podem ser neurológicos ou gastrointestinais. Estes animais vão apresentar proteinúria, hematuria, cilindros hialinos e azotémia pré-renal.

Os rins apresentam-se com edema e hemorragia perirenal, inchados e pálidos, e com bastantes petéquias de 2-3mm de diâmetro. Quanto ao edema, deve-se ao extravasamento de fluidos, resultante do CID e da ligação dos taninos às células endoteliais, provocando a sua lesão e conseqüente incapacidade de realizar as suas funções naturais. Os glomérulos apresentam-se isquémicos, mas para além disso estão normais, contudo ao fim de uns dias pode haver dilatação do espaço urinário. Embora nem sempre esteja presente, poderá ser observada, microscopicamente, hematuria.

Alguns animais têm a capacidade de recuperar a lesão, porém noutros casos a lesão renal pode progredir com retracção, fibrose difusa e colecções dispersas de células mononucleares. A necrose completa em grupos de túbulos, com hemorragia intratubular distingue a nefrose de intoxicação aguda de taninos da maioria das outras intoxicações.

No início das lesões renais, ocorre anúria ou oligúria, progredindo nos estágios de intoxicação subaguda à crónica para poliúria, com produção de urina bastante diluída, visto que os rins não a conseguem concentrar devido à destruição da medula por parte dos tóxicos. A insuficiência renal vai causar proteinúria, que significa a presença de um excesso de soro de proteínas na urina. Uma vez que as proteínas do soro são prontamente reabsorvidas a partir da urina, a presença de excesso de proteína ou indica uma insuficiência de absorção ou filtração.

#### ***Efeitos a nível sistémico***

A intoxicação por taninos vai causar uma anemia hipocrómica microcítica, devido à deficiência em ferro. Este tipo de anemia é tradicionalmente classificada

como não regenerativa, ainda que uma regeneração discreta a moderada ocorra geralmente, devendo por isso ser classificada como anemia semi-regenerativa. Além disso, os índices hematimétricos da anemia por deficiência em ferro são microcíticos e hipocrômicos, distinguindo-a das outras anemias não regenerativas que são normocíticas e normocrômicas.

A causa mais frequente deste tipo de anemia é a deficiência em ferro para compor a síntese de hemoglobina, e deve-se sobretudo a uma dieta deficiente em ferro, uma absorção diminuída, um aumento das necessidades, uma perda de volume sanguíneo, ou até mesmo por sequestro de ferro.

O ferro é um dos principais constituintes da hemoglobina, responsável pelo transporte de oxigénio para os tecidos, e da mioglobina, que é uma molécula que transporta oxigénio para as células musculares, especialmente para os músculos esqueléticos e para o coração.

O ferro é absorvido para a corrente sanguínea principalmente no intestino delgado, mais especificamente no duodeno e jejuno. Uma vez absorvido, este liga-se à transferrina, que é a proteína que o transporta para a medula óssea, onde precursores eritróides o captam para formar a hemoglobina. Os precursores eritróides amadurecem, tornando-se hemácias jovens. Como uma hemácia dura em média 120 dias, após a destruição destas hemácias velhas, o ferro é reaproveitado para compor a hemoglobina de novas hemácias.

Como já foi referido anteriormente, os taninos vão provocar uma alteração na permeabilidade, bem como danos directos na mucosa intestinal. Estes dois factores são predisponentes não só para uma diminuição na absorção de ferro, mas também para a ocorrência de significativas perdas de sangue em virtude de hemorragias agudas ou crónicas gastrointestinais que vão levar à anemia.

As evidências experimentais dos estudos de Rao e Prabhavathi (1982) e Siegenberg *et al.* (1991) confirmam prévias observações de que os compostos polifenólicos inibem significativamente a absorção de ferro.

A anemia ferropriva é caracterizada pela palidez, causada pela diminuição de oxihemoglobina na pele e mucosas, fadiga, fraqueza, falta de apetite, apatia e taquicardia. Em casos muito graves poderá haver dispneia.

A formação de hemossiderina normalmente ocorre após hemorragia de um órgão. A hemossiderina é um pigmento microscópico de origem endógena derivado da hemoglobina, que possui coloração acastanhada, encontra-se nos macrófagos e é

resultante da destruição das hemácias. Na sua composição tem carboidratos, lípidos, proteínas e ferro, e pode acumular-se em diferentes órgãos, como nas células epiteliais do fígado, rins, pâncreas, em fibras cardíacas e ocasionalmente livre, no tecido conjuntivo, o que pode ser tóxico. As células sanguíneas resultantes da hemorragia gastrointestinal, ao deixar os vasos sanguíneos, vão morrer, e a hemoglobina das hemácias vai ser fagocitada pelos macrófagos que vão formar depósitos de hemossiderina.

#### **2.4. Diagnóstico de Intoxicação por Taninos em Ruminantes**

O diagnóstico da intoxicação por taninos é efectuado através de um conjunto de factores e análises laboratoriais. Primeiro que tudo é importante avaliar o local onde os animais pastam e averiguar sobre a presença de árvores do género *Quercus*, bem como do pasto em si, para verificar a proporção entre pasto existente e pelo qual os animais se alimentam, e quantidade de bolotas.

Os sinais clínicos apresentados pelos animais são bastante importantes no diagnóstico desta doença, porém são inespecíficos. A ingestão de folhas de carvalho, bem como das bolotas, pode ser associada a nefrose manifestada por poliúria, edema ventral, dor abdominal, constipação seguido pela passagem de fezes contendo muco e sangue, apatia, ataxia, desidratação, atonia ruminal e anemia.

O rim é o órgão mais afectado pela intoxicação por bolotas (Sandusky *et al.*, 1977; Spier *et al.*, 1987; Naser *et al.*, 1982; Plumlee *et al.*, 1998) e as concentrações de ureia e creatinina plasmáticas (Garg *et al.*, 1992; Sanderson, 2005) são os principais parâmetros sanguíneos indicativos da função renal. Devendo-se optar preferencialmente pela medição de ureia, pois oferece uma maior sensibilidade no diagnóstico (Pourjafar *et al.*, 2003).

No que diz respeito ao estudo anatomopatológico, a necrópsia permite observar lesões principalmente no rim, tal como necrose tubular aguda, congestão, ou hemorragias no córtex renal. Outros achados podem incluir ascite, hidrotórax, edema perirenal, alterações hepáticas (Spier *et al.*, 1987; Garg *et al.*, 1992; Frutos *et al.*, 2005) e alterações a nível gastrointestinal, como estase ruminal, intestinos sem conteúdo ou apenas com muco no seu interior, ou até mesmo hemorragias gastrointestinais. O rim deverá ser recolhido para posterior análise histopatológica.

## 2.5. Tratamento e Prevenção

Já foram realizados diversos trabalhos com informações para reduzir ou mesmo até evitar completamente os efeitos negativos dos taninos nas plantas. Caso fosse possível, seria bastante importante, a redução dos efeitos que estes possuem, principalmente em áreas geográficas que contenham um pasto empobrecido, com poucos recursos vegetais, e onde a maioria das espécies disponíveis sejam ricas em taninos.

Autores como Blakley (2005) e Wina *et al.* (2005), referiram num estudo, que se pode fazer um tratamento preventivo com bastantes benefícios para animais que consomem bolotas jovens, ricas em taninos, com a administração de um suplemento com hidróxido de cálcio a 10-15%, devido à sua capacidade de se unir aos taninos e evitar assim a sua acção. Está também descrito, que molhar a alimentação com água ou soluções alcalinas pode separar os compostos fenólicos das partes mais nutritivas, reduzindo assim a sua actividade.

Recentemente têm-se estudado polímeros sintéticos como o polivinil pirrolidona (PVP), o polivinil polipirrolidona (PVPP) e nomeadamente o polietilenoglicol (PEG) que contêm um número de moléculas de oxigénio suficientes para formar fortes ligações com os grupos fenólicos e hidroxilas dos taninos (Silanikove *et al.*, 2001). Particularmente o PEG, tem sido amplamente estudado, devido às capacidades que possui para formar complexos tanino-proteína, e ainda a capacidade de deslocar a proteína de um complexo tanino-proteína pré-formado (Makkar *et al.*, 1995; Getachew *et al.*, 2008; Hervás *et al.*, 2000). Ben Salem *et al.* (2003) observaram que em cabras intoxicadas pelo consumo de *Quercus coccifera*, a administração de PEG provocou significativas melhoras do quadro clínico, tendo-se verificado uma normalização das frequências respiratória e cardíaca, das contracções ruminais e da temperatura corporal.

Uma vez já instaurada a intoxicação, não há nenhum tratamento específico, pelo que é feito um tratamento de suporte, sintomatológico, e baseado também na eliminação do tóxico. O tratamento é efectuado à base de administração de água morna por via oral, com soluções purgantes, como azeite, sulfato de magnésio ou sulfato de sódio, e com estabilizadores da flora ruminal. Pode-se também fazer fluidoterapia para corrigir a desidratação e a acidose, e administrar diuréticos para auxiliar o rim a eliminar os tóxicos do organismo (Knight, 1999; Blakley, 2005).

Para melhorar a actividade ruminal e estabilizar a flora existente é importante associar à água morna, administrada *per os*, Biorúmen® e Sulfato de Magnésio. O Biorúmen é composto por bicarbonato de sódio, fosfato de sódio, zinco, cobre, magnésio, cobalto, *saccharomyces cerevisiae*, plantas digestivas e aromáticas (*Foeniculum officinale*, *peumus boldus*, *trigonella foenumgraecum*, *gentiana lutea*). As principais funções destes compostos são as seguintes; o bicarbonato de sódio controla a acidose ruminal e equilibra o pH caso ocorra; *sacaromices cervisiae* são leveduras capazes de ajudar a flora ruminal a tornar-se mais activa, melhorando a digestão dos alimentos; extracto de quatro plantas aromáticas, permite a expulsão de gases, a palatibilidade e digestibilidade dos alimentos, melhorando desta forma a motilidade ruminal; e, por fim, são quelantes de diferentes oligoelementos, ajudando a degradação dos alimentos a fim de melhorar a sua digestibilidade. O Sulfato de Magnésio é muito importante devido às suas características diuréticas, que vão promover um aumento da excreção renal, facilitando a eliminação dos tóxicos.

É importante também a administração de Diurizone®, que é um medicamento composto por um diurético, a hidroclorotiazida, e um córtico, a dexametasona. A hidroclorotiazida é um diurético não mercurial, que aumenta intensamente a excreção renal da água, favorecendo a reabsorção dos edemas. A associação de hidroclorotiazida com dexametasona, glucocorticóide de marcada acção anti-inflamatória sobretudo a nível dos capilares, ajuda a restabelecer o intercâmbio hídrico nos processos congestivos e edematosos de diferentes origens.

Outro medicamento importante para se utilizar em casos de intoxicação por taninos é Indigest. Indigest®, cuja substância activa é a membutona, actua ao nível do sistema digestivo, incrementando a digestão e absorção do tracto gastrointestinal, favorecendo o trânsito e a assimilação dos alimentos.

