

AUGUSTO JOAQUIM DE CARVALHO LANÇA

**ESTUDO DO VALOR ALIMENTAR DA TREMOCILHA
BRAVA (*Lupinus luteus* L.), EM OVINOS, E DO SEU
EFEITO SOBRE A COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO
LEITE E QUALIDADE DO QUEIJO DE SERPA**

Dissertação apresentada à Universidade de Évora, para obtenção do grau de

Doutor em Ciências Agrárias

ÉVORA

1999

AUGUSTO JOAQUIM DE CARVALHO LANÇA

**ESTUDO DO VALOR ALIMENTAR DA TREMOCILHA
BRAVA (*Lupinus luteus* L.), EM OVINOS, E DO SEU
EFEITO SOBRE A COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO
LEITE E QUALIDADE DO QUEIJO DE SERPA**

Dissertação apresentada à Universidade de Évora, para obtenção do grau de

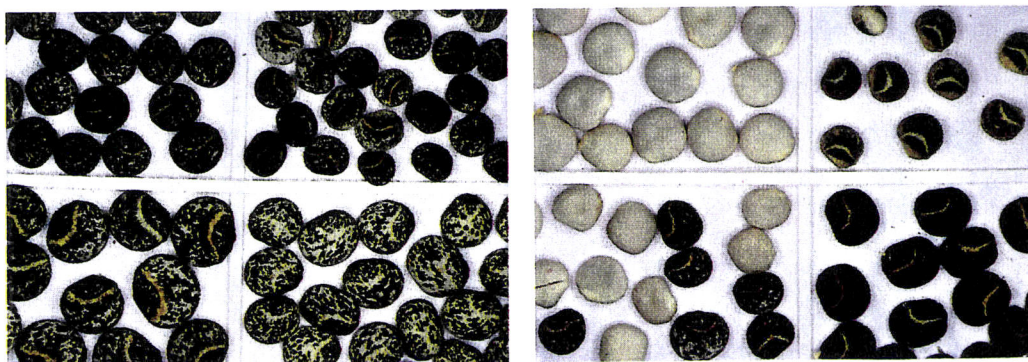
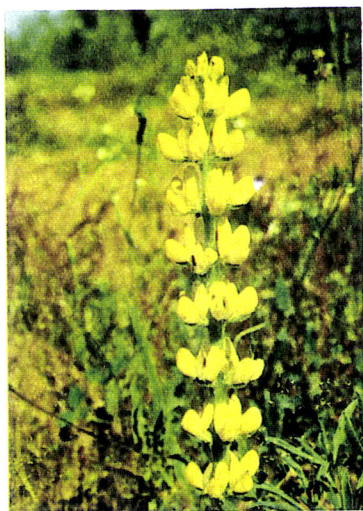
Doutor em Ciências Agrárias



120 868

ÉVORA

1999



"Não são necessários nem grande arrojado de phantasia nem genio de calculo para imaginar que preciosa mina a lavoura alemtejana tem a explorar na cultura do tremoceiro. Realisa uma economia formidavel, e ao mesmo tempo organisa-se, entendendo por organização a circulação conveniente dos elementos em jogo, de modo a havel-os a tempo e horas e em quantidade bastante, sem quebra da fertilidade primitiva, antes elevando-a de colheita para colheita."

"A Cultura Economica do Trigo"- José M. Tavares da Silva -Empreza Typographica
Eborensis - Évora, 1906.

AGRADECIMENTOS

O autor agradece a todos os que o apoiaram e tornaram possível a realização deste trabalho, muito particularmente:

Ao Doutor João Manuel Carvalho Ramalho Ribeiro, Chefe do Departamento de Nutrição e Alimentação Animais da Estação Zootécnica Nacional, por se ter prestado, com dedicação e empenho, a ser nosso orientador e pelas amplas facilidades concedidas na utilização do equipamento daquele departamento.

Ao Professor Doutor Apolinário Vaz Portugal, Director da Estação Zootécnica Nacional, por nos ter posto à disposição todos os meios existentes na instituição que dirige.

Ao Doutor Gourlay Young do Amaral, à Dra. Maria Armanda Silva de Almeida, à Doutora Olga Mafalda Salvador Conde Moreira, à Eng. Maria Teresa Paes Vacas de Carvalho Ponce Dentinho e ao Dr. Rui José Branquinho de Bessa, do Departamento de Nutrição e Alimentação Animais da EZN, não só pelo apoio científico mas também moral, concedido nos momentos de maiores dificuldades.

Ao Doutor Carlos Carmona Belo, pelas facilidades concedidas no Departamento de Ovinos da EZN e pelas sugestões que dispensou durante o nosso trabalho naquele departamento.

Ao Professor Doutor Maciej Wiewiórowski, do Instituto de Química Bio-orgânica de Poznan, Polónia, à Professora Doutora Beata Kosiot, da Faculdade de Química da Universidade Adam Mickiewicz, Poznan, Polónia e à Doutora Mercedes Muzquiz, do Instituto Nacional de Investigação Agrária de Espanha, por nos terem auxiliado, apesar da

distância, quer com a sua opinião quer com o envio de reagentes, sem os quais a maior parte deste trabalho não teria sido efectuado.

À Professora Doutora Maria Elvira Baptista, do Departamento de Zootecnia da Universidade de Évora, pela revisão da componente estatística do nosso trabalho.

Ao Dr. João de Brito Fialho, por ter colocado à nossa disposição a rouparia da Herdade da Abóboda, em Vila Nova de S.Bento.

Ao Eng. João da Silva Boavida Canada e aos restantes membros do Painei de Provadores do Queijo de Serpa pela amabilidade com que acederam a prestar a sua colaboração.

Aos funcionários da Estação Zootécnica Nacional, na pessoa da sua decana, D. Maria Fernanda Ferreira dos Santos Vaz, pela inextinguível simpatia e espírito de ajuda com que quotidianamente nos acolheram ao longo de 4 anos de trabalho.

Este trabalho foi financiado pela Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica através dos programas CIÊNCIA (BD/1683/91-IE) e PRAXIS XXI (BD/3726/94). Aos responsáveis por esta instituição o nosso muito obrigado.

ABREVIATURAS

ADF	- <i>Acid Detergent Fiber</i> (Fibra Insolúvel em Detergente Ácido)
ADL	- <i>Acid Detergent Lignin</i> (Lenhina no Resíduo de ADF)
ALC	- Alcalóides
BS	- Bagaço de Soja
CEL.	- Celulose
CM	- Coeficiente de Maturação
CMV	- Concentrado de Minerais e Vitaminas
D	- Digestibilidade da Matéria Orgânica em Relação à Matéria Seca
DADF	- Digestibilidade do ADF
DFB	- Digestibilidade da Fibra Bruta
DL	- Dose Letal
DMO	- Digestibilidade da Matéria Orgânica
DMS	- Digestibilidade da Matéria Seca
DNDF	- Digestibilidade do NDF
DP	- Desvio Padrão
DPB	- Digestibilidade da Proteína Bruta
EE	- Extracto Etéreo
EM	- Energia Metabolizável
EPM	- Erro Padrão da Média
HEM	- Hemicelulose
HCS	- Hidratos de Carbono Solúveis
HRQIMG	- Humidade Referida ao Queijo Isento de Matéria Gorda
LH	- Hormona Luteinizante
MGRRS	- Matéria Gorda Referida ao Resíduo Seco
MS	- Matéria Seca
N	- azoto

NDF	- <i>Neutral Detergent Fiber</i> (Fibra Insolúvel em Detergente Neutro)
PB	- Proteína Bruta
pH	- Potencial Hidrogeniônico
pKa	- Potencial de Ionização Ácida
PV	- Peso Vivo
T	- Tremoço
TB	- Tremocilha Brava
TFE	- Tremoço-de-Folhas-Estreitas
ufc	- Unidades Formadoras de Colónias

RESUMO

ESTUDO DO VALOR ALIMENTAR DA TREMOCILHA BRAVA (*Lupinus luteus* L.), EM OVINOS, E DO SEU EFEITO SOBRE A COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO LEITE E QUALIDADE DO QUEIJO DE SERPA

Augusto Joaquim de Carvalho Lança

O objectivo deste trabalho foi averiguar se o sabor amargo e as propriedades anti-microbianas dos alcalóides da tremocilha brava afectavam a ingestão e utilização digestiva da dieta, a composição química do leite e a qualidade do queijo de ovelha. Numa 1ª experiência comparou-se um suplemento de tremocilha brava (TB) (1,0% alcalóides) com suplementos constituídos por variedades doces de tremoço (T) e tremoço-de-folhas-estreitas (TFE), e com um suplemento testemunha de bagaço de soja (BS). Esta suplementação foi fornecida aos animais com feno de baixa qualidade e de modo a manter as dietas isoazotadas. Quer a ingestão de MS total (g/KgPV^{0,75}) quer a DNDf e DPB das 4 dietas não diferiram significativamente entre si. A DMO da dieta TB (72,0%), não diferiu significativamente ($P>0,05$) das apresentadas pelas dietas BS (70,5%) e T (74,2%) mas foi inferior à da dieta TFE (77,5%), a que continha maior proporção de concentrado. Também a DADF da dieta TB (66,4%) não diferiu significativamente das determinadas nas dietas BS (61,0%) e T (69,6%) mas foi inferior à da dieta TFE (74,4%). Tanto os valores do balanço azotado de cada dieta como os coeficientes de digestibilidade dos suplementos não mostraram diferenças significativas.

Numa 2ª experiência estudou-se o efeito dos alcalóides da TB sobre a actividade microbiana do líquido ruminal ovino incubado *in vitro*. Num primeiro conjunto de incubações submeteu-se o líquido ruminal a 6 concentrações crescentes de esparteína (0, 1, 2, 3, 4 e 5 mM). Ao fim de 24h de incubação, os líquidos ruminais sem esparteína produziram significativamente mais gás (603 ml) ($P<0,05$) do que aqueles em que a concentração do alcalóide foi de 2 mM (578 ml), 3 mM (570 ml), 4 mM (573 ml) e 5 mM (567 ml). Também às 6 e 12 h de incubação se assistiu a um declínio da produção de gás conforme aumentou a concentração de esparteína ($P<0,05$), que foi no entanto mais nítido às 6 h, com as máximas concentrações a registarem apenas 61% do gás produzido nos fermentadores testemunha ($P<0,05$). A concentração de N-amoniaco só apresentou valores significativamente diferentes ($P<0,05$) às 12 h da fermentação, com o líquido ruminal sem esparteína a exibir uma concentração de N-amoniaco de 34,2 mg/100ml, inferior ao teor de 37,0 mg/100 ml dos fermentadores com 1 e 3 mM de esparteína e 37,9 e 38,0 mg/100ml naqueles com 4 e 5 mM. Os valores do pH do líquido ruminal livre de esparteína foram sempre inferiores àqueles registados nas outras concentrações, mas só às 6 e 12 h e para as duas concentrações máximas estas diferenças foram significativas ($P<0,05$). O pH registado nos fermentadores correspondentes às situações extremas (0 e 5 mM) foram, respectivamente, de 6,86 e 7,20 às 6 h e de 6,17 e 6,40 às 12 h. Noutro conjunto de incubações, comparou-se a vitalidade do líquido ruminal quando incubado com tremocilha brava ou com a mesma quantidade de tremocilha doce *Topaz* aos níveis de 5, 10 e 15 g de MS. Em qualquer das situações não se obtiveram produções de gás significativamente diferentes, à excepção do nível de 5 g às 12 h em que a TB originou mesmo uma maior produção de gás ($P<0,05$). Ao cabo de 12 e 24 h de incubação registaram-se também diferenças significativas ($P<0,05$) nos valores do pH, com os fermentadores com TB a apresentarem um pH inferior aos da tremocilha doce.

Numa 3ª experiência estudou-se a acção da flora ruminal ovina sobre os alcalóides da tremocilha brava *in vitro*. Incubaram-se pequenas quantidades de tremocilha (0,5 g MS) em líquido ruminal e mediram-se as concentrações de lupinina, esparteína, gramina e lupanina no início das fermentações, assim como às 24h e às 48 h. A concentração do alcalóide maioritário, a lupinina, não sofreu alteração significativa ($P>0,05$), sendo de 65,5 µg/ml à hora 0 e de 67,3 µg/ml às 48 h. As concentrações dos outros alcalóides alteraram-se significativamente durante a fermentação. A

quantidade de espartefna diminuiu ligeiramente mas de uma maneira significativa, passando de 8,4 μ g/ml às 0 h para 7,0 μ g/ml às 48 h ($P < 0,05$) enquanto que a de gramina baixou abruptamente de 5,4 μ g/ml para 0,5 μ g/ml logo às 24 h, sendo quase nula às 48 h (0,2 μ g/ml) ($P < 0,001$). Os teores em lupanina subiram de forma contínua passando de 3,8 μ g/ml para 8,2 μ g/ml no final das incubações ($P < 0,001$). No entanto, a quantidade total de alcalóides presentes no meio não se alterou significativamente ($P > 0,05$).

Numa 4ª experiência estudaram-se, em ovelhas Serra da Estrela, as modificações originadas por dietas com 0, 15 e 30% de tremocilha brava (0%-TB, 15%-TB e 30%-TB) sobre a produção de leite e sua composição química, a ingestão de MS e variação do peso vivo (PV). A produção de leite (g/dia) observada nas ovelhas alimentadas com as dietas 0%-TB (418), 15%-TB (380) e 30%-TB (347) foi baixa e mostrou uma tendência para declinar com a ingestão de TB, embora de uma maneira não significativa. A produção originada pela dieta 30%-TB foi inferior em 17% ao controlo. Quer a ingestão de MS total quer o aumento de PV acompanharam aquela tendência mas também aqui os valores das 3 dietas não diferiram significativamente entre si. De todos os parâmetros da composição química do leite estudados só o teor em alcalóides revelou diferir significativamente ($P < 0,01$). Foi nulo nos animais 0%-TB e atingiu 1,9 mg/Kg e 5,6 mg/Kg nos animais 15%-TB e 30%-TB, respectivamente. Todos os animais que consumiram tremocilha excretaram alcalóides no leite, sobretudo lupinina, na concentração de 1,4 mg/Kg nas ovelhas 15%-TB e 4,6 mg/Kg nas 30%-TB. No leite de alguns dos animais também se detectaram quantidades vestigiais de espartefna e lupanina, mas em nenhum deles se assinalou a presença de gramina. A taxa de recuperação dos alcalóides no leite foi da mesma ordem nos animais 15%-TB e 30%-TB, respectivamente 0,04% e 0,05%. Tanto a taxa de recuperação dos alcalóides totais como da lupinina atingiram um máximo de 0,1%. A taxa de recuperação dos alcalóides revelou-se positivamente correlacionada com a produção de leite ($r=0,86$), mas não com a ingestão de alcalóides. Encontrou-se uma correlação positiva entre este último parâmetro e a concentração de alcalóides no leite ($r=0,79$).

O leite obtido durante este trabalho foi transformado em queijo de Serpa, no sentido de averiguar se as dietas ingeridas pelos animais operavam qualquer modificação na qualidade do queijo. O leite dos animais 15%-TB e o dos animais 30%-TB foi dividido por 2 sublotos de maneira a criar um maior gradiente de alcalóides e originar queijos de pesos semelhantes. Obtiveram-se por isso 5 grupos: queijos de leite sem alcalóides (queijo 0A, $n=8$) proveniente dos animais 0%-TB, queijos de leite com 1 mg/Kg (1A, $n=2$) e de leite com 3 mg/Kg (3A, $n=4$) proveniente dos animais 15%-TB e queijos de leite com 6 mg/Kg (6A, $n=4$) e de leite com 7 mg/Kg (7A, $n=2$) proveniente das ovelhas 30%-TB. Os queijos dos animais alimentados com tremocilha apresentaram um maior valor de MGRRS (Matéria Gorda Referida ao Resíduo Seco), com os queijos 7A a atingirem o máximo de 55,1%, contra apenas 45,6% do controlo ($P < 0,001$). Contrariamente, os queijos das ovelhas 15 e 30%-TB registaram os menores teores proteicos, com um mínimo de 17,4% nos 7A face aos 25,5% dos 0A ($P < 0,01$). A concentração de N solúvel nos queijos 15%-TB e 30%-TB foi também inferior à dos testemunha. Os queijos 7A registaram igualmente o menor teor desta fracção (0,6%), cerca de metade do encontrado nos 0A (1,3%) ($P < 0,001$). O coeficiente de maturação dos queijos dos animais suplementados com bagaço-de-soja (31,6) também se manifestou superior ao determinado nos queijos 1A (24,2), 3A (28,5), 6A (17,6) e 7A (22,1) ($P < 0,001$). A pasta dos queijos das ovelhas alimentadas com tremocilha absorveram uma maior quantidade de cloretos do que a dos queijos testemunha. Nestes o seu teor foi de apenas 1,5% tendo subido para 3,2%, 3,0%, 3,5% e 4,5% nos queijos 1A, 3A, 6A e 7A, respectivamente ($P < 0,001$). O único alcalóide detectado nos queijos das ovelhas suplementadas com tremocilha foi a lupinina. A sua concentração variou entre a média de 1,7 mg/Kg dos queijos 1A e a de 11,2 mg/Kg dos queijos 6A ($P < 0,001$). A carga microbiana dos queijos 1A, 3A e 6A não diferiu significativamente das $7,3 \cdot 10^8$ ufc (unidades formadoras de colónias) encontradas nos queijos testemunha, mas todas foram significativamente superiores ($P < 0,05$) ao valor de $6,0 \cdot 10^7$ ufc determinada nos queijos 7A. Os queijos obtidos foram também submetidos a avaliação sensorial pelo Painel de Provadores do Queijo de Serpa. Só as crostas dos queijos 7A obtiveram uma pontuação muito baixa, quase nula (0,7) bastante inferior

($P < 0,001$) às atribuídas aos restantes queijos, que variaram entre 2,8 (0A) e 3,3 (1 e 3A). A forma foi pontuado de maneira superior ($P < 0,001$) nos queijos 0A (3,1), 1A (3,4) e 3A (3,5) e 6A (2,9) tendo os 7A obtido a classificação de 2,1. Estes queijos também receberam uma pontuação significativamente inferior ($P < 0,001$) no parâmetro textura e cor da pasta (3,0) tendo os restantes obtido uma pontuação compreendida entre 5,2 (3A) e 4,3 (6A). Quanto ao sabor e aroma os queijos melhor classificados foram os 3A (4,9), seguidos dos 1A e 6A (4,2), 0A (4,1) e 7A com apenas 2,3 ($P < 0,001$). As baixas pontuações recebidas pelos queijos 7A em todos os parâmetros referidos contribuíram para a sua significativamente mais baixa classificação final (8,1) ($P < 0,001$), impeditiva da certificação. Em contrapartida todos os outros grupos de queijos obtiveram uma classificação final média superior a 14 pelo que poderiam ser certificados como queijos de Serpa.

Concluiu-se que a suplementação de ovinos com tremocilha brava não é susceptível de afectar a digestibilidade e ingestão de dietas à base de forragens pobres. Apesar da esparteína afectar a flora ruminal *in vitro*, em condições de campo os alcalóides desta planta não deverão constituir obstáculo à actividade microbiana ruminal. Os alcalóides quinolizidínicos foram pouco metabolizados por esta flora, ao contrário da gramina, um alcalóide de núcleo indol. A ingestão de tremocilha brava também não deve afectar a produção de leite de ovelha, em animais de baixo potencial produtivo como os utilizados no sequeiro. Em contrapartida, os seus alcalóides, à excepção da gramina, contaminam o leite, o que confirma os resultados do estudo *in vitro*. Uma elevada proporção de tremocilha na dieta pode prejudicar a qualidade do queijo de Serpa. Torna-se, no entanto, necessário esclarecer a relação entre o teor de alcalóides no leite e a quantidade de sal acumulada no queijo.

ABSTRACT

STUDY OF THE FEEDING VALUE OF BITTER YELLOW LUPIN (*Lupinus luteus* L.) IN SHEEP AND ITS EFFECT ON THE CHEMICAL COMPOSITION OF MILK AND QUALITY OF SERPA CHEESE

Augusto Joaquim de Carvalho Lança

The objective of this work was to determine if the bitter taste and the anti-microbial properties of bitter yellow lupin alkaloids affected the intake and digestive utilization of the diet, the chemical composition of milk and the quality of ewe cheese. In a 1st experiment, a bitter yellow lupin supplement (BYL) (1.0 % alkaloids) was compared to supplements constituted by sweet varieties of white lupin (WL), narrow leafed lupin (NLL) and by a control supplement of soybean meal (SBM). This supplementation was given to animals along with poor quality hay in order to maintain the isonitrogen level in the diets. Total dry matter (DM) intake ($g/KGLW^{0.75}$) as well as NDF and CP digestibilities from the four diets were not significantly different. The organic matter (OM) digestibility from de BYL diet (72.0%) was not significantly different ($P>0.05$) from those presented by SBM (70.5%) and WL diets (74.2%), but was lower than that presented by the NLL diet (77.5%). This last diet had the greatest proportion of concentrate. In the same way, ADF digestibility of the BYL diet (66.4%) did not differ significantly from the digestibility of SBM (61.0%) and WL (69.6%) diets, although it was lower than the digestibility of the NLL diet (74.4%). Both the nitrogen balance values from each diet and the digestibility coefficients for supplements showed no significant differences.

In a 2nd experiment, the effect of BYL alkaloids on the microbial activity of *in vitro* incubated sheep rumen fluid was studied. In a first set of incubations, rumen fluid was submitted to 6 increasing sparteine concentrations (0, 1, 2, 3, 4 and 5 mM). After 24h of incubation, sparteine-free rumen fluids produced significantly more gas (603 ml) ($P<0.05$) than those in wich alkaloid concentration was 2 mM (578 ml), 3 mM (570 ml), 4 mM (573 ml) and 5 mM (567 ml). Between the 6th and 12 th hour of incubation, a decrease was observed in the production of gas when the concentration of sparteine increased ($P<0.05$). However, this decrease was more clearly seen at 6 hours when maximum concentrations registered only 61% of the gas produced in the control fermentators ($P<0.05$). The concentration of ammoniated N only presented significantly different values ($P<0.05$) at 12 hours of fermentation, while the sparteine-free rumen fluid presented an ammoniated N concentration of 34.2 mg/100 ml. This value was lower than the 37.0 mg/100ml value recorded in fermentators with 1 and 3 mM of sparteine and 37.9 and 38.0 mg/100ml in those with 4 and 5 mM. The pH values of sparteine free rumen fluid were always lower than those recorded in other concentrations. However, differences were only significant ($P<0.05$) for the two maximum concentrations at 6 and 12 hours. The pH recorded in extreme situation fermentators (0 and 5 mM) was 6.86 and 7.20 at 6 hours and 6.17 and 6.40 at 12 hours, respectively. The vitality of rumen fluid when incubated with BYL or with the same quantity of *Topaz* sweet yellow lupin at 5, 10 and 15 g DM will be compared in another group of incubations. The production of gas was not significantly different in any of these cases, except for the 5 g level at 12 hours, in wich BYL led to a greater production of gas ($P<0.05$). After 12 and 24 hours of incubation, significant differences ($P<0.05$) were recorded in pH values, while BYL fermentators presented a lower pH than those with sweet lupin.

The effect of sheep rumen flora on *in vitro* BYL alkaloids was studied in a 3rd experiment. Small quantities of lupin (0.5g DM) were incubated in rumen fluid and the concentrations of lupinine, sparteine, gramine and lupanine were measured at the beginning of fermentations and 24 and 48 hours. The concentration of lupinine, the predominant alkaloid, did not show any significant change ($P>0.05$), presenting 65.5 $\mu g/ml$ at 0 hours and 67.3 $\mu g/ml$ at 48 hours. The concentrations of the other alkaloids changed significantly during fermentation. The quantity of sparteine decreased

slightly but significantly, having decreased from 8.4 $\mu\text{g/ml}$ at 0 hour to 7.0 at 48 hours ($P<0.05$). The quantity of gramine decreased abruptly from 5.4 $\mu\text{g/ml}$ to 0.5 $\mu\text{g/ml}$ at 24 hours and almost null at 48 hours ($P<0.001$). Lupanine contents rose continuously, having increased from 3.8 $\mu\text{g/ml}$ to 8.2 $\mu\text{g/ml}$ at the end of incubations ($P<0.001$). However, the total quantity of alkaloids in the fluid did not change significantly ($P>0.05$).

The effect of diets containing 0, 15 and 30% BYL on milk production and its chemical composition, DM intake and live weight (LW) variation was studied in a 4th experiment with Serra da Estrela ewes. The production of milk (g/day) observed in ewes fed 0%-BYL (418), 15%-BYL (380) and 30%-BYL (347) was low and showed a tendency to decrease with BYL intake, although not significantly. Production originated from the 30% diet was 17% lower than the control. Although values for all 3 diets did not differ significantly, both total DM intake and LW increase accompanied that tendency. The only parameter of milk chemical composition that differed significantly ($P<0.01$) was that of alkaloids. This parameter was null in 0%-BYL animals and reached 1.9 mg/Kg and 5.6 mg/Kg in 15% and 30%-BYL animals, respectively. All animals with lupin intake excreted alkaloids in the milk, especially lupinine in the concentration of 1.4 mg/Kg in 15%-BYL ewes and 4.6 mg/Kg in 30%-BYL ewes. Although gramine was not detected in any of the milk, vestigial quantities of sparteine and lupanine were also detected in the milk of some animals. The alkaloid rate of recovery in milk was similar in 15% and 30%-BYL animals, 0.04% and 0.05%, respectively. Both the total alkaloid rate of recovery and the lupinine rate of recovery reached a 0.1% maximum. The alkaloid rate of recovery was positively correlated with milk production ($r=0.86$), but not with alkaloid intake. However, a positive correlation was observed between this last parameter and the concentration of alkaloids in milk ($r=0.79$).

The milk obtained during this work was transformed into Serpa cheese in order to determine if diets had any effect on the quality of cheese. The milk from 15% and 30%-BYL animals was divided into 2 sub-lots in order to create a greater gradient of alkaloids and produce cheeses with similar weights. Therefore, 5 groups were formed: cheese produced with alkaloid-free milk (0A cheese, $n=8$) from 0%-BYL ewes; cheese produced with milk containing 1 mg/Kg alkaloids (1A cheese, $n=2$) and 3 mg/Kg alkaloids (3A cheese, $n=4$) from 15%-BYL animals and cheese produced with milk containing 6 mg/Kg (6A cheese, $n=4$) and 7 mg/Kg alkaloids (7A cheese, $n=2$) from 30%-BYL ewes. The cheese from animals fed lupin presented a greater FRDR (Fat Redered to Dry Residue), with 7A cheeses that reached a 55.1% maximum vs only 45.6% for the control ($P<0.001$). On the other hand, cheeses from 15 and 30%-BYL ewes presented the lowest protein contents, with a 17.4% minimum in 7A cheeses vs. 25.5% in 0A cheeses ($p<0.01$). The soluble N concentration in 15%-BYL and 30%-BYL cheeses was also lower than that of the control. 7A cheeses also presented the lowest content of this fraction (0.6%), about half of that observed in 0A cheeses (1.3%) ($P<0.001$). The maturation coefficient of cheeses from animals supplemented with SBM(31.6) was also higher than that observed in 1A (24.2), 3A (28.5), 6A (17.6) and 7A (22.1) cheeses ($P<0.001$). The cheese paste from animals fed lupin absorbed greater quantities of chlorides than the control. The NaCl content in control cheeses was 1.5% having then increased to 3.2%, 3.0%, 3.5% and 4.5% in 1A to 7A cheeses, respectively ($P<0.001$). Lupinine was the only alkaloid detected in cheeses from ewes supplemented with lupins. Lupinine concentration varied between the 1.7 mg/Kg mean in 1A cheeses and 11.2 mg/Kg in 6A cheeses ($P<0.001$). The microbial load in 1A, 3A and 6A cheeses did not differ significantly from the $7.3 \cdot 10^8$ cfu (colony forming units) found in the control. However, all were greater ($P<0.05$) than the $6.0 \cdot 10^7$ cfu value in 7A cheeses. The cheeses obtained were also submitted to sensorial analysis by the Taste Panel of Serpa Cheese. Only 7A cheese crusts received a very low grade, which was much lower ($P<0.001$) than values attributed to the remaining. These values varied between 2.8 (0A) and 3.3 (1 and 3A). Grades for shape were higher ($P<0.001$) in 0A cheeses (3.1), 1A (3.4) and 6A (2.9). 7A were graded 2.1. These cheeses also received significantly lower grades ($P<0.001$) for paste texture and colour parameter (3.0), while the remaining ones were graded between 5.2 (3A) and 4.3 (6A). The best graded cheeses in terms of flavour were the 3A (4.9), followed by 1A and 6A (4.2), 0A (4.1) and 7A cheeses with only 2.3 ($P<0.001$). The low

grades attributed to 7A cheeses in all of the referred parameters contributed to its significantly lower final grade (8.1) ($P < 0.001$), which made certification impossible. On the other hand, all of the other cheese groups had a mean final grade which was higher than 14, thus allowing them to be certified as Serpa cheeses.

In conclusion, supplementation with BYL does not affect the digestibility and intake of poor forage diets. Although sparteine affects *in vitro* rumen flora, the alkaloids of this plant should not be an obstacle to rumen microbial activity in field conditions. Contrarily to gramine, quinolizidine alkaloids were poorly metabolized by this flora. The intake of BYL does not affect milk production in ewes with low productive potential, as those used in poor pastures. On the other hand and according to *in vitro* studies, BYL alkaloids, with the exception of gramine, contaminated milk. A high proportion of lupin in the diet may decrease the quality of Serpa cheese. However, it is necessary to determine the relation between the alkaloid content in milk and the quantity of salt accumulated in the cheese.

ÍNDICE

PARTE I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

OS TREMOCEIROS NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL	1
1. Características e distribuição dos tremoceiros	3
2. Integração dos tremoceiros nos sistemas agro-pecuários	5
2.1. Alimentação de ruminantes durante o período estival	7
2.2. O montado	9
2.3. O sistema de <i>ley-farming</i>	11
3. Composição química	12
3.1. Proteínas	12
3.2. Glúcidos	13
3.3. Lípidos	15
3.4. Alcalóides	15
3.4.1. Síntese dos alcalóides	16
3.4.2. Toxicidade	19
3.4.3. Ocorrência	21
4. O grão dos tremoceiros na alimentação animal	24
4.1. Suínos	24
4.2. Aves	26
4.3. Ruminantes	28
4.3.1. Fermentação no rúmen	28
4.3.2. Sensibilidade dos ruminantes aos alcalóides	29
4.3.3. Destino dos alcalóides no ruminante	30
4.3.4. Os tremoceiros na alimentação intensiva de ruminantes	32
4.3.4.1. Animais em lactação	33
4.3.4.2. Animais em crescimento	34
4.3.5. Os tremoceiros e a alimentação de ruminantes no sequeiro	36
4.3.5.1. Valor alimentar dos agostadouros de tremoceiros	38
4.3.5.2. Alimentação de animais em crescimento	39
4.3.5.3. Alimentação de reprodutores	40
5. Objectivos do trabalho experimental	42

PARTE II - TRABALHO EXPERIMENTAL

1. Valor alimentar da tremocilha brava para ovinos	47
1.1. Introdução	47
1.2. Materiais e métodos	48
1.2.1. Dietas	48
1.2.2. Animais e manejo	50
1.2.3. Análises químicas	51
1.2.4. Análise estatística	52
1.3. Resultados e discussão	52
1.3.1. Composição química dos suplementos e das dietas	52
1.3.2. Digestibilidade aparente da MO, NDF, ADF e PB	55
1.3.3. Ingestão de MS	58
1.3.4. Balanço azotado	61
1.3.5. Digestibilidade aparente da MO, NDF, ADF e PB dos suplementos	62
1.4. Conclusões	64
2. Efeito dos alcalóides da tremocilha brava sobre a actividade microbiana ruminal <i>in vitro</i>	65
2.1. Introdução	65
2.2. Materiais e métodos	68
2.2.1. Animais e técnica de colheita do suco ruminal	68
2.2.2. O sistema <i>in vitro</i>	69
2.2.3. Substractos	69
2.2.4. Medições e análises químicas	70
2.2.5. Análise estatística	72
2.3. Resultados e discussão	72
2.3.1. Produção de gás	72
2.3.2. Absorção de N-NH ₃	80
2.3.3. pH	82
2.4. Conclusões	86
3. Destino dos alcalóides da tremocilha brava no líquido ruminal incubado <i>in vitro</i>	87
3.1. Introdução	87
3.2. Materiais e métodos	89
3.2.1. Animais e técnica de colheita de suco ruminal	89

3.2.2. O sistema <i>in vitro</i>	90
3.2.3. Substractos	90
3.2.4. Análises químicas	91
3.2.5. Análise estatística	91
3.3. Resultados e discussão	91
3.4. Conclusões	97
4. Efeito da tremocilha brava sobre a produção de leite de ovelha e sua composição química	99
4.1. Introdução	99
4.2. Materiais e métodos	101
4.2.1. Análise estatística	105
4.3. Resultados e discussão	105
4.3.1. Ingestão de MS, EM e PB	105
4.3.2. Variação do peso vivo	109
4.3.3. Produção de leite	110
4.3.4. Composição química do leite	112
4.3.4.1. Taxa de recuperação dos alcalóides	119
4.4. Conclusões	125
5. Efeito da tremocilha brava sobre a qualidade do queijo	127
5.1. Introdução	127
5.2. Materiais e métodos	130
5.2.1. Análises químicas e microbiológicas	132
5.2.2. Análise sensorial	133
5.2.3. Análise estatística	134
5.3. Resultados e discussão	135
5.3.1. Composição química	135
5.3.2. Características microbiológicas	148
5.3.3. Avaliação sensorial	150
5.4. Conclusões	161
6. Conclusões gerais	163
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	167
ANEXOS	185

PARTE I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

OS TREMOCEIROS NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL

1. Características e distribuição dos tremoceiros

Os tremoceiros (*Lupinus* spp.) são plantas dicotilédoneas pertencentes à sub-família Papilionácea e à família das Leguminosas. Apresentam porte erecto, inflorescências dispostas em cachos verticais, vagens espalmadas, compridas e mais ou menos deiscentes. As raízes são profundas e bem desenvolvidas, o que torna as plantas bem adaptadas aos solos grosseiros e arenosos das regiões de clima mediterrânico. Geralmente são autogâmicas, mas a fecundação cruzada é frequente e os cruzamentos intervarietais numa mesma espécie são frequentes, o que torna difícil a manutenção da sua pureza genética, como é o caso do baixo teor em alcalóides (GUERRERO, 1983). Ao género *Lupinus* spp. pertencem mais de um milhar de espécies diferentes, umas anuais outras perenes, englobando estas últimas, espécies herbáceas e espécies arbustivas, e que quanto à origem se podem dividir em dois grandes grupos (BROQUA e EMILE, 1990): espécies com origem na bacia mediterrânica, anuais, e espécies americanas, repartidas do Alaska à Terra-do-Fogo, na sua maioria perenes. No primeiro grupo incluem-se as plantas de maior interesse agrícola: *L. albus* L. (tremoço), *L. luteus* L. (tremocilha), *L. angustifolius* L. (tremoço-de-folhas-estreitas (TFE)) - *L. consentinii* Guss e *L. hispanicus* Boiss e Reuter. O segundo grupo inclui a espécie herbácea *L. mutabilis* Sweet bastante utilizada para alimentação humana em toda a zona andina e ainda numerosas espécies selvagens, com alcalóides susceptíveis de provocar intoxicações e teratogenicidade nos animais. A maior parte das espécies selvagens apresenta elevada deiscência e os grãos são pequenos e ricos em alcalóides. As espécies domesticadas apresentam, pelo contrário, e de um modo geral, vagens indeiscentes, baixo nível de alcalóides e sementes volumosas.

O cultivo dos tremoceiros tendo em vista a produção de forragem e grão, é uma prática muito antiga já levada a cabo por gregos e romanos. Mais recentemente, a partir do século XVIII, encontram-se referências à sua utilização nos solos arenosos da Europa Meridional e no século XIX a cultura é levada para a Europa do Norte, onde quer o grão

quer a forragem passam a integrar a alimentação de ruminantes em vastas zonas da Alemanha, Polónia e Rússia. A partir dos anos 20 deste século os tremoçoceiros expandem-se pelas regiões de clima mediterrânico da África do Sul e da Austrália, onde o seu melhoramento genético, no sentido do desenvolvimento de variedades doces para a indústria das rações, tem um grande impulso.

A tremocilha é a espécie de *Lupinus* mais cultivada em Portugal para a alimentação animal, facto a que não são estranhos a sua característica espontânea em todo o país e o seu relativamente baixo teor em alcalóides. De todos os tremoçoceiros cultivados é o que melhor se adapta aos solos grosseiros e de baixa fertilidade, rusticidade que é reforçada pela defesa contra predadores e insectos que os alcalóides lhe proporcionam (WINK, 1986). Dos tremoçoceiros cultivados em todo o Mundo é o único que apresenta a característica de estar integrado num sistema silvopastoril - o montado - devido às elevadas quantidades de N e matéria orgânica que incorpora no solo (Quadro 1.1.) e do seu aproveitamento como forragem e como grão pelos ruminantes e, por vezes, suínos. O elevado teor em proteína bruta (PB) e reduzida concentração em amido do grão da tremocilha e dos restantes tremoçoceiros, torna-os um suplemento adequado em dietas à base de forragens pobres, palhas e restolhos (PRESTON e LENG, 1987), tão frequentes no nosso sequeiro durante a época estival.

Quadro 1.1. Fixação de azoto por leguminosas de solos ácidos.

Cultivo	Kg de N ₂ fixado/ha/ano
Ervilhacas	85
Tremoços e Tremocilha	150-169
Trevos	104-220

Origem: Burns e Hardy (1975) cit. por Orive e Temprano (1983)

2. Integração dos tremoceiros nos sistemas agro-pecuários

Os tremoceiros integram-se em diversos sistemas agro-pecuários tendo-se expandido por várias latitudes. São cultivados como colheita de Verão de sementeira primaveril na Europa central e setentrional, bem como na Nova Zelândia, e como cultura de sementeira outonal nas zonas de clima mediterrânico ou subtropical, como o SW dos Estados Unidos da América (KAY, 1979). Adaptam-se tanto ao curto Verão da Islândia, onde o TFE é considerado uma boa pastagem para o acabamento de borregos (GUDMUNDSSON e RUNOLFSSON, 1986) como ao clima de savana da Tanzânia onde o grão e a palha são pastoreados pelos ruminantes durante a estação seca (MBWILE e WIKTORSSON, 1982). Aliando elevadas produções de MS altamente digestível, em zonas marginais para a agricultura (Quadro 2. 1.), às maiores taxas de incorporação de N no solo de entre as

Quadro 2.1. Produção de MS, EM e PB de cultivos de sequeiro no estado de maturação, no Sul de Portugal.

Cultivo	MS (t/ha)	EM (Mcal/ha)	PB (Kg/a)	Autores
Tremocilha	9,5	19665	950	1
	8,6	18348	944	2
	7,4	-	-	3
Trevo	6,2	15314	950	1
Ervilhaca	6,1	14091	1050	1
Aveia	10,9	21037	600	1
Cevada	8,1	15471	520	1

1- ABREU *et al.* (1982); 2- LANÇA (1992); 3- WHANON (1952)

leguminosas cultivadas e à produção de plantas naturalmente protegidas por alcalóides, os tremoceiros inserem-se numa agricultura que não sendo exclusivamente produtivista seja ecológica e economicamente racionalizada, adaptando os sistemas que pratica às características pedoclimáticas do espaço em que se desenvolve (AZEVEDO e CARY, 1989). Integram-se ainda na estratégia de extensificação e adaptação da produção animal aos recursos disponíveis (PORTUGAL, 1989), otimizando o seu aproveitamento, facto que assume particular relevância tendo em conta que actualmente se tem assistido a uma subida dos custos de produção acompanhada de uma descida de preço dos produtos animais. De entre os principais factores que determinam o cultivo da tremocilha brava destacam-se: boa adaptação às condições edafo-climáticas; produções de energia metabolizável (EM) e PB superiores às de outras culturas nas condições de sequeiro e nos solos em que vegeta; dificuldade de adaptação das variedades doces e de outras espécies de tremoceiros; as variedades doces de tremocilha resistem mal às geadas (ALONSO, 1984) e ataques dos insectos, principalmente afídios, uma das principais pragas dos tremoceiros (KAY, 1979; NELSON e DELANE, 1990) (Quadro 2.2.) e pelo menos algumas variedades doces resistem mal aos períodos de seca (CAMPOS-ANDRADA *et al.*, 1994); inadequação das variedades amargas das outras espécies à alimentação animal; regressão das variedades doces ao estado amargo, por cruzamento com tremocilha brava espontânea (SOUSA, 1983); maior procura das sementes amargas (SOUSA, 1983).

O tremço vulgar também é cultivado entre nós mas requiere solos de maior fertilidade, pelo que está limitado a algumas áreas, destinando-se sobretudo ao consumo humano (TERRATS, 1986). Contudo, a elevada produção de grão que proporciona (VELEZ, 1994) torna-o indicado para a alimentação de ruminantes durante o Verão após a senescência das plantas, nas áreas a que se adapta. O cultivo de TFE doce, espécie também mais exigente em solos do que a tremocilha, encontra-se ainda em fase experimental e recorrendo a cultivares de origem australiana.

Quadro 2.2. Comparação da produção média (t/ha) de variedades doces (sem alcalóides) e amargas (com alcalóides) de tremoceiros.

Espécie	Amargas	Doces	Comparação (doce=100%)
<i>L. angustifolius</i> ¹	3,72	2,19	169,9
<i>L. albus</i> ¹	4,62	3,83	120,6
<i>L. luteus</i> ¹	2,65	1,66	159,6
<i>L. mutabilis</i> ²	2,80	0,86	325,5

1- KAHNT e HIJAZI (1987) e 2- von BAER (1990) cit. por GULEWICZ *et al.*(1994).

Embora variedades espontâneas ocorram em todo o Oeste ibérico, o seu teor em alcalóides é impeditivo da sua utilização na alimentação animal. Tal como os restantes grãos de leguminosas produzidas na Europa, a produção de grão de tremoceiros para a indústria das rações encontra-se condicionada pelos baixos preços do bagaço de soja nos mercados mundiais. Além disso, o cultivo da tremocilha brava para grão é ainda mais penalizado visto que os agricultores não recebem subsídios para o seu cultivo, devido ao elevado teor em alcalóides. Assim, as estratégias de integração dos tremoceiros nos sistemas agro-pecuários têm-se baseado na sua utilização pelos agricultores como auto-aprovisionamento em N e energia e como cultura melhoradora do solo. Tal é o caso das zonas de clima mediterrânico onde o grão é utilizado na suplementação de ruminantes, durante a estação seca.

2.1. A alimentação de ruminantes durante o período estival

Apesar do importante papel que os ruminantes desempenham nos sistemas agro-pecuários das zonas de clima mediterrânico, as condições edafo-climáticas da maior parte

destas regiões são das menos favoráveis àquela produção animal. A grande irregularidade interanual e intra-anual das precipitações é agravada pela sua sazonalidade marcada, podendo o período seco prolongar-se por 3 a 6 meses (CRESPO, 1975). Qualquer que seja a situação só há verdadeira abundância de erva na Primavera e nas outras estações a sua disponibilidade é baixa. Em virtude disso, a maior parte dos agricultores regula as cargas animais pela situação mais desfavorável, o que explica os baixos encabeçamentos praticados. A suplementação com alimentos concentrados durante o estio, afigura-se como o único meio que permite níveis mínimos de intensificação da produção de ruminantes (PARDO e GARCIA, 1984). Com efeito, o principal recurso alimentar disponível durante o Verão é constituído por restolhos e pastos secos, agostadouros caracterizados pelo seu baixo teor em proteína e predominância de fibra lenhificada, de que resulta uma baixa digestibilidade (VAN SOEST, 1973). Assim, o principal factor que limita a produção animal é a perda de peso que origina esta alimentação desequilibrada (FOOT *et al.*, 1980; PURSER, 1981; PRESTON e LENG (1987). Caracteriza-se por possuir uma insuficiente quantidade de proteínas fermentáveis no rúmen e de enxofre (à excepção de pastagens onde predominam as leguminosas) e uma baixa digestibilidade, originada por elevadas concentrações em lenhina. Nesta dieta predominam as paredes celulares, há um desequilíbrio na razão proteína/energia e ocorrem deficiências em minerais. Como resultado verifica-se uma baixa eficiência da produção e uma reduzida actividade microbiana ruminal. Existe uma deficiência em energia e proteína no metabolismo do animal, devida à insuficiente ingestão de alimento e escasseiam substâncias neoglucogénicas (propionato, aminoácidos), de que resulta uma deficiente utilização do acetato que poderá levar os animais ao estado de cetose.

Para GUESSOUS (1990) a obtenção de fenos a partir de espécies anuais de sequeiro, que satisfaçam as necessidades dos animais, é um objectivo difícil de atingir, devido aos baixos valores de digestibilidade e proteína que geralmente alcançam, facto também detectado por LANÇA (1987), num levantamento ao valor nutritivo dos fenos produzidos

no Alentejo. A ensilagem de espécies pratenses e forrageiras permitiria uma melhor preservação do seu valor nutritivo, mas este alimento adapta-se mal à suplementação em condições extensivas devido a dificuldades de utilização e transporte. Fenos e silagens são, em todo o caso, alimentos mais caros do que os agostadouros e os agricultores preferem guardá-los para o Outono e o Inverno, quando todos os outros recursos disponíveis já se encontram esgotados.

Entre nós, quando os animais começam a perder peso nos restolhos e pastagens secas, é frequente suplementar-se esta dieta com concentrados, fenos, palhas, sub-produtos ou cereais. Numa perspectiva de redução dos custos de produção de ruminantes esta última solução parece ser a mais interessante, pois estes produtos têm um baixo preço e são, por vezes, obtidos na própria exploração. Contudo, existem trabalhos que apontam para uma utilização mais eficiente dos grãos de leguminosas na suplementação de restolhos e pasto seco (KENNEY, 1980; KENNEY, 1981; ROWE *et al.*, 1989; SUITER e CROKER, 1980 cit. por SALGUEIRO, 1986). Os cereais fornecem EM ao ruminante, mas o seu conteúdo proteico é insuficiente para animais em crescimento e o seu teor em amido baixa o pH ruminal, o que, para além de sujeitar os animais a problemas de acidose, cria condições sub-óptimas para o aproveitamento da componente fibrosa da dieta. O papel da tremocilha-gão, consumida como agostadouro, na produção extensiva de ruminantes nas nossas condições de sequeiro, consistiria assim, em colmatar de uma das formas mais eficientes, a necessidade do agricultor dispor duma fonte energético-proteica de baixo custo que complemente a dieta fibrosa dos ruminantes durante o estio. Nos sistemas mediterrânicos que integram os tremeceiros, dois deles assumem particular relevância: o montado e os sistemas de *ley-farming*.

2.2. O montado

Para PINTO (1994) o cultivo da tremocilha não se justifica *per se*, mas pelo seu papel no sistema silvopastoril que constitui o montado, onde melhora as produtividades das componentes arbórea, arvense e animal. Neste sistema o grão da tremocilha torna-se essencial ao proporcionar alimento abundante para os ovinos quando a restante vegetação se lenhifica e perde valor alimentar, a partir do final da Primavera, permitindo uma maior intensificação do sistema (SOUSA, 1983; PINTO, 1994). À componente arbórea a leguminosa fornece N e MO para além de melhorar a estrutura do solo (HENDERSSON, 1989; GARDNER e McDONALD, 1988), beneficiando a sua nutrição. Embora não se tenham realizado estudos sobre a relação entre a tremocilha e o montado, é do conhecimento empírico dos subericultores que os sobreiros beneficiam nitidamente com o cultivo da tremocilha no sub-coberto. Esta cultura diminui ainda o risco de incêndio, pela necessidade de mobilização superficial do solo inerente à instalação da própria cultura, e que geralmente ocorre quando se procede à desmatação periódica. O estudo efectuado por CABRAL *et al.* (1993) evidencia que a mortalidade dos sobreiros em Portugal resulta em grande parte da incorrecta gestão deste ecossistema florestal, nomeadamente do excessivo peso da cerealicultura e bovinicultura no subcoberto, em detrimento da utilização silvopastoril com base nos ovinos. Todas as operações que não impliquem a elevação ou, no mínimo, a manutenção do teor de matéria orgânica do solo conduzem inevitavelmente à degradação do montado (NATIVIDADE, 1950) e a instalação de pastagens no subcoberto surge assim, como uma operação prioritária em vastas zonas do Sul do país (FERRAZ, 1993). Os agostadouros de tremocilha, ao lado de pastagens de outras espécies para consumo no resto do ano, servem assim esta necessidade de elevação da fertilidade do solo dos montados. Neste sistema de aproveitamento, contrariamente ao que sucede durante a fenação e ensilagem, o grão da tremocilha é ingerido pelo ruminante no subcoberto, em agostadouros que podem permanecer até 3 anos no terreno, não se verificando por isso significativa exportação de nutrientes. Nos anos subsequentes ao da sementeira inicial, verifica-se um grande desenvolvimento das gramíneas espontâneas, como resultado da

acumulação de azoto pela cultura. Assim, neste sistema potencializa-se ao máximo as singulares características desta planta dos nossos solos pobres: elevada acumulação de N e MO no solo a par de altas produções de EM e PB.

2.3. O sistema de *ley-farming*

Nas condições de sequeiro das regiões de clima mediterrânico da Austrália foram desenvolvidos nos anos 60 sistemas de *ley-farming* de exploração da terra, com uma pastagem de trevo subterrâneo a alternar com o cereal. A função da leguminosa consiste em manter o nível de fertilidade do solo, quebrar o ciclo de vida das pragas e manter o efectivo animal (WHITE, 1987). No entanto, a curta rotação trevo-cereal facilmente elimina a leguminosa, o que, aliado ao crescente uso de herbicidas, descida dos preços dos produtos ovinos e irregularidade das precipitações, levou a que os agricultores, a partir do início da década de 70, iniciassem a substituição do trevo subterrâneo pelo TFE doce (SMITH e REEVES, 1988; SMART, 1986). Concomitantemente, desenvolveu-se uma indústria de tremoço, dirigida para as empresas asiáticas de alimentos compostos para animais que tornou o SW australiano a principal zona exportadora do Mundo (SMART, 1986). A revisão efectuada por NELSON e DELANE (1990), a partir de dados obtidos em 130 explorações australianas, mostra que a produção de trigo, quando esta cultura ocupa o terreno a seguir ao tremoço, é mais elevada do que a seguir ao cultivo de outro cereal (1870 Kg/ha contra 1290 Kg/ha). Mesmo com os melhores níveis de adubação azotada a produtividade do cereal na rotação Tremoço-Trigo foi superior, o que reflecte o efeito melhorador da leguminosa não só sobre a matéria orgânica do solo, mas também na sua estrutura e estado sanitário. Neste sistema agro-pecuário o tremoço é geralmente recolhido e vendido para a indústria das rações e o restolho destinado à alimentação estival dos rumiantes. O grão residual juntamente com as palhas, vagens e folhas secas constitui um suplemento para os animais que simultaneamente também consomem os restolhos de cereais

naquela altura do ano. O valor alimentar destes restolhos é considerado superior ao valor alimentar dos restolhos de cereais e semelhante ao de pastagens à base de leguminosas (SALGUEIRO, 1986). KENNEY e ROBERTS (1987) registaram nestes restolhos aumentos da taxa de fertilidade em ovinos superiores a 20 %, comparados com um testemunho constituído por ovinos sobre pastagem anual de sequeiro. Tal como entre nós, no montado, o agostadouro de tremoceiros também é utilizado na alimentação de ruminantes nas zonas de clima mediterrânico da África do Sul e da Austrália. Neste caso o grão não é recolhido e o cultivo, já senescente, é consumido *in situ* pelos animais. A cultura pode ser utilizada como *flushing* durante a época da cobrição, o que permite aumentar a taxa de fertilidade dos rebanhos numa amplitude superior a qualquer outro suplemento (FLETCHER, 1981; KNIGHT, 1980; RITAR e ADAMS, 1988), ou na recria e acabamento de borregos e manutenção do efectivo adulto (SMITH e REEVES, 1988). A pastagem seca de tremço proporciona geralmente maiores crescimentos do que a consociação de trevo subterrâneo e azevém (ARNOLD *et al.*, 1976).

3. Composição química

Na composição química do grão dos tremços sobressai o elevado teor em PB, que os torna suplementos proteicos por excelência, e a presença de glúcidos de natureza estrutural, em detrimento da fracção glucídica não parietal, que apresenta teores bastante baixos, ou mesmo vestigiais no caso do amido. Como a maior parte das leguminosas, os tremços contêm factores anti-nutritivos, principalmente alcalóides de quinolizidina e, em algumas espécies, de indol, alvo durante as últimas décadas de importantes esforços no sentido do seu erradicação, objectivo que por enquanto ainda não foi atingido. Mesmo as chamadas variedades doces apresentam alcalóides na sua composição.

3.1. Proteínas

À semelhança das restantes leguminosas, as proteínas dos tremoços são constituídas por globulinas (80 a 90%) e albuminas . O primeiro grupo constitui as proteínas de reserva e é formado por várias fracções, destacando-se de entre elas a alfa-conglutinina (legumina), a beta-conglutinina (vicilina) e a gama-conglutinina. São solúveis em soluções salinas e pouco solúveis na água, sendo utilizadas durante a germinação como fonte de N (KAY, 1979;de HARO, 1983). Com a albumina encontra-se a maior parte das enzimas da semente, sendo, com a alfa-conglutinina, a fracção proteica com maior concentração de cisteína e metionina.

O teor em PB difere segundo a espécie oscilando entre 36,0 a 47,6 % na tremocilha, 31,7 a 45,9 % no *L. mutabilis*, 34,3 a 44,9% no tremoço vulgar e 28,0 a 37,9% no TFE (HILL, 1977). A concentração proteica da tremocilha excede os valores geralmente determinados na soja (35 %) e aproxima-se dos teores do bagaço desta leguminosa enquanto o tremoço vulgar e o TFE são as espécies de concentração proteica mais baixa. O género *Lupinus* apresenta valores superiores aos do feijão (22%), ervilha (22,5%), fava (24,9%) (HILL, 1986) e grão-de-bico (21,7%) (DIXON e HOSKING, 1992).

Tal como nas outras leguminosas, os tremoços possuem baixos teores de aminoácidos sulfurados, principalmente cistina e metionina, o que torna necessária a sua complementação com estes aminoácidos ou a adição de cereais, quando entra em dietas para monogástricos. Como ocorre uma degradação generalizada das proteínas das leguminosas no rúmen, na maior parte das vezes aquela deficiência será pouco relevante nas dietas para ruminantes.

3.2. Glúcidos

Os glúcidos presentes no grão dos tremoços são principalmente do tipo parietal. Contrariamente à maior parte das leguminosas, em que o amido é o principal glúcido de reserva, os tremoços contêm apenas quantidades vestigiais deste polissacárido, para além de

possuírem pequenas quantidades de glúcidos solúveis sob a forma de oligossacáridos da família dos alfa-galactósidos (BRILLOUET, 1984) e em quantidades semelhantes às presentes na fava e na ervilha (DIXON e HOSKING, 1992). As fibras concentram-se no invólucro da semente e são compostas, segundo BAYLEY *et al.* (1974), por 50 % de celulose, 27% de pectina, 12 % de hemicelulose e 0,4 % de lenhina. O teor em fibra bruta é menor no tremoço vulgar (3 - 10 %) do que na tremocilha e no TFE (13 a 18 %, respectivamente) (HILL, 1977). Comparativamente à ervilha, favarola e soja, os tremoços apresentam maior teor em NDF e ADF e quantidades semelhantes de lenhina (Quadro 3.1.). A semente dos tremoços e tremocilha é praticamente isenta de amido (HILL, 1977; BEROARD e VEREL, 1976 cit. por BRILLOUET, 1984). A revisão feita por HILL (1977) aponta para valores inferiores a 1% na tremocilha e no TFE, enquanto não existiriam senão vestígios na semente do tremoço vulgar (Quadro 3.1.).

Quadro 3.1. Composição química do grão do tremoço vulgar, comparativamente à de outras leguminosas (% MS)

	Tremoço	Ervilha	Favarola	Soja
PB	40,0	25,0	29,0	40,2
Lípidos	10,0	1,8	1,5	21,3
Celulose	14,0	6,1	10,0	7,4
Cinzas	3,9	3,5	4,0	6,1
Amido	traços	50,0	40,0	traços
Açú. Sol.	10,0	7,0	5,7	7,0
NDF	21,6	12,5	15,0	13,5
ADF	17,7	8,4	11,0	9,5
Lenhina	1,0	1,0	1,0	0,7

Origem: CARROUÉ *et al.* (1992)

Nestas leguminosas, a sacarose e os oligossacáridos alfa-galactósidos estaquiose, rafinose e verbascose substituem o amido no papel de glúcidos de reserva durante a germinação, fornecendo energia para o desenvolvimento do embrião (BRILLOUET, 1984). Os alfa-galactósidos são formados por uma molécula de sacarose ligada a uma (rafinose), duas (estaquiose) ou três (verbascose) moléculas de galactose. O teor nestes açúcares solúveis e em sacarose pode variar de 4,5 - 5,5 % no TFE a 6,0-8,9% na tremocilha e no tremoço vulgar (RODENAS *et al.*, 1982) valores que são da mesma ordem dos referidos por CARROUÉ *et al.* (1992) para a ervilha, favarola e soja.

3.3. Lípidos

A fracção lipídica do grão dos tremoços é constituída maioritariamente por triglicéridos, cujos ácidos gordos são na sua maioria monoinsaturados (83-91%), com predominância dos ácidos oleico e linoleico. O primeiro é o mais abundante no tremoço, o segundo predomina na tremocilha, enquanto no TFE as suas proporções são semelhantes (HILL, 1977). O tremoço vulgar é a espécie de maior teor em lípidos (7,8 a 14,5 %), enquanto a tremocilha (4,0 a 7,1%) e o TFE (5,3 a 6,6 %) apresentam teores semelhantes (HILL, 1977; MUZQUIZ *et al.*, 1982) sendo todos eles superiores aos registados nas restantes leguminosas cultivadas e só ultrapassados pelos teores lipídicos da soja e do amendoim (CARROUÉ *et al.* ,1992; DIXON e HOSKING, 1992). A concentração de lípidos nos tremoços representa assim uma importante contribuição para o seu teor energético.

3.4. Alcalóides

Os alcalóides são compostos heterocíclicos azotados não proteicos, com propriedades alcalinas, existentes em várias espécies vegetais como produtos do metabolismo secundário

(VAN SOEST, 1982). Em todas as espécies do género *Lupinus* encontram-se alcalóides do tipo quinolizidínico, também presentes noutras leguminosas (WINK, 1984; BIRCK, 1985) e somente a tremocilha apresenta um alcalóide do tipo indol, a gramina, também presente em algumas espécies de gramíneas (CULVENOR, 1973). Os alcalóides dos tremoceiros são neurotóxicos e transmitem sabor amargo à planta. Outros alcalóides de efeito tóxico relevante, presentes em espécies de interesse alimentar para os ruminantes compreendem a perlolina e a ergovalina da festuca alta e a gramina, beta-carbolinas e triptamina da alpista encarnada (*Phalaris arundinacea* L.). Outros alcalóides tóxicos são ingeridos acidentalmente pelos animais, geralmente em pastoreio, e de entre estes salientam-se os alcalóides pirrolizidínicos de *Senecio* spp. e outros alcalóides presentes na cicuta (conicina), alfavaca (swainsonina) e figueira-do-inferno (hiosciamina) (Quadro 3.2.).

3.4.1. Síntese dos alcalóides

Todos os órgãos dos tremoceiros contêm alcalóides, mas a sua síntese só ocorre nos tecidos verdes, especialmente nas folhas (WINK, 1990), desenrolando-se a maior parte das reacções no estroma dos cloroplastos (HARTMANN, 1988). Os alcalóides quinolizidínicos são sintetizados a partir do aminoácido lisina, através do seu produto de descarboxilação, a cadaverina. Três moléculas de lisina originam outras três de cadaverina, que se combinam para produzir a estrutura tetracíclica do alcalóide lupanina, o qual parece ser o precursor de todos os outros alcalóides quinolizidínicos (WINK, 1984; HARTMANN, 1988). A estrutura básica destes alcalóides é o anel bicíclico de quinolizidina, que ocorre na lupinina. Angustifolina, albina e citisina são tricíclicos, enquanto lupanina, esparteína e anagirina possuem uma estrutura tetracíclica (CHEEKE e KELLY, 1989). A gramina, tal como os alcalóides da cravagem do centeio, pertence ao grupo dos alcalóides indólicos, que com mais de 1500 moléculas diferentes, constitui o maior grupo de alcalóides conhecido (BICK, 1985). Segundo CULVENOR (1973) a síntese da gramina é feita a

Quadro 3.2. Alcalóides presentes em algumas espécies vegetais e sua toxicidade para os ruminante em condições de campo.

Alcalóide	Espécie	Toxicidade	Autor
Nicotina	Tabaco	?	1
Jacobina	<i>Senecio jacobea</i>	Hepatotóxico	2
Isopeletearina	Romãzeira	?	1
Morfina, codeína, tebaina	<i>Papaver somniferum</i>	?	1
Colchicina	<i>Liliacea spp.</i>	?	1
Betacarbolinas, triptamina	<i>Phalaris tuberosa</i>	Neurotóxicos	1
Ergovalina e ergovalinina	Cravagem do centeio e festuca	Neurotóxicos	1,5,12
Cinchonina	Oliveira	?	1
Deoxinufaridina	Nenufar	?	1
Solanina	Batata	?	1
Buxosina	Buxo	?	1
Tomatidina	Tomate	-	1
Anagirina	Tremoços americanos	Mutagénico	3
Piperidina	Pimenta	?	1
Hordenina	Cevada, Milho	-	4
Betaina, Colina, Hordenina	Arroz	-	5
Lolina, Perlolina	Festuca	Fotosensibilizante	5
Gramina, beta-carbolina	<i>Phalaris arundinacea</i>	Neurotóxicos	5,13
Perlolina, Halostaquina	Azevém perene	Neurotóxico	5

Quadro 3.2. Alcalóides presentes em algumas espécies vegetais e sua toxicidade para os ruminante em condições de campo (continuação).

Alcalóide	Espécie	Toxicidade	Autor
Esporidesmina	Azevém perene	Fotosensibilizante	5
1-acetoxy-6-amino-octahydro-indolizidina	Trêvo encarnado (feno)	Salivante	5
Heliotropina, Heliotrina	<i>Heliotropum europaeum</i>	Hepatotóxico	6
Cafeína	Café	?	7
Hiosciamina	Figueira do inferno	Neurotóxico	7,11
Esparteína	Giesta	?	8
Conicina	Cicuta	Mutagénico	9,10
Swainsonina	Alfavaca	Mutagénico, Abortivo	10
		Neurotóxico	
Ciclopamina, cicloposina	<i>Veratrum</i> spp.	Mutagénico	10
Anabasina	<i>Nicotiana glauca</i>	Mutagénico	10
Teobromina	Chá	-	13

1- BICK, 1985. 2- CRAIG *et al.* 1992. 3-DAVIS e STOUT, 1986. FRANK *et al.*, 1990. 5-CULVENOR, 1973. 6-JONES *et al.* ,1981. 7-PAPADOYANNIS e von BAER, 1993. 8-HARTMANN (1988). 9-PANTER e KEELER, 1990. 10- KEELER (1984). 11- van KEMPEN *et al.*(1993). 12- WESTENDORF *et al.* (1993). 13- van SOEST (1982)

partir do aminoácido triptófano, como os restantes alcalóides de anel indólico. Durante a frutificação a produção de alcalóides abranda e cessa no final da maturação. Regista-se nesta fase uma migração dos alcalóides para as sementes, os órgãos da planta onde se detectam as maiores concentrações destes compostos (WINK, 1984), o que reflecte o papel de defesa dos alcalóides na estratégia evolutiva dos tremoceiros.

3.4.2. Toxicidade

A função dos alcalóides na planta é conferir-lhe sabor amargo e toxicidade, defendendo-a dos animais, insectos e microorganismos (WINK, 1984) e o reconhecimento dos alcalóides representa uma contra-adaptação por parte dos animais que não sofrem assim os seus efeitos tóxicos (CULVENOR, 1973). O papel de defesa dos alcalóides dos tremoceiros é confirmado por vários estudos (BACKER e NEHRING, 1965; WINK, 1984 e KRZYMANSKA *et al.*, 1988 citados por GULEWICZ *et al.*, 1994) que apontam para uma maior resistência das variedades amargas às infecções e outras agressões do meio ambiente e para aumentos significativos das concentrações de alcalóides durante situações de *stress*, como no caso de rotura de tecidos e infecções por vírus, bactérias ou fungos. De acordo com WINK (1987), plantas de variedades pobres em alcalóides cultivadas conjuntamente com outras de variedades amargas são selectivamente consumidas por coelhos, afídios e outros insectos. As propriedades insecticidas e repelentes são aproveitadas por alguns insectos comensais, tal como o afídio dos tremoços *Macrosiphum albifrons* que ao consumir a planta usa os alcalóides para a sua própria protecção, defendendo-se assim dos seus predadores (WINK e ROMER, 1986, BURNOVILLE *et al.*, 1988, EMRICH e WINK, 1992 e WINK, 1993 citados por HILL e PASTUSZEWSKA, 1993). Normalmente, a maioria dos insectos são repelidos ou mortos pelos alcalóides quinolizidínicos, variando as concentrações entre 0,5 - 12 mM no caso da lupanina. Caracois e lesmas alimentam-se nas variedades doces de tremoceiros mas não tocam nas

folhas das variedades amargas, com teores em alcalóides compreendidas entre 0,7 - 7 mM (Dose Letal (DL) 50) (WINK, 1984).

A fragmentação das folhas dos tremoceiros provoca um aumento local de 2 a 4 vezes a concentração normal de alcalóides o que diminui o risco de infecção microbiana dos tecidos (HARTMANN, 1984). Com efeito, concentrações de lupanina e esparteína entre 0,3 e 7 mM inibem o desenvolvimento de bactérias gram-positivas e gam-negativas enquanto os fungos são sensíveis a DL50 mais elevadas, situadas entre 10 e 50 mM. A DL 50 para a lupanina e esparteína em algumas bactérias aeróbias é, respectivamente, 5 e 0,5-3Mm. Estas concentrações inibitórias do desenvolvimento microbiano são registadas *in vitro*, sendo geralmente inferiores às concentrações em alcalóides registadas nas variedades amargas (WINK, 1984). Os dados referentes à influência dos alcalóides dos tremoceiros sobre a flora ruminal deverão ser bastantes escassos. Sabe-se, no entanto, que a gramina, presente em pequena quantidade na tremocilha e na alpista encarnada (*Phalaris arundinacea* L.), e outros alcalóides da mesma família, inibem a actividade celulolítica *in vitro*, embora em concentrações superiores às existentes nas plantas (van SOEST, 1982), não influenciando a sua digestibilidade *in vitro* (MARTEN *et al.*, 1981 cit. por WITTENBERG *et al.*, 1992) ou *in vivo* (WITTENBERG *et al.*, 1992). Também a perlolina, um dos principais alcalóides da festuca alta, inibe o crescimento microbiano e reduz a digestibilidade da celulose *in vitro* (BUSH *et al.*, 1970 cit. por van SOEST, 1982) tendo WESTENDORF *et al.* (1992) encontrado digestibilidades aparentes da ADF e NDF significativamente superiores nas variedades de festuca pobres em alcalóides.

Existem outros microorganismos que não só resistem ao efeito tóxico dos alcalóides quinolizidínicos como os utilizam como fonte de nutrientes. Segundo RYBICKA (1964) duas espécies de bactérias da família *Corynebacteriaceae* capazes de decompor lupinina e esparteína, utilizando-as como fonte de carbono e azoto foram isoladas no solo de um campo de tremocilha. A bactéria *Pseudomonas lupanini* é capaz de levar a cabo a oxidação da lupanina, utilizando-a como a sua única fonte de azoto e carbono (MOZEJKO-

TOCZKO, 1960). CRAIG *et al.* (1992) registaram igualmente no rúmen de ovinos a destoxificação dos alcalóides pirrolizidínicos de *Senecio jacobaea* por bactérias anaeróbias

Tal como o Homem, a maior parte dos vertebrados não se adaptam ao consumo de variedades de *Lupinus* ricas em alcalóides devido ao seu sabor amargo e toxicidade (WINK, 1984). Esparteína e lupanina influenciam os receptores da acetilcolina (WINK e TWARDOWSKI, 1990 cit. por WINK, 1990) o que explica o facto dos principais sintomas de intoxicação por alcalóides quinolizidínicos registados em animais de laboratório, sejam do foro neuro-respiratório, tal como depressão, respiração acelerada, tremores, convulsões e paragem respiratória. Os alcalóides actuariam ao nível dos gânglios, inibindo a transmissão do impulso gangliónico do sistema nervoso simpático (KINGSBURY, 1964 e YOVO *et al.*, 1984 cit. por CHEEKE e KELLY, 1989) e a conexão neuro-muscular (MAZUR *et al.*, 1966 cit. por HILL e PASTUSZEWSKA, 1993). De acordo com estes autores a esparteína seria cerca de 2,5 vezes mais tóxica do que a lupanina, com DL 50 de 60 e 159 mg .Kg⁻¹, respectivamente.

3.4.3. Ocorrência

As espécies de *Lupinus* com sementes pequenas, como a tremocilha, apresentam concentrações mais baixas de alcalóides do que as de sementes gradas (WINK, 1987). De todas as espécies de tremoceiros cultivados, a tremocilha é a que apresenta a menor concentração de alcalóides nos seus génotipos amargos (até 1,2 %) (MUZQUIZ *et al.* . 1982), enquanto os tremoços possuem concentrações mais elevadas (3-5 %) (HACKBARTH e PAKENDORF, 1970 cit. por HILL, 1977; HARTMANN, 1988) apresentando o TFE uma concentração intermédia (MUZQIZ *et al.*, 1982). As variedades doces de tremoceiros, obtidas por melhoramento genético, devem possuir uma concentração máxima de alcalóides de 0,05 % na MS da semente, não se tendo ainda conseguido a obtenção de tremoceiros isentos daquelas substâncias.

As diferentes espécies de *Lupinus* cultivadas apresentam variações quantitativas e qualitativas do seu conteúdo em alcalóides (Quadro 3.3.). Na tremocilha predomina o alcalóide quinolizidínico lupinina, embora BURACZEWSKA *et al.* (1993) tenham encontrado uma predominância do alcalóide indólico gramina, na variedade polaca *Popiel* de baixo teor em alcalóides (0,13%). A esparteína é o segundo alcalóide mais importante na tremocilha, mas pode ser ultrapassada pela gramina como no caso da variedade anteriormente referida. É relevante o facto de MUZQUIZ *et al.* (1982) não terem encontrado qualquer vestígio de esparteína numa variedade espontânea amarga de tremocilha do SW espanhol (1,2 % de alcalóides) e praticamente a mesma quantidade de lupinina e esparteína na tremocilha brava portuguesa, dois ecótipos geograficamente vizinhos. O alcalóide gramina não é detectado em algumas variedades de tremocilha (MUZQUIZ *et al.*, 1982; WINK, 1990; WINK, 1984) enquanto na variedade *Popiel* é o alcalóide predominante. Foi o único alcalóide detectado, a par da lupinina, embora em baixa quantidade, na tremocilha brava do SW espanhol atrás referida. No TFE predomina o alcalóide lupanina, logo seguido da angustifolina e 13-hidroxilupanina. Segundo CULVENOR (1973) nesta espécie assinalou-se ainda a presença dos alcalóides lupinina, isolupanina e matrina. A lupanina também é o alcalóide predominante no tremoço vulgar, logo seguido da 13-hidroxilupanina. Albina, multiflorina e ester-alcalóides são outros alcalóides minoritários já assinalados nesta espécie (WINK, 1990).

A variação do teor em alcalóides dentro de cada espécie, para além de comandada geneticamente, também tem origem em factores ambientais. De acordo com GLADSTONES (1988) os níveis de alcalóides de uma espécie podem variar várias vezes, dependendo das condições de cultivo. LOVKOVA *et al.* (1984), por exemplo, conseguiram baixar o teor em alcalóides da tremocilha com a aplicação de cobre no solo e MIRONENKO (1958) cit. por CULVENOR (1973) conseguiu baixar o teor em alcalóides na tremocilha e no TFE baixando as doses de fósforo aplicados nas culturas e subindo as

doses de potássio e molibdênio, não encontrando, no entanto, qualquer resposta às variações de cobre.

Quadro 3.3. Alcalóides presentes nas principais espécies de tremoceiros cultivados (% alcalóides).

Espécie	Alcalóides	Autor
Tremocilha	Lupinina > Esparteína > Gramina	1
	Lupinina, Esparteína, Gramina, Hidroxilupanina, Lupanina	2
	Lupinina (40-70%) > Esparteína (30-50%)	3
	Lupinina (60%) > Esparteína (30%) > Lupanina (<1%)	4
Tremocilha "Juno" (0,02 %)	Lupinina > Gramina > Esparteína	5
Tremocilha "Popiel" (0,13 %)	Gramina > Esparteína > Lupinina	6
Tremocilha brava ecótipo português (0,8 %)	Lupinina (50%), Esparteína (50%)	6
Tremocilha brava ecótipo espanhol (1,2 %)	Lupinina > Gramina	6

1 - HILL (1977). 2 - CULVENOR, 1973. 3 - WINK (1990). 4 - WINK (1994).
5 - BURACZEWSKA *et al.* (1993). 6 - MUZQUIZ *et al.* (1982).

Quadro 3.3. Alcalóides presentes nas principais espécies de tremoceiros cultivados (% alcalóides) (continuação).

TFE	Angustifolina, Hidroxilupanina, Lupanina, Lupinina, Isolupanina, Matrina	1
TFE "Sur"(0,05%)	Lupanina (50-80%) > 13-Hidroxilupanina (10-20%) > Angustifolina (5-20%)	2
Tremoço "Wat" (0,1%)	Lupanina > 13-Hidroxilupanina > multiflorina	2
Tremoço	Lupanina (50-80%) > 13-Hidroxilupanina (5-15%) > > Albina (5-15%) > Multiflorina (3-10%) > Ester-alcalóides (1-5%)	3

1 - CULVENOR, 1973. 2 - BURACZEWSKA *et al.* (1993). 3 - WINK (1990).

4. O grão dos tremoceiros na alimentação animal

O grão dos tremoceiros, como os das restantes leguminosas cultivadas entre nós, não é muito utilizado na produção animal intensiva em virtude dos baixos preços do bagaço de soja nos mercados mundiais. Contudo, vários estudos demonstram que é possível os tremoços substituírem, no todo ou em parte, o bagaço de soja na alimentação animal sem que ocorram efeitos significativos sobre a produtividade. Já no que respeita à alimentação de ruminantes em condições extensivas, os tremoços encontram-se presentes onde quer que o clima mediterrânico se conjugue com solos ácidos e grosseiros. Na bibliografia consultada registaram-se poucas referências a situações de intoxicação induzidas pelo consumo de tremoceiros amargos, o que se poderá dever ao facto do sabor amargo impedir os animais de consumirem doses excessivas de alcalóides.