Durante todo o tratamento, e também como modo preventivo, os animais devem ser retirados de pastagens em que possuam bolotas à sua disponibilidade. Também como modo preventivo autores como Price e Butler (1980) descrevem algumas técnicas para diminuir os efeitos negativos dos taninos como selecção genética, remoção ou inactivação, porém, isto pode induzir a perda das vantagens agronómicas que estes conferem. No seguimento deste pensamento, de não diminuir as vantagens agronómicas dos taninos, Almeida (1986) experimentou algumas técnicas tais como: remoção física dos taninos, adição à dieta de substâncias com capacidade complexante com os taninos, tratamento químico *in situ* do produto alimentar para alterar o tanino, adição à dieta de substâncias adjuvantes da

desintoxicação metabólica, tratamento hormonal dos frutos, selecção de variedades de plantas com baixo conteúdo de taninos. O problema de todos estes processos reflecte-se na sua aplicabilidade prática e viabilidade económica.

Ostrowski *et al.* (1989) observaram que novilhos que tinham recuperado completamente de uma intoxicação por bolotas, beneficiaram em desenvolver uma boa condição corporal, devido ao ganho de peso compensatório, e por terem um índice de conversão menor. Por outro lado, quando os sinais clínicos são muito evidentes, e o dano renal é muito severo, um mau prognóstico é muito mais comum (Knight, 1999).

### **3. Objectivos**

Com isto, os objectivos deste trabalho foram estudar a mortalidade e morbilidade de intoxicação por taninos em bovinos e avaliar a taxa de sucesso de diversos protocolos no tratamento desta afecção.



## 4. Material e Métodos

### 4.1. População e amostra do estudo

No âmbito deste estudo foram incluídos bovinos cruzados de diferentes raças, englobando três distintas explorações de sistema extensivo, situadas na região do Ribatejo, em Portugal. A população total foi constituída por 440 animais, 280 pertencentes à exploração A, 70 animais pertencentes à exploração B e 90 pertencentes à exploração C.

Nas explorações estudadas o manejo alimentar dos bovinos é idêntico, sendo que estas se alimentam do pastoreio diversificado existente, e sob forma de suplemento, é-lhes fornecido palha e silagem. Os terrenos das regiões onde os animais se localizam possuem bastantes árvores do género *Quercus*, pelo que as bolotas encontram-se à sua disposição o tempo inteiro.

A amostra do estudo consistiu de animais suspeitos de intoxicação por taninos, com base nos seguintes critérios:

- História clínica e evidências circunstanciais, como a presença de uma grande quantidade de bolotas e de árvores do género *Quercus*,
- Observação de sinais clínicos característicos da doença, que os animais apresentavam, nomeadamente:
  - a) Morte súbita
  - b) Debilidade
  - c) Apatia
  - d) Anorexia
  - e) Deambulação
  - f) Anemia
  - g) Desidratação
  - h) Poliúria com urina bastante diluída
  - i) Constipação
  - j) Fezes escuras ou diarreias sanguinolentas
  - k) Hipomotilidade ou estase ruminal
  - l) Halitose e fezes com cheiro fétido e característico
  - m) Em estados muito avançados, letargia e por vezes decúbito
  - n) Tremores musculares

## **4.2. Diagnóstico de intoxicação por taninos**

Os dados foram recolhidos entre os dias 1 de Setembro a 31 de Dezembro de 2013.

Nas três explorações, foram efectuadas colheitas de sangue, pela veia coccígea, para análise de quantificação de ureia sanguínea, bem como análises histopatológicas do rim colhido aquando da necrópsia dos primeiros animais que morreram em cada uma das explorações.

### **4.2.1. Análises laboratoriais**

Para as análises laboratoriais efectuadas foram colhidas um total de dez amostras de sangue, dos animais que demonstravam maior sintomatologia clínica, com o objectivo de quantificar os níveis sanguíneos de ureia.

Adicionalmente, foram realizadas quatro análises histopatológicas do rim, dos animais necropsiados tendo por objectivo a análise das estruturas.

### **4.2.2. Achados de necrópsias**

Como método utilizado para o diagnóstico da doença foram efectuadas necrópsias a quatro animais, aleatórias dos 23 animais que morreram, duas delas da exploração A e uma da exploração B e outra da C. As necrópsias foram realizadas aos primeiros animais que morreram em cada exploração e, adicionalmente, aproveitou-se para lhes extrair o rim, de modo a serem enviados para análise laboratorial.

## **4.3. Protocolos de tratamento utilizados**

Os tratamentos utilizados não foram iguais para todos os animais, sendo diferenciados consoante o tipo de exploração e o estado de cada indivíduo. Quanto ao tipo de exploração, os tratamentos variavam, devido ao facto de a disponibilidade financeira de alguns produtores não permitir o uso de tratamentos muito complexos, visto que são dispendiosos. Quanto à variação em relação ao tipo de animal, a utilização de medicamentos dependia consoante os sinais clínicos apresentados, e também em pela situação reprodutiva do animal em questão, mais concretamente se estava gestante ou não. Foram efectuados cinco tratamentos diferentes, iniciados após o aparecimentos dos primeiros sintomas:

Tratamento A:

- Administração oral de 20/30 litros de água morna com Biorúmen® (uma saqueta de 125g, *per os*, laboratório Ceva).
- Administrado a dezassete vacas na exploração A.

Tratamento B:

- Biorúmen® e Diurizon® (25ml, IV, do laboratório Vetoquinol).
- Administrado a vacas não gestantes, de forma a não provocar aborto.
- Administrado a três vacas na exploração A.

Tratamento C:

- Conjugação de Biorúmen® e Sulfato de Magnésio (800g, *per os*, produzido por Turfmasters),
- Administrado em vacas gestantes que estivessem muito atáxicas e com a urina muito diluída.
- Administrado a seis animais na exploração A.

Tratamento D:

- Biorúmen®, Sulfato de Magnésio e Indigest® (40ml, IV, do laboratório Calier).
- Administrado em vacas gestantes, que estivessem visivelmente mais afectadas, com urina muito diluída e fezes muito pastosas.
- Administrado em quatro vacas na exploração A

Tratamento E:

- Biorúmen®, Sulfato de Magnésio, Diurizon® e Indigest®.
- Tratamento ideal a ser utilizado, porém tem custos elevados e não pode ser administrado a vacas gestantes
- Administrado a três vacas na exploração B, e duas vacas na exploração C

#### 4.4. Maneio

O maneio recomendado nas três explorações foi o de retirar os animais de terrenos que possuíssem bolotas e suplementá-los com silagens, de modo a complementar as suas necessidades alimentares.

Para as três explorações, o maneio acabou por ser aplicado de forma distinta,

- **Exploração A:** O maneio efectuado foi retirar todos os bovinos dos terrenos que continham bolotas e, como forma de rentabilizar o espaço, passaram a alugá-los a produtores de suínos. Além disto, os animais foram suplementados com silagem.
- **Exploração B:** O maneio aplicado foi retirar completamente os animais de terrenos com bolotas e suplementá-las com silagem.
- **Exploração C:** O maneio realizado foi mudar os animais existentes num determinado terreno, para um outro que continha um nível de bolota substancialmente inferior, mas reforçando a sua alimentação com silagem.

#### 4.5. Cálculo da prevalência

A prevalência é uma medida estática e tem por objectivo informar o número de casos de uma doença num determinado momento. O cálculo da prevalência foi feito com base na seguinte fórmula:

$$\text{Prevalência} = \text{número de animais doentes} / \text{população em risco}$$

#### 4.6. Cálculo da Mortalidade

O cálculo da mortalidade foi feito com base na seguinte fórmula:

$$\text{Mortalidade} = \text{número de animais que morreram na exploração} / \text{número de animais da exploração}$$

#### 4.7. Cálculo da Morbilidade

A morbilidade, em epidemiologia, é calculada através da taxa de portadores de determinada doença em relação ao total da população objecto de estudo num determinado momento. O cálculo das taxas e coeficientes de morbilidade e morbilidade-mortalidade são essenciais para vigilância epidemiológica e controlo das

doenças. O cálculo da relação entre mobilidade e mortalidade foi obtido com base na seguinte fórmula:

**Morbilidade = número de animais afectados pela doença / número total de animais na exploração**

## 5. Resultados

### 5.1. Prevalência da doença

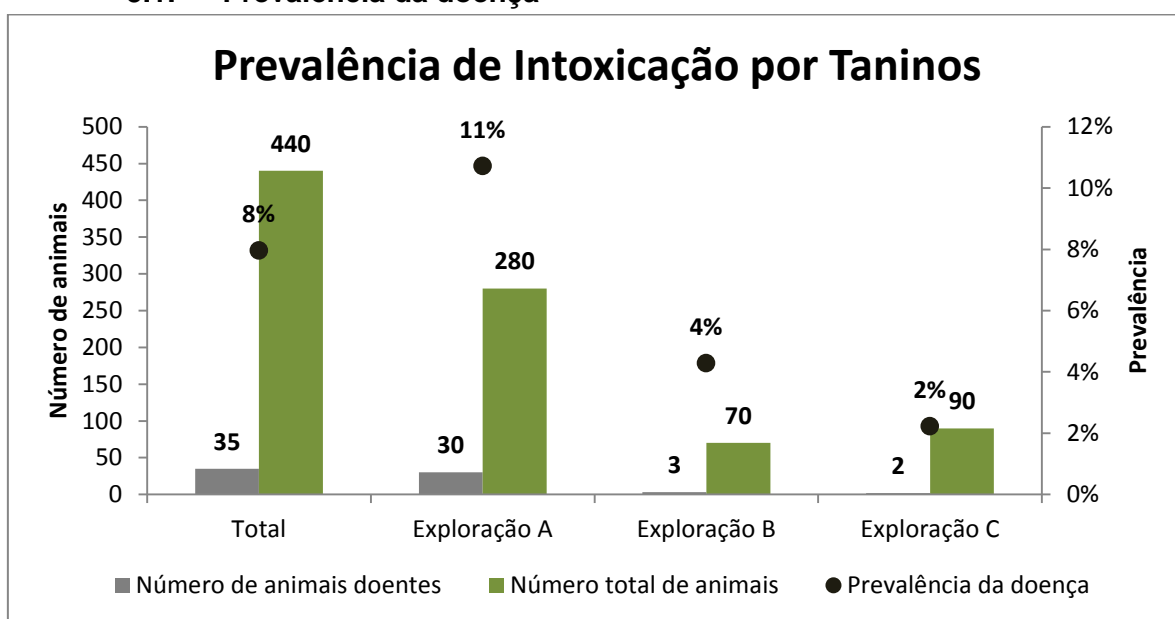


Figura 1: Prevalência de Intoxicação por Taninos no total e individualmente em cada exploração expresso em valor absoluto e relativo.

A Figura 1 permite evidenciar que, para o período de tempo do estudo, no total da amostra de 440 animais, 35 foram afectados pela doença. Assim, o gráfico demonstra que 8% (n=35) dos animais foram afectados pela doença, enquanto que 92% (n=405) não foram afectados.

Na exploração A, dos 280 animais existentes, 11% (n=30) dos animais foram afectados. Na exploração B, dos 70 animais existentes, 4% (n=3) foram afectados pela doença. No caso da exploração C, dos 90 animais que fazem parte desta exploração, 2% (n=2) foram afectados pela doença.