4.1. Suínos

A correcção do baixo teor em aminoácidos essenciais, principalmente metionina, não é suficiente para tornar o grão dos tremoceiros um suplemento proteico bem utilizado pelos suínos, pois esta espécie apresenta uma maior sensibilidade aos alcalóides quinolizidínicos e aos alfa-galactósidos do que as restantes espécies de interesse zootécnico. Em alguns dos trabalhos consultados torna-se mesmo difícil separar os efeitos negativos destes dois nutrientes.

A ingestão sofre uma redução quando a concentração de lupanina atinge 0,03 % da dieta (HILL e PASTUZESKA, 1993), valor que para GODFREY *et al.* (1985) se situaria antes em 0,2%. Estes diferentes resultados poder-se-iam dever à diferença de idades entre os suínos dos dois trabalhos, factor que é determinante do grau de sensibilidade, pois os animais jovens são mais sensíveis ao sabor amargo do que os adultos (CHEEK e KELLY, 1989). Segundo estes autores, o consumo de variedades doces de tremoço pelos suínos origina uma quebra do crescimento e provoca recusa do alimento e vômito, tendo GODFREY *et al.* (1985) demonstrado que a produtividade dos leitões declina à mínima presença de alcalóides na ração. Não se encontrou na bibliografia qualquer referência a níveis de alcalóides na dieta a partir dos quais os animais mostram sintomas de intoxicação, o que poderá ser explicado pela fraca apetência das dietas com maior concentração naqueles compostos. Da mesma maneira, os autores consultados não referem qualquer explicação para o facto dos suínos serem mais sensíveis aos alcalóides quinolizidínicos do que os ruminantes.

À excepção dos ruminantes, as leguminosas produzem flatulência na maior parte dos animais, devido à presença de alfa-galactósidos (rafinose, verbascose e estaquise) que não são digeridos por deficiência da enzima alfa-1,6-galactosidase na mucosa intestinal. Em virtude disso, os oligossacáridos não são absorvidos e no intestino grosso são fermentados pelas bactérias intestinais, liberando-se grande quantidade de gases, principalmente dióxido de carbono, que perturbam o trânsito intestinal. Nos ruminantes, a flora ruminal possui alfa-1,6-galactosidases pelo que utiliza os alfa-galactósidos para a obtenção de energia,



impedindo a sua progressão até ao intestino grosso (MUZQUIZ, 1992; CARROUEÉ *et al.*, 1992).

Os níveis óptimos de incorporação do grão dos tremoceiros doces nas dietas para suínos, encontrados na bibliografia, variam bastante, o que poderá reflectir os diferentes níveis que os alcalóides e os alfa-galactósidos podem atingir nas sementes, patentes nas revisões efectuadas por BRILLOUET (1984) e CARROUEÉ *et al.* (1992). Em porcos desmamados a inclusão de tremoço doce com 0,02 a 0,06 % de alcalóides, na dieta provoca sempre uma redução do consumo, directamente proporcional ao nível de incorporação, segundo CASTAING *et al.* (1982) e QUEMERE *et al.* (1984). Para CAZES *et al.* (1982) e GROSJEAN (1984) o nível de incorporação máximo de tremoço doce com 0,06 % de alcalóides situar-se-ia nos 5%. Para os suínos em crescimento-acabamento os níveis de incorporação máximos de grão obtidos pelos diversos autores são mais variáveis e parecem reflectir diferentes teores de alcalóides e alfa-galactósidos. Enquanto em trabalhos realizados em França, com a variedade *Kalina* (0,06 % de alcalóides) de *L. albus*, a taxa de incorporação limite se situaria em 5 % (BOURDON *et al.*, 1980; CASTAING *et al.*, 1982; CAZES *et al.*, 1982; GROSJEAN, 1984) os trabalhos realizados com variedades australianas de *L. angustifolius*, com menos de 0,01 % de alcalóides, mostram que o seu nível de incorporação pode ir até 28% sem quebra de produtividade (TAVERNER, 1975; BATTERHAM, 1979). Como os autores não registam qualquer problema de flatulência, é possível que estas variedades também tenham níveis de alfa-galactósidos mais baixos. O efeito negativo dos alcalóides torna-se, no entanto, bem patente logo que o seu teor na semente sobe. Uma outra variedade de *L. angustifolius*, mas com uma concentração superior de alcalóides (0,27 %), provoca uma quebra significativa do ganho médio diário e índice de conversão, comparativamente ao controle de bagaço de soja, quando o nível de incorporação é apenas de 6 - 8 % da MS da dieta (HALE e MILLER, 1985).

4.2. Aves

As aves parecem ser menos sensíveis aos alcalóides quinolizidínicos do que os suínos, o que se poderá dever ao seu menos apurado sentido do paladar. No entanto, verifica-se, tal como no caso dos suínos, que a produtividade dos animais decresce sempre que o nível de incorporação de grão amargo na dieta aumenta e que é possível substituir proporções consideráveis de bagaço de soja, por tremoço doce desde que se faça uma adequada suplementação com aminoácidos essenciais, pese embora que estes animais também são sujeitos a problemas de flatulência.

O tremoço doce pôde substituir parte do bagaço de soja a um nível de incorporação de 30%, numa dieta suplementada com aminoácidos essenciais, sem efectar a produtividade de perus jovens (ERICKSON e ELLIOT, 1984 cit. por ERICKSON, 1985) e pode mesmo ser a única fonte proteica da dieta de frangos e galinhas poedeiras desde que devidamente suplementado com lisina, aminoácidos sulfurados, triptófano e ácido fólico (LACASSAGNE, 1984). No entanto, as aves também são sensíveis aos alfa-galactósidos da dieta, indigestíveis no seu tracto digestivo (MOLINA *et al.*, 1983 cit. por CENTENO *et al.*, 1989) o que poderá explicar o facto de CENTENO *et al.* (1989) terem encontrado forte redução do consumo e crescimento de frangos quando se alimentavam com mais de 20% de tremoço doce numa dieta corrigida com aminoácidos essenciais. Também BURACZEWSKA *et al.* (1993) registaram uma diminuição do crescimento de pintos alimentados com tremoço ou tremocilha doces (< 0,05% de alcalóides) quando o seu nível de incorporação atingiu 30 % da MS de dietas suplementadas com aminoácidos essenciais. GUILLAUME *et al.* (1979) conseguiram alimentar pintos com dietas contendo até 40% de tremoço amargo com 2,12% de alcalóides, embora 1/3 dos animais não tenha sobrevivido por não conseguir ingerir o alimento, quando o nível de incorporação atingiu aquele valor. Níveis de incorporação crescentes de tremoço amargo provocaram uma redução proporcional do crescimento dos animais. Também ANACLETO e RIBEIRO (1984) registaram uma diminuição gradual do aumento médio diário de peso e do consumo quando

sujeitaram pintos a dietas com 0, 3, 6 e 9% de tremocilha brava (0,598 % de alcalóides) suplementadas com metionina.

4.3. Ruminantes

Os ruminantes são os animais de interesse pecuário menos sensíveis aos alcalóides quinolizidínicos, podendo suportar concentrações de alcalóides no alimento que seriam impeditivos do consumo para as outras espécies. Nestes animais, o principal obstáculo à utilização dos tremoço parece residir antes na forte degradabilidade da sua proteína no rúmen, limitante do desempenho produtivo das vacas leiteiras de alto rendimento, quando o tremoço cru se usa como o único suplemento proteico. As produtividades obtidas nos restantes animais, quando são suplementados com tremoço doce, são da mesma ordem das conseguidas quando o suplemento é constituído por bagaço de soja.

4.3.1. Fermentação no rúmen

Como os restantes grãos de leguminosas, o grão dos tremoços também sofre uma extensa degradação quando atinge o rúmen. De acordo com estudos de degradação *in situ*, com uma taxa de fluxo de 0,02/h, mais de 80% da MS do grão dos tremoços é fermentada no rúmen ao fim de 48 h de incubação (DIXON e HOSKING, 1992), valor que segundo SHULTZ *et al.* (1993) sobe para 86 % e 96% no caso do tegumento e cotilédones do tremoço, respectivamente. A fracção proteica desta espécie atinge uma degradabilidade no rúmen de 95%, que baixa para 77% com o aquecimento a 110°C e para apenas 53% com a extrusão a 165°C (BAYOURTHE *et al.*, 1994). Por isso, só uma pequena quantidade de proteína do tremoço cru atinge o intestino delgado, cerca de 21 g/Kg de MS, segundo o sistema PDI, e há um défice de energia fermentescível no rúmen face ao teor proteico do substrato, do que resulta um baixo valor de PDIE: 91 a 141 g/Kg MS (INRA, 1981;

BAYOURTHE *et al.*, 1994). Para além da extrusão, os efeitos negativos da forte degradabilidade da proteína dos tremoços podem ser limitados se os associarmos a alimentos ricos em energia fermentescível e pobres em azoto como a silagem de milho, a polpa de beterraba (ÉMILE *et al.*, 1991) ou o melaço.

4.3.2. Sensibilidade dos ruminantes aos alcalóides

Os ovinos parecem ser a espécie pecuária mais tolerante aos alcalóides, situando-se o limiar de rejeição absoluta do alimento entre os níveis de 2 e 5 % de alcalóides na MS. No entanto, níveis inferiores a 2%, apesar de não serem impeditivos do consumo, poderão limitar a ingestão de MS tornando praticamente inviável a utilização de algumas variedades amargas. Com ovinos em pastoreio num campo de tremoços híbridos *Russel*, com 2% de alcalóides, principalmente lupanina, HILL *et al.* (1993) verificaram que os animais começaram por comer as infestantes no primeiro dia e só no segundo dia iniciaram o consumo dos tremoços, a que estavam plenamente adaptados no final do período de pastoreio. No entanto os animais não se conseguiram a adaptar ao consumo de *L. arboreus*, espécie com 5 % de alcalóides, não indicando no entanto o autor o tipo de alcalóides presente nesta espécie. Estes resultados concordam com os obtidos por outros autores que também estudaram a utilização dos tremoços amargos na alimentação de ruminantes. GUDMUNDSSON e THORSSON (1994) registaram a ingestão de *L. notkatensis* (1,2 a 1,6% de alcalóides, dos quais 80% esparteína e 13% lupanina) por ovinos em pastoreio, apesar dos animais apenas conseguirem satisfazer 30-40% das necessidades de manutenção. Também MADRUGA e BORBA (1994) alimentaram ovinos com forragem verde de tremoço amargo, apesar dos baixos valores de ingestão voluntária que obtiveram (38,97 g MS.KG^{-0,75}), e LANÇA (1992) conseguiu manter uma carga de 40 ovelhas.ha⁻¹ num cultivo de tremocilha brava seca (0,9 % de alcalóides no grão), durante dois meses, sem alteração significativa do peso dos animais, tendo estes consumido mais de metade do grão

disponível (1030 Kg.ha⁻¹) durante os primeiros 20 dias de pastoreio. Os autores não observaram qualquer sintoma de intoxicação nos animais durante os trabalhos anteriormente referidos.

Para além dos tremoços amargos, também algumas variedades de festuca alta rica em alcalóides (perlolina, ergovalina) são mal consumidas pelos ruminantes. De acordo com van SOEST (1992) a festuca alta é a única gramínea cuja ingestão aumenta com a maturação, visto que as plantas jovens possuem mais alcalóides. No entanto, na festuca alta a redução da ingestão não parece dever-se tanto a qualquer sabor desagradável como no caso dos tremoçoceiros, devendo ser antes provocada por um efeito associado da neurotoxicidade dos alcalóides e da sua capacidade inibidora da actividade microbiana celulolítica.

A maior parte dos alcalóides presentes nos tremoçoceiros espontâneos da América do Norte, como a anagirina, são mutagénicos e causam deformações fetais quando ingeridos pelas fêmeas em gestação (MEEKER e KILGORE, 1987). Nas espécies de tremoçoceiros cultivadas não foram contudo detectadas quaisquer concentrações destes alcalóides (KEELER e GROSS, 1980 cit. por KEELER, 1984).

4.3.3. Destino dos alcalóides no ruminante

Os ruminantes são mais resistentes a certos produtos tóxicos do que os monogátricos, pois os microorganismos do rúmen têm a capacidade de os destoxificar. Pelo contrário, a actividade da flora ruminal pode ser prejudicial ao hospedeiro pois também existe uma série de substâncias que são transformadas em toxinas, uma vez chegadas ao rúmen. No grupo de substâncias destoxificadas no rúmen destacam-se os alcalóides pirrolizidínicos do género *Senecio*, os nitritos, o ácido ricinoleico do óleo de castor, a micotoxina ocratoxina A, a toxina do botulismo, o oxalato, os fitoestrogénicos dos trevos, metabolitos da degradação da mimosina e o gossipol do algodão (revisão de DAWSON e ALLISON, 1988) assim

como os alcalóides pirrolizidínicos e de ergotamina da festuca alta (WESTENDORF *et al.* , 1993) e os alfa-galactósidos dos tremoço e da tremocilha (CARROUÉE *et al.*, 1992).

De entre os processos de bioativação destacam-se a hidrólise dos glucosinalatos das crucíferas com produção de goitrina, a formação de cianeto pela hidrólise dos glicósidos cianogénicos, a síntese de dimetil-disulfido após a ingestão de couve, a produção de compostos nitrogenados altamente tóxicos a partir da miserotoxina das alfavacas (*Astragalus* spp.), a formação do pulmonotóxico 3-metilindole pela fermentação do triptófano e a redução dos nitratos a nitritos (CARLSON e BREEZE, 1984).

Uma maior resistência a certas toxinas pelos ruminantes também se poderá dever à sua destoxificação pelo metabolismo do animal. A revisão feita por MANDOLINI (1992) cit. por van KEMPEN, *et al.* (1993) indica que os ovinos toleram doses dos alcalóides da figueira-do-inferno (*Datura stramonium*) que normalmente são tóxicas para os monogástrico, devido a possuírem uma maior actividade da enzima atropina estearase. Do mesmo modo, as ovelhas são mais resistentes do que os bovinos à intoxicação por alguns alcalóides pirrolizidínicos de *Senecio* spp., apesar de não os metabolizarem no rúmen, o que leva CARLSON e BREEZE (1984) a pensar que estas diferenças interespecificas se poderão dever a diferentes taxas de metabolização hepática dos alcalóides.

Sabe-se que a destoxificação ruminal dos alcalóides hepatotóxicos de *Senecio* spp., heliotrina e lasciocarpina, é operada por bactérias anaeróbias de entre as quais se identificou *Peptostreptococcus heliotrinreducans*. É um organismo que não fermenta glúcidos, obtendo antes a sua energia a partir da redução da heliotrina, mas também do fumarato e dos nitratos (LANIGAN, 1976 cit. por DAWSON e ALLISON, 1988). A capacidade da flora para metabolizar estes alcalóides é influenciada pela sua presença na dieta, e os animais que se alimentam de pastagens onde existem plantas de *Senecio* spp. têm uma maior capacidade de destoxificação do que outros alimentados com palha de cereais (CARLSON e BREEZE, 1984). Na bibliografia consultada não se encontrou qualquer referência a uma possível destoxificação dos alcalóides quinolizidínicos, o que permitiria explicar a

capacidade dos ruminantes ingerirem quantidades destes alcalóides que são normalmente tóxicos para os monogástricos.

Os trabalhos sobre o destino dos alcalóides no corpo dos animais consumidores são escassos, particularmente no que respeita aos alcalóides dos tremoços. Após absorção intestinal os alcalóides podem sofrer destoxificação no fígado e, visto que podem apresentar-se em formas salinas, portanto solúveis em água, eliminação pela urina. Estudos feitos em ratos e coelhos revelaram a metabolização da esparteína em 2-dihidroesparteína no fígado e é sob esta forma que o alcalóide é excretado na urina humana, embora algumas pessoas o excretem inalterado (OHNHAUS *et al.*, 1985). O cavalo excreta lupanina inalterada na urina, tal como o rato (HAYWOOD, 1978 e WITTENBURG e NEHRING, 1965 cit. por CHEEKE e KELLY, 1989). O facto de se terem verificado deformações no feto de uma mulher consumidora de leite de cabras alimentadas com tremoços selvagens americanos, ricos no alcalóide quinolizidínico mutagénico anagirina, levou MEEKER e KILGORE (1987) a supor que os alcalóides dos tremoços serão também eliminados sem transformação significativa no leite dos ruminantes.

4.3.4. Os tremoçoceiros na alimentação intensiva de ruminantes

Na alimentação intensiva de ruminantes utilizam-se unicamente variedades pobres em alcalóides para se minimizar os riscos de ocorrer uma redução de ingestão do alimento pela presença de quantidades significativas destas substâncias. Nos trabalhos levados a cabo com ruminantes registou-se principalmente a utilização de variedades de tremoço e TFE, não se identificando qualquer efeito negativo da sua incorporação na dieta, em substituição de bagaço de soja. No entanto, como as proteínas dos tremoçoceiros são rapidamente degradadas no rúmen, tornam-se inadequadas para a suplementação proteica de animais com elevadas necessidades como as vacas leiteiras. Neste caso, o tratamento do tremoço por tanagem ou extrusão permite melhorar significativamente a produção de leite.

4.3.4.1. Animais em lactação

GUILLAUME *et al.* (1987), bem como ÉMILE *et al.* (1991) e MAY *et al.* (1993) não encontraram diferenças significativas na produção de leite de vacas leiteiras alimentadas com bagaço de soja ou tremoço doce. No entanto, no trabalho de GUILLAUME *et al.* (1987) a produção de leite quando corrigida pelo teor butírico, já foi significativamente superior nos animais alimentados com bagaço de soja, diferença que os autores atribuem à maior fermentescibilidade da proteína dos tremoços. Registraram igualmente uma menor ingestão de MS nas vacas suplementadas com tremoços. A produção de leite sobe de maneira significativa quando o tremoço sofre extrusão, circunstância em que o seu valor como suplemento ultrapassa o tremoço cru e mesmo o bagaço de soja (ÉMILE *et al.*, 1991; BENCHAAAR *et al.*, 1991). A forte fermentescibilidade das proteínas do grão dos tremoçoceiros foi confirmada por FREER e DOVE (1984) cit. por HILL (1990), KYBELOLAUD *et al.* (1991) e BAYOURTHE *et al.* (1994) e a menor concentração proteica do leite dos animais alimentados com tremoço pode ser uma sua consequência (GUILLAUME *et al.*, 1987; ÉMILE *et al.*, 1991). Do trabalho destes autores conclui-se igualmente que, devido à sua capacidade de ingestão, os bovinos digerem mal os tremoços inteiros, excretando uma grande parte inalterada nas fezes.

A suplementação de caprinos leiteiros com tremoço doce revelou-se igualmente satisfatória, em estudos efectuados por autores franceses. MASSON (1981) comparou o valor alimentar do grão de quatro proteaginosas - faveta, ervilha, tremoço e soja - e concluiu que os animais consumiam melhor o tremoço e a soja, o que se reflectiu numa mais elevada produção de leite. Também o teor proteico e butiroso do leite foi maior nestes tratamentos. BROQUA *et al.* (1983) suplementaram cabras leiteiras, alimentadas à base de silagem de milho, com 500 g de tremoço partido e 200 g de cevada. A produção de leite

e a sua composição foram semelhantes às de outros animais suplementados com 300 g de bagaço de soja e 400 g de cevada

4.3.4.2. Animais em crescimento

Na maior parte dos estudos efectuados com animais em crescimento não se registou qualquer diminuição da produtividade associada à inclusão de tremoços doces na dieta. A única excepção parece ser a dos borregos, que poderão baixar a ingestão do suplemento de tremoço, o que se poderá dever ao teor em alcalóides de variedades ditas doces ser demasiado elevado, ou a uma maior dificuldade do animais jovens em mastigarem os duros grãos dos tremoços, quando estes são fornecidos sem qualquer tratamento prévio.

Na alimentação intensiva de borregos GIOVANNI (1981), CAZES (1984) e KUNG *et al.* (1991) concluíram que o tremoço doce pode substituir completamente o bagaço de soja, tendo os dois primeiros autores registado mesmo um aumento do ganho médio diário e do índice de conversão dos animais suplementados com tremoço. A diminuição da fermentescibilidade da proteína no rúmen, pelo aquecimento a 130 °C, não originou diferenças significativas no ganho médio diário dos animais, que foi semelhante a outros suplementados com tremoço cru ou bagaço de soja (KUNG *et al.* 1991). GONZÁLEZ *et al.* (1984) compararam o tremoço não só com o bagaço de soja mas também com o bagaço de girassol, e não encontraram igualmente qualquer diferença na resposta dos animais aos diferentes suplementos. Num trabalho levado a cabo na Austrália por KENNEY (1980a), com TFE doce, alimentaram-se borregos *ad libitum* com 6 tratamentos constituídos por quantidades crescentes deste tremoço (0 a 100%) em substituição de aveia e 10% de feno, tendo o consumo e o ganho médio diário dos animais sido directamente proporcional à quantidade de leguminosa na ração.

Em todos os trabalhos com borregos referidos, exceptuando este último, os tremoços foram grosseiramente moidos. Em dois ensaios levados a cabo com tremoço inteiro (ITCF,

1982 cit. por LACASSAGNE, 1984) registaram-se quebras acentuadas da velocidade de crescimento, 15 a 22% inferiores à observada no tratamento de bagaço de soja e que se ficaram a dever a uma menor ingestão da dieta. A forma de apresentação da dieta poderia ter influído nos resultados obtidos apesar do ITCF (1981) cit. por LACASSAGNE (1984) ter obtido um bom resultado numa experiência levada a cabo com tremoços inteiros e FAURIE *et al.* (1992) cit. por CARROUÉE *et al.* (1992) não terem encontrado qualquer diferença entre o consumo e a digestibilidade do tremoço inteiro ou moido, em borregos. Também o teor em alcalóides destes tremoços pode ser responsável por baixas ingestões, uma vez que o teor em alcalóides pode variar bastante com os factores ambientais.

Nos trabalhos realizados com bovinos em crescimento a suplementação constituída por tremoço ou TFE doces dá resultados comparáveis aos do bagaço de soja e, contrariamente ao que se verificou em vacas leiteiras, os animais em crescimento aproveitam tão bem o grão inteiro como moido. Na engorda de novilhos o tremoço pode substituir o bagaço de soja, sem alteração do ganho médio diário dos animais (HUGUET *et al.*, 1983; RAYMOND e SEROUX, 1984; EMILE *et al.*, 1988) ou mesmo levar a resultados significativamente superiores (ÉMILE *et al.*, 1991). Também SCHWARZ e KIRCHGESSNER (1989) cit. por HILL (1990) compararam a tremocilha doce com a fava, a ervilha e o bagaço de soja como suplemento para novilhos alimentados com dietas isoazotadas à base de silagem de milho, sem encontrarem qualquer diferença entre os ganhos médios diários dos animais de cada tratamento. FUKAMCHI (1986) cit. por HILL (1990) não encontrou igualmente qualquer diferença entre o desempenho produtivo de vitelos suplementados com 13% de TFE ou bagaço de soja desde os 150 aos 700 Kg. Tão pouco se registaram quaisquer diferenças entre a qualidade da carne e a composição das carcaças.

A moenda do grão parece não ser necessária para que seja bem consumido e aproveitado pelos animais (HAWTHORNE e FROMM, 1977; HUGUET, 1984 cit. por

LACASAGNE, 1984; ÉMILE *et al.*, 1991). Os últimos autores chegaram, inclusivamente, a obter resultados superiores com o grão inteiro.

4.3.5. Os tremoceiros e a alimentação dos ruminantes no sequeiro

Utilizam-se os tremoceiros secos como pastagem, durante o Verão (agostadouros), em muitas regiões de clima mediterrânico e solos ácidos do Sul de Portugal e de Espanha assim como da África do Sul e Austrália. Como já foi referido, nestas condições os animais dispõem sobretudo de alimentos com baixo teor proteico e EM, como as pastagens secas, restolhos e palhas de cereais, pelo que os tremoceiros secos consumidos *in situ* constituem uma fonte barata e adequada de azoto e fibra digestível, sem teores em amido que diminuam a digestibilidade da fibra ou que provoquem acidose láctica, como acontece frequentemente nos restolhos de cereais. Nas regiões de cariz mediterrânico da Austrália utilizam-se estes agostadouros durante o *flushing* dos reprodutores ovinos, na alimentação de ovelhas em final da gestação, no arranque de borregos após e durante o desmame e na engorda e acabamento dos animais.

Em Portugal e Espanha a tremocilha é a espécie de *Lupinus* mais utilizada para agostadouro (CORZO, 1986; ARAGÓN, 1987), sendo assim consumida por bovinos, suínos e sobretudo pelos pequenos ruminantes, geralmente em regime de pastoreio intermitente associado aos restolhos e pastagem natural seca. Neste regime, os criadores de gado sabem empiricamente que os animais consomem maior quantidade de palhas, pasto seco e espécies lenhosas (no caso dos caprinos).

Na Austrália utiliza-se principalmente o agostadouro de TFE para a alimentação de ovinos, embora os animais também aproveitem os restolhos da lupinicultura, bastante desenvolvida nestas regiões. Existem também notícias de que muitos agricultores espalham os tremoços com um distribuidor centrífugo sobre os restolhos de cereais e pastos secos, aproveitando a facilidade com que os ovinos conseguem ingerir estes grãos quando

dispersos pelo solo, notando-se que esta suplementação melhora o aproveitamento da fibra da dieta e aumenta o seu consumo (NELSON e DELANE, 1990). Não é pois de estranhar que os principais trabalhos levados a cabo sobre o valor alimentar dos tremoceiros para os ruminantes tenham sido realizados por autores australianos. Para SMITH (1986) o grão dos tremoceiros estimula os ruminantes a ingerirem maiores quantidades de forragem de baixa qualidade e, segundo PRESTON e LENG (1987), fornecem sobretudo azoto fermentável, aminoácidos e fibra digestível para os microorganismos do rúmen. Colmatar-se-ia o baixo teor destes nutrientes nas palhas, o que favorece o desenvolvimento microbiano e a manutenção de níveis populacionais necessários a uma eficiente colonização dos substratos fibrosos. O trabalho de SMITH e KENNEY (1987) cit. por PRESTON e LENG (1987) é particularmente elucidativo deste aspecto: ovelhas alimentadas com pasto seco (5-7% PB e 43-49% D) aumentaram a sua ingestão em 42% quando foram suplementadas com 85 g/dia de TFE e bovinos suplementados com 900 g/dia aumentaram a ingestão da pastagem em 11%.

KNIGHT *et al.* (1975) e KENNEY (1980b) sugerem que, em condições de campo, também deve haver uma importante quantidade da proteína ingerida que escapa à proteólise ruminal e é absorvida nos intestinos. Um suplemento de *flushing* constituído por TFE aumentou significativamente a taxa de prolificidade de ovelhas, comparativamente a um tratamento constituído por cevada e ureia, que forneceu mais 25% de energia e a mesma quantidade de azoto (KNIGHT *et al.* ,1975). KENNEY (1980b) registou um aumento paulatino e significativo da taxa de sobrevivência de borregos e do seu peso vivo quando suplementou ovelhas antes da parição com aveia (13 % PB) e quantidades crescentes de TFE. Também para TELONI *et al.* (1989) o aumento das concentrações plasmáticas de glucose (130%) em ovelhas suplementadas com 750 g diários de tremoços, comparativamente a uma dieta de manutenção constituída por feno e aveia, parece indicar que parte da sua proteína é encaminhada para a neoglucogénese, com o aumento da produção de propionato no rúmen a contribuir para apenas 29% da glucose produzida.

Assim, o efeito positivo de um suplemento de tremoços durante o Verão, englobaria não só uma mais eficiente digestão microbiana dos alimentos fibrosos de baixa qualidade, mas também produções de glucose, a partir do catabolismo de aminoácidos da dieta, que levam a uma maior eficácia de aproveitamento do acetato produzido no rúmen a partir daqueles alimentos.

4.3.5.1. Valor alimentar dos agostadouros de tremoceiros

O valor alimentar dos agostadouros de tremoceiros depende principalmente da quantidade de semente produzida: os agostadouros que originam maiores produções animais são os que contêm maiores quantidades de sementes (ARNOLD *et al.*, 1976; ARNOLD e WALLACE, 1977). Os pequenos ruminantes encontram-se mais adaptados ao pastoreio dos agostadouros pela facilidade com que seleccionam as sementes espalhadas pelo solo. Os trabalhos em que ALLDEN e GEYTENBEEK (1984) compararam o crescimento de bovinos e ovinos nos agostadouros de várias leguminosas - favas, TFE, chícharo, ervilha e trevo subterrâneo - mostram que os bovinos crescem melhor nas espécies de sementes maiores ou naquelas que as retêm nas vagens, como é o caso das favas. Os tremoços conservaram o seu grão nas vagens no início do pastoreio e durante este período os bovinos aumentaram de peso rapidamente, mas logo que as vagens se abriram espalhando as sementes pelo solo o crescimento parou. As vagens dos chícharos e ervilhas perderam o grão muito cedo e este ficou inacessível para o bovinos. A velocidade de crescimento destes animais só superou a dos ovinos no agostadouro de trevo subterrâneo, mas aqui o factor determinante não deveria ter sido a quantidade de semente presente na pastagem.

Nas regiões de clima mediterrânico da Austrália, a lupinose é uma doença frequente nos animais que pastam os agostadouros de tremoceiros, exercendo uma influência determinante no seu valor alimentar. Trata-se de uma micotoxicose causada por *Phomopsis*

leptostromiformis (Kuhn) Bubák, um comensal que coloniza os troncos da leguminosa, e que exerce a sua acção sobre o fígado através de duas micotoxinas, fomopsina A e B, responsáveis pela paragem da mitose nos hepatócitos com subsequente necrose e morte dos animais (CULVENOR *et al.*, 1977). LUCAS e CÂMARA (1943) cit. por REGO e TOMAZ (1991) já tinham identificado o fungo em tremocilhas da zona de Pegões e REGO e TOMAZ (1991) também o encontraram em plantas provenientes de Alcácer do Sal. LANÇA (1992) detectou a presença do fungo num campo de tremocilha do Baixo-Alentejo, mas em quantidades não susceptíveis de desencadear a doença. A ingestão das plantas, mesmo após as primeiras chuvas, em Setembro, não provocou qualquer alteração aparente na saúde dos animais. No entanto, sabe-se que o desenvolvimento do fungo pode variar bastante, respondendo positivamente a aumentos da humidade atmosférica (TATCHER, 1982). Os prejuízos provocados pela doença na Austrália levaram ao desenvolvimento de cultivares de TFE resistentes ao fungo (COWLING *et al.*, 1988). Em Portugal, muitos criadores e pastores notam ocasionalmente a morte súbita de ovinos em agostadouros de tremocilha brava embora não se saiba se o *Phomopsis leptostromiformis* está implicado. Nos restolhos dos tremoceiros cultivados na Austrália a quantidade de semente residual ronda 200 Kg/ha e as ovelhas consomem cerca de 250 g/dia, podendo os criadores manter os animais nos restolhos durante 10 semanas com uma carga de 10 ovinos/ha (NELSON e DELANE, 1990).

4.3.5.2. Alimentação de animais em crescimento

A suplementação de animais jovens em pastoreio com proteaginosas, em condições de sequeiro mediterrânico durante o Verão, tem um efeito positivo sobre a velocidade de crescimento ao possibilitar maiores ingestões de MS com um alto valor proteico. A nutrição do feto e das crias também é melhorada devido a uma melhor nutrição da mãe, o que se traduz em pesos mais elevados ao nascimento e ao desmame (PRESTON e LENG, 1987).

A relação entre o pastoreio de agostadouros e a velocidade de crescimento em ovinos, pode ser observada no quadro 4.1..

Quadro 4.1. Ganhos médios diários de ovinos em agostadouros de gramíneas e leguminosa.

Agostadouro	Carga (animais/ha)	Dias de Pastoreio	GMD (g/dia)	Autor
TFE doce	50	80	125	1
	60	14/28	50/121 ^a	2
	40	84	120	3
Tremocilha doce	50	80	81	1
Tremocilha brava	25	25	80	4
	12,5	53	66	4
	40	63	0	5
Aveia x TFE	15	91/70	53/161 ^a	2
	30	43/42	67/148	2
	60	28	28/125	2
Cevada	40	84	31	3
Ervilha	40	84	67	3
Chicharo (<i>Lathyrus</i> <i>cicera</i>)	40	84	43	3

1 - ARNOLD *et al.* (1976). 2 - MORCOMBE *et al.* (1987). 3 - ALLDEN e GEYTENBEEK (1980). 4 - CORZO (1982). 5 - LANÇA (1992). a- com maior/menor lupinose.

4.3.5.3. Alimentação de reprodutores

Os agostadouros de tremoceiros podem ser aproveitados para realizar o *flushing* nos ovinos. A melhoria da fertilidade e prolificidade obtida deve-se a um aumento da taxa de ovulação e a uma diminuição da mortalidade embrionária (CROCKER *et al.*, 1979; LINDSAY *et al.*, 1980; HYND, 1986). Os tremoceiros têm a particularidade de aumentar a taxa de ovulação até 30 pontos percentuais, comparativamente ao agostadouro de pastagem anual (LINDSAY *et al.*, 1980), mesmo sem aumento do peso vivo do animal como acontece normalmente durante o *flushing* (KNIGHT *et al.*, 1975). Segundo STWART e OLDHAM (1986) bastam 6 dias de consumo de grão, antes da cobrição, para se conseguirem aumentos significativos da taxa de ovulação. CROKER *et al.* (1979) sugerem que a elevada concentração proteica da semente é o factor chave no desencadear daquela reacção, opinião que é reforçada pelo facto de uma suplementação com cereais na altura da cobrição, nunca provocar aumentos tão amplos da taxa de ovulação (MARSHAL, 1978 cit. por MURRAY e ROWE, 1984).

A taxa de ovulação depende fortemente das condições de nutrição, sendo incrementadas por aumentos de ingestão de energia e proteína digestível (FLETCHER, 1981). Para um mesmo nível energético a taxa de ovulação será maior para os mais elevados níveis de ingestão de proteína (SMITH, 1988). O trabalho deste autor mostra que ovelhas alimentadas com dietas de alto teor proteico, têm níveis significativamente superiores de enzimas hepáticas implicadas no metabolismo do estradiol e, em virtude disso, também maiores concentrações plasmáticas de FSH antes e durante a luteólise. Esta maior quantidade de FSH seria responsável por um maior número de folículos ovulantes. Vários trabalhos sugerem que será este o mecanismo de actuação dos tremoceiros sobre a taxa de ovulação (BRIEN *et al.*, 1976; NOTTLE *et al.*, 1987 cit. por RITAR e ADAMS, 1988). Porém, outros trabalhos parecem indicar que a acção da proteína dos tremoceiros será antes exercida ao nível dos ovários, estimulando a sua sensibilidade às gonadotrofinas

(RADFORD *et al.*, 1980; RITAR e ADAMS, 1988). O processo que leva a um aumento da taxa de fertilidade pela suplementação com tremoços não está ainda bem esclarecido, visto que KNIGHT *et al.* (1975) conseguiram aumentar significativamente aquele parâmetro em ovelhas suplementadas com tremoços, relativamente a outros animais suplementados com cevada e ureia, isoazotadamente e com 25% mais de energia. Nos carneiros, a ingestão de tremoços aumenta o tamanho testicular e a capacidade espermatogénica, através do incremento da produção de LH (SUTHERLAND e MARTIN, 1980).

5. Objectivos do trabalho experimental

Da revisão bibliográfica efectuada concluiu-se que a utilização da tremocilha brava pelos ruminantes se encontra pouco estudada, assim como o destino dos seus alcalóides através dos metabolismos da flora ruminal e do seu hospedeiro. Ignora-se se o teor em alcalóides da tremocilha - até 1,2 % da MS - constitui um obstáculo a um pleno desempenho produtivo nos ruminantes. Dadas as propriedades tóxicas, inibidoras do consumo e antibióticas dos alcalóides quinolizidínicos seria interessante saber como responde o ruminante a elevadas quantidades destas substâncias na dieta, e até que ponto não seria preferível substituir a tremocilha brava por variedades doces de *Lupinus*. Julgamos que as respostas a estas questões têm hoje em dia um especial interesse para a nossa agropecuária, visto que se adivinha uma redução dos restolhos disponíveis durante o Verão, devido à crescente redução das áreas dedicadas aos cereais, que poderá ser colmatada por um aumento do cultivo da tremocilha para agostadouros. Além disso, o incremento das áreas plantadas com sobreiros e azinheiras, permite antever um desenvolvimento que a silvopastorícia deverá sofrer a médio e a longo prazo, e a que a cultura da tremocilha, pelas razões anteriormente expostas, não deverá ficar alheia. Não é também menos importante a crescente procura pelos consumidores de carne e leite produzidos em regimes não intensivos, sistemas em que a tremocilha poderia assumir um papel relevante.

Notou-se uma lacuna nos conhecimentos relativos ao efeito da suplementação com tremocilha brava sobre a produção de leite na ovelha, ignorando-se igualmente se os seus alcalóides contaminam o leite e se, dadas as suas propriedades anti-microbianas e sabor amargo, alteram a qualidade do queijo. A área de distribuição geográfica da tremocilha no Alentejo abarca várias regiões demarcadas de produção de queijo e importa saber se a utilização desta leguminosa como suplemento proteico tem algum impacto sobre a qualidade do queijo, visto que as ordenhas têm vindo a ser prolongadas pelo final da Primavera, altura em que os agostadouros de tremocilha podem ser utilizados para equilibrar a dieta das ovelhas. Assim, este trabalho pretende estudar o efeito do grão da tremocilha brava sobre a ingestão e utilização digestiva dos nutrientes da dieta recorrendo a variedades doces de tremçoço e ao bagaço de soja como termos de comparação. Analisa-se também o efeito dos alcalóides da tremocilha sobre a actividade microbiana ruminal *in vitro* e o seu destino no suco ruminal. Compara-se ainda o efeito de um suplemento de tremocilha brava sobre a produção de leite de ovelhas Serra da Estrela e sua composição química, com o de um tratamento constituído por bagaço de soja. Por último aproveita-se o leite produzido pelas ovelhas para fabricar queijo de Serpa e estudar o efeito da alimentação sobre a composição química e características sensoriais destes. Pretendemos, em suma, averiguar se a tremocilha brava e os seus alcalóides poderão exercer qualquer efeito negativo sobre a actividade microbiana do rúmen dos ovinos e sobre a flora caseificante e qualidade do queijo, susceptível de limitar a expansão da tremocilha brava nos sistemas agro-florestais do Sul de Portugal.

PARTE II - TRABALHO EXPERIMENTAL

1. Valor alimentar da tremocilha brava para ovinos

1.1. Introdução

Os tremoços utilizados na alimentação de ruminantes são sobretudo de variedades doces, de baixo teor em alcalóides (< 0,05% da MS da semente), e aparentemente estes níveis de alcalóides não constituem obstáculo à utilização digestiva da dieta (HILL, 1990). Entre nós a tremocilha brava é a espécie de *Lupinus* mais consumida pelos ruminantes, geralmente em regime de pastoreio directo, e os alcalóides que contém podem atingir o teor de 1,2% da MS da semente, conferindo-lhe um característico sabor amargo. Apesar dos animais consumirem bem toda a planta seca, depois dos alcalóides terem migrado para a semente, o sabor amargo parece ser o único factor fortemente inibidor do consumo da planta quando ainda verde, que só é ingerida quando a maioria das restantes espécies da pastagem já foram consumidas. Uma muito baixa palatabilidade e ingestão do material verde também foram registadas no *L. nootkatensis* amargo (GUDMUNDSSON *et al.* (1992) e no tremoço vulgar amargo (MADRUGA e BORBA, 1994). Os estudos efectuados sobre o valor alimentar de variedades amargas de *Lupinus* para ruminantes são bastantes escassos, dada a utilização generalizada das variedades doces. Em Portugal, o cultivo tradicional da tremocilha brava constitui notável excepção, facto que se pode justificar pela rusticidade que os alcalóides transmitem à planta sem no entanto impedirem a sua ingestão pelo ruminante.

ARNOLD *et al.* (1976), à semelhança de LANÇA (1992), não encontram aparentemente qualquer efeito negativo significativo dos alcalóides sobre a ingestibilidade e a produtividade animal, quando alimentaram ovelhas com o grão de TFE amargo (0,5 % de alcalóides) e tremocilha brava (0,8 %), respectivamente. Também CHEEKE e KELLY (1989) referem a facilidade com que os ovinos ingerem grandes quantidades de tremoços selvagens (1 % de alcaloides) nas pastagens do Oeste americano. Sabe-se que os ovinos se recusam a consumir o grão do tremoço vulgar, pelo que a espécie escolhida para pastoreio,

mesmo nos solos onde aquele vegeta melhor, é geralmente a tremocilha. Nós próprios, como se refere em 1.2., falhámos em fazer ingerir aos animais grão de tremoço amargo vulgar. A recusa dos animais em ingerir as variedades amargas desta espécie deverá estar relacionada com o seu maior teor em alcalóides - mais de 2 % da MS, contra menos de 1,5 % no TFE, e até 1,2 % na tremocilha brava e nos tremoços selvagens da América do Norte. Segundo HILL e PASTUSZEWSKA (1993) o limiar de rejeição absoluta encontra-se entre os 2 % e os 5 %. Os dados relativos aos parâmetros digestivos das variedades amargas encontrados na literatura referem-se unicamente à forragem verde do tremoço vulgar e de *L. nootkatensis*, sendo aceite que aparentemente não existe qualquer efeito negativo significativo dos alcalóides destas espécies sobre a utilização digestiva da dieta (MADRUGA e BORBA, 1994; GUDMUNDSSON *et al.*, 1992)

O presente estudo pretende contribuir para colmatar a falta de dados referentes ao valor alimentar de dietas em que se utilize a tremocilha brava e tremoços doces como suplemento único de forragens de baixa qualidade, condições em que estas leguminosas assumem maior interesse nos sistemas de produção animal do sequeiro. Por outro lado, os trabalhos encontrados na literatura sobre o valor alimentar de variedades amargas em ruminantes não incluem a tremocilha brava e os seus alcalóides principais - lupinina e esparteína - sabendo-se que diferenças qualitativas no perfil dos alcalóides presentes na dietas podem implicar respostas diferentes no animal para uma mesma concentração de alcalóides (HILL e PASTUZEWSKA, 1993). Assim, pretendemos fazer um estudo comparativo do valor alimentar de dietas constituídas por feno suplementado com as principais espécies de *Lupinus* com interesse agronómico no nosso país e determinar se se verifica alguma diminuição no valor dos coeficientes de utilização digestiva dos principais nutrientes da dieta provocada pelo consumo da tremocilha brava.

1.2. Materiais e métodos.

1.2.1. Dietas

Estudaram-se quatro dietas à base de feno de aveia de corte tardio suplementadas com bagaço de soja (dieta BS) (testemunha), tremocilha brava (dieta TB), tremoço doce (dieta T) (*L. albus* L. variedade Estoril) e TFE doce (*L. angustifolium* L. variedade Uniwhite) (Quadro 1.1.). As nossas tentativas de adquirir tremocilha doce, com uma percentagem de alcalóides inferior a 0,05% da MS da semente, para incluir neste estudo comparativo revelaram-se infrutíferas. Tentámos igualmente utilizar uma dieta em que o suplemento fosse constituído por tremoço amargo, mas os animais deixaram de o ingerir no 3ª dia da habituação, exibindo os sintomas característicos de intoxicação por lupanina - prostração, descoordenação motora, respiração ofegante -, tendo sido substituído pela variedade doce "Estoril". As quatro dietas, isoazotadas, foram fornecidas de modo a suprir as necessidades de manutenção, em regime *ad libitum* (Quadro 1.2.).

Quadro 1.1. Composição química dos alimentos utilizados (%MS).

Parâmetros	Feno	BS	TB	T	TFE
MS(%)	84,17	86,73	88,30	85,80	90,16
MO	93,08	93,52	96,70	96,30	96,89
PB	9,07	49,00	41,76	33,51	28,11
NDF	63,71	15,01	30,92	20,63	27,64
ADF	39,29	8,87	23,33	18,42	22,52
ADL	4,69	0,65	2,49	1,87	0,84
CEL	34,60	8,22	20,84	16,55	21,68
HEM	24,42	6,14	7,59	2,21	5,12
HCS	3,50	14,45	10,53	7,11	13,10
EE	-	0,83	6,34	10,14	6,44
ALC	-	-	1,00	0,04	0,04
DMS	55,50	90,50	87,1	89,60	92,00
DMO	53,90	90,01	86,6	88,60	91,30

Quadro 1.2. Composição das dietas utilizadas (%MS).

	Dieta			
	BS	TB	T	TFE
Feno	78,68	74,43	66,37	59,04
Concentrado	19,82	24,07	32,13	39,46
CMV	1,5	1,5	1,5	1,5
PB	16,55	17,12	16,78	16,46
NDF	53,74	54,25	48,72	47,44
ADF	32,98	34,53	31,84	31,66
ADL	4,12	3,84	3,57	3,06
CEL	28,86	30,69	28,27	28,6
HEMI.	20,76	19,76	16,88	15,78
ALC.	0	0,24	0,01	0,02
EM(MJ.Kg ¹) ^a	8,51	8,64	9,21	9,78

a) Estimada a partir da DMS dos alimentos (MAFF, 1977)

A forragem foi cortada em partículas com cerca de 5 cm de comprimento, de modo a limitar a saída de material para fora das caixas metabólicas. Os suplementos foram distribuídos em natureza.

1.2.2. Animais e manejo

Utilizaram-se quatro carneiros da raça Serra da Estrela com cerca de quatro anos de idade e com o peso vivo médio de $61,48 \pm 6,95$ Kg. Antes do início do ensaio os animais foram desparasitados, vacinados para prevenção de enterotoxemia e pasteurelose. Os carneiros foram distribuídos aleatoriamente pelas quatro dietas, segundo um esquema

estatístico de quadrado latino. Alimentaram-se duas vezes por dia (9:00 e 17:00 horas), em regime *ad libitum*, tendo sido admitidas rejeições de 10% do feno fornecido. Os suplementos foram fornecidos de modo a manter as dietas isoazotadas.

Habituararam-se os carneiros às dietas durante 14 dias, período em que se alojaram em boxes individuais. Seguiam-se 7 dias de registo individual e diário das quantidades de alimento fornecido e recusado bem como das fezes e urinas excretadas. Neste período os animais eram transferidos para caixas metabólicas e registados os pesos iniciais e finais, sendo a média utilizada no cálculo da ingestão de MS. No início de cada um dos quatro períodos experimentais recolheram-se amostras dos suplementos, para análise laboratorial. Foram ainda efectuadas recolhas individuais e diárias de 10% do feno fornecido e refugado, assim como de 10% das fezes e de 5% das urinas excretadas, que se agruparam em amostras compósitas por cada tratamento e animal. Nos recipientes de recolha das urinas colocaram-se diariamente 5 ml de ácido sulfúrico a 50%, para limitar as perdas de amónia. As amostras de fezes e urina foram armazenadas em recipientes opacos a -18°C até ao final de cada período experimental. As amostras de alimentos e fezes foram secas em estufa ventilada e à temperatura de 60°C durante 48 horas.

1.2.3. Análises químicas

As amostras secas dos alimentos, refugos e fezes foram moidas num moinho de laboratório com crivo de malha redonda de 1mm de diâmetro, antes de serem analisadas. A humidade residual foi determinada em amostras de 0,5 g, secas em estufa a 103°C durante a noite, e o teor em cinzas por incineração em mufla a 550°C durante 3 horas. Utilizou-se o método macro-Kjeldhal (AOAC, 1990) para determinar a concentração de N e estimou-se a concentração em PB nas amostras, multiplicando o valor encontrado por 6,25. Para a determinação do teor em fibra insolúvel em detergente neutro (NDF), fibra insolúvel em detergente ácido (ADF) e lenhina no residuo da ADF (ADL) recorreu-se ao método proposto por GOERING e VAN SOEST (1970). Para estimar o valor da celulose subtraiu-

se ao teor em ADF o teor em ADL, e a partir da diferença entre NDF e ADF estimou-se o teor em hemicelulose. A concentração em hidratos de carbono solúveis foi determinada pelo método proposto por HERBERT et al.(1971). O teor em alcalóides totais foi determinado pelo método proposto por VON BAER (1977) e a digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica (DMO) e da MS (DMS) pelo processo de TILLEY E TERRY (1963) modificado por ALEXANDER e McGOWAN (1966).

1.2.4. Análise estatística

Foi feita a análise de variância para um delineamento em quadrado latino, comparando-se as médias dos tratamentos pelo teste LSD. As diferenças registadas entre os tratamentos foram consideradas significativas (*), muito significativas (**) ou altamente significativas (***) quando se estimou a sua probabilidade de ocorrência não casual em 95% ($P < 0,05$), 99% ($P < 0,01$) ou 99,9% ($P < 0,001$), respectivamente (GOMEZ e GOMEZ, 1984).

1.3. Resultados e discussão

1.3.1. Composição química dos suplementos e das dietas

No quadro 1.3. apresentam-se os dados referentes à composição química de tremocilha, tremoço e TFE obtidos por vários autores. O teor em PB da tremocilha brava utilizada é da mesma ordem dos encontrados na bibliografia. É inferior ao valor encontrado por LANÇA (1992) num ecótipo do Baixo Alentejo, mas bastante semelhante ao determinado por MUZQUIZ *et al.* (1982) em material com a mesma origem. As concentrações proteicas dos grãos de tremoceiros utilizados encontram-se dentro dos limites encontrados na literatura por HILL(1977), e são inferiores às registada no BS. A partir dos valores citados podemos ainda concluir que algumas variedades de tremocilha podem atingir níveis de PB próximos dos do BS.

O teor lipídico da tremocilha, tremoço e TFE é da mesma ordem dos referidos por HILL (1977) e semelhante aos referidos pelos restantes autores. O maior teor em gordura apresentado pelo tremoço, em relação à tremocilha e TFE também está de acordo com os assinalado pelos restantes autores. Como seria de esperar, o BS apresenta um valor vestigial de gordura.

Os dados referentes às fracções da *fibra Van Soest* no grão de tremocilha e tremoços escasseiam na literatura. Refira-se, apesar disso, que o teor NDF da tremocilha brava é superior ao determinado por LANÇA (1992). Esta diferença pode estar associada ao facto de ambas as sementes pertencerem a ecótipos naturais, com uma variabilidade mais acentuada do que as variedades seleccionadas. Aquele valor também é superior ao determinado por ARNOLD *et al.* (1976) numa variedade doce de tremocilha. Os valores de NDF encontrados no tremoço e TFE enquadram-se no leque referido pela bibliografia e são da mesma ordem do detectado na tremocilha, todos inferiores ao valor de NDF do BS. Sobressaiem ainda os baixos teores em lenhina detectados nas sementes analisadas o que é indicativo da elevada digestibilidade da componente fibrosa, da ordem dos 90 % segundo o INRA (1981), e em que predomina a celulose. A tremocilha apresentou os mais elevados teores em lenhina (2,5%).

O tremoço registou o menor teor em HCS, tendo a tremocilha e o TFE registado valores semelhantes ao do BS. O valor encontrado na tremocilha está próximo dos determinados por MUZQUIZ *et al.* (1982) quer em várias cultivares de tremocilha quer em ecótipos do Sul de Espanha, e é muito semelhante ao determinado por ARNOLD *et al.* (1976). Enquanto que a concentração em HCS determinada no tremoço se enquadra nos valores encontrados pelos outros autores, no TFE a concentração encontrada é superior, embora se aproxime da determinada por ARNOLD *et al.* (1976). O valor de alcalóides encontrados no tremoço e TFE são típicos de cultivares doces, enquanto que o teor em alcalóides da tremocilha se encontra dentro dos valores que constam na literatura. A menor DMS *in vitro* por nós observada na TB pode ser consequência do seu maior teor em lenhina. Apesar das dietas com T e com TFE apresentarem maiores

Quadro 1.3. Composição química do grão de algumas cultivares (cv.) de tremocilha, tremoço e TFE (%MS).

Espécie	MS	MO	PB	EE	NDF	ADF	ADL	HCS	Amido	Alc.	Autor
(%)											
<i>L. luteus</i>											
Várias cv.	86,3 a	94,8a	36,0a	4,0					0		1
	90,2	96,0	47,6	a 7,1					a		
									1,5		
Ecótipos	90,8a		42,1a	3,9				6,02a		0,8	3
	92,8		43,8	a 5,1				8,61		a	
										1,2	
Brava	92,8		42,8	4,0				7,54		0,8	3
Brava	89,2	95,8	46,0		23,8					0,9	4
Weiko III			42,1		26,9			10,0		<0,05	5
<i>L. albus</i>											
Várias cv.	79,4	95,3a	34,3a	9,9					4,0	0,03	1
	a	97,1	44,9	a							
	93,0			14,5							
Várias cv.	92,3a		36,7a	8,3				7,5		0,1	3
	93,3		40,2	a				a 8,7		a	
				9,1						0,3	
WB1			40,8		23,1			9,4		<0,05	5
Ultra	88,1	94,9	35,3	11,0	23,8	18,8	2,8	8,7		0,02	6
Teafwhite			35,9	9,3						0,07	2

1 - HILL (1977); 2 - JOHNSON *et al.* (1986); 3 - MUZQUIZ *et al.* (1982); 4 - LANÇA, (1992); 5- ARNOLD *et al.* (1976); 6- GUILLAUME *et al.* (1987).

Quadro 1.3. Composição química do grão de algumas cultivares (cv.) de tremocilha, tremoço e TFE (%MS) (continuação)

Espécie	MS	MO	PB	EE	NDF	ADF	ADL	HCS	Amido	Alc.	Autor
(%)											
<i>L. angustifolius.</i>											
Várias cv	86,7a	96,1a	28,0a	5,3 a					7,3		1
	91,6	97,6	37,9	6,6							
Várias cv	91,4a		31,5a	4,4 a				4,5		0	2
	91,5		33,7	5,3				a		a	
								5,5		0,05	
Várias cv			32,9a		26,4a			9,6			3
			33,2		27,8						

1- HILL(1977); 2-MUZQUIZ *et al.*(1982); 3- ARNOLD *et al.*(1976)

concentrações energéticas, os teores em PB, ADF e celulose foram semelhantes em todos os tratamentos.

1.3.2. Digestibilidade aparente da MO, NDF, ADF e PB.

No quadro 1.4. e na Figura 1.1 apresentam-se os valores referentes aos coeficientes de digestibilidade aparente da MO, NDF, ADF e PB, determinados nas dietas utilizadas. Nos anexos 1.1. a 1.4. encontram-se os valores determinados para cada carneiro bem como as respectivas análises de variância.

A DMO da dieta TB não diferiu significativamente da das dietas BS e T ($P > 0,05$). Foi contudo inferior ($P < 0,001$) à da dieta TFE. Em relação à dieta BS as dietas T e TFE registaram uma maior DMO ($P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente). A DMO da dieta TFE foi, por sua vez, superior à da dieta T ($P < 0,05$). O aumento da DMO com o aumento de

Quadro 1.4. Coeficientes de digestibilidade aparente observados nas dietas experimentais (Média ± EPM).

Parâmetros	n	BS	TB	T	TFE	EPM	signif.
DMO	4	70,53	71,98	74,17	77,53	0,93	**
DNDF	4	64,85	69,36	68,45	73,78	2,39	ns
DADF	4	60,96	66,38	69,57	74,37	2,41	**
DPB	4	75,34	74,27	78,16	78,36	1,50	ns

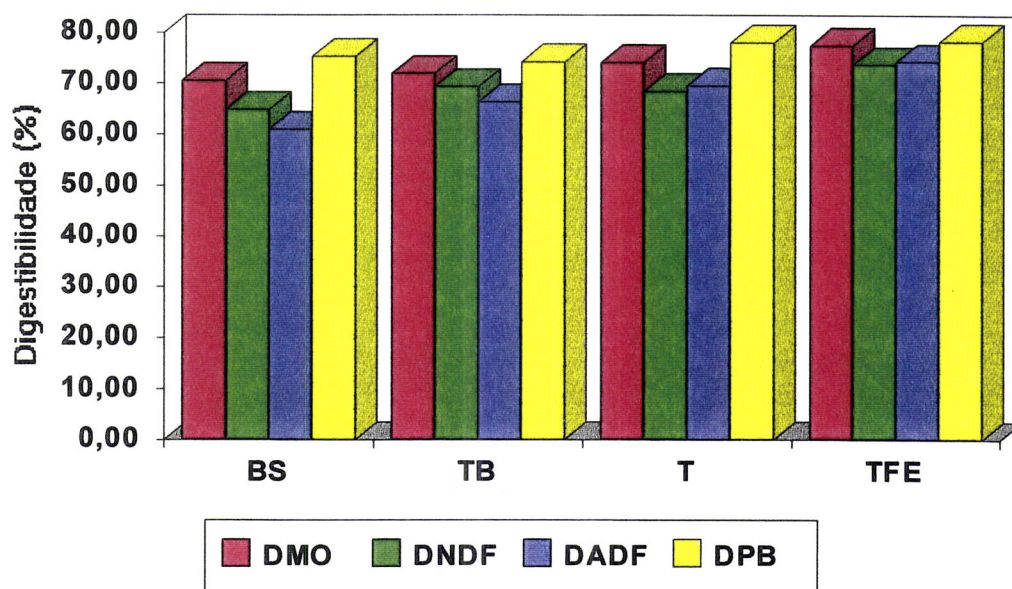


Figura 1.1. Coeficientes de digestibilidade aparente observados nas 4 dietas experimentais.

grão na dieta, deve-se provavelmente ao incremento da proporção de substâncias altamente digestíveis. A DADF da dieta TB também não diferiu significativamente da encontrada nas dietas BS e T ($P>0,05$). Só se registaram diferenças significativas entre a DADF das dietas BS e T, TB e TFE ($P<0,05$) e BS e TFE ($P<0,01$). Houve um efeito positivo bem marcado dos níveis mais elevados de grão sobre a DADF, ao contrário do que sucedeu com a DNDF, parâmetro em que não se registaram diferenças significativas entre as dietas. Os maiores valores de DADF das dietas com maior quantidade de tremoço deverão corresponder principalmente a uma maior proporção de ADF com menor teor de lenhina, logo com uma maior disponibilidade da fibra para a digestão microbiana. Uma proporção crescente de tremoço na dieta não correspondeu a nenhuma quebra dos valores da DADF. Os concentrados ricos em amido, como os cereais, têm um efeito depressor sobre a DADF da dieta (Quadro 1.5.), mas os tremoços, cujo teor em amido é dos mais baixos de entre as leguminosas cultivadas, originam condições favoráveis à digestão da fibra através da manutenção de valores relativamente elevados de pH e da população celulolítica da flora ruminal (WATSON *et al.*, 1984; VALENTINE e BARCH, 1987 e HYND *et al.*, 1985 *cits.* por HILL, 1990).

Quadro 1.5. Efeito da suplementação com grão de aveia na DMO, DNDF e DADF de uma dieta à base de feno da gramínea *Axonopus affinis* Chase (5,6% PB)

Aveia (%MS)	Digestibilidade(%)		
	MO	NDF	ADF
0	52,4	62,1	57,5
19	54,7	57,8	51,9
36	57,9	52,3	47,5
50	58,9	50,1	38,3

Origem: Lloyd e Davies (1992)

Não se registaram diferenças significativas entre a DPB de cada uma das dietas o que traduz a elevada disponibilidade do azoto dos tremços, caracterizado até por uma excessiva solubilidade (GUILLAUME *et al.*, 1987; SMITH e WARREN, 1986; VALENTINE e BARTCH, 1987). Estes resultados contradizem os obtidos por JOHNSON *et al.* (1986), que encontraram uma menor DPB numa dieta para vacas leiteiras, em que se usou tremço com 0,068% de alcalóides como suplemento proteico, em comparação com o bagaço de soja.

1.3.3. Ingestão de MS

Na figura 1.2. apresentam-se os dados referentes à ingestão de MS registados em cada uma das dietas. Os valores obtidos em cada animal e a respectiva análise de variância são mostrados no anexo 1.5..

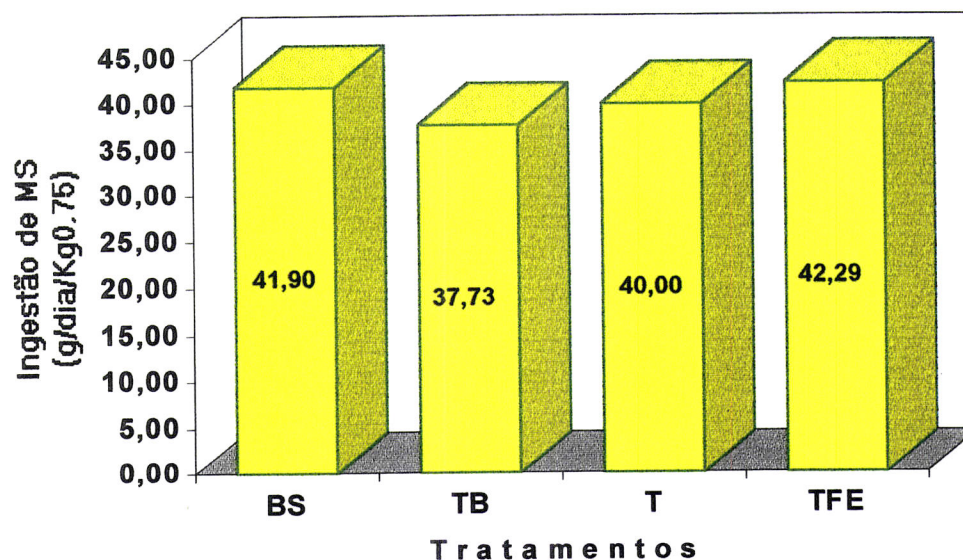


Figura 1.2. Ingestão média de MS observada nos animais alimentados com as 4 dietas. EPM = 3,50.

Não se encontraram diferenças significativas entre as quantidades médias de MS ingeridas pelos animais ($P > 0,05$), embora a ingestão da dieta TB tenha sido inferior em 10% à verificada na dieta BS, e em 11 e 6% à verificada nas dietas TFE e T, respectivamente. Os efeitos da inclusão de tremoço na dieta sobre a ingestão de MS são por vezes contraditórios, o que pode reflectir quer os seus diferentes teores em alcalóides, que podem variar bastante mesmo nas variedades reconhecidas como doces, quer diferentes níveis de incorporação de tremoço na ração ou mesmo diferenças qualitativas entre os alcalóides de cada espécie. No entanto, da maior parte dos trabalhos efectuados conclui-se que a suplementação com tremoço doce não altera a quantidade de MS ingerida, nem provoca problemas de aceitação.

GIOVANNI (1981) e TISSERAND e LAWRENCE (1979) também não encontram alterações na quantidade de MS ingerida, quando substituíram BS por tremoço doce (não referem o teor em alcalóides) ou ervilha, na suplementação de borregos alimentados com feno nem ARNOLD *et al.* (1976) obtiveram diferenças significativas entre a ingestão *ad libitum* de agostadouros de cultivares doces (0,01 % de alcalóides na semente) e amargas (0,5 %) de TFE. KUNG *et al.* (1981), trabalhando com ovinos, não encontraram igualmente qualquer diferença na ingestão de MS de dietas isoazotadas e isoenergéticas suplementadas com 21 % de tremoço doce (não refere o teor em alcalóides) ou com bagaço de soja. SMITH e WARREN (1986) também não registaram qualquer diferença na ingestão de dietas com 22 % de TFE (0,06 % de alcalóides) ou com bagaço de algodão assim como os trabalhos de HUGUET *et al.* (1984), ÉMILE *et al.* (1991) e MAY *et al.* (1993) efectuados com bovinos e o de BROQUA *et al.* (1983) e MASSON (1981) efectuados com caprinos, revelam a ausência de diferenças significativas na ingestão de dietas suplementadas com tremoço doce (não referem o teor em alcalóides) ou bagaço de soja.

Já PURROY *et al.* (1992) encontraram valores de ingestão, em borregos, significativamente mais baixos quando uma série de leguminosas (lentilhas, favas e BS) eram substituídas por tremoço vulgar cv. *Multolupa* (0,9 % de alcalóides) como fonte proteica,

facto que os autores atribuem à presença de alcalóides na dieta. Também a inclusão de 17 % de tremço com 0,02% de alcalóides, numa dieta para vacas leiteiras, em substituição de bagaço de soja provocou uma redução significativa da ingestão de MS segundo GUILLAUME *et al.* (1987). Ainda segundo estes autores o decréscimo registado na ingestão poderia ser o resultado da presença de alcalóides na dieta ou uma consequência da forte fermentescibilidade do N dos tremços que conduziria a uma deficiência proteica no animal. SINGH *et al.* (1991) cit. por MAY *et al.* (1993) também se referem a uma significativa redução na MS ingerida por vacas leiteiras suplementadas com tremço doce.

A menor ingestão verificada na dieta TB poderá dever-se aos alcalóides presentes na dieta, embora os animais ingerissem de imediato a totalidade da tremocilha que lhes era oferecida. Assim, aquela tendência para redução da ingestão poderia ser mais o resultado de um efeito post-absortivo dos alcalóides do que traduzir uma redução da palatabilidade da dieta.

De acordo com HILL (1977), a substituição de tremços doces por amargos reduziu o apetite de suínos, fenómeno igualmente verificado por MUINDI e RUNDGREN (1981) quando alimentaram ratos com tremços de médio teor em alcalóides (0,6 % da MS), bagaço de soja e bagaço de algodão. A ingestão de tremços foi, em média, 76% da ingestão das restantes leguminosas. A revisão feita por WALDROUP e SMITH (1989) cit. por BIRK (1994), conclui que mesmo as variedades de *Lupinus* consideradas doces contêm ainda alcalóides suficientes para reduzir o apetite e as taxas de crescimento, embora se saiba que os monogástricos são mais sensíveis aos alcalóides.

A redução do apetite por vezes associada à ingestão de tremço pode estar ligada a alterações do tecido hepático e renal, a alterações no metabolismo das proteínas ou, talvez ainda, reflectir alterações do foro neurológico. Quando PALFII *et al.* (1983) alimentaram novilhos com um forragem de erva e tremço amargo registaram um aumento dos níveis de fosfatase alcalina no sangue, fígado e rins, bem como distrofia granular dos hepatócitos e do epitélio dos túbulos renais, sendo os níveis das lesões proporcionais à quantidade da leguminosa na dieta. Numa experiência levada a cabo em ratos alimentados com uma dieta

com 0,2% de alcalóides de tremoço - nível inferior ao usado por nós na dieta TB - JÉCSAI *et al.* (1986) observaram a acumulação de gotículas lipídicas nos hepatócitos e alteração da composição em aminoácidos das proteínas hepáticas. Comparativamente a uma dieta só com 0,01 % de alcalóides, aquela dieta reduziu ainda a utilização das proteínas e provocou perda de apetite e de peso e, por fim, a morte.

Para CHEEKE e KELLY (1989) os principais sinais de intoxicação pelos alcalóides dos tremoços observam-se ao nível neurológico, registando-se nos ovinos, depressão, dificuldade respiratória, tremores e convulsões. Segundo aqueles autores os casos de intoxicação aguda são frequentes nas pastagens naturais do Oeste americano, pois os ovinos ingerem com avidez as vagens de tremoço, submetendo-se com facilidade a doses tóxicas. Porém, os alcalóides destas espécies são diferentes dos que ocorrem na tremocilha. HILL e PASTUSZEWSKA (1993) incluem ainda no grupo destas perturbações as provocadas ao nível do aparelho digestivo, e que também poderiam ter sido responsáveis pela tendência para uma menor ingestão da dieta TB.

1.3.4. Balanço azotado

No quadro 1.6. e nos anexos 1.6. a 1.9. apresentam-se os valores do azoto retido, bem como do azoto ingerido e azoto fecal e urinário excretados. Os valores obtidos em cada um dos animais e a respectiva análise de variância são apresentados nos anexos 1.6. a 1.9.. Não se verificaram diferenças significativas ($P > 0,05$) tanto no N excretado (fecal e urinário) como no N retido pelos animais alimentados com os diferentes suplementos, o que poderá resultar do facto da suplementação azotada se realizar bastante acima das necessidades de manutenção dos animais. Com efeito, o balanço azotado em animais adultos em regime de manutenção tenderá sempre para zero devido à ausência de deposição ou exportação proteica, independente da qualidade do azoto da dieta. Por outra parte, também se registou uma grande dispersão dos valores de N retido (coeficiente de variação de 147 %). Contudo, o N retido nos animais da dieta BS foi superior em 48 % 42 % e 36 % ao N retido nos

animais das dietas TB, T e TFE, respectivamente. Esta diferença poder-se-á dever à maior fermentescibilidade ruminal das proteínas dos tremoços relativamente às das proteínas do bagaço de soja (GUILLAUME *et. al.*, 1987) e que se teria traduzido numa perda de N para a síntese de proteína microbiana e numa menor quantidade de aminoácidos absorvidos pelos animais.

Quadro 1.6. Balanço azotado (g/dia) observado nos carneiros alimentados com as quatro dietas experimentais (Média ± EPM).

Parâmetros	n	BS	TB	T	TFE	EPM
N ingerido	4	25,78	24,21	25,17	26,16	2,05
N fecal	4	6,34	6,26	5,54	5,61	0,58
N urinário	4	17,32	16,52	18,14	18,99	1,54
N retido	4	2,12	1,43	1,49	1,56	1,72

1.3.5. Digestibilidade aparente da MO, NDF, ADF e PB dos suplementos

No quadro 1.7. apresentam-se os valores da digestibilidade aparente da MO, NDF, ADF e PB dos suplementos obtidos pelo método da diferença (GIGIER e SAUVANT, 1985). Nos anexos 1.10. a 1.13. encontram-se os valores determinados para cada animal e a respectiva análise de variância. Não se registaram diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os valores de DMO, DNDF, DADF e DPB de cada um dos suplementos. Os valores da DMO

obtidos para a tremocilha, tremoço e TFE são semelhantes aos obtidos por DAVIS e OFFUTT (1975) para a DMS *in vivo* do tremoço (95,2 %), mas superiores ao valor de 86 % obtido pelo INRA (1981) também no tremoço. Contudo os valores deste último para a DPB (88 %) e DFB (90 %) do tremoço são semelhantes aos por nós determinados nas três espécies de tremeceiros estudadas.

Quadro 1.7. Digestibilidade aparente dos nutrientes do bagaço de soja, tremocilha brava, tremoço e TFE, estimada pelo método da diferença (Média±EPM), n=4.

Parâmetros	BS	TB	T	TFE	EPM	Feno
DMO	99,94	98,50	96,44	98,04	1,86	60,27
DPB	89,19	87,73	90,62	89,23	2,89	53,96
DNDF	68,85	94,56	83,24	92,90	14,33	64,67
DADF	88,36	96,53	93,84	96,91	8,53	59,22

As DMO, DPB e DADF dos suplementos são da mesma ordem e reflectem a elevada disponibilidade destes nutrientes, particularmente da componente parietal, a qual atinge um teor superior a 30 % da MS no grão da tremocilha. O maior teor em alcalóides e lenhina desta espécie não afectam aparentemente a sua digestibilidade. O nível de incorporação do BS na MS da dieta - 20 % - poderia ter afectado negativamente a precisão dos valores de DNDF e DADF encontrados, dada a sua grande variabilidade, a qual se reflectiu em elevados EPM e coeficientes de variação. De acordo com GIGER e SAVANT (1985) a incerteza da estimativa da digestibilidade do concentrado pelo método da diferença aumenta consideravelmente quando o seu nível de incorporação é inferior a 20 - 25 % da ração. No

entanto, a DFB encontrado no BS pelo INRA (1981) - 76 % a 80 %- também é inferior à registada pelo mesmo autor no tremoço (90 %), o que indica uma elevada qualidade nutritiva dos glúcidos parietais desta semente, também superior à referida pelo mesmo autor para a ervilhaca (DFB de 60 %), soja e fava (57 %), ervilha (55 %), aveia (33 %), cevada (42 %) e milho (72 %).

1.4. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, a tremocilha brava parece constituir um suplemento de qualidade nutritiva semelhante às do tremoço doce vulgar e TFE doce, apesar do seu maior teor em alcalóides totais. Do ponto de vista nutritivo, e aos níveis de incorporação estudados, não se justificaria, por isso, a sua substituição por variedades doces de *Lupinus*.

A ingestão de quantidades elevadas de tremoços parece não exercer qualquer efeito negativo sobre a digestibilidade de uma forragem de baixa qualidade, pelo que serão mais adequados à sua suplementação, durante o pastoreio estival, do que o grão dos cereais.

Registou-se uma tendência para uma menor ingestão da dieta com tremocilha brava que talvez se deva a um efeito negativo post-absortivo dos alcalóides presentes na dieta, sobre o metabolismo do animal. No entanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa.

À semelhança de outros tremoceiros, a tremocilha brava possui glúcidos parietais de elevada digestibilidade, ao contrário das outras leguminosas e cereais, facto que contribui para atenuar os possíveis efeitos negativos do seu elevado teor em NDF.

2. Efeito dos alcalóides da tremocilha brava sobre a actividade microbiana ruminal *in vitro*

2.1. Introdução

Embora a maioria dos alcalóides exerça o seu efeito tóxico sobre o sistema nervoso central dos animais, só alguns são tóxicos para os microorganismos. Segundo a revisão de COSTA (1993), distinguem-se pela sua acção anti-microbiana os alcalóides de isoquinolina da ipecacuanha (*Cephaelis ipecacuanha* Rich.), particularmente a emetina, que é tóxica para vários microorganismos, entre eles *Entamoeba histolytica* e outros agentes de desinterias amebianas. Também a conessina, um alcalóide esteróide de *Holarrhena antidysenterica*, demonstrou actividade anti-amebiana. Outros alcalóides esteróides, como as solaninas presentes na batata (*Solanum tuberosum* L.) e na erva moira (*S. nigrum* L.) possuem efeitos anti-bacterianos e anti-fúngicos, possivelmente devido às suas propriedades anti-mitóticas. Alguns alcalóides de núcleo indólico, o grupo a que pertence a gramina da tremocilha brava, nomeadamente a harmana e outros alcalóides de *Peganum harmala* L. são tóxicos para os protozoários. Contudo, o alcalóide mais conhecido pela sua propriedade anti-protozoária é a quinina, um alcalóide de estrutura quinoleínica e o principal agente químico anti-palúdico, em virtude de destruir todas as formas assexuadas de *Plasmodium* spp..

Os alcalóides quinolizidínicos dos tremoceiros exercem um efeito inibidor sobre uma grande variedade de microorganismos aeróbios (WINK, 1986). No entanto, os trabalhos dedicados às espécies anaeróbias são relativamente escassos. Na flora ruminal encontra-se já estudado o efeito dos alcalóides da festuca alta e de *Phalaris arundinacea* L.. Estes compostos reduzem a actividade celulolítica e parecem estar associados à baixa produtividade dos animais alimentados com aquelas forragens (van SOEST, 1982; TUCKER e BUSH, 1992). Não está ainda esclarecido se, à semelhança do que acontece com estes alcalóides, também ocorrerá uma diminuição da actividade microbiana ruminal na presença dos alcalóides da tremocilha brava, embora aparentemente, em condições de

campo, não seja notória uma redução da digestibilidade das dietas constituídas por esta planta, ou da produtividade animal.