## 5.2. Mortalidade

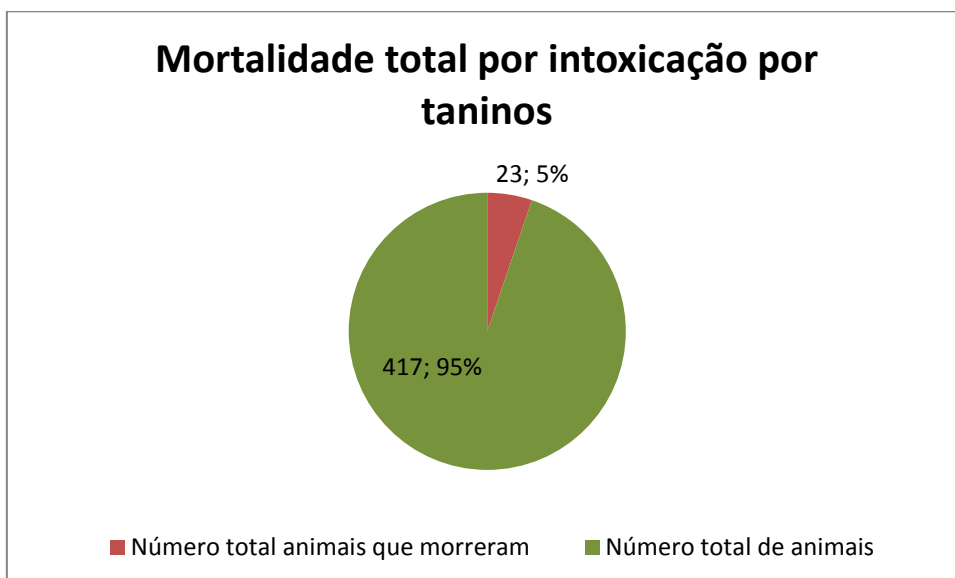


Figura 2: Mortalidade total por Intoxicação por Taninos nas três explorações.

Como demonstra a Figura 2, a mortalidade total foi de 5% (n=23).



Figura 3: Mortalidade total por Intoxicação por Taninos na exploração A.

Como se pode observar na Figura 3, na exploração A o número de animais que morreram corresponde a 7% (n=20) do efectivo.



Figura 4: Mortalidade total por Intoxicação por Taninos na exploração B.

A Figura 4 mostra que na exploração B, 3% (n=2) dos animais na exploração morreram por intoxicação por taninos.

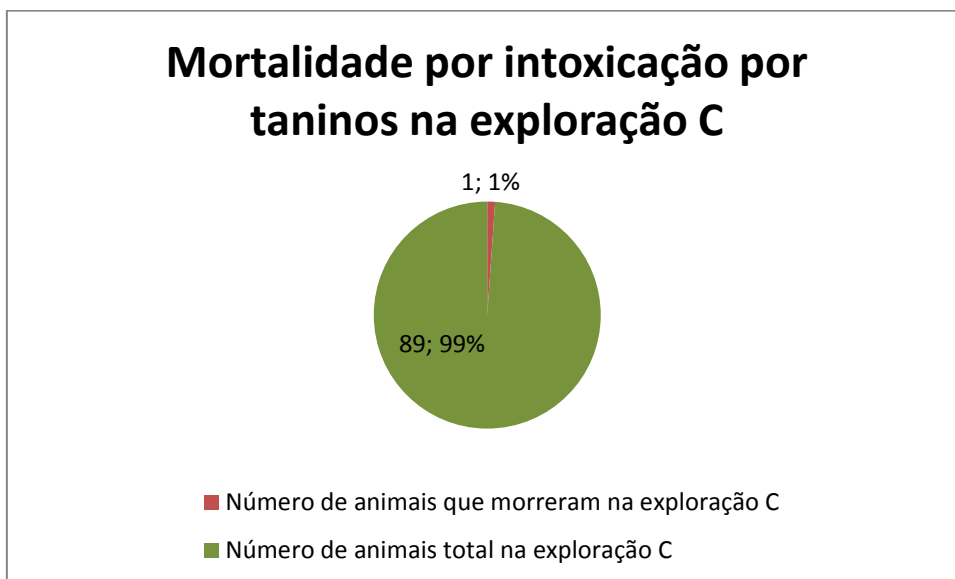
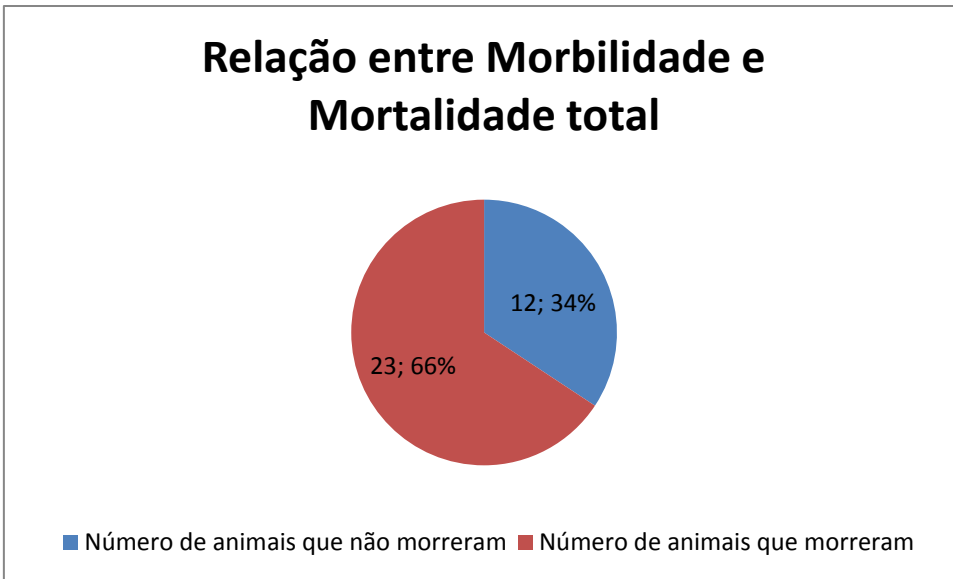


Figura 5: Mortalidade total por Intoxicação por Taninos na exploração C.

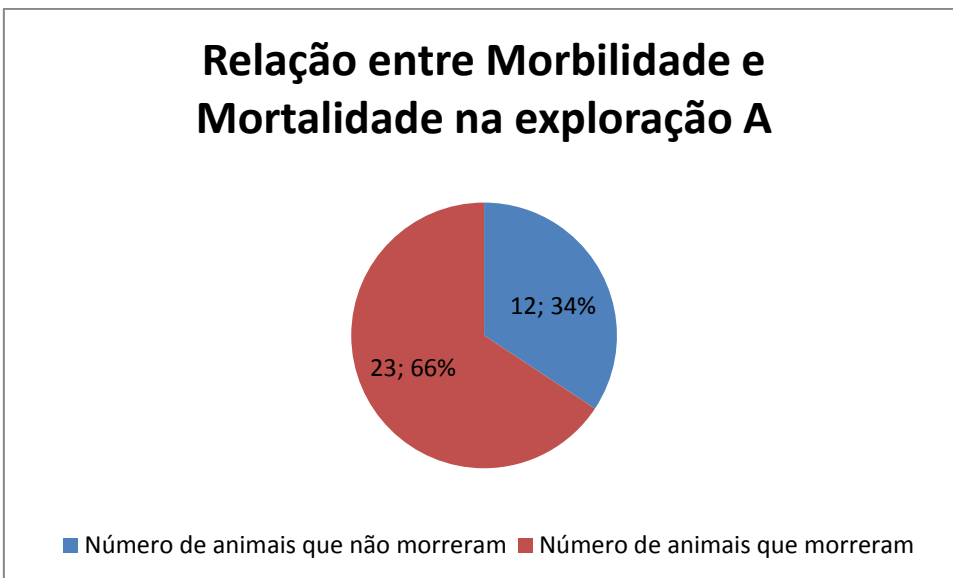
A Figura 5 mostra que na exploração C, 1% (n=1) do efectivo morreu por intoxicação por taninos.



*Figura 6:* Relação entre Mortalidade e Morbilidade nos animais intoxicados por taninos total das três explorações.

A Figura 6 demonstra que a mortalidade total dentro do número de animais doentes foi de 66% (n=23).

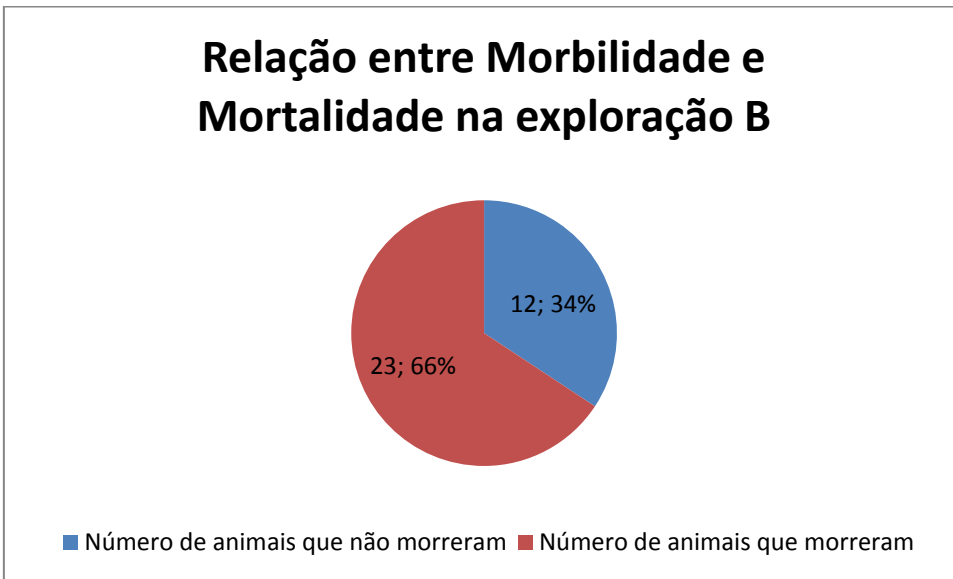
### 5.3. Morbilidade



*Figura 7:* Relação entre Mortalidade e Morbilidade nos animais intoxicados por taninos na Exploração A.

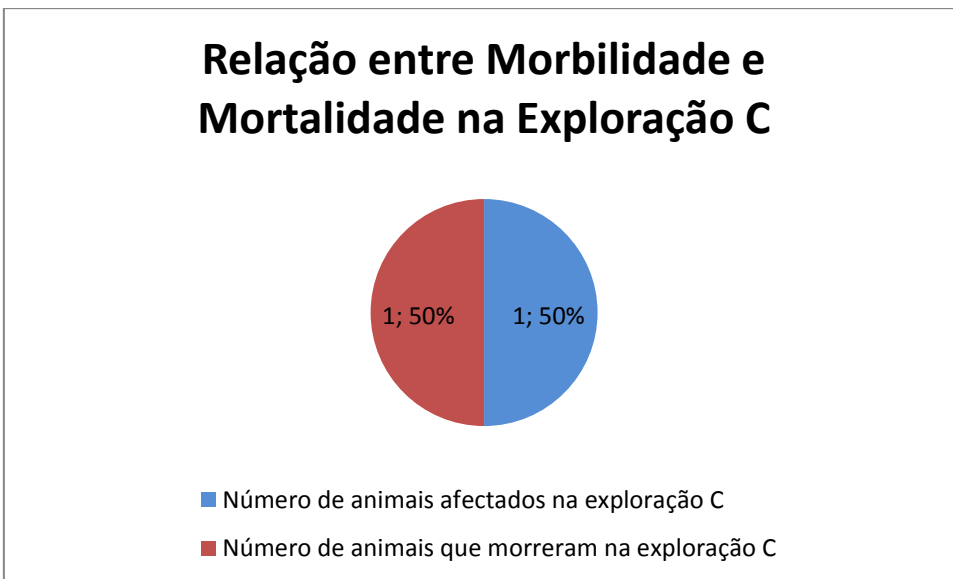
Como se pode observar na Figura 7, a mortalidade de animais doentes na exploração A foi de 67% (n=20).