A tendência para um menor consumo da dieta com tremocilha brava registada na experiência anterior, poderia reflectir uma redução da actividade microbiana ruminal. Devido a um efeito tóxico dos alcalóides, poderá ter ocorrido uma diminuição da taxa de degradação da fibra e da velocidade de esvaziamento do rúmen, apesar de não se terem registado diferenças significativas entre a digestibilidade aparente da dieta com tremocilha e a do tratamento testemunha, ou entre as digestibilidades aparentes da tremocilha e dos restantes suplementos.

Dos trabalhos levados a cabo com outras espécies de tremoceiros, em que predominam alcalóides diferentes dos que ocorrem na tremocilha, parece poder concluir-se que aparentemente não existe qualquer acção adversa sua sobre a flora ruminal. MADRUGA e BORBA (1994) num trabalho realizado com forragem de tremoço amargo consumida por bovinos, encontraram altos valores de digestibilidade da dieta apesar dos elevados teores de lupanina presentes no alimento. Também GUDMUNDSSON e THORSSON (1994) encontraram valores de DMS *in vivo* de forragem verde do tremoço amargo *L. notkatensis* semelhantes à de erva verde, sendo os alcalóides predominantes neste tremoço, a esparteína (75 a 85% dos alcalóides presentes) e a lupanina (10 a 16 %).

Vários compostos têm a capacidade de reduzir a actividade microbiana ruminal e o desenvolvimento de culturas purificadas de bactérias ruminais, embora se conheçam mal os mecanismos pelos quais estas substâncias actuam sobre o metabolismo dos microorganismos. De entre estes compostos destacam-se o oxalato (JAMES *et al.*, 1967), óleos essenciais (OH *et al.*, 1968), alguns compostos fenólicos, nomeadamente os ácidos ferúlico e *p*-cumárico (CHESSON *et al.*, 1982), micotoxinas (MERTENS, 1979 cit. por DAWSON e ALLISON, 1988) antibióticos (revisão de DAWSON e ALLISON, 1988) e alguns alcalóides.

A perlolina é o principal alcalóide produzido pela festuca alta (*Festuca arundinacea* Schreb.), a par da N-formillolina e da N-acetillolina (WESTENDORF *et al.*, 1993)

podendo a forragem acumular até 0,7 % da MS daquele alcalóide (GENTRY, 1968 cit. por BUSH *et al.*, 1972). Esta espécie pode também provocar intoxicações nos bovinos, semelhantes ao ergotismo, cujo agente causador seria o fungo *Acremonium coenophialum* produtor de alcalóides do tipo da ergotamina como os produzidos por *Claviceps purpurea* no centeio e outras gramíneas (HEMKEN *et al.*, 1984). A heritabilidade da concentração em perlolina é bastante elevada e de grande variabilidade intervarietal, o que permitiu a obtenção de cultivares com baixo nível de alcalóides (VAN SOEST, 1982). Os animais que pastam a festuca alta podem perder peso, fenómeno que foi associado à baixa ingestibilidade da forragem, e que se agrava nas plantas jovens. Esta baixa ingestão poderá resultar não só dos efeitos dos alcalóides sobre o metabolismo animal mas também do sabor amargo que os alcalóides transmitem ao alimento e de um efeito inibidor sobre a flora ruminal, com a consequente redução da taxa de digestão da fibra. O trabalho de BUSH *et al.* (1972) mostrou que a perlolina inibe a digestão *in vitro* da celulose e a produção de ácidos gordos voláteis, quando a sua concentração no meio ultrapassa 0,1 mM. O desenvolvimento das principais espécies de bactérias celulolíticas em cultura pura (*Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Bacteroides succinogenes*) foi completamente inibido quando a concentração de perlolina no meio ultrapassou 1 mM. A sensibilidade dos protozoários ao alcalóide é semelhante à demonstrada pelas bactérias. Concentrações superiores a 1,13 mM provocaram a morte da maior parte dos protozoários ao fim de 48 h. Esta inibição da flora ruminal *in vitro* foi confirmada *in vivo* pelo trabalho realizado por BOLING *et al.* (1975), que registaram uma diminuição da digestibilidade da celulose e da PB da dieta quando a esta foi acrescentada perlolina.

Os outros alcalóides da festuca, para além da perlolina, e de *Acremonium coenophialum*, também exercem um efeito inibidor da actividade microbiana ruminal, embora não tenha sido ainda possível identificá-los. HANNAH *et al.* (1990), FIORITO *et al.* (1991) e WESTENDORF *et al.* (1993) mostraram que a digestibilidade de dietas com

festuca infectada por *Acremonium coenophialum* foi inferior à de outras contendo plantas não infectadas.

Os alcalóides indólicos de *Phalaris arundinacea* - gramina, triptaminas e beta-carbolinas - também inibem *in vitro* a actividade celulolítica da flora ruminal, mas em concentrações que não ocorrem no rúmen dos animais naturalmente alimentados com a forragem (MARTEN *et al.*, 1981 cit. por VAN SOEST, 1982). Aqueles autores conduziram um estudo para avaliar a toxicidade de cultivares de *Phalaris arundinacea* com diferentes níveis de alcalóides, sobre borregos em crescimento, tendo identificado diferenças na taxa de crescimento dos animais correspondentes a diferentes níveis de alcalóides na dieta, mas sem registarem diferenças entre a digestibilidade *in vitro* da MS das dietas. Também WITTENBERG *et al.* (1992) não conseguiram identificar qualquer efeito negativo de uma cultivare de *Phalaris arundinacea* rica em alcalóides, sobre a digestibilidade da forragem. Embora se registre *in vitro* um efeito adverso sobre a actividade microbiana os efeitos negativos destes alcalóides sobre o ruminante ocorreriam predominantemente ao nível do seu metabolismo.

Com o objectivo de determinar os efeitos de concentrações crescentes de alcalóides de tremocilha brava, purificados e em natureza, sobre os microorganismos do rúmen, procedeu-se à medição da actividade bacteriana através da produção de gás, do crescimento bacteriano a partir da absorção de N solúvel e da evolução do pH do meio, recorrendo-se a um sistema *in vitro*.

2.2. Materiais e métodos

2.2.1. Animais e técnica de colheita de suco ruminal

O líquido ruminal foi obtido a partir de dois carneiros Merino Negro fistulados no rúmen. Os animais foram mantidos estabulados e alimentados duas vezes ao dia com uma dieta de manutenção constituída por 50% de feno de aveia, 25% de luzerna desidratada e

peletizada e 25% de concentrado comercial. O conteúdo ruminal retirou-se de manhã, antes de ser fornecida a primeira refeição, e imediatamente a seguir à abertura da fistula, com a ajuda de um sistema mecânico de vácuo e de um *Erlenmeyer* munido de um tubo. O material recolhido foi depois filtrado através de uma gaze colocada sobre um funil. Depois de transportado para o laboratório, o líquido ruminal foi transferido para um *Erlenmeyer* e misturado com saliva artificial na proporção de 1:3. 200 ml da mistura foram então introduzidos dentro de fermentadores, conservados num banho-maria a 39° C. Todo o material foi mantido em água a 39°C antes de utilizado e as operações decorreram debaixo de uma injeção de CO₂.

2.2.2. O sistema *in vitro*

O sistema utilizado compunha-se de 12 fermentadores de 300 ml fechados hermeticamente, conservados num banho-maria a 39°C, munido de agitação lateral e ao abrigo da luz. Um tubo plástico flexível ligava cada fermentador a uma proveta graduada de 2 l, mantida invertida e cheia com uma solução de CaCl₂ a 30% (peso/volume), o que permitia a colheita do gás proveniente da actividade microbiana. Uma rolha de borracha adaptada à parede de cada fermentador permitia a colheita de amostras com a ajuda de uma seringa.

2.2.3. Substractos

Numa primeira experiência estudou-se a resposta da flora ruminal a 6 concentrações crescentes de esparteína (Uquipa, Sacavém). A esparteína é um alcalóide maioritário na tremocilha brava logo a seguir à lupinina e o único disponível comercialmente. Recorreu-se à esparteína pura, pois é sob esta forma que o alcalóide surge nos tecidos secos, como é o caso das sementes (COSTA, 1993). Utilizaram-se as concentrações de 0, 1, 2, 3, 4 e 5 mM de esparteína e admitiu-se como 3 mM a concentração hipotética máxima de esparteína

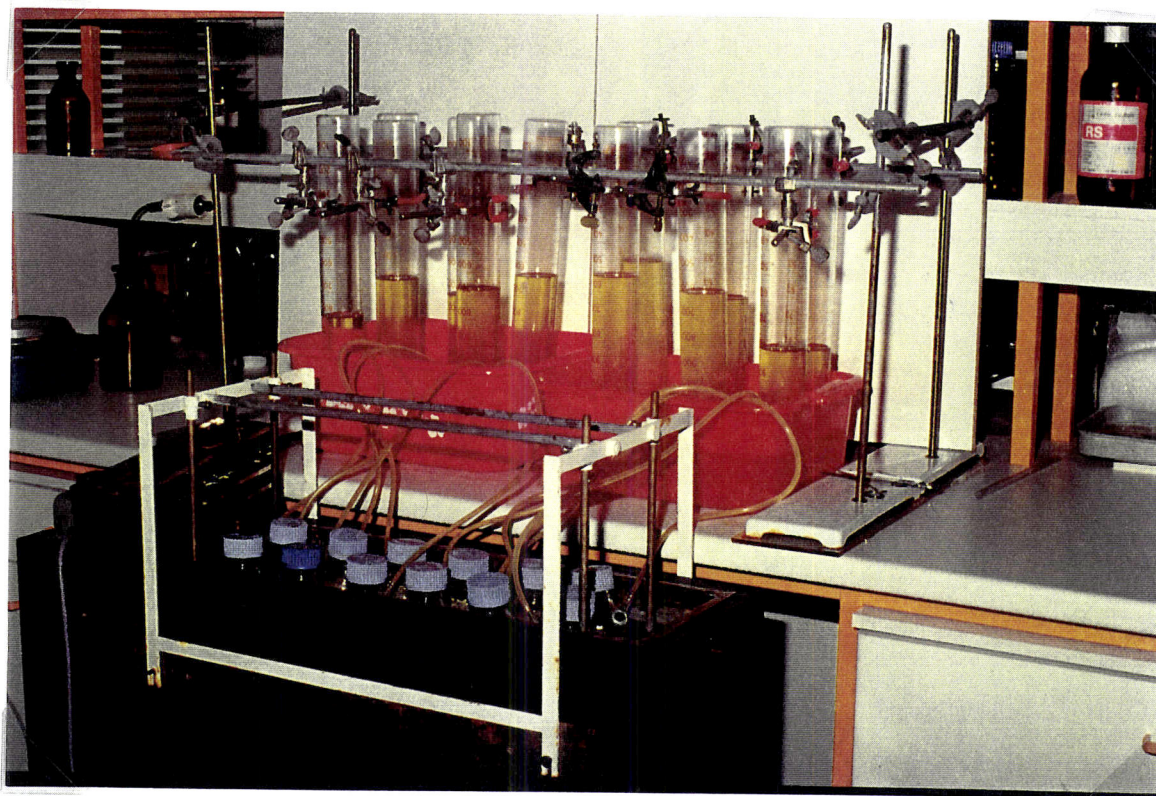


Figura 2.1. Fermentadores utilizados no estudo *in vitro*

no líquido ruminal em condições de campo - 15% MS no conteúdo ruminal e uma dieta constituída por tremocilha brava com 0,04% de esparteína (MUZQUIZ *et al.*, 1982).

Juntou-se a cada fermentador 100 mg de azoto solúvel, sob a forma de sulfato de amónia, e 3 g de MS de amido de trigo como fontes de N e energia, respectivamente. A esparteína foi dissolvida previamente em saliva artificial, com a ajuda de um agitador magnético, e de seguida introduziu-se a quantidade pretendida em cada fermentador. Respeitou-se a constante de dissolução do alcalóide que é de 1 g por 325 ml de soluto aquoso (AOAC, 1990). Numa segunda experiência utilizaram-se como substractos sementes de tremocilha brava e tremocilha doce da variedade *Topaz*. O material foi moído num moinho de martelos dotado de um crivo de 0,8 mm e fermentado segundo três níveis de incorporação: 5, 10 e 15 g de MS por fermentador. Todos os fermentadores foram munidos de um agitador magnético.

2.2.4. Medições e análises químicas

Obtiveram-se amostras de 7 ml de cada fermentador, no início bem como às 6, 12 e 24 horas. Logo de seguida mediu-se o pH e juntou-se a cada amostra 70 microlitros de uma solução de HgCl_2 a 5% tendo sido depois armazenadas em câmara congeladora a -20°C . A produção de gás foi medida às mesmas horas. Nas amostras da primeira experiência mediu-se o N solúvel pelo método proposto pela AOAC (1990). Nas sementes das duas variedades de tremocilha utilizadas analisou-se o seu teor em MS por secagem de amostras de 5 g a 105°C em estufa ventilada durante a noite, e o teor em MO, por incineração destas amostras em mufla a 550°C durante 3 horas. A concentração em PB foi estimada multiplicando por 6,25 o azoto total determinado pelo método macro-Kjeldahl, usando o selénio como catalizador (AOAC, 1975). A fibra insolúvel em detergente neutro (NDF) e em detergente ácido (ADF) bem como a lenhina no resíduo do ADF (ADL) foram determinadas pelo processo proposto por GOERING e van SOEST (1970). Para a determinação do teor em glúcidos solúveis utilizou-se o método preconizado por HERBERT *et al.* (1971) e determinou-se a DMS de acordo com o processo de TILLEY e TERRY (1963) modificado por ALEXANDER e McGOWAN (1966). Todas as análises foram processadas em duplicado.

O teor em alcalóides foi medido segundo o método de cromatografia gás-líquido proposto por PRIDDIS (1983) depois de se ter efectuado a extracção de acordo com o processo enunciado por PAPADOYANNIS e von BAER (1993). A tremocilha brava (100 mg MS) e a tremocilha doce *Topaz* (1000 mg MS) foram moidas num moinho de martelos e passados por um crivo de 0,8 mm. Juntou-se-lhes depois 15 ml de HCl 0,5 N, agitou-se num vortex e deixou-se repousar durante 3 horas. O material foi passado por um *ultraturrax* e centrifugou-se de seguida a 10 000 rpm durante 5 minutos. Recolheu-se o sobrenadante e lavou-se o resíduo com mais 15 ml de HCl 0,5 N. Após 30 minutos a mistura foi centrifugada, juntaram-se os sobrenadantes e subiu-se o pH até 12 com NaOH. A solução foi de seguida descarregada em cartuxos *Extrelut* (Merck) e os alcalóides extraíram-se com 3 x 20 ml de diclorometano. O solvente foi então roto-evaporado a 45°C e o resíduo diluído em 1 ml de etilacetato com 250 μg de caféina. Para a identificação e

quantificação dos alcalóides individuais utilizou-se um cromatógrafo de gás *Hewlett-Packard* 5880A equipado com um detector de ionização de chama de hidrogénio. Recorreu-se a uma coluna capilar OV-101 com 12 m x 0,2 mm e seguiram-se as seguintes condições de operação: temperatura de 250°C na injeção; temperatura de 300°C no detector; manutenção do forno a 60°C durante 1 minuto, aumento de 30°C/minuto até 120°C. Esta situação foi mantida por 30 s e de seguida procedeu-se ao aumento de 10°C/minuto até 260°C, mantendo-se esta temperatura por 2 minutos; utilizou-se o hélio como gás de arraste com o fluxo de 2ml/minuto e como *make up* à taxa de 28 ml/minuto; fluxo de hidrogénio de 30 ml/minuto; fluxo de ar de 400 ml/minuto. Identificaram-se os picos com a injeção dos alcalóides individuais. Utilizou-se a cafeína como padrão externo.

2.2.5. Análise estatística

As incubações foram levadas a cabo com uma semana de intervalo pelo período de um mês. Realizou-se a análise de variância segundo um desenho em blocos casualizados de maneira a ter em conta as variações de produção de gás registadas de semana para semana, constituindo assim cada uma das 4 semanas um bloco. Realizou-se a comparação das médias dos tratamentos constituídos por concentrações crescentes de esparteína pelo teste de Duncan (GOMEZ e GOMEZ, 1984). Os tratamentos constituídos por quantidades crescentes de tremocilha brava e tremocilha doce foram submetidos a análise de variância tendo-se comparado as médias pelo teste LSD. Consideraram-se as diferenças entre os tratamentos como significativas, muito significativas ou altamente significativas, quando a probabilidade da sua ocorrência foi, respectivamente, de 95% ($P < 0,05$), 99% ($P < 0,01$) e 99,9% ($P < 0,001$) (GOMEZ e GOMEZ, 1984).

2.3. Resultados e discussão

2.3.1. Produção de gás

No quadro 2.1. e nos gráficos das figuras 2.2. a 2.4. apresenta-se a produção de gás obtida nos fermentadores com as diferentes concentrações de esparteína ao cabo de 6, 12 e 24 h. Os valores obtidos e respectivas análises de variância são apresentados nos anexos 2.1. a 2.11..

O aumento da concentração de esparteína provocou um decréscimo paulatino da libertação de gás pela flora microbiana. Esta diminuição foi mais acentuada no início da fermentação. Ao fim das primeiras 6 horas a quantidade de gás produzida pela flora submetida à maior concentração de esparteína foi inferior em 39 % à registada no tratamento testemunha ($P < 0,05$). Esta diferença, embora mantendo-se significativa, foi-se atenuando com o decorrer da fermentação tendo passado para 16% às 12 horas e para apenas 6% às 24 horas (Quadro 2.2. e Figura 2.4.).

Quadro 2.1. Produção de gás pelos microorganismos do rúmen submetidos a 6 concentrações crescentes de esparteína.

Tempo (h)	Gás (ml) ^a						EPM
	0 mM	1 mM	2 mM	3 mM	4 mM	5 mM	
6	179 a	159 ab	155 abc	138 bcd	122 cd	109 d	15,48
12	427 a	419 ab	409 abc	391 a-d	379 bcd	358 d	19,60
24	603 a	586 ab	578 b	570 b	573 b	567 b	8,87

^a Média de 4 repetições obtidas cada uma em 2 fermentadores. Os valores da mesma linha assinalados com sobrescritos diferentes diferem significativamente ($P < 0,05$).

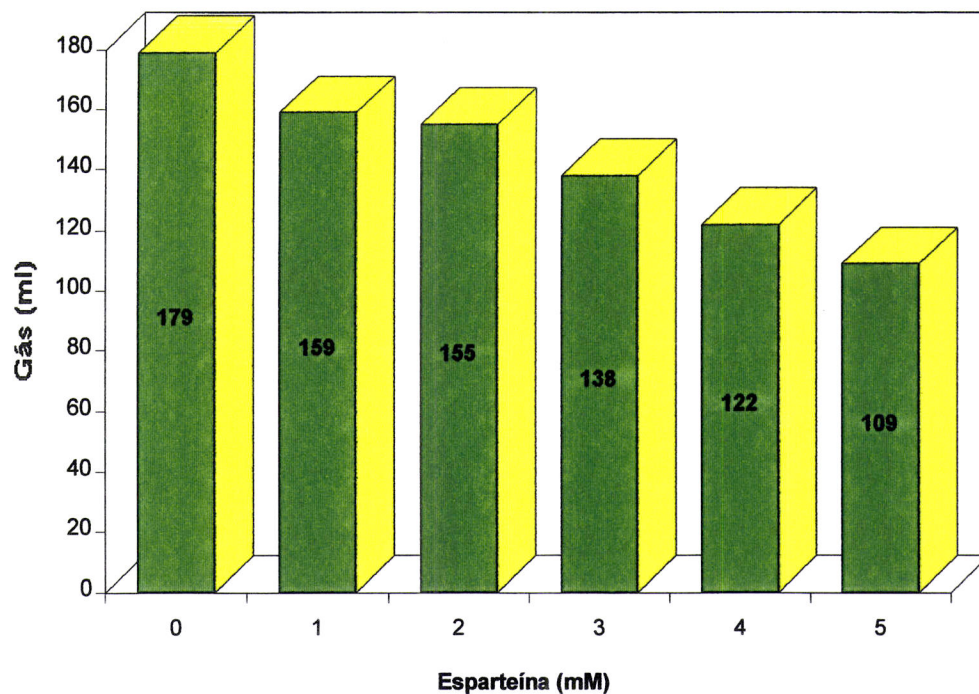


Figura 2.2. Produção de gás pela flora ruminal submetida a concentrações crescentes de esparteína ao fim de 6 h de fermentação *in vitro*.

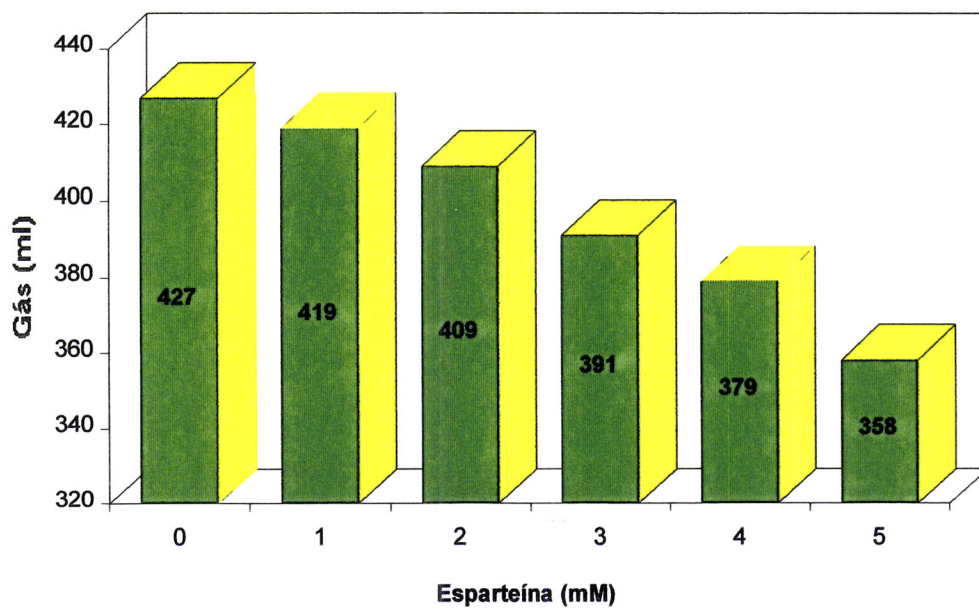


Figura 2.3. Produção de gás pela flora ruminal submetida a concentrações crescentes de esparteína ao fim de 12 h de fermentação *in vitro*.

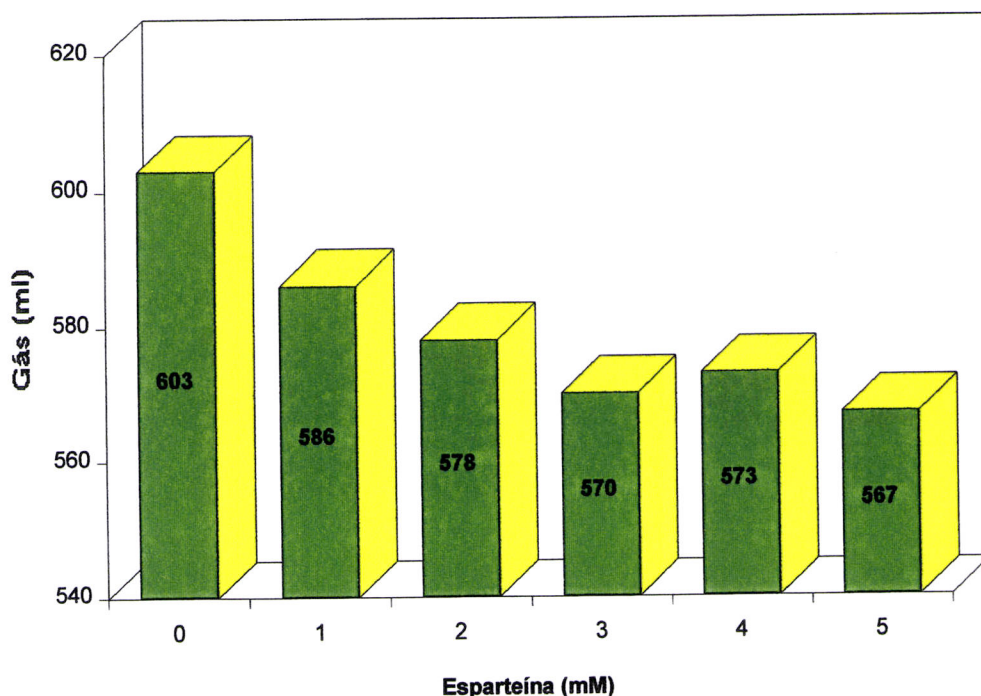


Figura 2.4. Produção de gás pela flora ruminal submetida a concentrações crescentes de esparteína ao fim de 24 h de fermentação *in vitro*.

Durante este intervalo de tempo a quantidade de gás produzida nos fermentadores com 2 a 5 mM do alcalóide foi significativamente inferior ($P < 0,05$) à do fermentador testemunha. Estes resultados assemelham-se aos obtidos por BUSH *et al.* (1972) que registaram completa inibição da actividade microbiana celulolítica *in vitro*, assim como a morte de todos os protozoários ao fim de 24 horas de fermentação, quando a concentração do alcalóide perlolina, da festuca alta, ultrapassava 1 mM. Todavia, ao contrário do que se notou com a esparteína, esta inibição teve um carácter irreversível, o que leva a pensar que a flora se adapta relativamente bem a teores relativamente elevados de esparteína no conteúdo do rúmen. Para além disso, em condições de campo estas concentrações de esparteína impeditivas da actividade ruminal poderão raramente ser atingidas. O inóculo obteve-se a partir de animais que nunca foram alimentados com tremocilha brava e, por isso, os resultados reflectem o efeito do alcalóide sobre uma população não adaptada. Em face da aparente facilidade com que os microorganismos se adaptaram à presença da esparteína, talvez fosse possível que numa experiência levada a cabo com uma fauna e flora

adaptadas ao alcalóide não se obtivessem diferenças significativas entre os tratamentos utilizados.

Quadro 2.2. Inibição da produção de gás (%) pelos microorganismos do rúmen sob concentrações crescentes de esparteína, ao fim de 6, 12 e 24 horas de incubação *in vitro*, comparativamente ao tratamento testemunha sem alcalóides.

Tempo (h)	Inibição (%)				
	1 mM	2 mM	3 mM	4 mM	5 mM
6	11,17	13,41	22,91	31,84	39,11
12	1,87	4,22	8,43	11,24	16,16
24	2,82	4,15	5,47	4,98	5,97

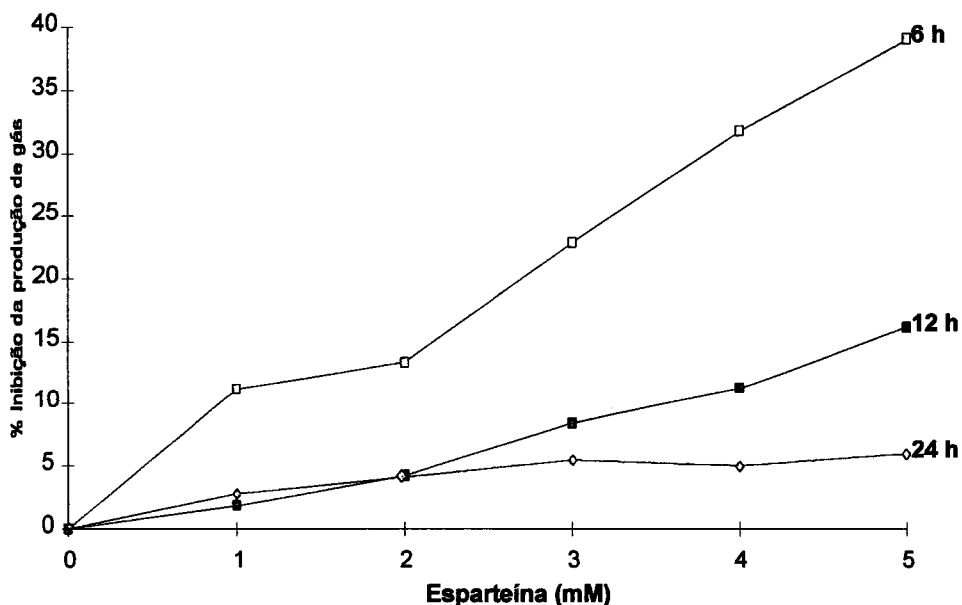


Figura 2.4. Efeito da esparteína sobre a produção de gás pelos microorganismos do rúmen *in vitro*.

No quadro 2.3. encontra-se a composição química do grão das duas variedades de tremocilha utilizadas. As duas variedades apresentaram níveis semelhantes de MS, MO e EE. O teor em fibra encontrado na tremocilha brava foi consideravelmente mais elevado, tal como o de lenhina, e assemelham-se aos detectados por outros autores na tremocilha brava (LANÇA, 1992). A quantidade de PB na tremocilha *Topaz* foi superior à da tremocilha brava, mas ambas se enquadram nos valores estabelecidos na revisão efectuada por HILL (1977).

Quadro 2.3. Composição química do grão das variedades de tremocilha utilizadas (%MS)

Parâmetros	Tremocilha	Tremocilha
	Brava	<i>Topaz</i>
MS (%)	88,30	84,50
MO	96,70	96,10
PB	41,76	48,43
EE	6,34	4,56
NDF	30,92	23,08
ADF	23,33	19,51
ADL	2,49	0,43
HCS	10,53	6,68
DMO	86,60	87,20
Lupinina	0,92	0,06
Esparteína	0,21	0,01
Gramina	0,03	-
Lupanina	0,05	-
Alcalóides	1,21	0,07

A concentração em alcalóides determinada na tremocilha *Topaz* é típica das variedades doces e inferior ao valor de 0,16 % encontrado por POTKANSKI *et al.* (1993) nesta cultivare. Estes autores utilizaram um método gravimétrico para a determinação dos alcalóides, que poderia ter dado origem a resultados menos precisos, devido à sua menor sensibilidade (PAPADOYANNIS e von BAER, 1993). O teor em alcalóides totais da tremocilha brava enquadra-se nos teores referidos por MUZQUIZ *et al.* (1982) para os ecótipos naturais do SW da Península Ibérica.

Em ambas as variedades predomina a lupinina, logo seguida pela esparteína. As quantidades relativas destes alcalóides na tremocilha brava por nós utilizada é, no entanto, diferente das encontradas por MUZQUIZ *et al.* (1982) vistos que estes autores apuraram quantidades equivalentes de lupinina e esparteína em tremocilha brava de origem portuguesa, para uma concentração semelhante de alcalóides totais. Todavia, num ecótipo espanhol de tremocilha brava estes autores encontraram quantidades equivalentes de lupinina e esparteína ao passo que num outro não detectaram esparteína, sendo a lupinina o alcalóide principal logo seguido de pequenas quantidades de gramina. Detectou-se ainda na tremocilha brava utilizada pequenas quantidades de gramina e lupanina, o que está de acordo com o perfil de alcalóides referido para esta espécie na revisão efectuada por CULVENOR (1973). No quadro 2.4. apresentam-se as concentrações em alcalóides nas tremocilhas utilizadas, calculadas com base no peso moléculas e no seu teor nas sementes. Como se pode observar, as concentrações de esparteína nos fermentadores em que se utilizou tremocilha como substrato foram inferiores às que se empregaram com a esparteína pura. As suas concentrações variaram de 0,009 mM, no tratamento constituído pela menor quantidade da tremocilha *Topaz*, até 0,6 mM nos fermentadores com 15 g de tremocilha brava. As doses de esparteína pura usadas aproximam-se, assim, mais das concentrações da lupinina. Tanto as doses de gramina como de lupanina são relativamente baixas, como seria de esperar.

Quadro 2.4. Concentrações de alcalóides nos fermentadores com tremocilha como substracto.

Substracto	Alcalóides (mM)				Total
	Lupinina	Esparteína	Gramina	Lupanina	
5g T. B.	1,20	0,20	0,04	0,04	1,48
5g T.T.	0,08	9,00.10 ⁻³	-	-	0,09
10 g T.B.	2,40	0,40	0,08	0,08	2,96
10 g T.T.	0,16	0,02	-	-	0,18
15 g T.B.	3,60	0,60	0,12	0,12	4,44
15 g T.T.	0,24	0,03	-	-	0,27

Pesos moléculares: Lupinina - 169 g, Esparteína - 234 g, Gramina - 174g e Lupanina-248g. TB-tremocilha brava, TT-tremocilha *Topaz*.

No quadro 2.5. apresentam-se as produções de gás originadas por cada uma das doses das variedade de tremocilha utilizadas. Nos anexos 2.12. a 2.20. encontram-se os valores obtidos assim como as análises de variância. Os níveis de alcalóides utilizados aparentemente não afectaram a actividade microbiana, visto que a produção de gás a partir do substracto rico em alcalóides não diferiu significativamente ($P > 0,05$) da permitida pelo substracto de baixo teor em alcalóides. Registou-se mesmo uma diferença significativa ($P < 0,05$) favorável à tremocilha brava às 12 h, todavia sem repercussão sobre os valores finais da produção de gás. Nos fermentadores com maiores quantidades de substracto - 10 e 15 g - assinalou-se uma tendência para uma menor produção de gás associada à tremocilha brava, ao final de 12 e 24 h de fermentação. Esta redução da produção de gás foi maior quando se empregou 15 g de substracto - menos 8% e menos 10% às 12 e 24 h,

respectivamente - do que quando a dose foi de 10 g - menos 4% e menos 5% às 12 e 24 h, respectivamente.

Quadro 2.5. Produção de gás a partir da fermentação *in vitro* de doses crescentes (5, 10 e 15 g MS) de tremocilha brava ou tremocilha doce Topaz (TT).

Tempo (h)	Gás (ml) ^a								
	5TB	5TT	EPM	10TB	10TT	EPM	15TB	15TT	EPM
6	427	384	3,94	670	637	21,51	744	707	25,72
12	648 ^a	604 ^b	13,71	938	974	26,12	945	1025	28,07
24	807	775	29,16	1209	1272	21,95	1178	1306	42,54

^a Média de 4 repetições obtidas cada uma em 2 fermentadores. Os valores da mesma linha assinalados com sobrescritos diferentes diferem significativamente (P < 0,05).

Registou-se também que, tanto às 12 h como às 24 h, a redução na produção de gás provocada pela tremocilha brava duplicou, quando a concentração de alcalóides aumentou em apenas 50 %. Esta tendência vai de encontro aos resultados obtidos na experiência com esparteína pura e que apontam para um efeito inibitório dos alcalóides da tremocilha brava em doses que dificilmente serão significativas em condições de campo. Por outro lado, é possível que a actividade microbiana ruminal seja mais sensível à esparteína do que à lupinina visto que quando utilizados em concentrações semelhantes, da ordem das 4 mM, apenas o primeiro alcalóide afectou a produção de gás.

2.3.2. Absorção de N-NH₃

No quadro 2.6. e na figura 2.5 mostram-se os valores da concentração de N amoniacal no meio dos fermentadores com concentrações crescentes de esparteína. Os valores obtidos e a respectiva análise de variância apresentam-se nos anexos 2.8. a 2.11..

Quadro 2.6. Concentração de N amoniacal nos fermentadores com 6 concentrações crescentes de esparteína (mM)^a.

Tempos (h)	N - NH ₃ (mg.100ml ⁻¹)						EPM
	0 mM	1 mM	2 mM	3 mM	4 mM	5 mM	
0	52,88	56,88	56,49	53,07	53,07	54,87	1,67
6	46,25	45,04	49,08	47,51	46,30	48,52	2,47
12	34,15 ^a	36,96 ^b	35,99 ^{ab}	37,04 ^b	37,93 ^b	37,96 ^b	1,12
24	29,06	28,72	31,31	30,63	31,19	29,35	1,48

^a Média de 4 repetições, obtidas cada uma em 2 fermentadores. Os valores da mesma linha assinalados com sobrescritos diferentes diferem significativamente (P < 0,05).

Qualquer que tenha sido a concentração de esparteína utilizada registou-se um decréscimo contínuo da concentração de azoto amoniacal ao longo do tempo, o que indica a ocorrência de síntese proteica mesmo sob a maior concentração do alcalóide. Estes resultados estão de acordo com os que respeitam à produção de gás e que indicaram ter ocorrido actividade microbiana em todos os meios. Porém, enquanto as produções de gás obtidas apontam para uma quebra significativa da actividade microbiana a partir de concentrações de esparteína superiores a 3, 4 e 2 mM, às 6, 12 e 24 h, respectivamente, o desaparecimento de N do meio não apresenta diferenças significativas (P<0,05) senão às 12 h. Nesta altura, a concentração média de N nos fermentadores sem esparteína foi inferior em 10 % à detectada naqueles em que se empregou a dose máxima do alcalóide. Logo com a concentração mais baixa, bem como com 3 e 4 mM, encontrou -se uma quantidade

significativamente superior de N solúvel, o que parece indicar que mesmo a um nível relativamente baixo (1 mM) a esparteína teria interferido com o desenvolvimento bacteriano. Todavia, a diferença na produção de gás obtida às 12 h e com esta concentração, apesar de inferior ao tratamento testemunha, não se revelou estatisticamente significativa. O mesmo se verificou quando se utilizou como substrato 10 ou 15 g de tremocilha e uma concentração de 0,4 e 0,6 mM de esparteína, respectivamente.

No termo das fermentações os valores da concentração de N amoniacal revelaram-se semelhantes em todos os tratamentos. Contudo, no final de um período de 24 horas de fermentação *in vitro* o N amoniacal existente no meio poderá já ter origem na degradação de proteína microbiana e por isso pouco indicativo seria do efeito do alcalóide sobre a síntese proteica. Por outro lado, nas primeiras horas das fermentações, a ausência de diferenças significativas entre os valores de N amoniacal sob as várias concentrações de esparteína poderá resultar de um efeito tóxico acumulativo do alcalóide sobre o crescimento bacteriano, que só se teria manifestado mais tarde, contrariamente ao que ocorreu sobre a actividade fermentativa, traduzida na produção de gás, onde o efeito da esparteína se manifestou logo às 6 horas.