*Figura 8:* Relação entre Mortalidade e Morbilidade nos animais intoxicados por taninos na Exploração B.

Na Figura 8, pode observar-se que na exploração B, 67% (n=2) dos animais que estavam afectados morreram.



*Figura 9:* Relação entre Mortalidade e Morbilidade dos animais intoxicados por taninos na Exploração C.

Como se pode verificar na Figura 9, na exploração C 50% (n=1) dos animais afectados morreram.

#### 5.4. Achados de necrópsia

Nos achados macroscópicos da necrópsia, foram observados os rins que se apresentavam bastante pálidos e edemaciados, com petéquias. O conteúdo do rúmen estava bastante pastoso, e continha grandes quantidade de bolotas. A nível intestinal, havia edema da parede, o conteúdo era apenas muco sanguinolento, pelo que não havia presença de fezes em qualquer porção do intestino. Foram também encontrados linfonodos mesentéricos totalmente negros.



Figura 10: Rim direito que apresenta petéquias (foto do autor).

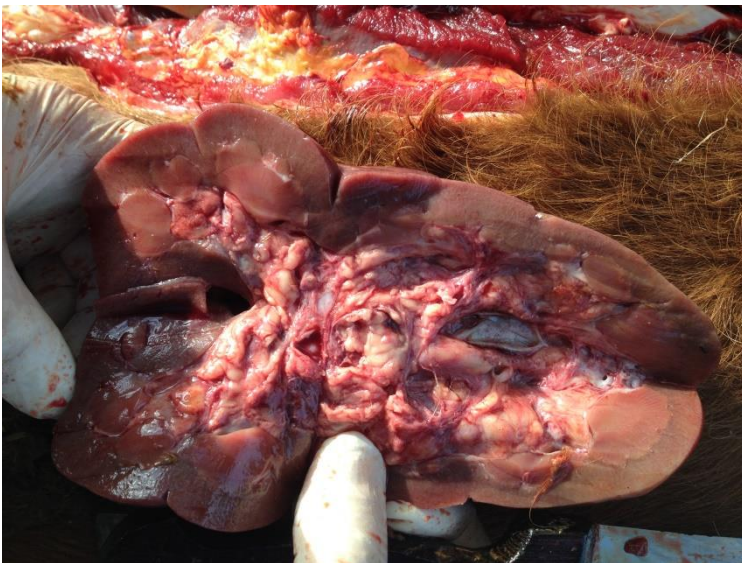


Figura 11: Rim direito que se apresenta pálido e edemaciado (foto do autor).



Figura 12: Corte de rúmen que apresenta o seu conteúdo muito pastoso, com bastantes bolotas (foto do autor).



Figura 13: Corte de intestino que apresenta um muco sanguinolento (foto do autor).

## 5.5. Achados laboratoriais

A Tabela 1 apresenta os resultados das dez análises sanguíneas realizadas para quantificação do nível de ureia presente no sangue dos bovinos com sinais clínicos de doença.

Tabela 1: Valores séricos de ureia, idade e sexo de dez animais afetados por intoxicação por taninos.

Número	Valores ureia		Valor de Referência	IDADE	SEXO
1	449.3	mg/dL	10-30 mg/dL	12	F
2	491.8	mg/dL		7	F
3	683.9	mg/dL		1	M
4	392.7	mg/dL		6	F
5	244.5	mg/dL		7	F
6	444.3	mg/dL		5	F
7	383.5	mg/dL		10	F
8	538.8	mg/dL		5	F
9	525.3	mg/dL		7	F
10	213.4	mg/dL		5	F

Como se pode observar na Tabela 1, dos dez animais amostrados, só dois (números 5 e 10) sobreviveram à doença, e correspondem aqueles cujos níveis séricos de ureia eram inferiores a 300 mg/dL.

Pode-se verificar que a idade dos bovinos é bastante variada e que a doença não tem predisposição nesta categoria. Quanto ao sexo, apesar da maior parte analisada serem fêmeas, é importante referir que as vacadas no total só possuíam 5 machos.

Os resultados obtidos na análise histopatológica dos rins foram todos semelhantes. Foi observada uma necrose de coagulação dos túbulos contornados ao nível do córtex renal; células de revestimento dos tubos contornados apresentavam-se necrosadas e destacadas para o lúmen; em algumas células de revestimento foi encontrado um pigmento castanho granular compatível com hemossiderina; presença de cristas refringentes no lúmen dos tubos hialinos; e, por fim, colónias de bactérias saprófitas. Em todas as análises efectuadas, o diagnóstico final, enviado pelo laboratório foi determinado ser a necrose tubular aguda, que é a principal causa de insuficiência renal aguda e as suas causas seriam isquémia e toxémia.

## 5.6. Números de animais tratados com tratamento A / B / C / D / E

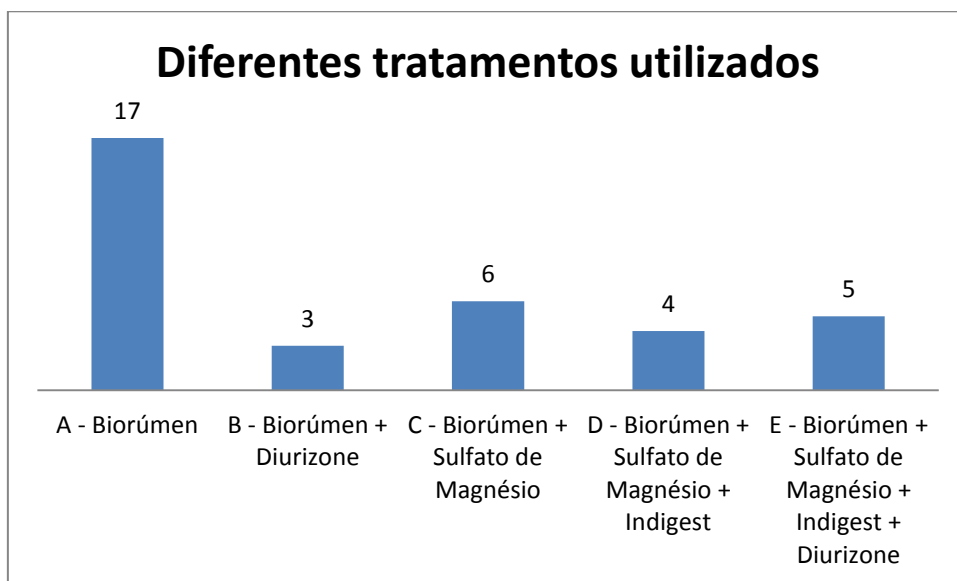


Figura 14: Número de animais Intoxicados por Taninos tratados com os diversos tratamentos.

Como se pode verificar na Figura 14, dos 35 tratamentos efectuados, 49% foram realizados aplicando exclusivamente o Biorúmen®, 9% foram com Biorúmen® e Diurizone®, 17% com Biorúmen® e Sulfato de Magnésio, 11% com Biorúmen®, Sulfato de Magnésio e Indigest® e 14% com Biorúmen®, Sulfato de Magnésio, Indigest® e Diurizone®.

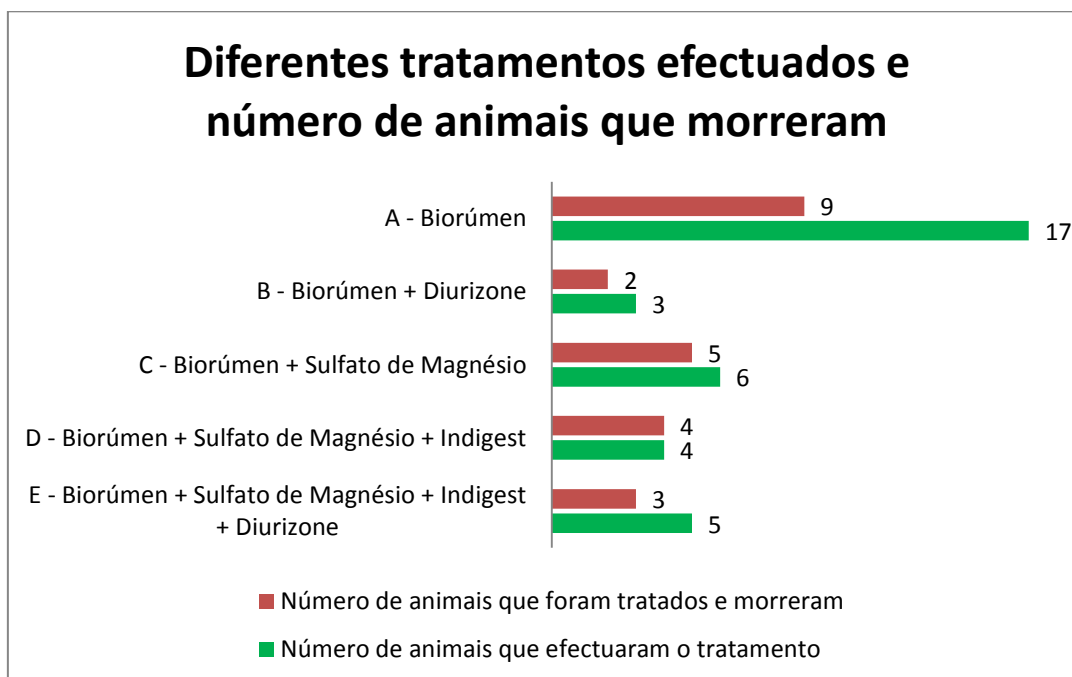


Figura 15: Relação entre os diversos tratamentos efectuados e o número de mortes que ocorreu em cada um.

A Figura 15 mostra o número dos diferentes tratamentos efectuados e a mortalidade associada a cada um deles. 53% dos animais tratados com o tratamento A, 67% dos animais tratados com o tratamento B, 83% dos animais tratados com o tratamento C, 100% dos animais tratados com o tratamento D e 60% dos animais tratados com o tratamento E morreram.

### 5.7. Relação entre animais tratados com diferentes tratamentos e taxa de sucesso

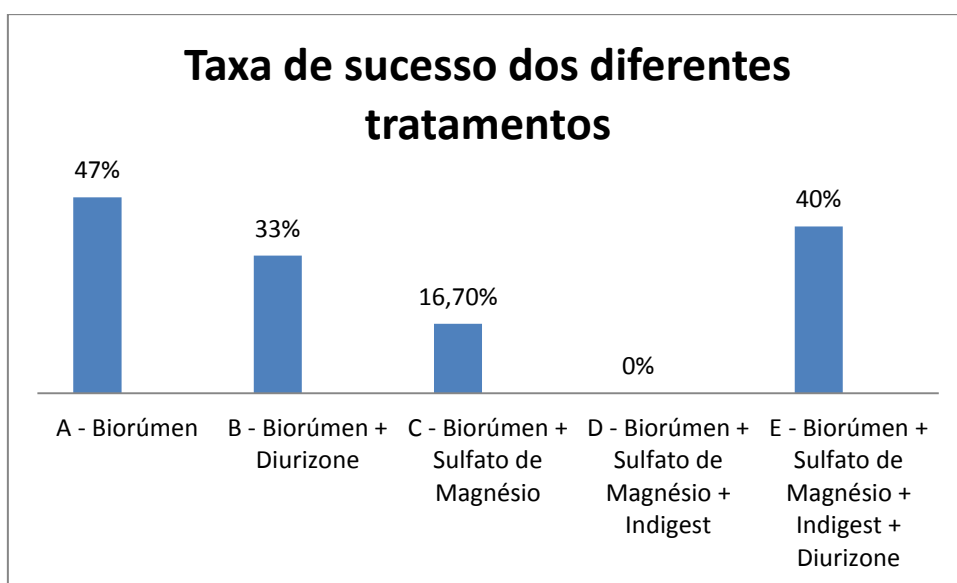


Figura 16: Taxa de sucesso dos diferentes tratamentos aplicados em animais Intoxicados por Taninos.

A Figura 16 mostra a taxa de sucesso de cada tratamento aplicado. Como se poderá observar, o tratamento efectuado com Biorúmen® foi o que teve a maior taxa de sucesso, com 47%, porém é importante referir que os bovinos que foram alvo deste tratamento, eram aqueles que apresentavam sinais clínicos mais ligeiros.

## 5.8. Relação entre severidade de sinais clínicos e taxa de sucesso do tratamento

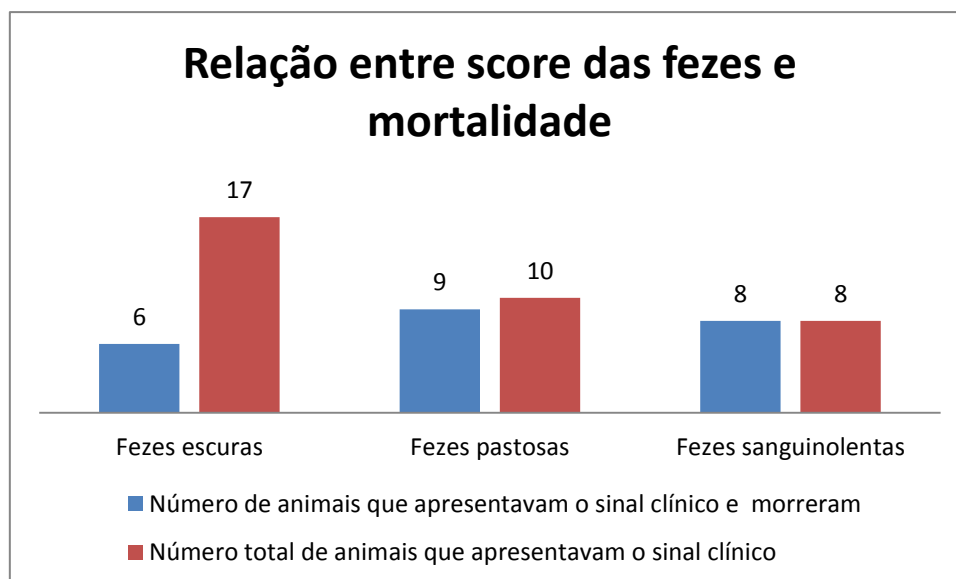


Figura 17: Relação entre o tipo de fezes nos animais intoxicados por taninos e mortalidade.

Na Figura 17 pode-se observar o número de animais que apresentavam diferentes tipos de fezes e o número de animais que morreram dentro de cada grupo de tipo de fezes. Todos os animais que apresentavam fezes sanguinolentas pereceram, 90% dos animais que apresentavam fezes pastosas, pereceram e 35% dos animais que apresentavam fezes escuras não sobreviveram ao estado de intoxicação.

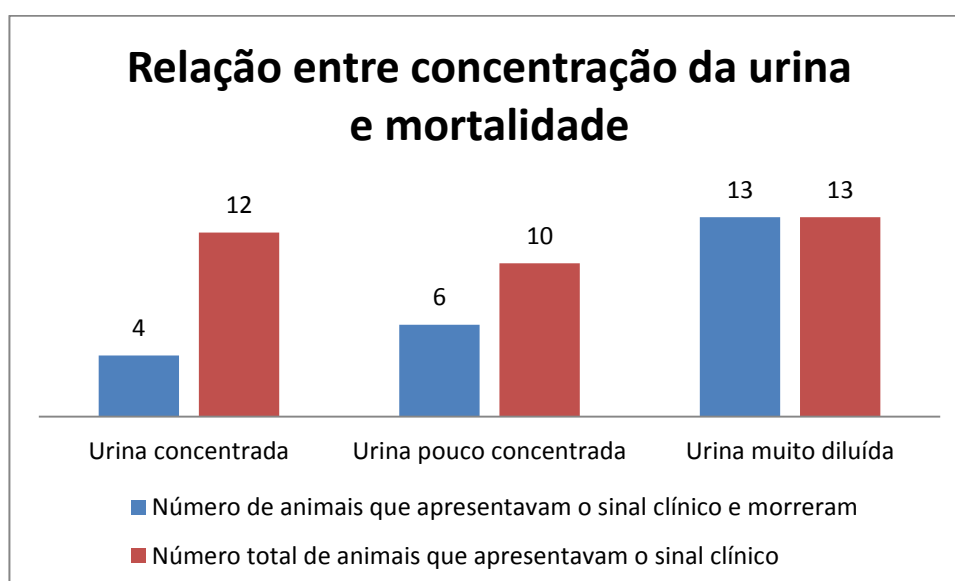
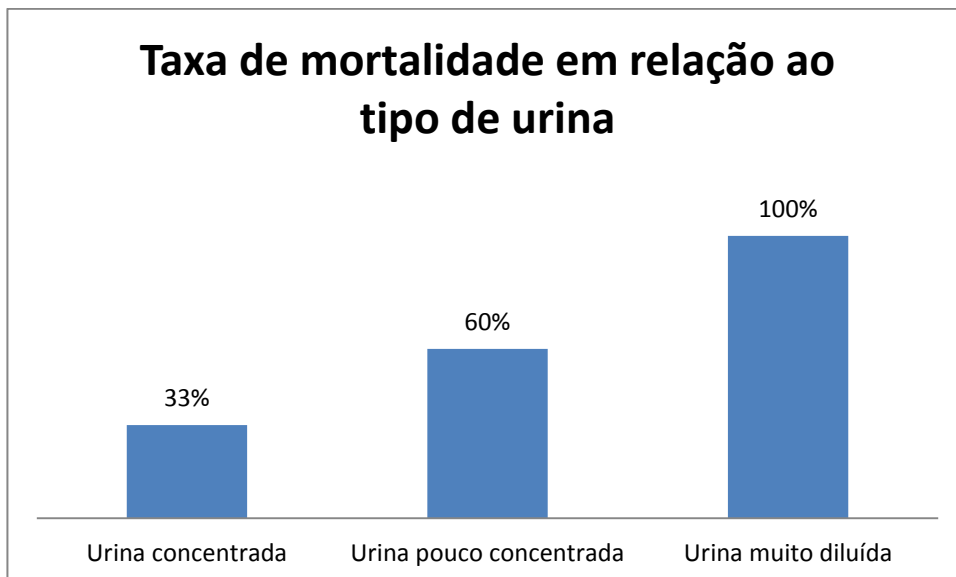


Figura 18: Relação entre a concentração da urina nos animais intoxicados por taninos e mortalidade.

Na Figura 18 pode-se observar o número de animais que apresentavam os diferentes tipos de urina, e o número de animais que morreram dentro de cada tipo de categoria.



*Figura 19:* Taxa de mortalidade apresentada pelos bovinos Intoxicados por Taninos em relação ao tipo de urina.

Como se pode observar na Figura 19, a taxa de mortalidade mais alta corresponde à da urina muito diluída, que foi de 100%. A percentagem de mortalidade de urina pouco concentrada foi de 60%, enquanto a de urina concentrada foi de 33%.



## 6. Discussão

A Intoxicação por Taninos teve uma prevalência consideravelmente mais elevada na exploração A, com 11%, seguida da exploração B, com 4% e por fim a exploração C com 2%. Apesar da prevalência ter sido maior na exploração A, é importante referir que esta foi a exploração onde os animais possuíram maior número de bolotas à sua disposição e durante um maior período de tempo.

A mortalidade total das três explorações onde ocorreu a Intoxicação por Taninos foi de 5% (n=23), o que revela ser um número bastante elevado, tendo em conta que a prevalência total da doença foi de 8% (n=35). Tal como no caso da prevalência, também na mortalidade a exploração A obteve o maior registo de mortes, tendo atingido os 7%.

A mortalidade em relação à morbilidade da doença é elevada, sendo que no total dos 35 animais afectados, 66% (n=23) morreram. Dentro deste parâmetro foi a exploração C que possuiu a menor taxa de mortalidade, com 50%, porém a amostragem desta exploração em termos de animais doentes era de apenas dois bovinos. A exploração A e B apresentaram uma relação entre morbilidade e mortalidade igual, em que 67% dos animais doentes acabaram por morrer.

Os resultados da necrópsia foram os esperados, confirmando as acções que os taninos causam no organismo e que já foram anteriormente descritas. O conteúdo do rúmen estava bastante pastoso, devido à formação dos complexos insolúveis que os taninos formam com as proteínas, descritos por Jean-Bain (1998). Uma vez que o rúmen dos quatro animais apresentavam uma quantidade muito elevada de bolotas, isto leva a questionar os mecanismos etiológicos de regulação do ritmo de ingestão e consumo combinado de outros compostos, apresentado por McArthur *et al.* (1991); Clauss *et al.* (2005); e Mlambo *et al.* (2007). No seguimento deste pensamento, um estudo apresentado por Waghorn *et al.* (1994) refere que uma diminuição na ingestão de taninos, ao causarem um atraso no esvaziamento do tracto gastrointestinal, poderá não ser válido para todos os casos. Como refere Dawson *et al.* (1999), foi observado que os taninos causam lesões no aparelho digestivo, como por exemplo abomasite, edema intestinal, enterite e formação de úlceras no jejuno e íleo. Como refere McLeod (1974), a intoxicação sistémica poderá ter sido causada pela absorção de tóxicos através da mucosa intestinal, visto que esta estava lesada. Os rins apresentavam-se bastante pálidos e edemaciados, possivelmente devido à isquémia e à necrose tubular

aguda. Nas quatro necrópsias efectuadas não foi observado qualquer tipo de líquidos como ascite ou hidrotórax, que foram referidos por Spier *et al.* (1987); Garg *et al.* (1992); e Frutos *et al.* (2005).

A Tabela 1 contém os valores das dez análises sanguíneas realizadas para quantificação do nível de ureia presente no sangue e como se pode verificar os valores são todos superiores ou iguais a 213.4 mg/dL. Estes níveis tão elevados de ureia podem explicar a desidratação, os tremores musculares, seguido de enrijecimento dos membros e podendo evoluir para tetania (Antonelli *et al.*, 2004). De todos os animais presentes na tabela, apenas os números 5 e 10, que possuíam os níveis de ureia inferiores a 300 mg/dL, sobreviveram.

Nesta tabela observamos também uma ampla janela de idades, pelo que podemos concluir que a intoxicação por taninos não tem predisposição quanto à idade. Quanto ao sexo dos indivíduos afectados, somente um é macho, porém na população em estudo só havia cinco machos.