2.3.3. pH

Os valores do potencial hidrogeniónico às 6, 12 e 24 h de fermentação dos substratos, na presença de quantidades crescentes de esparteína, apresentam-se no quadro 2.7 e na figura 2.6.. Os valores obtidos e sua análise estatística são apresentados nos anexos 2.4. a 2.7.. Os valores encontrados estão dentro dos limites fisiológicos (McDONALD *et al.*, 1986) e o seu decréscimo contínuo ao longo do tempo indica uma regular degradação do amido posto à disposição dos microorganismos e o conseqüente aumento da concentração em ácidos.

Quadro 2.7. Evolução do pH nos fermentadores com 6 concentrações crescentes de esparteína.

Tempos (h)	pH ^a						EPM
	0 mM	1 mM	2 mM	3 mM	4 mM	5 mM	
0	7,28	7,31	7,33	7,35	7,36	7,35	0,04
6	6,86 ^a	6,93 ^a	6,90 ^a	7,05 ^{ab}	7,00 ^b	7,20 ^b	0,09
12	6,17 ^a	6,23 ^a	6,26 ^{ab}	6,32 ^{ab}	6,41 ^b	6,40 ^b	0,07
24	5,55	5,59	5,58	5,60	5,63	5,59	0,03

^a Média de 4 repetições , obtidas cada uma em 2 fermentadores. Os valores da mesma linha assinalados com sobrescritos diferentes diferem significativamente (P < 0,05).

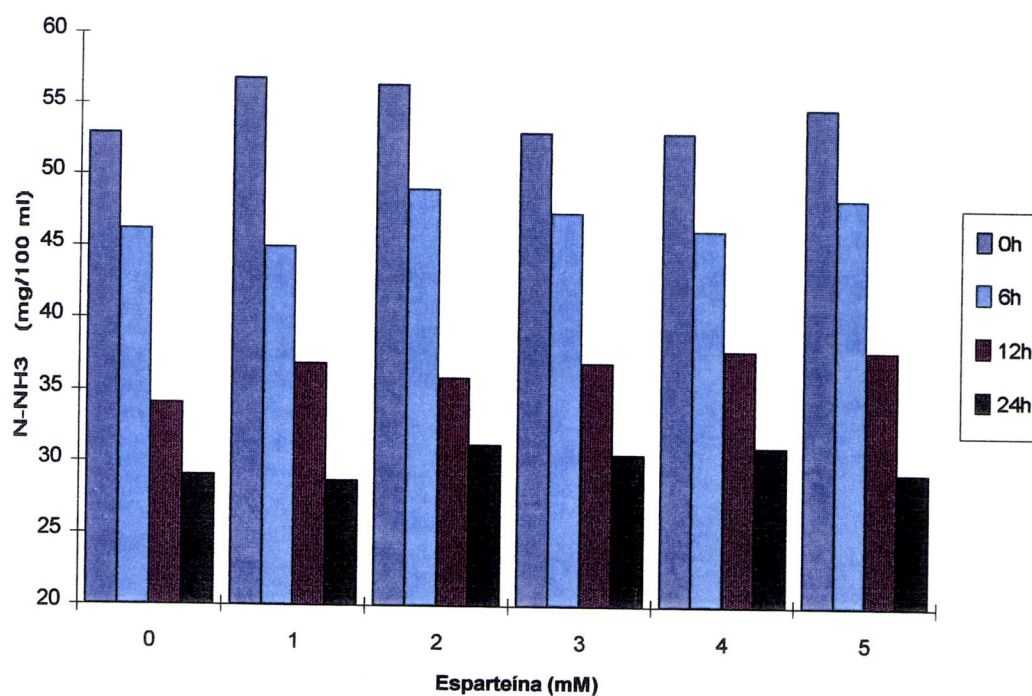


Figura 2.5. Evolução da concentração de N - NH₃ no suco ruminal *in vitro*, sob o efeito de 6 concentrações crescentes de esparteína.

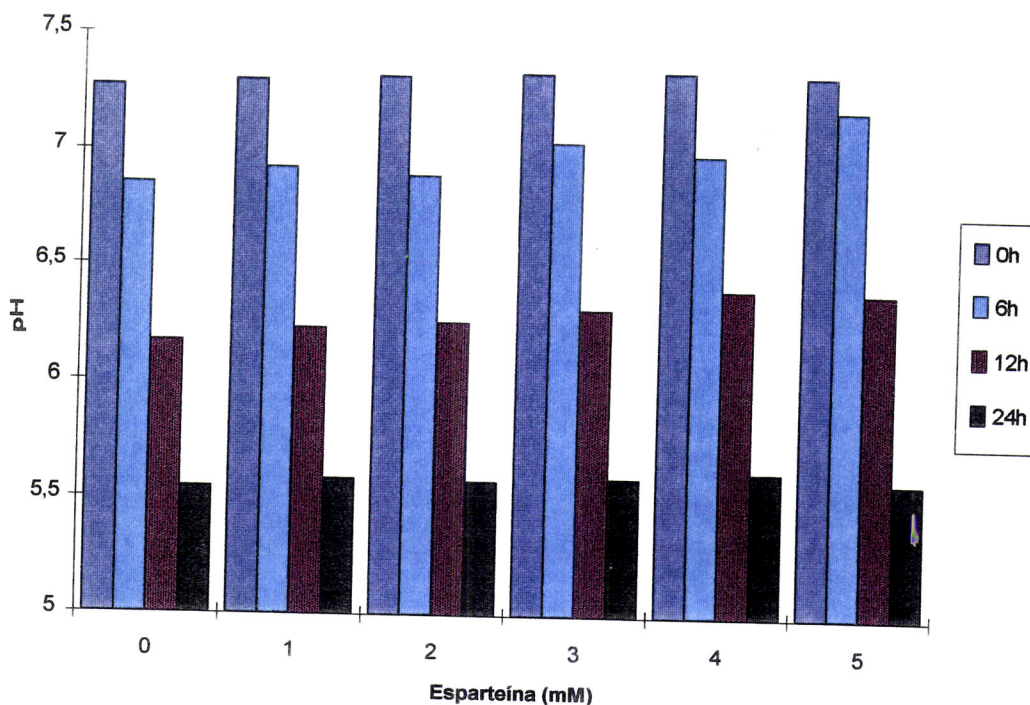


Figura 2.6. Evolução do pH no suco ruminal *in vitro*, sob 6 concentrações crescentes de esparteína.

No início da fermentação, à hora 0, os valores do pH não foram significativamente influenciados pela presença da esparteína ($P > 0,05$) e das suas propriedades alcalinizantes, apesar de se terem registado valores de pH um pouco superiores nos fermentadores com esparteína. Às 6 h o valor médio do pH nos fermentadores com 5 mM de esparteína foi significativamente superior aos registados nos fermentadores com 0, 1 e 2 mM ($P < 0,05$). Nos tratamentos constituídos por 0 a 4 mM não se notaram diferenças significativas ($P > 0,05$). Às 12 h as diferenças entre os valores do pH dos tratamentos atenuaram-se mas os do tratamento com 4 mM e 5 mM de esparteína, também se tornaram significativamente superiores ao do testemunha ($P < 0,05$). Como seria de esperar num sistema fechado, às 24 h a acumulação dos ácidos provenientes dos processos fermentativos reduziu os valores do pH para níveis muito baixos, já nos limites fisiológicos e as diferenças entre os tratamentos deixaram de ser significativas ($P > 0,05$). As diferenças entre os valores de pH dos tratamentos às 6 e 12 h estão de acordo com os resultados da produção de gás e indicam

igualmente que a fermentação dos substratos foi significativamente inibida pela presença da esparteína.

No quadro 2.8. apresentam-se os valores de pH obtidos durante a fermentação de sementes de tremocilha brava e tremocilha doce *Topaz*. Nos anexos 2.12. a 2.32. mostram-se os valores obtidos e a análise estatística. Após 6 h de fermentação não se registaram diferenças significativas entre os valores de pH dos tratamentos com iguais níveis de substrato ($P > 0,05$). Logo neste tempo, nos tratamentos com maior quantidade de tremocilha, registou-se uma acentuada acidificação do meio em virtude da elevada quantidade de MS fermentescível utilizada e o pH desceu para valores anormais. Todavia, tal como ocorreu com os outros tratamentos, também aqui não se registaram diferenças significativas. Às 12 e 24 h de fermentação todos os tratamentos com tremocilha brava apresentaram níveis significativamente inferiores de pH ($P < 0,05$), apesar de não se terem registados diferenças significativas entre os valores da produção de gás às mesmas horas.

Quadro 2.8. Evolução do pH durante a fermentação *in vitro* de doses crescentes (5, 10 e 15 g MS) de tremocilha brava ou tremocilha doce *Topaz* (TT).

Tempo (h)	Gás (ml) ^a								
	5TB	5TT	EPM	10TB	10TT	EPM	15TB	15TT	EPM
0	7,13	7,14	0,05	7,05	7,10	0,03	7,04	7,03	0,03
6	6,80	6,82	0,02	5,99	6,12	0,06	5,47	5,56	0,16
12	6,78 ^a	6,85 ^b	0,02	5,98 ^a	6,20 ^b	0,06	5,38 ^a	5,74 ^b	0,08
24	6,61 ^a	6,73 ^b	0,03	5,85 ^a	6,08 ^b	0,07	5,48	5,66	0,12

^a Média de 4 repetições obtidas cada uma em 2 fermentadores. Os valores da mesma linha e da mesma dose de substrato assinalados com sobrescritos diferentes diferem significativamente ($P < 0,05$).

Este desfasamento poderia resultar do maior teor em PB da tremocilha *Topaz* - 48,80 % contra 41,76% na tremocilha brava - ter originado uma maior libertação de iões NH_4^+ e, consequentemente, valores de pH ligeiramente superiores.

Os resultados obtidos vão de encontro aos referidos por WINK (1984) sobre a acção da esparteína e de outros alcalóides quinolizidínicos em microorganismos aeróbicos. Segundo aquele autor, concentrações de esparteína superiores a 0,5 mM inibem o desenvolvimento de bactérias aeróbias. Como este nível tóxico sobe para 5 mM no caso da lupanina (WINK, 1984), o alcalóide principal no tremoço vulgar, é possível que a concentração tóxica de lupanina da tremocilha para os microorganismos seja muitas vezes superior à da esparteína, o que justificaria o facto da tremocilha brava não ter qualquer efeito sobre a flora ruminal *in vitro*. Pelo menos a concentração de 3,3 mM de lupanina, correspondente à dose máxima de tremocilha utilizada, parece não ter qualquer efeito inibidor da actividade bacteriana.

2.4. Conclusões

Aparentemente os alcalóides da tremocilha têm um efeito inibitório muito limitado sobre os microorganismos do rúmen. A sua acção sobre a flora parece não ser tão drástica como a da perlolina, na festuca alta. A esparteína pode reduzir a actividade e o crescimento microbiano, mesmo em baixas concentrações. Contudo, tendo em conta o estudo efectuado com os alcalóides em natureza na tremocilha brava, afigura-se pouco provável que esta acção inibitória possa assumir relevância em condições de campo. Para além disso, os resultados obtidos apontam no sentido de uma menor ou mesmo nula toxicidade da lupanina, o alcalóide predominante na tremocilha brava.

3. Destino dos alcalóides da tremocilha brava no líquido ruminal incubado *in vitro*.

3.1. Introdução

No capítulo precedente estudou-se o efeito dos alcalóides da tremocilha brava sobre a flora ruminal. Tendo-se concluído que não deveria existir um efeito pronunciado daquelas substâncias, pelo menos nas concentrações em que deverão ocorrer naturalmente no animal, é legítimo interrogarmos-nos sobre o seu destino no líquido ruminal. A acção inibitória da esparteína sobre a actividade microbiana anteriormente registada, diminuiu substancialmente no decorrer das fermentações, o que poderia dever-se a uma degradação do alcalóide pela flora ruminal, após um período de adaptação à sua presença. Por outro lado, poder-se-iam ter esgotado os substractos fermentáveis à disposição da flora e esta ter começado a usar a esparteína no seu metabolismo energético.

A heliotrina e a lasiocarpina, dois alcalóides pirrolizidínicos de *Heliotropium europaeum* (tornassol ou erva-das-verrugas), hepatotóxicos para todas as espécies pecuárias, são reduzidos por duas bactérias anaeróbias do rúmen da ovelha (CARLSSON e BREEZE, 1984) perdendo assim a sua toxicidade. Um dos organismos, um *Coccus* gram-negativo ainda não identificado, usa como substracto diversos glúcidos e, aparentemente, obtém relativamente pouca energia a partir da degradação redutiva da heliotropina. O outro organismo, *Peptostreptococcus heliotrinreducans*, não fermenta hidratos de carbono, conseguindo a sua energia a partir de reduções sucessivas em que formato e hidrogénio servem como dadores de electrões, e outras moléculas, tais como fumarato, nitrato, mas também heliotrina e lasiocarpina, servem como aceitadores de electrões (DAWSON e ALLISON, 1988). O mesmo destino também parecem ter os alcalóides pirrolizidínicos da festuca alta, N-formil e N-acetil-lolina, conhecidos pela sua acção tóxica sobre os linfócitos. Mas neste caso não ocorre destoxificação no rúmen. Ao contrário, a flora procede a uma activação daqueles alcalóides transformando-os em lolina, cuja acção sobre a multiplicação dos linfócitos do hospedeiro é ainda mais nefasta. (WESTENDORF *et al.*, 1993).

Também os alcalóides pirrolizidínicos de *Senecio jacobea* (erva-de-santiago, tasna ou mijação) - jacobina, jaczina, jacolina, senecionina e senecifilina - são rapidamente metabolizados pela flora do suco ruminal ovino. Todavia, no suco de bovinos estes alcalóides não são praticamente alterados, o que explicará o facto dos ovinos serem mais resistentes àquelas toxinas dos que os bovinos e os cavalos (CRAIG *et al.*, 1992). De acordo com o trabalho destes autores, a degradação dos alcalóides dependeria de um consórcio de bactérias metanogénicas. Apesar disso não encontraram indícios de que ocorresse a sua mineralização. Os ovinos suportam igualmente bem os alcalóides diterpenóides de *Delphinium* spp. (paparroz), uma infestante das pastagens em Portugal, altamente tóxica para todas as espécies pecuárias e para os humanos (COSTA, 1993), talvez devido a um efeito protector da flora ruminal, à semelhança do que acontece com os alcalóides de *Senecio jacobea*. A dose tóxica de delfinina (C₂₂H₃₅NO₆), stafisagrina (C₄₂H₃₃NO₅), delfinidina (C₄₂H₆₈N₂O₇) e delfisina (C₂₇H₄₆N₂O₄), para os ovinos, parece ser 6 vezes maior do que para os bovinos. Por esta razão, em algumas zonas do Oeste dos Estados Unidos recomenda-se que os ovinos pastem primeiro do que os bovinos, para removerem as plantas responsáveis pela toxicose, de maneira que estes não sejam afectados (revisão de CORREIA, 1981).

Os microorganismos do rúmen constituem uma barreira à entrada de toxinas no metabolismo do hospedeiro, degradando e destoxificando um leque variado de substâncias. A flora ruminal degrada *in vitro* os pesticidas organofosforados (COOK, 1957 cit. por CRAIG *et al.*, 1992) e destoxifica outras substâncias através da sua redução a amónia, como é o caso do nitrito e das miserotoxinas da alfavaca (DAWSON e ALLISON, 1988). A transformação da mimosina, um aminoácido tóxico de leguminosa arbórea *Leucaena leucocephala*, em metabolitos atóxicos constitui outro exemplo de neutralização de substâncias tóxicas pela flora ruminal (JONES e MEGARRITY, 1983). A ocratoxina, uma micotoxina produzida por *Aspergillus ochraceus* e outros penicílios, é outro tóxico susceptível de ser degradado no rúmen. De acordo com HULT *et al.* (1976) os bovinos conseguem degradar esta substância até à concentração de 12mg/Kg de ração, mediante a

sua transformação em ocratoxina alfa e fenilalanina, dois compostos isentos de toxicidade. A dose letal oral da toxina C do botulismo é 100 vezes superior à dose letal administrada por via subcutânea, o que talvez se deva a uma degradação no suco ruminal ovino e bovino, conforme atesta o trabalho de ALLISON *et al.* (1976). Também a hidrogenação dos ácidos gordos insaturados que é levada a cabo no rúmen, protege o animal de alguns lipídios tóxicos, como por exemplo o ácido erúxico presente na colza ou o ácido ricinoleico do óleo de castor (ROBB *et al.*, 1973; CORREIA, 1981). A utilização do oxalato como fonte energética pela bactéria ruminal *Oxalobacter formigenes* permite igualmente ao ruminante tolerar quantidades de ácido oxálico na dieta que seriam patogénicas para os monogástricos (DAWSON *et al.*, 1980).

Visto que os microorganismos do rúmen formam uma barreira à penetração de toxinas nas células do ruminante, este mecanismo de defesa permitiria explicar o facto destes animais serem mais tolerantes aos alcalóides quinolizidínicos do que as restantes espécies pecuárias. Assim, no sentido de se averiguar até que ponto a flora ruminal estaria habilitada para degradar os alcalóides da tremocilha brava, procedeu-se à sua incubação *in vitro*, e ao doseamento de cada um dos alcalóides presentes no meio às 0, 24 e 48 horas da fermentação.

3.2. Materiais e métodos

3.2.1. Animais e técnica de colheita de suco ruminal

O suco ruminal foi obtido a partir de três carneiros Merino Branco fistulados no rúmen. Os animais foram mantidos estabulados e alimentados duas vezes ao dia com uma dieta de manutenção constituída por 75% de feno de aveia e 25% de tremocilha brava, durante 30 dias, até ao início do período experimental, e durante a semana que este durou. O conteúdo ruminal retirou-se de manhã, antes de ser fornecida a primeira refeição, e imediatamente a seguir à abertura da fistula, com a ajuda de um sistema mecânico de vácuo

e de um *Erlenmeyer* munido de um tubo. O material recolhido foi depois filtrado através de uma gaze colocada sobre um funil. Depois de transportado para o laboratório, o suco ruminal foi transferido para um *Erlenmeyer* e misturado com saliva artificial na proporção de 1:3, com a ajuda de um agitador magnético. Foram então introduzidos 50 ml desta mistura dentro de fermentadores, com a ajuda de uma pipeta automática e sob agitação. Todo o material foi mantido em água a 39°C antes de utilizado e as operações decorreram debaixo de uma injeção de CO₂.

3.2.2. O sistema *in vitro*

O sistema *in vitro* compunha-se de um conjunto de tubos de vidro de 200 ml, com fundo esférico e munidos de uma rolha de borracha com uma válvula de Bunsen. Os tubos introduziram-se num suporte plástico, colocado no interior de um banho-maria a 39°C, com agitador de água, e coberto com uma tampa de modo a conservarem-se os fermentadores ao abrigo da luz.

3.2.3. Substractos

Utilizou-se como substracto 0,5 g (MS) de sementes de tremocilha brava, moída em moinho de martelos e passada por um crivo de 0,8 mm, cuja composição química se indica no quadro 2.3.. Para se poder controlar o desenrolar das fermentações foram introduzidos aleatoriamente por entre os fermentadores com tremocilha, fermentadores com 0,5 g de cevada e outros com 0,5 g de feno, cuja digestibilidade *in vivo* foi previamente determinada. No final da fermentação o conteúdo destes tubos foi filtrado, seco em estufa a 103 °C, e determinada a DMS das amostras. Os resultados obtidos foram confrontados com os valores determinados *in vivo*. Foram feitos dois conjuntos de inoculações, separadas de uma semana. Cada conjunto era formado por 24 fermentadores com tremocilha brava, 3 fermentadores com cevada, 3 com feno e 3 sem substracto. Foram retirados 8

fermentadores com tremocilha brava no início da fermentação (hora 0), outros 8 às 24 h e o último grupo às 48 h da incubação.

3.2.4. Análises químicas

Retirou-se de cada fermentador, com a ajuda de um agitador magnético, uma amostra de 15 ml que foi de seguida acidificada a pH 2 com HCl 0,5N e congelada a -20°C. Para o isolamento e quantificação dos alcalóides presentes nas amostras utilizou-se o método de extacção proposto por PAPADOYANNIS e von BAER (1993) e o processo cromatográfico gás-liquido utilizado por PRIDDIS (1983), como já foi referido em 2.2.4. .

3.2.5 Análise estatística

As concentrações de cada um dos alcalóides às 0, 24 e 48 h foram tratadas segundo um delineamento completamente casualizado e compararam-se os valores médios pelo teste LSD. Consideraram-se as diferenças entre as concentrações médias de cada alcalóide naqueles 3 tempos de observação como significativas, muito significativas ou altamente significativas, quando a probabilidade da sua ocorrência foi, respectivamente, de 95% ($P < 0,05$), 99% ($P < 0,01$) e 99,9% ($P < 0,001$) (GOMEZ e GOMEZ, 1984).

3.3. Resultados e discussão

A evolução da concentração de cada um dos alcalóides da tremocilha bava, ao longo de 48 h de fermentação *in vitro*, pode ser observada no quadro 3.1. e na figura 3.1.. Os valores obtidos e respectiva análise de variância apresentam-se nos anexos 3.1. a 3.5.. A digestibilidade das amostras de cevada e de feno submetidas ao ataque microbiano, em simultâneo e conjuntamente com as amostras de tremocilha, foram semelhantes às

determinadas *in vivo*, o que indica terem os processos fermentativos decorrido normalmente.

Quadro 3.1. Evolução da concentração dos alcalóides da tremocilha brava ao longo de 48 h de fermentação *in vitro* no suco ruminal ovino (Média \pm EPM) ^a.

Alcalóide	Concentração ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)			Signif.
	0 h	24 h	48 h	
Lupinina	65,49 \pm 3,79	63,20 \pm 3,93	67,30 \pm 4,05	NS
Esparteína	8,39 \pm 0,24	7,39 \pm 0,36	7,02 \pm 0,31	*
Gramina	5,35 \pm 0,36	0,49 \pm 0,10	0,15 \pm 0,04	***
Lupanina	3,84 \pm 0,51	6,69 \pm 0,74	8,23 \pm 0,49	***
Total	83,08 \pm 4,30	77,77 \pm 4,05	82,71 \pm 4,45	NS

^a Média de 16 repetições. Esparteína: $\text{LSD}_{0,05} = 0,897$. Gramina: $\text{LSD}_{0,001} = 1,123$.Lupanina: $\text{LSD}_{0,001} = 3,045$.

A concentração de lupinina, o principal alcalóide da tremocilha brava utilizada, não foi alterada pela actividade microbiana, ao fim de 24 ou 48 horas de digestão ($P > 0,05$). A concentração de esparteína foi significativamente menor às 24 h ($P < 0,05$) e diminuiu ainda até às 48 h ($P < 0,01$). Entre as 24 e as 48h o decréscimo verificado não foi significativo. Apesar deste decréscimo significativo da concentração da esparteína, no final da fermentação existia ainda 84 % da quantidade inicial. Detectou-se uma concentração de gramina muito baixa, logo às 24 h ($P < 0,001$). Quanto à lupanina, o alcalóide presente em menor quantidade, registou-se um aumento contínuo da sua concentração ao longo da fermentação. A sua concentração evoluiu de 3,84 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ para 6,69 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ às 24 h ($P < 0,01$), e 8,23 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ às 48 h ($P < 0,001$). A diferença entre as quantidades de lupanina

medidas no meio, às 24 e as 48h não foi significativa ($P>0,05$). A concentração total de alcalóides presentes no meio não se alterou significativamente durante a incubação ($P>0,05$).

Os resultados obtidos apontam para uma resistência dos alcalóides quinolizidínicos da tremocilha brava à degradação microbiana. Já a gramina, o único alcalóide de estrutura indólica presente na tremocilha, aparenta ser metabolizada com facilidade pelos microorganismos do rúmen. Esta diferença entre o comportamento das moléculas de lupinina e esparteína por um lado e de gramina, por outro, talvez se deva à diferente estrutura das suas moléculas (Figura 3.2.).

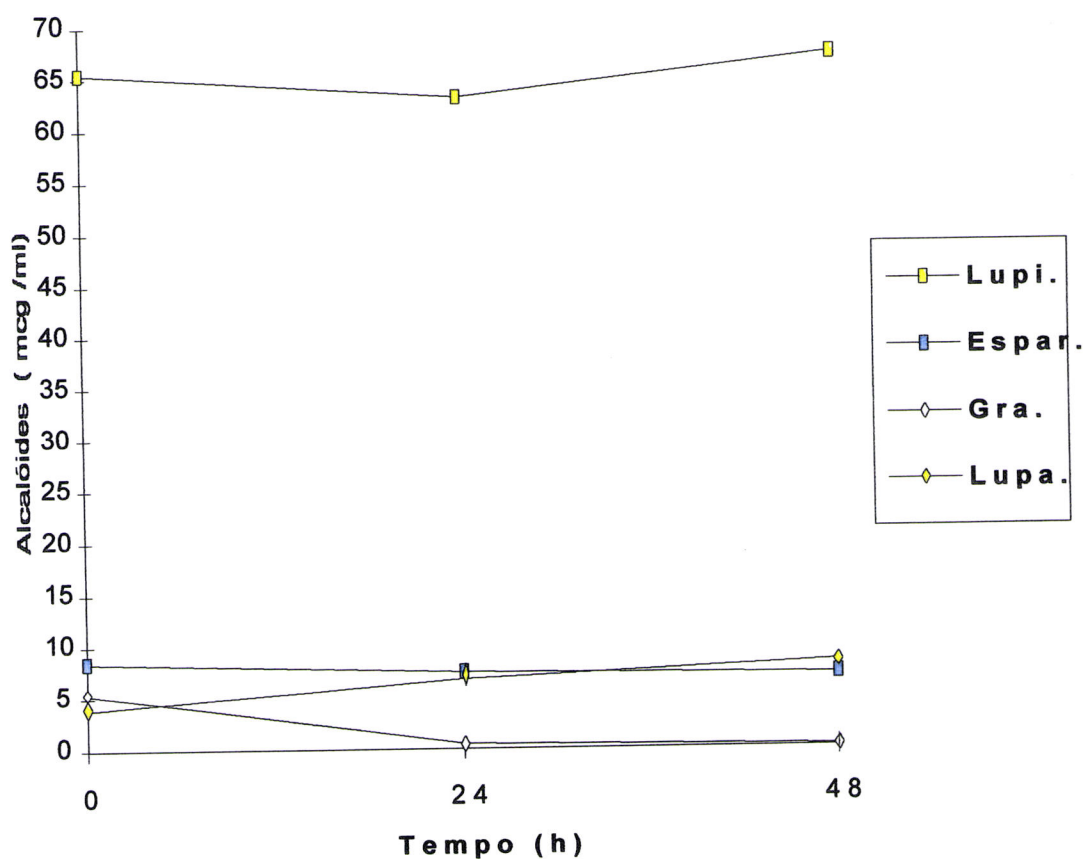


Figura 3.1. Evolução da concentração dos alcalóides da tremocilha brava ao longo de 48 h de fermentação *in vitro* em suco ruminal ovino.

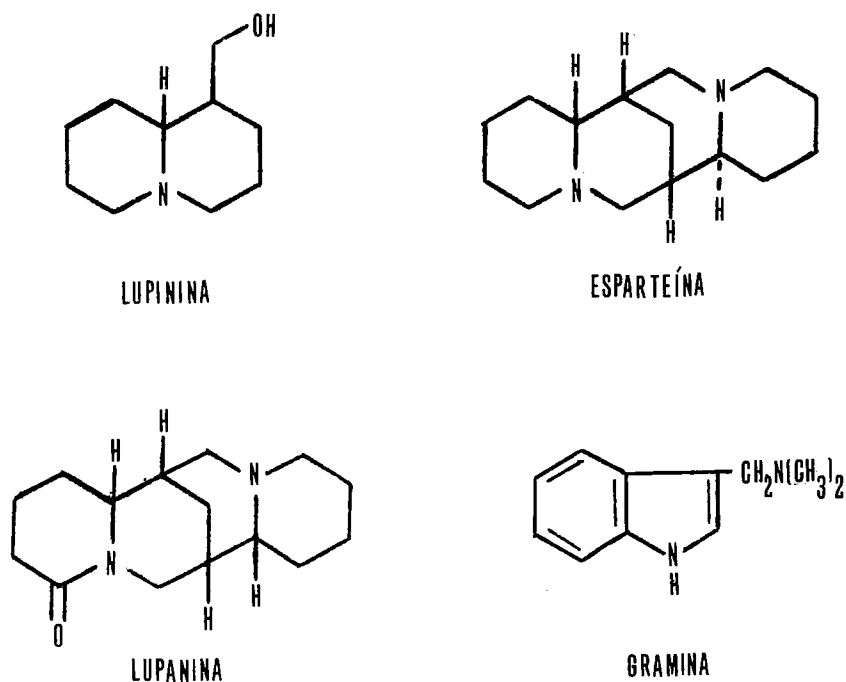


Figura 3.2. Estrutura química dos alcalóides da tremocilha brava

O ecossistema ruminal constitui um meio altamente redutor, onde as substâncias muito reduzidas, na ausência do oxigénio, são utilizadas com dificuldade no metabolismo energético dos microorganismos. Os compostos de carbono muito reduzidos, como o metano ou os lípidos, ou oxidados, como o dióxido de carbono, são assim preteridos em favor daqueles que possuem os átomos de carbono num estado intermédio de oxidação (HUNGATE, 1966). É por esta razão que os ácidos gordos não sofrem outra alteração que não seja a sua hidrogenação, constituindo o ácido esteárico o produto final destas reacções. A sua estrutura corresponde ao estágio de máxima redução da cadeia inicial dos ácidos gordos (HARFOOT e HAZLEWOOD, 1988). Nestas substâncias saturadas, os átomos de carbono efectuaram ligações com todos os seus electrões de valência pelo que dificilmente se podem transformar noutras em que estes átomos modifiquem o seu estado de oxidação. Nos glúcidos, os átomos de carbono apresentam-se num estado intermédio de oxidação, podendo assim serem utilizados na síntese de outras moléculas em que alguns carbonos ficam mais oxidados e outros mais reduzidos. Por esta razão, os hidratos de carbono são a principal fonte de energia para os microorganismos anaeróbios (HUNGATE, 1966). A esparteína é um composto saturado, por isso muito estável na presença de

redutores e de muitos oxidantes (COSTA, 1994), podendo apresentar um grau de redução semelhante ao do ácido esteárico (Quadro 3.2.).

Quadro 3.2. Equivalentes de oxidação de algumas substâncias orgânicas. ^a

Substância	Fórmula	Equivalente de oxidação/mole	Unidades de oxidação por C
Glucose	$C_6H_{12}O_6$	0	0
Ácido acético	$C_2H_4O_2$	0	0
Ácido propiónico	$C_3H_6O_2$	-1	-0,33
Ácido butírico	$C_4H_8O_2$	-2	-0,5
Dióxido de carbono	CO_2	+2	+2
Metano	CH_4	-2	-2
Ácido esteárico	$C_{18}H_{36}O_2$	-16	-0,81
Lupinina	$C_{10}H_{19}NO$	-8,5	-0,85
Esparteína	$C_{15}H_{26}N_2$	-13	-0,87
Lupanina	$C_{15}H_{24}N_2O$	-11	-0,73
Gramina	$C_{11}H_{14}N_2$	-7	-0,64

^a Adaptado de WOLIN (1960)

A molécula de lupinina, embora não tão reduzida, apresenta igualmente um estado de oxidação bastante negativo, que poderá ser impeditivo da sua metabolização pelos

microorganismos anaeróbios. No entanto, esparteína e lupinina são substâncias facilmente oxidadas por alguns microrganismos aeróbios do solo (RYBICKA, 1964). As moléculas dos alcalóides de ergotamina da festuca alta e da cravagem do centeio, ergovalina e ergovalinina (C₂₉H₃₅O₅N₅), também são muito saturadas, o que poderá constituir o principal factor a influenciar a sua elevada estabilidade no rúmen (TUCKER e BUSH, 1992; WESTENDORF *et al.*, 1993). Pelo contrário, a molécula da gramina, apresenta várias ligações duplas no seu núcleo indólico, que poderão, num meio redutor, aceitar electrões, estabelecendo ligações com hidrogénios. Por outro lado, a molécula poderá ainda ser reduzida, com libertação do grupos CH₃ à semelhança do que ocorre no processo de destoxificação do alcalóide pirrolizidínico heliotrina pela flora ruminal (Figura 3.3.).

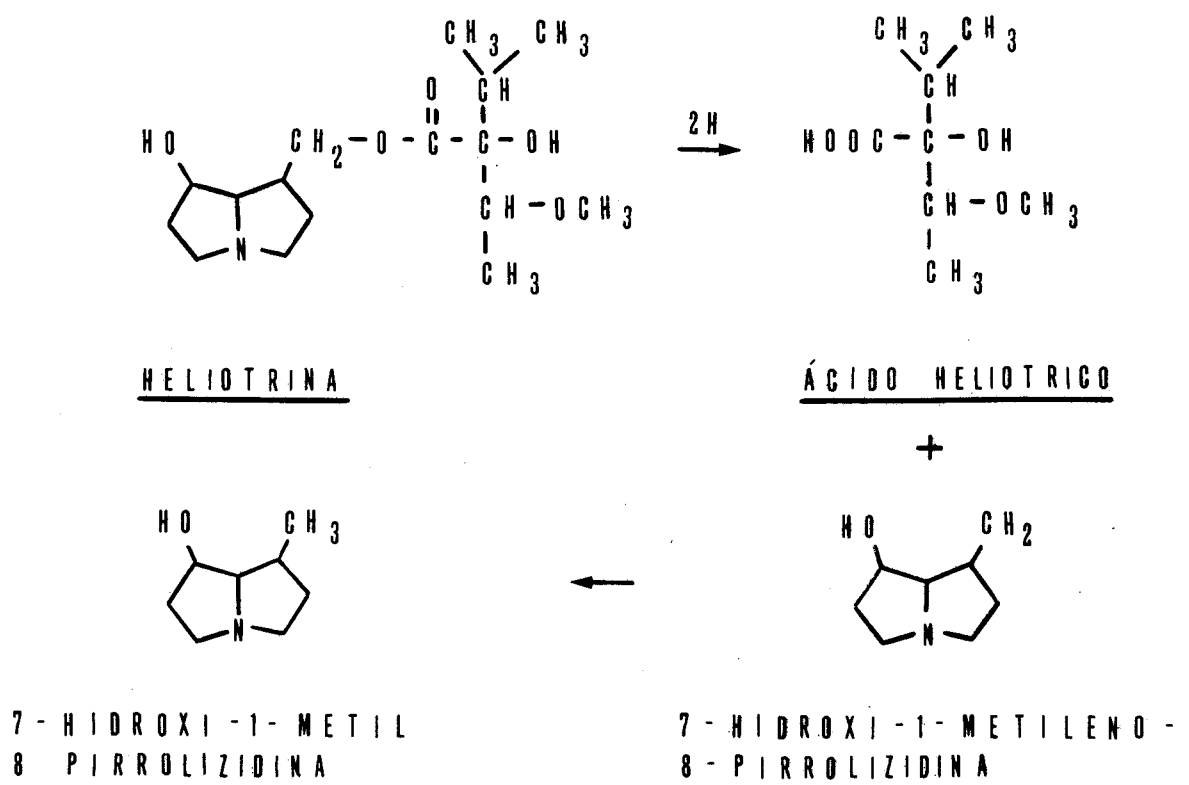


Figura 3.3. Metabolismo da heliotrina pelos microrganismos do rúmen (RUSSEL e SMITH, 1968 cit. por CARLSSON e BREEZE, 1984)

O aumento da concentração de lupanina no decurso da digestão *in vitro* sugere ter havido uma transformação de outro alcalóide naquela molécula, resultado que concorda com o obtido por RAZAKA (1992). No estudo que a autora efectuou sobre o comportamento dos alcalóides de *L. mutabilis* e *L. albus* (esparteína e lupanina) no suco ruminal bovino *in vitro*, utilizando um sistema *RUSITEC*, detectou-se, por cromatografia de camada fina, a presença de lupanina no meio, quando se incubou esparteína durante 48 h. Concomitantemente, encontrou-se uma menor concentração de esparteína àquela hora. A autora refere que a redução da concentração de esparteína não pode ser interpretada como o resultado da acção bacteriana, mas antes como uma lixiviação da esparteína, no fermentador, pela continua infusão de saliva artificial no meio. Contudo, os resultados por nós obtidos no sistema fechado utilizado, apontam para uma redução efectiva e continuada do teor em esparteína no meio, apesar de se registar em quantidades não equivalentes ao aumento da concentração de lupanina sintetizada *de novo*. Apesar disso, a formação de lupanina a partir da esparteína, apresenta-se, em ambos os trabalhos, como a hipótese mais plausível para a síntese *de novo* daquele composto. Resta saber se esta transformação ocorrerá por acção microbiana ou será antes devida a uma alteração espontânea da molécula de lupanina, que poderia, inclusivamente, ocorrer durante o processo de armazenamento das amostras de efluente de fermentador e extracção dos alcalóides. A esparteína ($C_{15}H_{26}N_2$) é um precursor da lupanina ($C_{15}H_{24}N_2O$) ou 2-oxo-11L-Esparteína, durante a síntese dos alcalóides nas plantas, pelo que talvez seja possível que alguns microorganismos do rúmen possam utilizar a esparteína como fonte de electrões, dando origem a uma molécula de lupanina. Para os mamíferos, a lupanina é mais tóxica do que a esparteína (GORDON e HENDERSON, 1951; POE e JOHNSON, 1954 e ZETLER e SRUBELT, 1980 cit. por WINK, 1984), com doses letais (50) de 0,2-0,8 mM e 0,2 - 2,2 mM, respectivamente, pelo que os microorganismos do rúmen poderiam proceder a uma bioactivação da esparteína e a um aumento da toxicidade da tremocilha brava ingerida.