Foram realizados cinco tratamentos diferentes e idealmente deveria ter sido sempre aplicado o tratamento E, nas vacas não gestantes, e o tratamento D nas vacas gestantes, visto que eram os tratamentos mais completos. Nas explorações B e C, foi possível fazer a administração do tratamento E em todas as vacas, porém na exploração A não foi possível, visto que havia muitas vacas afectadas e este tratamento é muito dispendioso. Quando os sintomas começaram a aparecer na exploração A, as primeiras vacas ainda foram tratadas com o tratamento D, contudo quando o número de vacas afectadas começou a subir exponencialmente, optou-se por efectuar o tratamento B, sempre que possível, e nas vacas que tivessem as fezes mais pastosas e escuras, efectuava-se o tratamento C. A todas as outras vacas era aplicado o tratamento A.

O tratamento com maior taxa de sucesso foi o A com 47%, mas tal como foi referido, este apenas foi aplicado às vacas que apresentavam uma sintomatologia mais ligeira. O tratamento E, o mais completo, foi o que obteve a segunda maior taxa de sucesso, de 40%, sendo que foi administrado a vacas que possuíam a sintomatologia mais severa, nomeadamente debilidade, anorexia, deambulação, anemia, desidratação, constipação, hipomotilidade e urina diluída.

O tipo de fezes que as vacas intoxicadas por taninos apresentam, como se pode observar na Figura 17 e 18, é bastante importante. Quando as vacas já apresentavam fezes do tipo sanguinolento, os tratamentos realizados foram

insuficientes, ou seja, 100% destas vacas morreram. Nestes casos de fezes sanguinolentas, os intestinos deveriam possuir bastantes úlceras, e a parede intestinal devia estar bastante friável, o que aumentava também a absorção de taninos pela mucosa, causando ainda mais sintomatologia sistêmica. Como refere McLeod (1974), os taninos condensados podem alterar gravemente o epitélio intestinal, permitindo a sua absorção, e desenvolvendo sintomatologia sistêmica semelhante à dos taninos hidrolisáveis. Este sinal clínico deve ser utilizado para fazer um prognóstico dos casos clínicos, visto ser um indicador da severidade da intoxicação.

Quanto à urina, ocorreu uma situação idêntica à das fezes, no grau três de urina, ou seja, quando esta era muito diluída, 100% das vacas morreram, pelo que os tratamentos nestes casos também foram insuficientes. Nestes casos em que a urina estava muito diluída, possivelmente a insuficiência renal conduziu à destruição da medula renal, o que incapacitou o rim de concentrar a urina. Esta situação confirma o que descreve Knight (1999), em que o mau prognóstico é muito mais comum em animais que exibam sinais clínicos muito evidentes e dano renal severo.

O tratamento com melhor taxa de sucesso consiste na administração Biorúmen®, Sulfato de Magnésio, Indigest® e Diurizone®, visto que dentro da mais diversa sintomatologia, foi o que obteve a maior taxa de sucesso. Em casos de sintomatologia ligeira de intoxicação por taninos, pode-se administrar somente Biorúmen®, que foi o que obteve a maior taxa de sucesso, mas aplicado apenas a animais com sinais clínicos ligeiros.

## 7. Conclusão

A intoxicação de bovinos por taninos é um fenómeno recorrente nas explorações de produção em extensivo, e pode ocorrer todos os anos, principalmente na altura da Primavera. Embora esta doença seja uma preocupação do dia-a-dia dos produtores, face ao impacto nocivo que pode gerar no negócio, existem poucos estudos disponíveis que abordem este tema, pelo que a apresentação desta dissertação se pode considerar como oportuna pois, por um lado, apela à consciência desta problemática e, por outro, actua como veículo de promoção de eventuais debates.

Esta doença afecta um elevado número de bovinos no território nacional, dado o facto de Portugal, ao integrar um número significativo de árvores do género *Quercus*, ser um país vulnerável ao aparecimento deste tipo de intoxicação, provocado pela ingestão de bolotas por parte destes animais.

Podemos concluir com este trabalho, que esta doença surge nos bovinos, independentemente do sexo ou da idade. De referir que todos os animais que apresentaram um nível de ureia no sangue superior a 300mg/dL, não sobreviveram à intoxicação. Igualmente as fezes sanguinolentas ou a urina muito diluída, foram por sinais clínicos relacionados com a morte dos animais.

Se analisarmos a mortalidade face à morbilidade, poderemos concluir que esta assume um peso muito relevante, assistindo-se a uma taxa superior a 33%, o que indicia de que se trata de uma doença grave que provoca uma necrose tubular aguda muito forte, além de afecções gastrointestinais, dada a frequência das suas manifestações.

Concluimos também, que o tratamento da doença, além de ser muito complexo, é igualmente dispendioso, e baseia-se sobretudo em minimizar a sintomatologia dos animais. De notar que o tratamento utilizado que registou a maior taxa de sucesso foi o tratamento à base de Biorúmen® (47%), porém este só foi aplicado em bovinos que apresentavam sinais clínicos mais ligeiros.

O tratamento considerado como sendo o mais completo, tinha como base a administração de Biorúmen®, Indigest®, Sulfato de Magnésio e Diurizone®, obteve a segunda maior taxa de sucesso (40%), tendo sido aplicado em bovinos que continham os mais diversos sinais clínicos.

## Bibliografia

AHARONI Y., GILBOA N., SILANIKOVE N., (1998). Models of suppressive effect of tannins. Analysis of the suppressive effect of tannins on ruminal degradation by compartmental models. *Anim Feed Sci Tech* 71, 251-267.

ALMEIDA, J. A. (1986). Influencia dos taninos de frutos de *Quercus ilex* L. e *quercus suber* L. sobre a fermentação retículo – ruminal e a digestão enzimática das proteínas. Tese de doutoramento. Universidade de Évora.

ANDREWS, A. H. (2008). *Medicina bovina: doenças e criação de bovinos*. 2. ed. São Paulo, SP: Roca, p. 831-833, 845.

ANTONELLI, A. C.; MORI, C. S.; SOARES, P. C.; KITAMURA, S. S.; ORTOLANI, E. L. (2004). Experimental ammonia poisoning in cattle fed extruded or prilled urea: clinical findings. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 67 – 74.

AUSTIN, P.J., SUCHAR, L.A., ROBBINS, C.T., HAGERMAN, A.E. (1989). Tannin-binding proteins in saliva of deer and their absence in saliva of sheep and cattle. *Journal of Chemical Ecology*, 15: 1335-1347.

BAE H.D., McALLISTER T.A., YANKE J., CHENG K.J., MUIR A.D. (1993). Effects of condensed tannins on endoglucanase activity and filter paper digestion by *Fibrobacter succinogenes* S85. *Appl Environ Microb* 59, 2132-2138.

BARMAN, K., RAI, S.N. (2008). In vitro nutrient digestibility, gas production and tannin metabolites of *Acacia nilotica* pods in goats. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 21: 59-65.

BARRY T.N., DUNCAN S.J. (1984). The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 1. Voluntary intake. *Brit J Nutr* 51, 485-491.

BARRY T.N., MANLEY T.R. (1984). The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 2. Quantitative digestion of carbohydrates and proteins. *Brit J Nutr* 51, 493-504.

BARRY, T.N.; MCNABB, W.C (1999). The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. *Brith. J. Nutr.* , v. 81, p.263-272.

BARTOLOMÉ, B., JIMÉNEZ-RAMSEY, L.M., BUTLER, L.G. (1995). Nature of the condensed tannins present in the dietary fibre fractions in foods. *Food Chemistry, Barking*, v.53, n.4, p.357-362.

BATE-SMITH, E. C. (1973). Haemanalysis of Tannins: The Concept of Relative Astringency. *Phytochemistry*, 12, 907.

BATE-SMITH, E.C., SWAIN, T. (1989). Plant polyphenols: vegetable tannins revisited. In: *Chemistry and Pharmacology of Natural Products*, p. 9. (Eds.: Phillipson, J.D., Ayres, D.C.). Cambridge University Press, Cambridge (Reino Unido).

BEELEN, P. M. G., BERCHIELLI, T. T., BEELEN, R., MEDEIROS, A. N (2006). Influence of condensed tannins from Brazilian semi-aride legumes on ruminal degradability, microbial colonization and enzymatic activity. *Small Ruminant Research*, v. 61, n. 1, p. 35-44.

BEN SALEM, H., BEN SALEM, I., NEFZAOU, A., BEN SAÏD, M.S. (2003). Effect of PEG and olive cake feed blocks supply on feed intake, digestion, and health of goats given kermes oak (*Quercus coccifera* L.) foliage. *Animal Feed Science and Technology*, 110: 45-59.

BENTO, M.H.L., ACAMOVIC, T., MAKKAR, H.P.S. (2005). The influence of tannin, pectin and polyethylene glycol on attachment of 15N-labelled rumen microorganisms to cellulose. *Animal Feed Science and Technology*, 122: 41-57.

BERNAYS, E.A., DRIVER, G.C., BILGENER, M. (1989). Herbivores and plant tannins. *Advances in Ecological Research*, 19: 263-302.

BHAT, T.K., SINGH, B., SHARMA, O.P. (1998). Microbial degradation of tannins. A current perspective. *Biodegradation*, 9: 343-357.

BLAKLEY, B.R. (2005). *Quercus* poisoning. In: *The Merck Veterinary Manual*. <http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/212900.htm>.

BLYTT H.J., GUSCAR T.K., BUTLER L.G. (1988). Antinutritional effects and ecological significance of dietary condensed tannins may not be due to binding and inhibiting digestive enzymes. *J Chem Ecol* 14, 1455-1465.

BRESSANI, R., ELÍAS, L.G., BRAHAM, J.E. (1982). Reduction of digestibility of legume proteins by tannins. *Journal of Plant Foods*, London, v.4, n.1, p.43-55.

BRUYNE, T.D., PIETERS, L., DEELSTRA, H., VLIETINCK, A. (1999). Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematics and Ecology*, 27: 445-459.

BURRIT, E.A., MALECHEK, J.C., PROVENZA, F.D. (1987). Changes in concentrations of tannins, total phenolics, crude protein, and *in vitro* digestibility of browse due to mastication and insalivation by cattle. *Journal of Range Management*, 40: 409-411.

CANNAS, A. Tannin main page. Cornell, 2001. Disponível em: <<http://www.sheepgoatmarketing.org/plants/toxicagents/tannin>>.

CARLSON, D.M. (1993). Salivary proline-rich proteins: biochemistry, molecular biology, and regulation of expression. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 4: 495-502.

CHIQUELLE J., CHENG K.J., COSTERTON J.W., MILLIGAN L.P. (1988). Effect of tannins on the digestibility of two isosynthetic strains of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) using *in vitro* and *in sacco* techniques. *Can J Anim Sci* 68, 751-760.

CLAUSS, M., GEHRKE, J., HATT, J.M., DIERENFELD, E.S., FLACH, E.J., HERMES, R., CASTELL, J., STREICH, W.J., FICKEL, J. (2005). Tannin-binding salivary proteins in three captive rhinoceros species. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 140: 67-72.

COOPER-DRIVER, G., FINCH, S., SWAIN, T. (1977). Seasonal variation in secondary plant compounds in relation to the palatability of *Pteridium aquilinum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 5: 177-183.

DAWSON, J.M., BUTTERY, P.J., JENKINS, D., WOOD, C.D., GILL, M. (1999). Effects of dietary quebracho tannin on nutrient utilisation and tissue

metabolism in sheep and rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79: 1423-1430.

DESCHAMPS, A.M., LEBEAULT, J.M. (1984). Production of gallic acid from tara tannin by bacterial strains. *Biotechnology Letters*, 6: 237-242.

DESHPANDE , S.S., CHERYAN, M., SALUNKHE, D.K. (1986). Tannin analysis of food products. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Boca Raton, v.24, n.4, p.401-449.

FAETH, S.H. (1986). Indirect interactions between temporally separated herbivores mediated by the host plant. *Ecology*, 67: 479-494.

FEENY, P.P., BOSTOCK, H. (1968). Seasonal changes in the tannin content of oak leaves. *Phytochemistry*, 7: 871-880.

FRUTOS P., HERVÁS G., GIRÁLDEZ F.J., FERNÁNDEZ M., MANTECÓN A.R. (2000). Digestive utilization of quebra- cho-treated soya bean meal in sheep. *J Agr Sci* 134, 101-108.

FRUTOS, P., HERVÁS, G., GIRÁLDEZ, F.J., MANTECÓN, A.R. (2004a). Review: tannins and ruminant nutrition. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2: 191-202.

FRUTOS, P., HERVÁS, G., GIRÁLDEZ, F.J., MANTECÓN, A.R. (2004b). An in vitro study on the ability of polyethylene glycol to inhibit the effect of quebracho tannins and tannic acid on rumen fermentation in sheep, goats, cows, and deer. *Australian Journal of Agricultural Research*, 55: 1125-1132.

FRUTOS, P., PÉREZ, V., BENAVIDES, J., MANTECÓN, A.R. (2005). Intoxicación del ganado vacuno por consumo de bellotas. *Albéitar*, 86: 42-44.

GARG, S.K., MAKKAR, H.P.S., NAGAL, K.B., SHARMA, S.K., WADHWA, D.R. (1992). Oak (*Quercus incana*) leaf poisoning in cattle. *Veterinary and Human Toxicology*, 34: 161- 164.

GETACHEW, G., PITTROFF, W., PUTNAM, D.H., DANDEKAR, A., GOYAL, S., DEPETERS, E.J. (2008). The influence of addition of gallic acid, tannic acid, or quebracho tannins to alfalfa hay on in vitro rumen fermentation and microbial protein synthesis. *Animal Feed Science and Technology*, 140: 444-461.



GINER-CHAVES, B. I. (1996). Condensed tannins in tropical forages. Tese (Doutorado em Filosofia) - Cornell University, Ithaca, 1996.

GOLDSTEIN, J.L.; SWAIN, T. (1965). The Inhibition of Enzymes by Tannins. *Phytochemistry*, 4, 185.

HAGERMAN A.E., BUTLER L.G. (1991). Tannins and lignins. In: *Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites, Vol I: The chemical participants*, (Rosenthal G.A. and Berenbaum M.R., eds.), Academic Press, NY (USA), pp. 355-388.

HAGERMAN A.E., ROBBINS C.T., WEERASURIYA Y., WILSON T.C., McARTHUR C. (1992). Tannin chemistry in relation to digestion. *J Range Manage* 45, 57-62.

HASLAM, E. (1977). Symmetry and Promiscuity in Proanthocyanidin Biochemistry. *Phytochemistry*, 16, 1625

HERNES, P.J., HEDGES, J.I. (2004). Tannin signatures of barks, needles, leaves, cones, and wood at the molecular level. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 68: 1293-1307.

HERVÁS G., FRUTOS P., SERRANO E., MANTECÓN A.R., GIRÁLDEZ F.J. (2000). Effect of tannic acid on rumen degradation and intestinal digestion of treated soya bean meals in sheep. *J Agr Sci* 135, 305-310.

HERVÁS, G., FRUTOS, P., GIRÁLDEZ, F.J., MANTECÓN, A.R., ÁLVAREZ DEL PINO, M.C. (2003a). Effect of different doses of quebracho tannins extract on rumen fermentation in ewes. *Animal Feed Science and Technology*, 109: 65-78.

HERVÁS, G., PÉREZ, V., GIRÁLDEZ, F.J., MANTECÓN, A.R., ALMAR, M.M., FRUTOS, P. (2003b). Intoxication of sheep with quebracho tannin extract. *Journal of Comparative Pathology*, 129: 44-54.

ILLIUS, A.W., JESSOP, N.S. (1996). Metabolic constraints on voluntary intake in ruminants. *Journal of Animal Science*, 74: 3052-3062.

JEAN-BAIN, C. (1998). Aspects nutritionnels et toxicologiques des tanins. *Revue Méd. Vet.*, v. 149, n. 10, p. 911- 920.

JONES G.A., McALLISTER T.A., MUIR A.D., CHENG K.J. (1994). Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. *Appl Environ Microb* 60, 1374-1378.

JONES, E.T.; MANGAN, J.L. (1977). Complexes of the Condensed Tannins of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) With Fraction I Leaf Protein and with Submaxillary Mucoprotein and Reversal by Polyethylene Glycol and pH. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 28, 126.

KNIGHT, A.P. (1999). Guide to Poisonous Plants. [http://southcampus.colostate.edu/poisonous\\_plants/index.cfm?countno=NO](http://southcampus.colostate.edu/poisonous_plants/index.cfm?countno=NO)

KRAUSE, D.O., SMITH, W.J.M., BROOKER, J.D., MCSWEENEY, C.S. (2005). Tolerance mechanisms of streptococci to hydrolysable and condensed tannins. *Animal Feed Science and Technology*, 121: 59-75.

KRAUSE, D.O., SMITH, W.J.M., MCSWEENEY, C.S. (2004). Use of community genome arrays (CGAs) to assess the effects of *Acacia angustissima* on rumen ecology. *Microbiology*, 150: 2899-2909.

KUMAR, R., SINGH, M. (1984). Tannins: their adverse role in ruminant nutrition. *J. Agric. Food. Chem.*, v. 32, n. 3, p. 447-453.

LEINMÜLLER E., STEINGASS H., MENKE K.H. (1991). Tannins in ruminant feedstuffs. *Biannual Collection of Recent German Contributions Concerning Development through Animal Research* 33, 9-62.

MAKKAR H.P.S., BLÜMMEL M., BECKER K. (1995). Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycol and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in *in vitro* techniques. *Brit J Nutr* 73, 897-913.

MAKKAR H.P.S., SINGH B., DAWRA R.K. (1988). Effect of tannin-rich oak (*Quercus incana*) on various microbial enzyme activities of the bovine rumen. *Brit J Nutr* 60, 287-296.

MAKKAR, H.P.S. (2003). Effect and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research*, v.49, p.241-256.

MAKKAR, H.P.S., BECKER, K. (1998). Adaptation of cattle to tannins: role of proline-rich proteins in oak-fed cattle. *Animal Science*, 67: 277-281.

MANGAN J.L. (1988). Nutritional effects of tannins in animal feeds. *Nutr Res Rev* 1, 209-231.

MARTÍNEZ, T.F., MOYANO, F.J. (2003). Effect of Tannic Acid on In Vitro Enzymatic Hydrolysis of Some Protein Sources. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 456.

MARTÍNEZ, T.F., MOYANO, F.J., DÍAZ, M., BARROSO, F.G., ALARCÓN, F.J. (2005). Use of tannic acid to protect barley meal against ruminal degradation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 1371-1378.

MAUFFETTE, Y., OECHEL, W.C. (1989). Seasonal variation in leaf chemistry of the coast live oak *Quercus agrifolia* and implications for the California oak moth *Phryganidia californica*. *Oecologia*, 79: 439-445.

MAZZUCHELLI, F., GONZÁLEZ, M., BANCO, J. (2000). Intoxicación por taninos en bovinos explotados en extensivo: discusión de un caso clínico. *Producción Animal*, 160: 87- 115.

MCALLISTER T.A., BAE H.D., JONES G.A., CHENG K.J. (1994). Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *J Anim Sci* 72, 3004-3018.

MCARTHUR, C., HAGERMAN, A., ROBBINS, C.T. (1991). Physiological strategies of mammalian herbivores against plant defenses. In: *Plant Defences against Mammalian Herbivory*, pp. 103-114. (Eds.: Palo, R.T., Robbins, C.T.). CRC Press, Florida (Estados Unidos).

MCLEOD M.N. (1974). Plant tannins - Their role in forage quality. *Nutrition Abstracts and Reviews*, 44: 803-815.

MCNABB W.C., PETERS J.S., FOO L.Y., WAGHORN G.C., JACKSON S.J. (1998). Effect of condensed tannins prepared from several forages on the in vitro precipitation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (rubisco) protein and its digestion by trypsin (EC 2.4.21.4) and chymotrypsin (EC 2.4.21.1). *J Sci Food Agric* 77, 201-212.

MCSWEENEY C.S., PALMER B., McNEILL D.M., KRAUSE D.O. (2001). Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Anim Feed Sci Tech* 91, 83-93.

MCSWEENEY, C.S., KENNEDY, P.M., JOHN, A. (1988). Effect of ingestion of hydrolysable tannins in *Terminalia oblongata* on digestion in sheep fed *Stylosanthes hamata*. *Australian Journal of Agricultural Research*, 39: 235-244.

MCSWEENEY, C.S., PALMER, B., BUNCH, R., KRAUSE, D.O. (2001). Effect of the tropical forage *Calliandra* on microbial protein synthesis and ecology in the rumen. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 78-88.

MEHANSHO H., BUTLER L.G., CARLSON D.M. (1987). Dietary tannins and salivary proline-rich proteins: interactions, induction and defence mechanisms. *Annu Rev Nutr* 7, 423-440.

MLAMBO, V., SIKOSANA, J.L.N., MOULD, F.L., SMITH, T., OWEN, E., MUELLER-HARVEY, I. (2007). The effectiveness of adapted rumen fluid versus PEG to ferment tannin- containing substrates in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, 136: 128-136.

MOLE S., WATERMAN P.G. (1987). Tannic acid and proteolytic enzymes: enzyme inhibition or substrate deprivation? *Phytochemistry* 26, 99-102.

MOLE, S., BUTLER, L.G., IASON, G. (1990). Defense against tannin in herbivores: a survey for proline rich salivary proteins in mammals. *Biochemical Systematics and Ecology*, 18: 287-293.

MUELLER-HARVEY I. (1999). Tannins: their nature and biological significance. In: *Secondary plants products. Antinutritional and beneficial actions in animal feeding* (Caygill J.C. and Mueller-Harvey I., eds.). Nottingham Univ Press (UK), pp. 17-70.

MUELLER-HARVEY I., MCALLAN A.B. (1992). Tannins. Their biochemistry and nutritional properties. In: *Advances in plant cell biochemistry and biotechnology*, Vol. 1 (Morrison I.M., ed.). JAI Press Ltd., London (UK), pp. 151-217.

MUTABARUKA, R., HAIRIAH, K., CADISCH, G. (2007). Microbial degradation of hydrolysable and condensed tannin polyphenols-protein complexes in soils from different land-use histories. *Soil Biology and Biochemistry*, 39: 1479-1492.

NARJISSE, H., ELHONSALI, M.A., OLSEN, J.D. (1995). Effects of oak (*Quercus ilex*) tannins on digestion and nitrogen balance in sheep and goats. *Small Ruminant Research*, 18: 201-206.