3.4. Conclusões

Os alcalóides de quinolizidina da tremocilha brava deverão ser moléculas relativamente estáveis no rúmen. Os resultados obtidos *in vitro* apontam para uma fraca destoxificação destas moléculas ao nível ruminal.

A gramina parece ser rapidamente metabolizável pela flora ruminal, o que se poderá dever à sua diferente estrutura química.

Aparentemente poderá ocorrer síntese *de novo* de lupanina, pelos microorganismos do rúmen, através da metabolização de moléculas de outros alcalóides. Deste processo resultaria um aumento da toxicidade dos alcalóides presentes na dieta.

Dado que a metodologia utilizada não permitir estudar com precisão o metabolismo da gramina e da esparteína pelos microorganismos, seria necessário aprofundar melhor o estudo do comportamento destes alcalóides no meio ruminal, pelo recurso a outras metodologias mais específicas.

4. Efeito da tremocilha brava sobre a produção de leite de ovelha e sua composição química

4.1. Introdução

O controlo da qualidade do leite constitui um dos principais objectivos a atingir nos actuais sistemas de produção de leite de ovelha, no quadro de uma utilização optimizada dos recursos forrageiros locais. O domínio dos parâmetros físico-químicos e biológicos do leite, principalmente dos que se relacionam com a sua qualidade higiénica (microorganismos patogénicos, toxinas, células somáticas, etc...) insere-se numa política de gestão sanitária dos rebanhos e de segurança alimentar, fundamental para a produção de queijos de leite cru (BARILLET e BOCQUIER, 1993).

A tremocilha brava é uma espécie autóctone de Portugal continental, coincidindo a sua zona de dispersão com a área demarcada da maior parte dos nossos queijos tradicionais. Os alcalóides quinolizidínicos da tremocilha não são, aparentemente, afectados pela actividade microbiana ruminal. Dado terem já demonstrado acção inibitória sobre bactérias aeróbias (WINK, 1987), caso haja contaminação do leite de ovelha com alcalóides é possível que estas substâncias inibam a flora responsável pela transformação do leite em queijo e, por outro lado, transmitam o seu característico sabor amargo a este produto, tornando-o impróprio para consumo. Desconhece-se igualmente se, à semelhança de outros compostos da mesma família, os alcalóides da tremocilha brava possuem algum efeito inibidor sobre a produção de leite.

Deformidades esqueléticas de vária ordem numa criança recém-nascida poderiam ser consequência do consumo de leite de cabra contaminado com anagirina, pela mãe (MEEKER e KILGORE, 1987). Contudo, os autores não procederam à detecção deste alcalóide quinolizidínico teratogénico dos tremoceiros bravos dos E.U.A. no leite dos animais. Os alcalóides pirrolizidínicos de *Senecio jacobea* (erva-de-santiago, tasna, ou mijacão) também podem contaminar o leite de vaca e desse modo desencadear a sua

actividade hepatotóxica nos seres humanos (DICKINSON *et al.*, 1976). De acordo com a revisão efectuada por COSTA (1994), os caprinos e outros herbívoros podem alimentar-se exclusivamente de solanáceas midriáticas - beladona (*Atropa belladonna* L.), meimendro negro (*Hyoscyamus niger* L.), figueira-do-inferno (*Datura stramonium* L. - de alto teor em alcalóides tropânicos (L-hiosciamina, atropina, atropamina, escopolamina) eliminando-os depois pela urina e pelo leite. As ovelhas também toleram altas doses dos alcalóides da figueira-do-inferno na dieta (MANDOLINI, 1992 cit. por van KEMPEN *et al.*, 1993) e tal como os caprinos, possivelmente, também excretarão hiosciamina e escopolamina pelo leite. Ignora-se contudo se o consumo do leite contaminado por estes alcalóides provocou intoxicações em humanos.

A ingestão de alcalóides do tremoço vulgar - lupanina e 13-hidroxilupanina - bem como de alcalóides da festuca alta e da cravagem do centeio, principalmente a ergovalina, têm um efeito negativo sobre a produção de leite nos bovinos. Enquanto os primeiros exerceriam o seu efeito negativo na produção leiteira principalmente através da redução da ingestão de alimento, actuando provavelmente sobre o mecanismo do apetite (GUILLAUME *et al.*, 1987; MUKISIRA *et al.*, 1995), já os alcalóides de ergotamina são conhecidos pela sua acção inibidora da prolactina (PORTER *et al.*, 1990) com a consequente redução da produção leiteira, mesmo quando o nível de infecção da forragem pelos fungos produtores dos alcalóides é reduzido (STRAHAN *et al.*, 1987; PATERSON *et al.*, 1995). De acordo com SÁ e SÁ (1979) também a atropina, um alcalóide presente na figueira-do-inferno, tem um efeito negativo sobre a produção de leite nos bovinos. Na mulher, está comprovado o efeito negativo da nicotina sobre a secreção láctea (VORHERR, 1974)

Para além das plantas com alcalóides, muitas outras da nossa flora alteram a qualidade do leite dos ruminantes. De acordo com CAMÕES (1901) cit. por SEARA (1994) sabe-se, empiricamente, que as famílias *Umbelliferas*, *Liliaceas* e *Cruciferas* dão ao leite sabor e cheiro desagradáveis. Também plantas aromáticas como o rosmaninho (*Rosmarinus officinalis*), o ouregão (*Origanum vulgare*), amargas como a losna (*Artemisia absinthium*)

ou purgativas como a graciola (*Gratiola officinalis*) e o almeirão (*Chicorium intybus*), transmitem ao leite as suas propriedades. O autor refere ainda vegetais que alteram a cor do leite. Este ficaria azulado após a ingestão de borragem (*Borrago officinalis*), pigmentado de vermelho com a ruiva-dos-tintureiros (*Rubia tinctorum*) e a mercurial (*Mercurialis perennis*) ou de amarelo, com o açafrão (*Crocus sativus*), o cornilhão (*Scorpiurus vermiculata*) ou a erva-vaqueira (*Anchusa officinalis*).

Na bibliografia consultada não se conseguiram encontrar dados referentes a qualquer efeito da tremocilha brava sobre a produção de leite nas ovelhas. Da mesma forma, não existe bibliografia sobre uma possível transferência dos seus alcalóides para o leite. As informações recolhidas no campo, a este respeito, referem unicamente o receio de alguns produtores de queijo adquirirem o leite de ovelhas alimentadas com tremocilha brava, o que torna plausível a hipótese de que esta leguminosa afecte a composição química do leite. Tendo em conta a importância que a tremocilha brava pode vir a desempenhar numa agricultura cada vez mais ecológica e silvopastoril, orientada para produtos de qualidade, interessa clarificar melhor os seus efeitos sobre a produção de leite dos pequenos ruminantes. Assim, este trabalho tem como principal objectivo estudar o efeito de uma dieta com tremocilha brava sobre a produção e composição do leite de ovelha.

4.2. Materiais e métodos

Usaram-se 18 ovelhas Serra da Estrela, entre o 50º e 77º dia do período de lactação, que foram distribuídas por três dietas em blocos de 3, de acordo com a produção de leite registada nos últimos 15 dias da lactação. A dieta testemunha continha 0% tremocilha brava (0%-TB) e as outras duas 15% e 30% (15%-TB e 30%-TB). Na primeira e na segunda dietas a tremocilha brava foi substituída por bagaço de soja, de modo a manter as rações isoazotadas e isoenergéticas (Quadros 4.1. e 4.2.). Respeitaram-se as recomendações do NRC (1995) para a alimentação de ovelhas em lactação. Utilizou-se feno de tritcale em início de espigamento, tendo sido incluído trinca de milho e aveia em grão nas dietas, de

maneira a manterem-se os mesmos níveis energéticos. Supplementaram-se os animais com um complemento mineral e vitamínico.

Quadro 4.1. Composição das dietas utilizadas (%MS)

Parâmetros	Tratamentos		
	0% - TB	15% - TB	30% - TB
<u>Alimentos</u>			
Feno	57,34	56,76	56,74
Milho	11,33	12,55	11,17
Aveia	4,01	1,70	-
Tremocilha	-	14,55	29,93
B. de Soja	25,28	12,33	-
CMV	2,05	2,07	2,06
<u>C. Química</u>			
MS (%)	83,99	84,45	84,57
MO	91,67	92,14	92,53
Cinzas	8,33	7,86	7,47
PB	18,75	18,30	18,36
Mcal.Kg MS ⁻¹ *	2,28	2,29	2,28
NDF	50,06	49,65	49,78
ADF	31,81	32,35	33,42
ADL	3,45	3,64	3,18
EE	1,85	2,64	3,42
Alcalóides	-	0,18	0,36

* A partir do valor da DMS (MAFF, 1975)

O período experimental durou 30 dias, tendo sido precedido de uma semana em que os animais foram alimentados com pastagem natural e feno de erva *ad libitum*, tendo sido as

produções diárias de leite durante este período utilizadas para a análise de covariância daquele parâmetro e para distribuir os animais pelos blocos. Seguiu-se outra semana para adaptação dos animais às dietas.

O peso vivo dos animais foi medido no início, a meio e no final do período experimental, de manhã e antes dos animais serem alimentados. As ovelhas foram instaladas em parques individuais e alimentadas *ad libitum*, depois de terem sido desparasitadas. A ração diária foi dividida por duas refeições iguais, às 9.00 e às 18.00 h, e os animais tiveram acesso permanente a água fresca. As sobras foram recolhidas e pesadas todos os dias, antes da refeição da manhã.

A composição química de cada alimento foi analisada semanalmente, ao longo dos 30 dias que durou o período experimental. Foram analisados os teores em PB, NDF, ADF, ADL, EE e DMS dos alimentos, bem como o teor em alcalóides individuais da tremocilha brava, utilizando a metodologia indicada em 2.2.. Os animais foram ordenhados diariamente às 8.30 e e 18,30 h, registando-se o peso de cada uma das produções de leite. Formaram-se amostras compósitas, por cada período de 5 dias, constituídas por sub-amostras de 10% do leite e recolhidas logo a seguir à ordenha. Até ao final de cada período as amostras eram mantidas em câmara frigorífica a 5°C. A cada amostra compósita juntou-se dicromato de potássio a 15%. No final de cada período de 5 dias foi medida em cada amostra compósita a concentração de sólidos totais, PB, lípidos totais e lactose, num aparelho *Milkoscan*, bem como a caseína (AOAC, 1990), ureia (NP-3255) e ácido láctico (AOAC, 1990). Nas amostras de leite do quarto período quinário procedeu-se ao doseamento dos alcalóides individuais bem como do seu teor em Ca e P (AOAC, 1990). As amostras de leite destinadas ao doseamento de alcalóides foram conservadas por congelação a -20°C durante os 5 dias que decorreu a amostragem, não lhes tendo sido adicionado dicromato de potássio.

O doseamento dos alcalóides baseou-se no método preconizado por PAPADOYANNIS e von BAER (1993). Para extrair e solubilizar os alcalóides, transformando-os nos seus cloretos, acidificaram-se 50 ml de leite a pH 2 com HCl 1 N

Quadro 4.2. Composição dos alimentos utilizados (%MS).

Parâmetro	Feno	T. Brava	B. Soja	Milho	Aveia
MS (%)	82,30	89,30	87,34	83,45	85,84
MO	92,84	96,39	92,54	98,50	97,09
Cinzas	7,16	3,61	7,46	1,50	2,91
PB	8,48	41,76	49,48	9,36	8,01
Mcal.Kg MS ⁻¹	1,74	3,08	3,18	3,33	2,42 *
NDF	68,00	30,92	30,40	17,55	35,00
ADF	45,60	23,33	18,00	5,10	13,10
ADL	5,55	2,40	0,88	0,22	0,75
EE	1,88	6,34	0,90	4,10	2,05
Alcalóides	-	1,21	-	-	-
Lupinina	-	0,92	-	-	-
Esparteína	-	0,21	-	-	-
Gramina	-	0,03	-	-	-
Lupanina	-	0,05	-	-	-

* A partir do valor da DMS (MAFF, 1975)

durante 3 horas. Após agitação com *ultratorrrax* e centrifugação a 10.0000 rpm, recolheu-se o sobrenadante. O resíduo lavou-se duas vezes com 15 ml de HCl 0,5 N e homogeneizou-se de novo num *ultratorrrax*. Os sobrenadantes foram depois alcalinizados com amónia até pH 12, para que os alcalóides tomassem a sua forma livre, e introduzidos numa coluna de terra diatomácia *Extrelut (Merck)*. De seguida arrastaram-se os alcalóides com 3 x 30 ml de diclorometano, que se secou em rotoevaporador a 45 °C. O resíduo foi depois recuperado com 1 ml de etilacetato contendo 250 µg de cafeína. Os alcalóides foram então separados e doseados por cromatografia gás-líquido, de acordo com o método proposto por PRIDDIS (1983) e já enunciado em 2.2.. Todas as amostras foram processadas em duplicado.

4.2.1. Análise estatística

Os resultados foram analisados de acordo com um desenho estatístico em blocos casualizados. Os valores da produção de leite foram submetidos a uma análise de covariância. Quando a análise de variância demonstrou a existência de diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos, compararam-se as médias pelo teste LSD. Consideraram-se as diferenças entre os tratamentos como significativas, muito significativas ou altamente significativas, quando a probabilidade da sua ocorrência foi, respectivamente, de 95% ($P < 0,05$), 99% ($P < 0,01$) e 99,9% ($P < 0,001$) (GOMEZ e GOMEZ, 1984).

4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Ingestão de MS, EM e PB

Na figura 4.1. apresentam-se os valores da ingestão média de MS registados nos animais alimentados com quantidades crescentes de tremocilha brava. No anexo 4.1. são apresentados os valores obtidos e respectiva análise de variância.

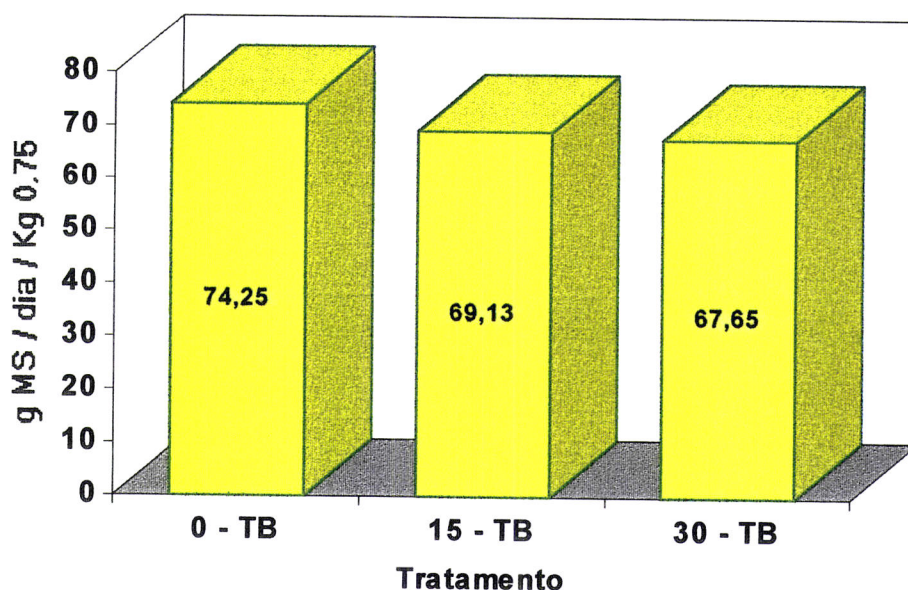


Figura 4.1. Ingestão média de MS (g MS/Kg^{0,75}) registada nos animais alimentados com quantidades crescentes de tremocilha brava (TB) na dieta. EPM=9,72.

A dieta testemunha foi a que provocou maior ingestão de MS - 74,25 g MS/Kg^{0,75} - logo seguida das dietas 15%-TB e 30%-TB com 69,13 e 67,65g MS/Kg^{0,75}, respectivamente. Estas diferenças não foram, porém, significativas ($P>0,05$) devido à forte dispersão de valores em torno da média, o que originou um coeficiente de variação de 24%. Contudo, a ingestão registada nos animais do tratamento 0% - TB, foi superior em 9% àquela registada nos do tratamento 30% - TB.

A tendência para uma menor ingestão das dietas com tremocilha brava, coincide com os resultados obtidos em 1.3.1.. Também aqui se registou uma menor ingestão da dieta que

incluiu aquela leguminosa, relativamente áquelas em que os suplementos foram constituídos por bagaço de soja ou tremoço doce. Tal como foi então referido, este facto poderá estar ligado ao maior teor em alcalóides destas dietas, embora também aqui os animais tenham consumido, mesmo com avidez, toda a tremocilha colocada à sua disposição. Como já foi referido, o efeito dos tremoceiros sobre os valores da ingestão em ruminantes em lactação apresentam-se contraditórios, o que poderá reflectir diferentes teores em alcalóides na dieta. Na maioria dos trabalhos dedicados à ingestão do grão de tremoço por bovinos em lactação, os valores médios do consumo das dietas que o incluem são inferiores aos do tratamento testemunha, constituído por bagaço de soja, quer esta redução tenha sido significativa (GUILLAUME *et al.*, 1987; JOHNSON *et al.*, 1986) ou não (MAY *et al.*, 1993). O ensaio de ÉMILE *et al.* (1991) constituem a única excepção, o que se poderá dever à baixa quantidade de tremoço utilizada ou a um menor teor em alcalóides, cujo valor os autores não indicam. No estudo em que MASSON (1982) comparou a ingestão de dietas suplementadas com tremoço e bagaço de soja por cabras em lactação, não se registaram igualmente quaisquer diferenças entre os tratamentos.

Os ensaios levados a cabo com variedades de festuca alta com diferentes teores em alcalóides, em bovinos leiteiros, mostram que os alcalóides inibem a ingestão, mas que por vezes as diferenças entre tratamentos não são estatisticamente significativas. No trabalho levado a cabo em dois anos consecutivos com as mesmas variedades de festuca, STRAHAN *et al.* (1987) determinaram sempre valores de ingestão inferiores nas variedades de maior teor em alcalóides, embora no primeiro ano esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa.

O efeito inibidor dos alcalóides quinolizidínicos sobre a ingestão de alimento em vacas leiteiras é bem evidente no trabalho de MUKISIRA *et al.* (1995), efectuado com tremoço amargo integral (2,53% de alcalóides) ou com extracção parcial dos alcalóides (redução para 1,4%). Os autores trabalharam com dois níveis de incorporação de tremoço, 15% e 30%, a que corresponderam, respectivamente, concentrações de alcalóides de 0,38 e 0,8 % nas dietas suplementadas com tremoço integral e 0,21 e 0,52% nas dietas suplementadas

com tremoço desamargado. O aumento do nível de incorporação de tremoço reduziu de maneira significativa a ingestão de ração e a extracção dos alcalóides provocou sistematicamente o efeito contrário. A concentração de alcalóides nas dietas 15% - TB e 30% - TB, utilizadas no presente trabalho, foram de 0,18% e 0,36%, respectivamente, em níveis de incorporação da tremocilha idênticos aos utilizados por aqueles autores, com o tremoço. A ausência de resultados significativamente diferentes poderia assim dever-se ao menor teor de alcalóides da tremocilha brava nas duas dietas, que teriam sido insuficientes para reduzir a palatabilidade da ração ou o apetite dos animais. Uma concentração de 0,36 % de alcalóides na ração 30%-TB estaria assim abaixo do limite máximo a partir do qual a ingestão seria inibida.

No quadro 4.3. são apresentados os valores da energia metabolizável e da proteína bruta ingeridas e utilizadas para a manutenção e produção de leite, observados nas três dietas.

Quadro 4.3 Balanço energético (Mcal/d) e proteico (g/d) das ovelhas alimentadas com as três dietas ^a.

Parâmetros	0%-TB	15%-TB	30%-TB	EPM
EM ingerida	3,015	2,967	2,891	0,340
EM utilizada	2,645	2,637	2,599	0,144
Balanço	0,370	0,330	0,292	0,244
PB ingerida	249	236	233	28,67
PB utilizada	106	107	106	7,45
Balanço	142	129	126	24,79

^a Média de 6 repetições

Calcularam-se as quantidades de energia metabolizável e PB ingeridas com base no valor da digestibilidade da MS (MAFF, 1977) de cada componente da dieta e na sua concentração em PB, respectivamente. As necessidades energéticas e proteicas das ovelhas foram estimadas a partir dos dados do NRC (1995).

Não se verificaram diferenças significativas ($P>0,05$) na quantidade de EM e PB ingeridas ou utilizadas pelos animais dos três tratamentos. Também as diferenças existentes entre os valores do balanço energético ou do balanço proteico não têm significado estatístico, tendo os valores médios destes parâmetros sido positivos. No entanto, uma ovelha do tratamento 0%-TB, outra do tratamento 15%-TB e duas do tratamento 30%-TB, registaram, em média, um balanço energético diário negativo durante os 30 dias que durou o ensaio.

4.3.2. Variação do peso vivo

Verificou-se um aumento do peso vivo médio dos animais dos tratamentos 0%-TB e 15%-TB, 1,792 e 0,983 Kg, respectivamente, enquanto que nos animais suplementados unicamente com tremocilha brava se registou, em média, uma diminuição de 0,066 Kg. Conforme se pode observar na figura 4.2., a um aumento da proporção de tremocilha na dieta correspondeu um decréscimo no ganho de peso. Todavia, as diferenças registadas entre os tratamentos não foram significativas ($P>0,05$), embora a tendência para uma perda do peso das ovelhas suplementadas só com tremocilha deva corresponder à tendência para uma menor ingestão de MS verificada nestes animais, apesar de em termos médios terem sido alimentados acima das necessidades.

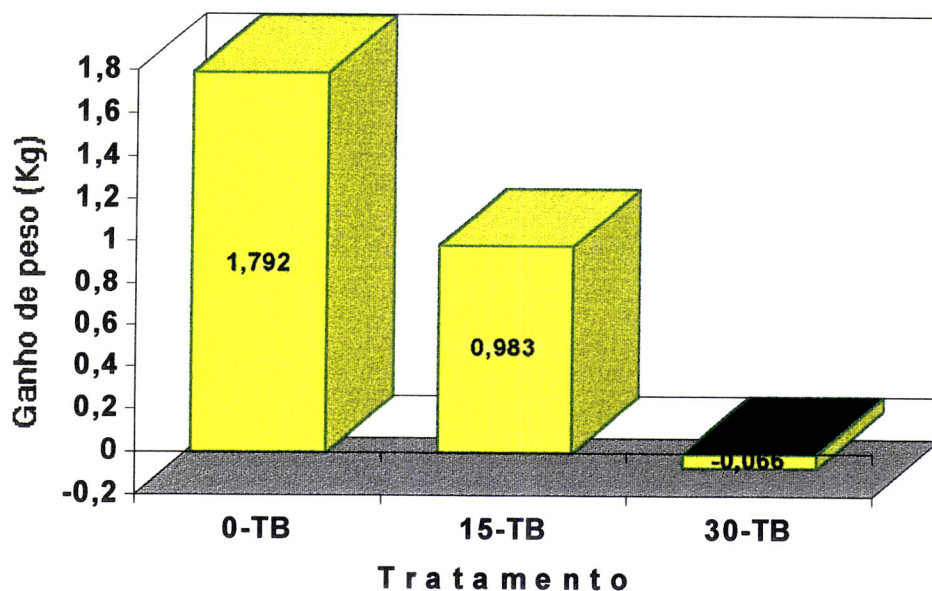


Figura 4.2. Variação do peso vivo médio dos animais alimentados com as três dietas (EPM=1,384)

4.3.3. Produção de leite

Na figura 4.3. apresentam-se os valores da produção média de leite registados nos animais alimentados com quantidades crescentes de tremocilha brava. No anexo 4.9. são apresentados os valores obtidos em cada um dos animais e a análise de variância respectiva. A uma quantidade crescente de tremocilha na dieta correspondeu um decréscimo da produção de leite, que foi de 418, 380 e 347 g/dia nos animais alimentados com as dietas 0%-TB, 15%-TB e 30%-TB, respectivamente. Todavia, não se registaram diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os tratamentos, tendo a grande dispersão dos valores em torno da média originado um coeficiente de variação de 33%. Apesar disso, a produção média das ovelhas alimentadas com 30% de tremocilha foi inferior em 17% à dos animais do tratamento testemunha.

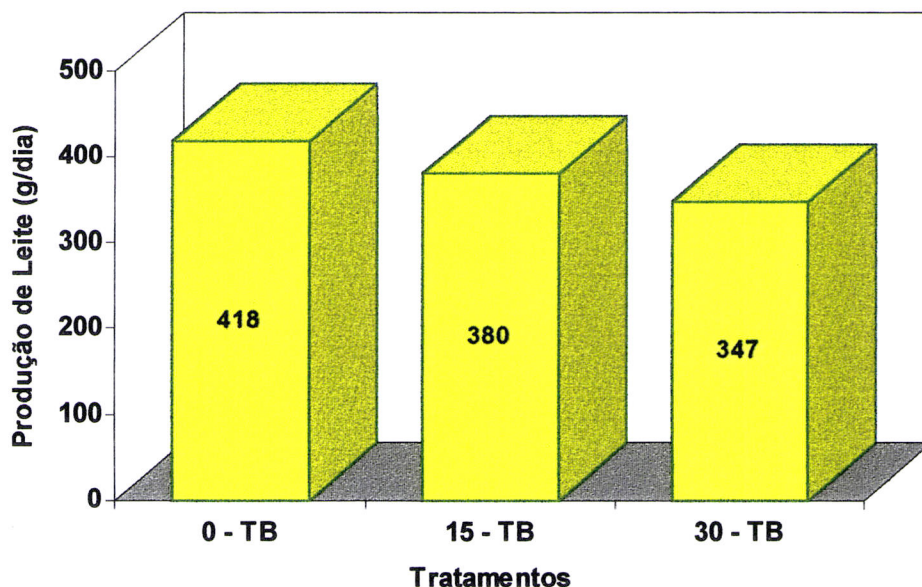


Figura 4.3. Produção de leite registrada em ovelhas alimentadas com quantidades crescentes de tremocilha brava na dieta. EPM=72,81.

Estes resultados são semelhantes aos obtidos por MASSON (1981), que também não encontraram diferenças significativas entre a produção de leite de cabras suplementadas com tremoço, ervilha, fava ou bagaço de soja. MAY *et al.*(1993) suplementaram vacas leiteiras com 25% de tremoço de baixo nível em alcalóides, comparativamente a um tratamento controle de bagaço de soja, e também não notaram alterações significativas da produção de leite. Também GUILLAUME *et al.*(1987) e EMILE *et al.*(1991) não notaram alterações significativas na produção de leite, em vacas suplementadas com bagaço de soja ou tremoço pobre em alcalóides, apesar dos animais alimentados com este suplemento pelos primeiros autores terem produzido meno 1,8 Kg/dia e consumido significativamente menos alimento do que os do tratamento controle. Os autores atribuem esta tendência para uma menor produção de leite, nos animais alimentados com tremoço, ao teor em alcalóides deste - 0,068% - valor que já permite classificar a variedade com semi-amarga, e que seria responsável pela menor ingestão desta ração. Já um suplemento constituído por variedades amargas da mesma espécie de tremoceiro, mas com 1,4% ou 2,5% de alcalóides e constituindo 30% da ração, provocou uma diminuição nítida e significativa da produção de

leite, comparativamente a uma dieta suplementada com bagaço de girassol, e que reflectiria uma redução significativa da ingestão destas rações (MUKISIRA *et al.*, 1995). Por isso, e tal como foi referido no caso da ingestão de alimento, tanto o tipo como os níveis de alcalóides na tremocilha brava poderão não ser propícios à inibição, de uma maneira significativa, quer do consumo das rações em que seja incorporada quer da produção de leite, nos animais suplementados com esta leguminosa, contrariamente ao que acontece com o tremoço, uma espécie cujas variedades amargas acumulam mais alcalóides.

4.3.4. Composição química do leite

No quadro 4.4. apresentam-se os valores da composição química do leite registados nos animais dos 3 tratamentos. Nos anexos 4.10. a 4.24. são apresentados os valores obtidos e a análise de variância respectiva. O teor em sólidos totais foi de 21,20% no leite das ovelhas do tratamento testemunha e de 19,17 e 20,05% no dos animais alimentados com 15 e 30% de tremocilha, respectivamente, diferenças estas não significativas ($P>0,05$). Registou-se um teor em PB de 7,23% no leite das ovelhas 0-TB e de 6,58 e 6,35 no leite dos animais dos tratamentos 15%-TB e 30%-TB, respectivamente, mas estes valores também não diferem significativamente ($P>0,05$). O leite das ovelhas 0%-TB apresentou a maior concentração lipídica - 9,18% - contra 7,73% no leite das ovelhas 15-TB e 8,72% nas ovelhas no leite das ovelhas 30%-TB, mas estas diferenças não foram significativas ($P>0,05$). Tão pouco as diferenças entre os valores da acidez foram significativas ($P>0,05$), apesar de no leite das ovelhas 0%-TB se ter registado uma concentração de 0,271%, contra 0,255% no leite 15%-TB e 0,245% no leite 30%-TB.

O valor da lactose foi de 4,04% no leite das ovelhas suplementadas com soja, 4,16% no leite das ovelhas suplementadas com 15% de tremocilha e 4,26% no leite dos animais suplementados com 30% de tremocilha, sendo as diferenças entre estas médias não significativas ($P>0,05$). No leite das ovelhas 0%-TB registou-se um teor de 6,19% de caseína, superior aos 5,85% e 5,65% apurados nos leites das ovelhas 15%-TB e 30%-TB,

respectivamente ($P>0,05$). As concentrações de Ca e P também não diferiram significativamente. As primeiras foram de 0,22%, 0,19% e 0,20% no leite das ovelhas dos tratamentos 0, 15 e 30%-TB, respectivamente, e as segundas foram de 0,14% no leite das ovelhas 0%-TB e 0,12% no leite dos animais dos dois tratamentos com tremocilha. O pH do leite também não variou significativamente ($P>0,05$) entre os tratamentos. Registou-se um pH de 6,68 no leite testemunha, 6,8 no leite 15%-TB e 6,78 no leite 30%-TB.

Quadro 4.4. Composição química do leite de ovelhas alimentadas com quantidades crescentes de tremocilha brava.^a

Parâmetros	0% - TB	15% - TB	30% - TB	EPM	Signif
Sólidos totais(%)	21,20	19,17	20,05	1.26	NS
PB (%)	7,23	6,58	6,35	0,36	NS
GB (%)	9,18	7,73	8,72	1,18	NS
Ácido láctico (%)	0,27	0,26	0,25	0,02	NS
Lactose (%)	4,04	4,16	4,26	0,30	NS
Caseína (%)	6,19	5,85	5,65	0,27	NS
Cinzas (%)	0,90	0,97	0,96	0,03	NS
Ca (%)	0,22	0,19	0,20	0,03	NS
P (%)	0,14	0,12	0,12	0,01	NS
pH	6,68	6,80	6,78	0,11	NS
Ureia (mg/Kg)	556	585	502	39,41	NS
Alca.Tot.(mg/Kg)	-	1,886	5,549	0,72	**
Lupinina (mg/Kg)	-	1,378	4,605	0,78	**
Lupanina(mg/Kg)	-	0,504	0,898	0,40	NS
Esparte. (mg/Kg)	-	0,004	0,046	0,03	NS

^a Médias de 6 repetições. NS = diferenças não significativas, ** = diferenças significativas para $p < 0,01$.

A concentração de ureia no leite variou entre 585 mg/Kg (9,75 mM) no leite 15%-TB e 502 mg/Kg (8,37 mM) no leite 30%-TB. O leite das ovelhas 0%-TB apresentou um valor intermédio de 556 mg/Kg (9,27 mM). As diferenças entre estes valores também são desprovidas de significado estatístico ($P>0,05$).

Todas as ovelhas alimentadas com tremocilha excretaram alcalóides no leite. A concentração média foi maior - 5,549 mg/Kg - nos animais alimentados com a dose máxima de tremocilha, e de apenas 1,886 mg/Kg nos animais 15%-TB. Não se detectaram alcalóides no leite dos animais testemunha (Figura 4.4.). A diferença entre aqueles dois valores foi estatisticamente significativa ($P<0,01$). O principal alcalóide excretado no leite foi a lupinina. A sua concentração média foi de 1,378 mg/Kg nas ovelhas 15%-TB e 4,605 mg/Kg no leite das ovelhas 30%-TB ($P<0,01$). Seguiu-se-lhe em importância a lupanina, com 0,504 e 0,898 mg/Kg no leite dos animais alimentados com 15 ou 30% de tremocilha, respectivamente. Todavia, a grande dispersão de valores em torno da média, fez com que a diferença entre estes valores não tivesse significado estatístico ($P>0,05$). No leite de alguns animais conseguiu-se detectar alguma esparteína, embora em quantidades vestigiais. Os seus valores médios foram de 4 μ g e 46 μ g/Kg no leite dos animais 15 e 30%-TB, respectivamente ($P>0,05$). Não foi detectada qualquer quantidade de gramina no leite dos animais de ambos os tratamentos.

Encontrou-se na bibliografia uma escassez de dados referentes à composição química do leite de ovelhas Serra da Estrela. Os teores em sólidos totais, PB e gordura são superiores aos determinados por PEREIRA *et al.* (1996) em ovelhas da mesma raça entre os 21 e 42 dias de lactação. Os animais por nós utilizados, encontravam-se num estado mais avançado da lactação, entre o 66º e o 96º dia, o que poderia ter provocado valores mais elevados daqueles parâmetros. Por outro lado, os valores relativamente elevados de PB poderão reflectir o excesso de N fornecido aos animais, mas que foi necessário manter para garantir elevados níveis de ingestão de alcalóides. A alta degradabilidade das proteínas dos suplementos no rúmen deveriam ter originado um excesso de amoníaco e a manutenção de altos níveis de ureia no sangue e no leite (KAUFMANN, 1982).

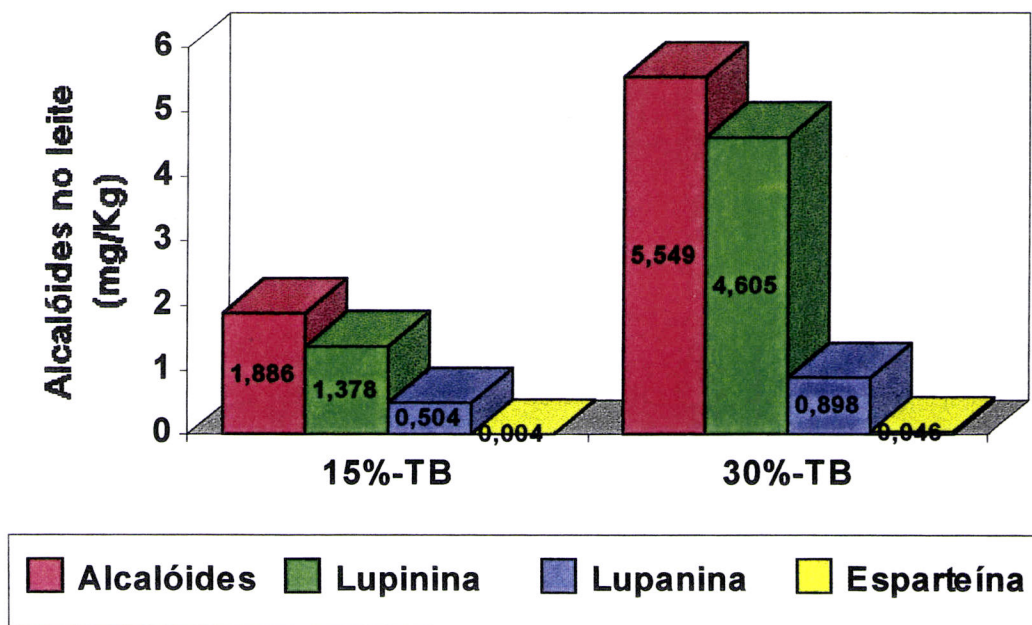


Figura 4.4. Concentração de alcalóides no leite de ovelhas suplementadas com 15 ou 30% de tremocilha brava.

O excesso de proteína fornecido aos animais pode igualmente provocar um grande incremento da proteína digerida nos intestinos e este um aumento da concentração proteica do leite (revisão de BOCQUIER e CAJA, 1993). Os valores da gordura registados são semelhantes aos referidos por estes autores para ovelhas Manchegas com uma produção de leite semelhante e são da mesma ordem dos valores mencionados pela DGP(1987) para a etnia Serra da Estrela. O teor em caseína enquadra-se, por sua vez, nos valores obtidos por MARTINS *et al.*(1992) em ovelhas da raça Saloia e Frisserra.

A concentração de lactose é pouco sujeita a variações provocadas pelo ambiente. As que foram registadas nos animais dos 3 tratamentos enquadram-se nos valores enunciados para as ovelhas Serra da Estrela por PEREIRA *et al.* (1996) e para o leite ovino por EDELSTEN (1989) e MARTINS *et al.* (1992). Os valores da acidez e do pH, intimamente ligados à higiene da produção e ao período decorrido após a ordenha, são semelhantes aos determinados por MARTINS *et al.* (1992) para o leite de ovelha da zona de Azeitão e

encontram-se dentro dos limites defendidos por estes autores para o leite de ovelha destinado ao fabrico de queijo. Embora sem significado estatístico, os maiores valores médios do pH registados no leite proveniente das ovelhas alimentadas com tremocilha, poderão estar ligados à presença dos alcalóides. Por outro lado, a menor acidez registada nestas amostras de leite, poderá resultar da presença dos alcalóides e de um efeito antibacteriano destes compostos.