NELSON, K. E.; PELL, A. N.; DOANE, P. H. et al. (1997). Chemical and biological assays to evaluate bacterial inhibition by tannins. *J. Chem. Ecol.*, v. 23, n. 4, p. 1175-1194.

NELSON, K.E., THONNEY, M.L., WOOLSTON, T.K., ZINDER, S.H., PELL, A.N. (1998). Phenotypic and phylogenetic characterization of ruminal tannin-tolerant bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3824-3830.

NESER, J.A., COETZER, J.A., BOOMKER, J., CABLE, H. (1982). Oak (*Quercus rubor*) poisoning in cattle. *Journal of the South African Veterinary Association*, 53: 151-155.

NICHOLSON, K., BUTLER, L.G., ASQUITH, T.N. (1986). Glycoproteins from *Colletotrichum graminicola* that bind phenols: implications for survival and virulence of phytopathogenic fungi. *Phytopathology*, 76: 1315-1318.

O'DONOVAN, L., BROOKER, J.D. (2001). Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of *Streptococcus gallolyticus* (*S. caprinus*) and *Streptococcus bovis*. *Mycrobiology*, 147: 1025-1033.

ODENYO, A.A., BISHOP, R., ASEFA, G., JAMNADASS, R., ODONGO, D., OSUJI, P. (2001). Characterization of tannin-tolerant bacterial isolates from east African ruminants. *Anaerobe*, 7: 5-15.

ODENYO, A.A., MCSWEENEY, C.S., PALMER, B., NEGASSA, D., OSUJI, P.O. (1999). *In vitro* screening of rumen fluid samples from indigenous African ruminants provides evidence for rumen fluid with superior capacities to digest tannin-rich fodders. *Australian Journal of Agricultural Research*, 50: 1147-1157.

OSTROWSKI, S.R., SMITH, B.P., SPIER, S.J., NORMAN, B.B., OLIVER, M.N. (1989). Compensatory weight gain in steers recovered from oak bud toxicosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 195: 481-484.

PENG, S., SCALBERT, A., MONTIES, B. (1991). Insoluble ellagitannins in *Castanea sativa* and *Quercus petraea* woods. *Phytochemistry*, 30: 775-778.

PEREZ-MALDONADO, R.A., NORTON, B.W., KERVEN, G.L. (1995). Factors Affecting In Vitro Formation of Tannin–Protein Complexes. *Journal of Science Food Agriculture*, 69,291

PLUMLEE, K.H., JOHNSON, B., GALEY, F.D. (1998). Comparison of disease in calves dosed orally with oak or commercial tannic acid. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 10: 263-267.

POURJAFAR, M., DERAKHSHANFAR, A., TALEBANFARD, H. (2003). Histopathological, hematobiochemical and urinalysis changes in experimental oak (*Quercus brantii*) poisoning in sheep. *Toxicology Letters*, 144: 70.

PRICE, M.L.; BUTLER, L.G. (1980). Tannins and Nutrition. Station bulletin n°272. Department of Biochememistry, Agricultural Experiment Station, Purdue University, West Lafayette, Indiana, USA.

PROVENZA, F.D. (1995). Postingestive feedback as an elementary determinant of food preference and intake in ruminants. *Journal of Range Management*, 48: 2-17.

PROVENZA, F.D., MALECHEK, J.C. (1984). Diet selection by domestic goats in relation to blackbrush twig chemistry. *Journal of Applied Ecology*, 21: 831-841.

RAO, B.S.N., PRABHAVATHI, T. (1982). Tannin content of foods commonly consumed in India and its influence on ionisable iron. *Journal of the Science of Food Agriculture*, London, v. 33, n. 1, p. 89-96.

REVIGLIO, I.I., *et al* (2004). Consumo de forragem e desempenho de bovinos de corte em pastos de capim-Marandu submetidos a regimes de lotação continua. In 12 Simpósio Internacional de Iniciação Científica de USP.

RIIPI, M., OSSIPOV, V., LEMPA, K., HAUKIOJA, E., KORICHEVA, J., OSSIPOVA, S., PIHLAJA, K. (2002). Seasonal changes in birch leaf chemistry: are there trade-offs between leaf growth and accumulation of phenolics? *Oecologia*, 130: 380-390.

ROSSITER, M.C., SCHULTZ, J.C., BALDWIN, I.T. (1988). Relationships among defoliation, red oak phenolics, and gypsy moth growth and reproduction. *Ecology*, 69: 267-277.

- RUSSELL, A. (1935). The natural tannins. *Chemical Reviews*, 17: 155-186.
- SALMINEN, J.P., ROSLIN, T., KARONEN, M., SINKKONEN, J., PIHLAJA, K., PULKKINEN, P. (2004). Seasonal variation in the content of hydrolyzable tannins, flavonoid glycosides and proanthocyanidins in oak leaves. *Journal of Chemical Ecology*, 30: 1693-1771.
- SALUNKHE, D.K., CHAVAN, J.K., KADAM, S.S. (1990). Dietary tannins: consequences and remedies. 200p.
- SANDERSON, S.L. (2005). Urinary system. In: *The Merck Veterinary Manual*. <http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/130100.htm>.
- SANDUSKY, G.E., FOSNAUGH, C.J., SMITH, J.B., MOHAN, R. (1977). Oak poisoning of cattle in Ohio. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 171: 627-629.
- SCALBERT A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30, 3875-3883.
- SCHOFIELD P., MBUGUA D.M., PELL A.N. (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Anim Feed Sci Tech* 91, 21-40.
- SCHOONHOVEN, L.M., VAN LOON, J.J.A., DICKE, M. (2006). Plant chemistry: endless variety. In: *Insect-Plant Biology*, pp. 48-57. Oxford University Press, New York (Estados Unidos).
- SGARBIERI, V.C. (1996). Proteínas em alimentos protéicos: propriedades - degradações - modificações. São Paulo : Varela. Cap. 5: Deterioração e modificações químicas, físicas e enzimáticas de proteínas.
- SHAW, R.A., VILLALBA, J.J., PROVENZA, F.D. (2006). Resource availability and quality influence patterns of diet mixing by sheep. *Journal of Chemical Ecology*, 32: 1267- 1278.
- SHIMADA, T. (2006). Salivary proteins as a defense against dietary tannins. *Journal of Chemical Ecology*, 32: 1149-1163.
- SIEGENBERG, D., BAYNES, R.D., BOTHWELL, T.H., MACFARLANE, B.J., LAMPARELLI, R.D., CAR, N.G., MACPHAIL, P., SCHMIDT, U., TAL, A., MAYET, F. (1991). Ascorbic acid prevents the dose- dependent inhibitory effects of

polyphenols and phytates on nonheme-iron absorption. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v.53, n.1-2, p.537-541.

SILANIKOVE N., NITSAN Z., PEREVOLOTSKY A. (1994). Effect of a daily supplementation of polyethylene glycol on intake and digestion of tannin-containing leaves (*Ce- ratoria siliqua*) by sheep. *J Agr Food Chem* 42, 2844-2847.

SILANIKOVE N., PEREVOLOTSKY A., PROVENZA, F.D. (2001). Use of tannin-binding chemicals to assay for tan- nins and their negative postingestive effects in ruminants. *Anim Feed Sci Technol* 91, 69-81.

SINGLETON, V.L. (1981). Naturally occurring food toxicants: phenolic substances of plant origin common in food. *Advances in Food Research*, New York, v.27, p.149- 242.

SINGLETON, V.L., KRATZER, F.H. (1973). Plant phenolics. In: NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. Toxicants occurring naturally in foods. Washington. p.309-345.

ŚLIWIŃSKI, B.J., SOLIVA, C.R., MACHMÜLLER, A., KREUZER, M. (2002). Efficacy of plant extracts rich in secondary constituents to modify rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 101: 101-114.

SPIER, S.J., SMITH, B.P., SEAWRIGHT, A.A., NORMAN, B.B., OSTROWSKI, S.R., OLIVER, M.N. (1987). Oak toxicosis in cattle in northern California: clinical and pathologic findings. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 191: 958-964.

SMITH, B.P. (2008) *Large Animal Internal Medicine* 4th Edition Mosby, 874-876.

SWAIN, T. (1979). Tannins and lignins. In: *Herbivore. Their Interaction with Secondary Plant Metabolites*, pp. 657-682. (Eds.: Rosenthal, G.A., Janzen, D.H.). Academic Press, New York (Estados Unidos).

TAMIR, M.; ALUMOT, E. (1969). Inhibition of Enzymes by Condensed Tannins from Green and Ripe Carobs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 20, 199.

TAYLER, J.C. (1959). A relationship between weight of internal fat, "fill", and the herbage intake of grazing cattle. *Nature*, 184: 2021-2022.



TIKKANEN, O.P., JULKUNEN-TIITTO, R. (2003). Phenological variation as protection against defoliating insects: the case of *Quercus robur* and *Operophtera brumata*. *Oecologia*, 136: 244-251.

VAN SOEST P.J. (1994). *Nutritional ecology of the ruminant*, 2nd ed. Cornell Univ Press. Ithaca, NY, USA. 476 p

VAN SUMERE, C.F.; ALBRECHT, J.; DEDONDER, A.; De POOTER, H.; PE, I. (1975). *Plant Proteins and Phenolics*. In: *The Chemistry and Biochemistry of Plant Proteins*. Eds: J.B. Harborne; C.F. Van Sumere. Academic Press, New York.

VILLALBA, J.J., PROVENZA, F.D. (1999). Effects of food structure and nutritional quality and animal nutritional state on intake behaviour and food preferences of sheep. *Applied Animal Behaviour Science*, 63: 145-163.

VILLALBA, J.J., PROVENZA, F.D., SHAW, R. (2006). Initial conditions and temporal delays influence preference for foods high in tannins and for foraging locations with and without foods high in tannins by sheep. *Applied Animal Behaviour Science*, 97: 190- 205.

WAGHORN G.C., SHELTON I.D., McNABB W.C. (1994). Effects of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on its nutritive value for sheep. 1. Non-nitrogenous aspects. *J Agr Sci* 123, 99-107.

WANG Y., WAGHORN G.C., DOUGLAS G.B., BARRY T.N., WILSON G.F. (1994). The effects of the condensed tannin in *Lotus corniculatus* upon nutrient metabolism and upon body and wool growth in grazing sheep. *Proc N Z Soc Anim Prod* 54, 219-222.

WINA, E., TANGENDAJA, B., SUSANA, I.W.R. (2005). Effects of chopping, and soaking in water, hydrochloric acidic and calcium hydroxide solutions on the nutritional value of *Acacia villosa* for goats. *Animal Feed Science and Technology*, 122: 79-92.

WIRYAWAN, K.G., TANGENDAJA, B., SURYAHADI, I. (2000). Tannin degrading bacteria from Indonesian ruminants. In: *Tannins in Livestock and Human Nutrition: Proceedings of an International Workshop*, Adelaide, Australia. ACIAR Proceedings No 92, pp. 123- 126. (Ed.: Brooker, J.D.). Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR), Adelaide (Australia).

YANAGIDA, A., SHOJI, T., KANDA, T. (2002). Characterization of polymerized polyphenols by size-exclusion HPLC. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66: 1972-1975.

ZHU, J., FILIPPICH, L.J., NG, J. (1995). Rumen involvement in sheep tannic acid metabolism. *Veterinary and Human Toxicology*, 37: 436-440.