As concentrações de cinzas, Ca e P encontradas no leite dos animais dos três tratamentos são da mesma ordem dos referidos por EDELSTEN (1989) e MARTINS *et al.* (1992). Não se encontraram na literatura valores referentes ao teor em ureia do leite ovino. No entanto, e tal como em todos os ruminantes, também nos ovinos este parâmetro depende da proteólise ruminal, e variará na sua proporção directa, visto que a molécula se desloca por difusão passiva do sangue para o leite. Os valores de ureia determinados no presente trabalho encontram-se muito próximos dos 7,6 mM determinados por OLTNER e WIKTORSSON (1983) no leite de vacas leiteiras alimentadas com 19 % de PB e dos 9,5 mM encontrados no sangue de cabras alimentadas com 16,5% de PB. O excesso de ureia no leite pode dificultar a coagulação da coalhada, durante a caseificação, e alterar as propriedades organolépticas do queijo (KRISTENSEN *et al.*, 1987 cit. por GUSTAFSSON e PALMQUIST, 1993).

A presença de lupinina, embora em pequenas quantidades, no leite de todos os animais alimentados com tremocilha brava, indica que este alcalóide não deverá ser metabolizado, pelo menos na sua totalidade, pelos microorganismos do rúmen e está de acordo com os resultados obtidos no estudo *in vitro*. Do mesmo modo, o aumento da proporção de lupanina no leite e um forte decréscimo da proporção de esparteína, que não foi detectada no leite da maior parte dos animais, também está de acordo com os resultados *in vitro* obtidos no capítulo anterior e no trabalho de RAZAKA (1993), que apontam para que uma transformação deste alcalóide em lupanina, no rúmen. Também a inexistência de gramina no leite concorda com os resultados *in vitro* e que sugeriam a sua metabolização pela flora ruminal. As quantidades vestigiais e mesmo nulas de esparteína detectadas no

leite, poderiam, inclusivamente, reflectir a sua metabolização pelo fígado tal como acontece no ratinho, no coelho e nos humanos (CHEEKE e KELLY, 1989). Pelo contrário, a lupanina parece não ser metabolizada pelos animais e escapar à destoxificação hepática. Os estudos de HAYWOOD e CHEM (1978) realizados em cavalos e os de WITTENBURG e NEHRING (1965) em ratinhos, demonstraram que este alcalóide é excretado na urina, sem sofrer qualquer alteração. Os resultados do estudo *in vitro* e a presença deste alcalóide no leite, poderia significar que a lupanina também não deve sofrer metabolização quer ao nível ruminal quer ao nível hepático, nos ovinos. Para além dos alcalóides quinolizidínicos, a presença no leite de outros alcalóides estruturalmente diferentes já foi assinalado por diversos autores (Quadro 4.5.), o que testemunha a facilidade com que muitos compostos deste grupo deverão atravessar as membranas das células dos capilares e alvéolos.

Quadro 4.5. Presença de alcalóides no leite de algumas espécies.

Alcalóides	Espécies	Autor
Cocaína	Mulher	1
Caféina	Mulher	1
Atropina	Mulher	2
Quinina	Mulher	2
Heroína	Mulher	2
Nicotina	Mulher	2
Alcalóides da cicuta	Vaca	3
Hiosciamina, atropina (beladona)	Cabra, ovelha	4
Alcalóides de <i>Senecio jacobea</i> L. (tasna)	Vaca	5

Autores: 1-CHASNOFF *et al.* (1987); 2-VORHERR (1974) cit. por CHASNOFF *et al.* (1987); 3-PANTER e KEELER (1990); 4- COSTA (1994), 5 -DICKINSON *et al.*, 1976.

Os mecanismos de passagem de compostos químicos para o leite baseiam-se essencialmente no princípio da difusão passiva e dependem, por consequência, das suas concentrações no plasma e das suas propriedades físico-químicas, como sejam o pKa, lipossolubilidade, peso molecular e ligação com as proteínas (KRAUER, 1983). Compostos lipossolúveis e não ligados às proteínas plasmáticas difundem-se passivamente para o leite com o gradiente de concentração.

A maior parte das substâncias com um peso molecular inferior a 600 atravessam sem dificuldade as membranas dos capilares e das células alveolares (BAVOUX e FRANCOUAL, 1980). Por outro lado, os compostos ácidos têm tendência a passar mais dificilmente do que os básicos (KAFETZIS *et al.* 1981). Sendo o pH do leite ligeiramente mais baixo do que o do plasma, a forma neutra de substâncias moderadamente básicas será mais importante no plasma do que no leite. As moléculas neutras difundem-se rapidamente, em função do seu gradiente de concentração no plasma, no leite, até que se atinja o equilíbrio de um lado e do outro das membranas. Uma vez no leite as moléculas são ionizadas e aí retidas. Por este processo (*ion trapping*) alcançam-se no leite concentrações totais mais elevadas de substâncias fracamente básicas, em relação ao plasma (KREUER, 1983). Ainda de acordo com este autor, para as bases, a relação de concentração entre o leite e o plasma (L/P) aumentará quanto mais elevado for o seu pKa. Mas se este se situar nitidamente para além dos valores fisiológicos do meio, como nas bases fortes, as substâncias serão quase totalmente ionizadas. Assim, só poderão influenciar efectivamente a relação L/P substâncias com um pKa entre 5 e 9.

No quadro 4.6. apresentam-se os valores do peso molecular e pKa dos alcalóides quinolizidínicos da tremocilha brava. Tomando unicamente em conta o seu peso molecular, estas substâncias deveriam ultrapassar sem dificuldades as membranas biológicas. No entanto, o alto valor do pKa da esparteína (primeira ionização), típico de uma base forte, indica que as suas moléculas se ionizam quase completamente em solução aquosa, captando com facilidade hidrogénios num dos seus átomos de N. Por isso, dificilmente a esparteína se encontrará no sangue sob uma forma neutra, mais lipossolúvel, e

atingirá concentrações significativas no leite, relativamente aos outros alcalóides. Este facto também permitiria ajudar a explicar a ausência de esparteína no leite da maior parte dos animais alimentados com tremocilha, e a presença de quantidades importantes de lupanina, um alcalóide cuja concentração nas sementes é quatro vezes inferior à da esparteína. Alguns alcalóides, como a morfina, codeína, atropina e a escopolamina também não são transmissíveis ao leite ou são-no em quantidades vestigiais, pelo menos na mulher (VORHERR, 1974) o que também se poderá dever à sua elevada basicidade (COSTA, 1993). Por sua vez, tanto o pka da lupinina como o da lupanina permitem supor que estes alcalóides poderão atravessar com maior facilidade as membranas celulares e originar concentrações no leite semelhantes à do plasma.

Quadro 4.6. Pka e peso molecular dos alcalóides quinolizidínicos da tremocilha brava.

Alcalóides	pKa ₂	pKa ₁	P.M.
Lupinina	8,25	-	169
Esparteína	10,26	3,05	234
Lupanina	7,47	-	248

Origem: SIMON (1958) e WIEWIOWSKI e SKOLIK (1963)

4.3.3.1. Taxa de recuperação dos alcalóides

Na quadro 4.7. apresentam-se as taxas de recuperação dos alcalóides no leite, para cada alcalóide e tratamento, registadas entre o 20º e 25º dia do período experimental. Nos anexos 4.25. a 4.27. são apresentados os valores obtidos e respectiva análise de variância. A

taxa de recuperação dos alcalóides totais foi da mesma ordem nos animais dos tratamentos 15 e 30%-TB, respectivamente, 0,041 e 0,049%. No primeiro grupo atingiu o valor máximo de 0,103% e no segundo 0,087%. A taxa de recuperação da lupinina, o alcalóide largamente dominante na dieta, foi significativamente superior nos animais alimentados com 30% de tremocilha ($P<0,05$), 0,049%, contra 0,034 % nas ovelhas do tratamento 15%-TB.

Quadro 4.7. Ingestão de alcalóides, excreção no leite e taxa de recuperação. ^a

Parâmetros	Lupinina	Espar.	Lupanina	Gramina	Total
<u>Dieta 15% -TB</u>					
Alcalóides na dieta					
(mg/dia)	1917	310	80	51	2358
Alcalóides no leite					
(mg/dia)	0,649	0,007	0,307	0	0,963
Taxa de Recuperação					
(%)	0,034 ^a	0,002	0,384	0	0,041
<u>Dieta 30% -TB</u>					
Alcalóides na dieta					
(mg/dia)	3504	572	148	94	4318
Alcalóides no leite					
(mg/dia)	1,703	0,015	0,405	0	2,123
Taxa de recuperação					
(%)	0,049 ^b	0,003	0,274	0	0,049
EPM (T.Recup.)	0,005	0,004	0,22	-	0,009

^a Média de 6 repetições. Os valores da taxa de recuperação na mesma coluna assinalados com sobrescritos diferentes diferem significativamente ($P<0,05$).

Este parâmetro variou entre 0,008 e 0,1% nas ovelhas 30%-TB e entre 0,009 e 0,078% nas 15%-TB. Em comparação com os outros alcalóides a taxa de recuperação da esparteína foi bastante reduzida, tendo-se registado valores semelhantes nos dois tratamentos: 0,002% no leite 15%-TB e 0,003% no leite 30%-TB ($P>0,05$). Refira-se contudo que se detectou esparteína no leite de um só animal do grupo 15%-TB, enquanto que no grupo dos animais que ingeriram mais tremocilha, foi encontrada esparteína no leite de metade das ovelhas. Nos dois tratamentos a maior taxa de recuperação foi registada na lupanina: 0,384% no leite das ovelhas do tratamento 15%-TB e 0,274% no leite das ovelhas do tratamento 30%-TB ($P>0,05$). Globalmente este valor variou entre 0,011 e 1,16%. A análise dos resultados permitiu concluir que a taxa de recuperação dos alcalóides está linearmente correlacionada com a produção diária de leite ($r = 0,864$) e pode ser descrita pela equação:

$$\text{T.R.(\%)} = 0,0004 + 0,1151 \times \text{Kg de leite (Quadro 4.8. e Figura 4.5.)}$$

A taxa de recuperação da lupanina encontra-se mais intimamente correlacionada com a produção de leite ($r = 0,892$) do que a da lupinina ($r = 0,739$), embora ambas difiram significativamente de 0 (Quadro 4.7.). Não se encontrou qualquer relação entre a ingestão de alcalóides e a sua taxa de recuperação no leite ($r = 0,406$) (Figura 4.6.). Apesar disso, é possível estabelecer uma correlação linear significativa ($P<0,01$) entre a quantidade de alcalóides ingeridos diariamente pela ovelhas e a sua concentração total no leite. Esta relação pode ser descrita pela equação:

$$\text{Alcalóides no leite (mg/Kg)} = -2,6141 + 1,8964 \times \text{Alcalóide ingeridos (g/d)} \quad (r = 0,785).$$

A partir desta equação pode concluir-se que para baixas ingestões de alcalóides a sua concentração no leite seria nula (Figura 4.7.).

Quadro 4.8. Equações de regressão e coeficientes de correlação das taxas de recuperação dos alcalóides (n=12).

Variáveis	Equação	r	S
Y = T.R. dos alcalóides (%) X = Produção de leite (Kg/d)	$Y = 0,0004 + 0,1151 X$	0,864	P<0,001
Y = T.R. da lupinina (%) X = Produção de leite (Kg/d)	$Y = 0,0071 + 0,0891 X$	0,739	P<0,01
Y = T.R. da lupanina (%) X = Produção de leite (Kg/d)	$Y = -0,1648 + 1,245 X$	0,892	P<0,001
Y = Alca. no leite (mg/Kg) X = Ingestão de alca. (g/d)	$Y = -2,6141 + 1,8964 X$	0,785	P<0,01

Esta relação e, por outro lado, o aumento da taxa de recuperação dos alcalóides que se verifica conforme aumenta a produção de leite, parece indicar que a passagem dos alcalóides do sangue para o leite dependeria dum transporte passivo, do sangue para as células alvéolares da glândula mamária, e dependente da sua concentração plasmática. As relações entre os parâmetros referidos são semelhantes às encontradas no trabalho de VELDMAN *et al.* (1992) sobre a taxa de recuperação de aflatoxinas no leite de vaca. Também estes autores encontraram uma elevada correlação positiva entre a taxa de recuperação das micotoxinas e a produção diária de leite, bem como entre a ingestão de aflatoxinas e a sua concentração no leite. Também aqui a taxa de recuperação das aflatoxinas foi independente das quantidades ingeridas. Neste trabalho determinaram-se taxas de recuperação de aflatoxinas que variaram entre 1,8% e 6,2% em vacas com uma produção de 16,6 e 39,5 Kg/dia, respectivamente, valores que são superiores aos que se encontraram no presente trabalho para os alcalóides da tremocilha brava, em ovelhas

leiteiras: 0,049% nas ovelhas alimentadas com 30% de tremocilha e produzindo 0,341 Kg/dia de leite e 0,041% nas ovelhas suplementadas com 15% de tremocilha e com uma produção leiteira de 0,377 kg/dia. Todavia, se se contabilizarem as taxas de recuperação de aflatoxinas e de alcalóides por unidade de leite produzido, obtêm-se os valores de 0,156% e 0,108% para aqueles bovinos leiteiros, e 0,141% e 0,108% nas ovelhas alimentadas com tremocilha brava, respectivamente, quantidades que são muito semelhantes entre si. Assim, poder-se-ia admitir que a taxa de recuperação dos alcalóides seria da mesma ordem da das aflotoxinas, para animais com o mesmo nível de produção. A taxa de recuperação dos alcalóides da tremocilha é ainda da mesma ordem da taxa de recuperação diária da quinina, no leite da mulher (0,05%) (VORHERR, 1974).

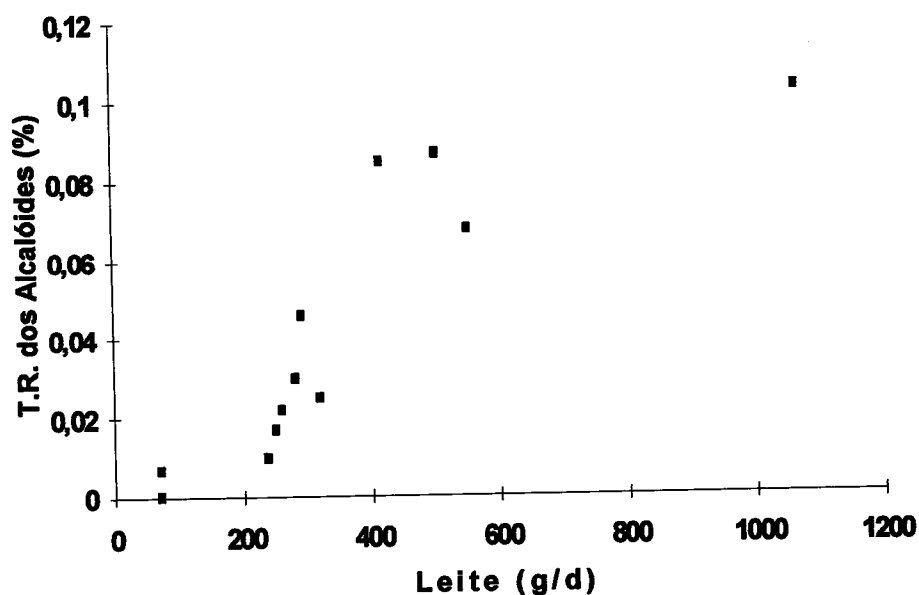


Figura 4.5. Relação entre produção de leite e taxa de recuperação dos alcalóides ingeridos, nos animais alimentados com tremocilha brava (n=12). $r = 0,864^{***}$.

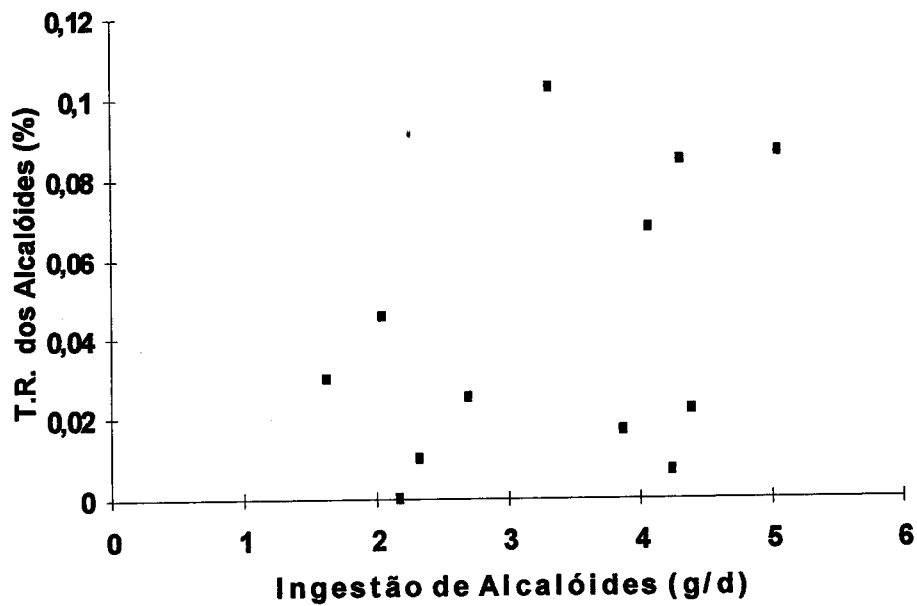


Figura 4.6. Relação entre ingestão de alcalóides e a sua taxa de recuperação no leite, nas ovelhas alimentadas com tremocilha brava (n=12). $r=0,406$.

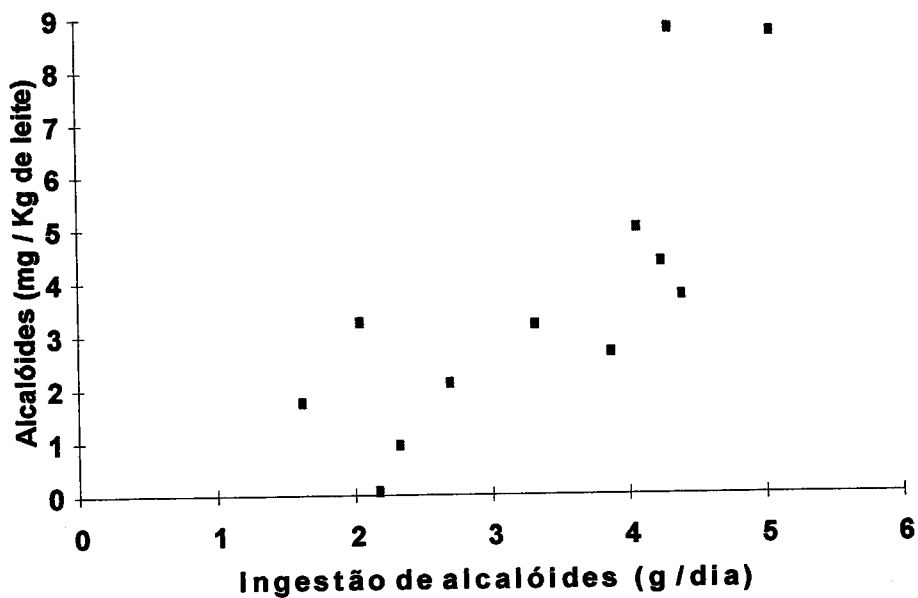


Figura 4.7. Relação entre ingestão de alcalóides e a sua concentração no leite, nas ovelhas alimentadas com tremocilha brava (n=12). $r=0,785^{**}$.

4.4. Conclusões

A suplementação de ovelhas leiteiras com níveis relativamente elevados de tremocilha brava (30% da MS) não afectou significativamente quer a ingestão de MS quer a produção de leite. Contudo, este trabalho confirmou a tendência para um menor consumo nas dietas que contêm tremocilha, comparativamente à dieta controle com bagaço de soja. Por outro lado, o baixo nível produtivo das ovelhas utilizadas pode ser impeditivo da expressão de um possível efeito negativo dos alcalóides sobre a produção de leite.

Foram encontrados alcalóides no leite de todos os animais suplementados com tremocilha brava. Este suplemento não induziu qualquer alteração significativa nos valores dos restantes parâmetros da composição química do leite.

Tal como na dieta, o alcalóide predominante no leite foi a lupinina, o que está de acordo com a estabilidade que revelou em meio ruminal incubado *in vitro*. No leite da maior parte dos animais não se detectou esparteína. A ausência de gramina no leite destes animais também está conforme com os resultados do trabalho *in vitro* e que apontavam para a sua degradação no meio ruminal. Por outro lado, o significativo aumento da concentração de lupanina no meio *in vitro*, possivelmente via esparteína, poderá explicar a maior taxa de recuperação deste alcalóide no leite.

A taxa de recuperação dos alcalóides da tremocilha no leite foi semelhante à registada com as aflatoxinas. Tal como no caso destas substâncias, aquele parâmetro encontra-se positivamente correlacionado com os valores da produção de leite, assim como a concentração de alcalóides no leite se correlaciona positivamente com a quantidade ingerida.

5. Efeito da tremocilha brava sobre a qualidade do queijo

5.1. Introdução

A manutenção de elevados parâmetros de qualidade e a sua constância e uniformidade são objectivos primordiais numa estratégia empresarial de produção de queijo. Esta problemática assume hoje em dia particular importância no nosso país visto que a produção de queijo, a par de outros produtos tradicionais de qualidade, constitui uma importante componente do desenvolvimento integrado do mundo rural mediterrânico. A criação de zonas demarcadas deverá ser acompanhada por um esforço de uniformização da qualidade dos produtos, que se revela fundamental para a criação de sólidas imagens de marca, tendo em vista, não só o consumo doméstico, mas também a exportação. O aumento do consumo de queijo tradicional e da sua valorização comercial dependem da diminuição da irregularidade da sua qualidade e da manutenção das suas características originais e genuínas.

Existe um conjunto de operações que são comuns à maior parte dos processos de caseificação e que se podem resumir em 4 etapas principais: a coagulação, o dessoramento, a salga e a maturação. A coagulação traduz as modificações físico-químicas que sofrem as micélias da caseína pela acção desnaturadora de enzimas proteolíticas (animais ou vegetais) e do ácido láctico com origem na flora bacteriana láctica. Conduz à formação da coalhada e à acidificação do meio com inibição da flora indesejável para a caseificação. O dessoramento consiste na separação do soro que impregna o coágulo e na obtenção da matéria sólida que constitui a coalhada. Este processo ocorre essencialmente por ruptura mecânica da coalhada e pela acção do ácido láctico durante a sinérese. A salga da massa assim obtida é feita de forma a regular-se o desenvolvimento microbiano, suprimindo-se espécies indesejáveis, e melhorar o sabor do queijo. A maturação ou cura, é a última fase do fabrico, e inclui alterações das propriedades físicas e químicas da massa. O queijo adquire o seu aspecto, textura e consistência, assim como o seu aroma e sabor característicos. Este

processo depende de um conjunto de reacções bioquímicas que ocorrem na massa do queijo e que são provocadas pela acção de enzimas, predominantemente de origem microbiana mas também das existentes no próprio leite e no agente coagulante.

O tipo e a qualidade do queijo depende da tecnologia utilizada no seu fabrico, das variações, operações adicionais ou acidentes que podem sofrer cada uma daquelas etapas, bem como das características do leite utilizado, nomeadamente o seu estado higiénico, durante a ordenha e conservação, e a sua composição físico-química. Nesta última, estão implicados factores como a raça, a fase de lactação, o estado sanitário e a alimentação dos animais. A componente alimentar com reflexo na qualidade do queijo, a que mais interessa no âmbito do presente trabalho, assume particular importância nos sistemas de criação de ruminantes em regime extensivo, pelas características que a variedade da flora local transmite ao produto final. Com efeito, sabe-se que algumas plantas transmitem ao leite substâncias benéficas para as qualidades organolépticas do leite e do queijo. O tomilho (*Thymus spp.*) quando ingerido por ovelhas leiteiras transmite o seu agradável sabor ao leite e ao queijo (LAI *et al.*, 1983). Dietas propionogénicas provocam a formação de gama-dodecanolactonas no leite que originam um sabor semelhante ao da framboesa, no queijo (URBACH, 1990). Por sua vez, ainda segundo este autor, as dietas pobres em lípidos, como aquelas em que predomina o feno de luzerna, podem originar um leite rico em lactonas e metilcetonas. As primeiras seriam as precursoras de sabores agradáveis próximos dos do coco e do pêsego, enquanto as segundas contribuiriam para o *flavor* típico dos queijos do tipo azul. DUMONT *et al.* (1981) compararam queijos Gruyère de várias origens e concluíram que os que provinham das montanhas continham mais compostos voláteis, como terpenos e sesquiterpenos, reflectindo as diferentes espécies vegetais consumidas e o maneio alimentar a que os animais eram sujeitos. Nas zonas planas os animais são geralmente alimentados com pastagens monoespecíficas e por isso menos ricas em moléculas odoríferas do que as pastagens de plantas espontâneas, como as das regiões montanhosas (MOINET, 1997). Da mesma maneira, segundo URBACH (1990), os animais alimentados com pastagens produzem leite com elevado teor em fitol e dihidrofitol

o que origina uma manteiga com melhor sabor e aroma e maior procura no mercado, comparativamente a outra produzida a partir do leite de animais alimentados com alimentos secos e isento daqueles álcoois, cuja origem seria a cadeia lateral de fitol da clorofila.

Os animais também podem ter acesso a espécies vegetais que transmitem ao leite substâncias deletérias, cujo efeito sobre a qualidade organoléptica do queijo ainda é mal conhecida. ANDERS e JAGO (1970) obtiveram queijo *cheddar* a partir de leite rico em ácidos gordos polinsaturados, proveniente de vacas suplementadas com óleo de cártamo, que praticamente não desenvolveu aroma, comparativamente ao queijo elaborado a partir de um leite testemunha. Segundo os autores, uma explicação possível para este facto, residira na inibição, pelo ácido linoleico, do sistema enzimático piruvato-desidrogenase das bactérias responsáveis pela cura do queijo.

Também a forma de conservação das forragens pode influenciar a qualidade do queijo. O consumo de silagem por animais em lactação comporta o risco de um enriquecimento do leite em esporos butíricos, que no queijo originam uma flora butírica responsável por mau gosto e orifícios exageradamente grandes. É por isso que em França não é permitido fornecer silagem aos animais cujo leite é utilizado no fabrico dos queijos Gruyère, Comté ou Emmenthal. Como seria de esperar este fenómeno agudiza-se nas silagens de pior qualidade. Uma silagem bem elaborada limita-se a transmitir ao queijo um gosto ligeiramente mais amargo, quando comparada com uma dieta à base de feno (MOINET, 1997).

Outras substâncias transmissíveis ao leite possuem propriedades antibióticas capazes de provocar alterações da qualidade do queijo, inibindo os microorganismos responsáveis pela caseificação, nomeadamente durante a coagulação e a cura. Incluem-se neste grupo os resíduos dos medicamentos antibióticos, resíduos de detergentes e desinfectantes da lavagem do material e algumas substâncias de origem vegetal consumidas pelos animais. O leite conspurcado ou contaminado por microorganismos provenientes de feridas, pode também provocar acidentes da caseificação pela flora anormal que é introduzida no meio e do desequilíbrio ecológico que daí resulta. A maior parte dos antibióticos com actividade

anti-mamítica inibem a proliferação das bactérias lácticas. O atraso na acidificação da coalhada que então se regista favorece o desenvolvimento de uma flora anormal em que predominam as bactérias coliformes (RICHARD e AUCLAIR, 1987). Como as bactérias lácticas têm também uma importante acção proteolítica sobre a caseína, decisiva para o desenvolvimento das qualidades organolépticas dos queijos durante a cura (WEBER e RAMET, 1987), a sua inibição por substâncias antibióticas conduz a uma diminuição da qualidade dos produtos.

Como já foi referido, está comprovada a inibição do desenvolvimento de algumas espécies bacterianas pelo alcalóides quinolizidínicos. Na bibliografia consultada não se encontraram quaisquer referências a um possível efeito deletério destes alcalóides sobre a qualidade do queijo ou de outros produtos lácteos, quer através da inibição da flora caseificante quer pela transmissão do seu gosto amargo aos produtos. Alguns ovinicultores disseram-nos que reduzem o consumo de tremocilha pelas ovelhas em lactação e que muitos roupeiros receiam utilizar o leite destes animais, temendo a transmissão do sabor amargo para os produtos. Por isso, pretende-se agora verificar se as concentrações de alcalóides encontradas no leite das ovelhas do estudo anterior produzem qualquer efeito negativo sobre a qualidade organoléptica do queijo de Serpa.

5.2. Material e métodos

O leite obtido ao longo da experiência referida no capítulo anterior foi armazenado a -20°C, no escuro, e em embalagens hermeticamente fechadas logo após a ordenha e à obtenção de amostras para as análises químicas referidas em 4.2.. O leite de cada ovelha foi armazenado separadamente, tendo sido as embalagens identificadas com o número de cada animal e o tratamento alimentar a que estava sujeito. Estas embalagens foram lavadas com detergente e enxaguadas, antes de serem utilizadas.

No termo do período experimental o leite foi transportado para a queijaria da Herdade da Abóbada, em Serpa, onde foi transformado em queijo. Na impossibilidade de se obter um

queijo a partir do leite de cada uma das ovelhas, o leite dos animais de cada um dos tratamentos 15%-TB (dieta com 15% de tremocilha) e 30%-TB (dieta com 30% de tremocilha) foi agrupado em lotes de maneira a obter-se, simultaneamente, um gradiente de alcalóides. Assim, dentro de cada um destes tratamentos conseguiram-se 2 lotes, cada um composto pelo leite de três ovelhas:

Ovelhas suplementadas com bagaço de soja: lote de leite sem alcalóides (Queijos 0A)

Ovelhas suplementadas com 15% de tremocilha: lote de leite com 1mg/Kg (Queijos 1A)

lote de leite com 3 mg/Kg (Queijos 3A)

Ovelhas suplementadas com 30% de tremocilha: lote de leite com 6 mg/Kg (Queijos 6A)

lote de leite com 7 mg/Kg (Queijos 7A)

Cada um destes lotes de leite foi processado independentemente e de igual modo, de acordo com o método utilizado no fabrico de Queijo de Serpa, e que a seguir resumidamente se descreve.

Na queijaria procedeu-se à descongelação do leite à temperatura ambiente durante 24 h , após o que se filtrou por um conjunto de 6 panos. Submeteu-se depois o leite a uma temperatura de 29°C, em banho-maria, e juntou-se-lhe a infusão de cardo (*Cynara cardunculus* L.). Esta foi preparada de véspera, por esmagamento de pétalas de cardo num almofariz, adicionando-se depois água à massa resultante. No dia seguinte a infusão foi coada e adicionada ao leite, na proporção de 3,5 g de cardo por 10 litros de leite. A coalhada então obtida foi cortada e vertida na queijeira, procedendo-se então ao dessoramento manual e à salga, na proporção de 100 g de sal por cada 10 litros de leite. A massa já dessorada foi moldada e acondicionada nos cinchos, passando de seguida à fase da cura em câmara frigorífica. Durante os primeiros quinze dias os queijos permaneceram a uma temperatura de 9°C, foram sujeitos a uma humidade de 95% e todos os dias foram virados. Decorrido este tempo foram lavados e passaram para uma segunda câmara onde a

temperatura passou a 12 °C e a humidade a 85%. O processo de cura terminou ao fim de 30 dias e os queijos foram então submetidos a análise química, microbiológica e sensorial.

5.2.1. Análises químicas e microbiológicas

Em todos os queijos obteve-se uma amostra cortando uma fatia a partir do centro do queijo, com cerca de 50 g, após o que lhe foi retirada a crosta. De seguida foi triturada em almofariz, homogeneizada e conservada num frasco de vidro fechado. Foi medido o resíduo seco (RS) de acordo com a Norma Internacional FIL-IDF 4:1958. Para tal aqueceu-se em estufa a 105°C até peso constante, uma cápsula de porcelana com areia de mar, a que se juntou após arrefecimento em exsiccador, 5 g de amostra do queijo, misturando bem com a areia. Introduziu-se de novo na estufa à mesma temperatura durante 4 horas após o que arrefeceu em exsiccador e se procedeu à pesagem. O teor em matéria gorda foi medido utilizando a NP.2015/83. Num butirómetro juntou-se a uma pequena quantidade de amostra ácido sulfúrico e álcool isoamílico. Depois de se ter separado a gordura por centrifugação, leu-se a sua percentagem na escala do butirómetro. O teor em azoto total foi quantificado pelo método *Kjeldhal* (AOAC, 1990), submetendo-se a amostra a ácido sulfúrico na presença de sulfato de cobre e óxido de titânio. Após adição de hidróxido de sódio destilou-se o digerido e recolheu-se o destilado sobre ácido bórico. O amoníaco foi depois titulado com HCl 0,1N até viragem do indicador. O teor em azoto calculou-se a partir da quantidade de HCl consumido. Para determinar o teor em azoto solúvel utilizou-se o método descrito por Carvalho (1989). Macerou-se 20g de homogeneizado em água destilada a 40°C, que se reuniram num balão volumétrico de 500 ml. Arrefeceu-se, completou-se o volume e deixou-se repousar durante 24 h a 4°C. Após centrifugação durante 20 minutos, a 3500 r.p.m e a 0°C, determinou-se a concentração de azoto no sobrenadante recorrendo ao método *Kjeldjal*. Para a quantificação dos alcalóides presentes no queijo utilizou-se o método descrito em 3., depois de se ter homogeneizado 3 g de massa, retirada do interior do queijo, em 15 ml de HCl 0,5N com a ajuda de um

Ultratorrax. A concentração de cloretos totais foi determinada recorrendo ao método proposto para o queijo pela AOAC (1990). Todas as análises foram efectuadas em duplicado. O coeficiente de maturação dos queijos foi expresso como a percentagem de N solúvel no N total. Foi ainda calculado para cada queijo o valor da humidade referido ao queijo isento de matéria gorda (HRQIMG) e o teor de matéria gorda no resíduo seco (MGRS).

As amostras para contagem microbiológica foram recolhidas assepticamente utilizando uma faca esterilizada à chama de lamparina. Cortou-se radialmente o queijo em fatias concêntricas de cerca de 50 g, após eliminação da casca. Contaram-se os mesófilos totais a partir de um homogeneizado em citrato de sódio a 2% (10g/90ml) a 45°C, obtido num homogeneizador *Stomacher*. Prepararam-se diluições decimais em solução estéril de Ringer a 25%, após o que as colónias de microorganismos foram contadas em placas de *Plate Count Agar*, incubadas a 30°C durante 72 horas (NP 459/85).

5.2.2. Análise sensorial

Os queijos foram analisados sensorialmente pelo Painel de Provadores do Queijo de Serpa, na Escola Superior Agrária de Beja, de acordo com as Regras de Controlo e Certificação do Queijo de Serpa. Os cinco elementos do painel analisaram sensorialmente todos os queijos e atribuíram a cada um uma pontuação final que consiste no somatório da classificação obtida pela crosta, forma, pasta e aroma/sabor, de acordo com a seguinte escala de pontuação:

Crosta

Lisa ou ondulada, fina ou medianamente espessa, inteira; cor amarelo-palha carregado, por vezes recoberta de formações secas de bolores brancos ou de cor de limão: 3,5 a 4 pontos. Pouco aderente, mal formada, com dificuldade de contenção da massa, fendas mais ou menos extensas e abertas, ou dura e espessa, cor branca, manchada ou amarelo muito

carregado: 2 a 3 pontos. Profundamente deteriorada, com excessiva espessura ou com manchas profundas: 0 a 1,5 pontos.

Forma e consistência

Regular com abaulamento lateral, sem arestas. Consistência semi-mole com alguma flutuação; som maciço ou ligeiramente timpânico: 3,5 a 4 pontos. Arestas vivas, consistência dura ou deformável por excesso de amanteigado; som timpânico acentuado: 2 a 3 pontos. Deformação exagerada; consistência demasiado fluída: 0 a 1,5 pontos.

Textura e Cor da Pasta

Bem ligada, fechada ou com alguns olhos, mediamente amanteigada; cor branco-marfim uniforme: 5,5 a 6 pontos. Mal ligada, aberta, com centros duros, abatatada ou irregular, com água intersticial; cor branco-mate, centros brancos, coloração irregular ou com manchas: 3 a 5 pontos. Desligada, esponjosa; cor totalmente branca ou manchada de várias tonalidades: 0 a 2,5 pontos.

Sabor e Cheiro

Sabor suave ou ligeiramente acentuado e picante; cheiro suave ou ligeiramente forte e amoniacal: 5,5 a 6 pontos. Saponificado, salgado, amargo, forte e desagradável; cheiro amoniacal forte acentuado: 3 a 5 pontos. Sabor e cheiro repugnante: 0 a 2,5 pontos.

Para obter aprovação pelo painel os queijos devem reunir os seguintes requisitos: pontuação total igual ou superior a 14 pontos e pontuação do sabor e cheiro superior a 4 pontos. Os valores da HRQIMG e da MGRRS devem situar-se entre 61 - 69% e 45 - 60%, respectivamente. O coeficiente de maturação deve ser igual ou superior a 45 embora este valor raramente seja atingido nos queijos de Serpa comercializados.

5.2.3. Análise estatística

Os valores médios dos parâmetros obtidos para os queijos de cada tratamento foram comparados pela análise de variância dos dados segundo um delineamento completamente casualizado com um número diferente de repetições por cada tratamento. Quando a análise

de variância demonstrou a existência de diferenças significativas entre os tratamentos, compararam-se as médias pelo teste da LSD. Consideraram-se as diferenças entre os tratamentos como significativas, muito significativas ou altamente significativas, quando a probabilidade da sua ocorrência foi, respectivamente, de 95% ($P < 0,05$), 99% ($P < 0,01$) e 99,9% ($P < 0,001$) (GOMEZ e GOMEZ, 1984).

5.3. Resultados e discussão

5.3.1. Composição química

No quadro 5.1. apresenta-se a composição química dos queijos estudados. Nos anexos 5.1. a 5.9. são apresentados os valores obtidos e a respectiva análise de variância. Obtiveram-se 8 queijos a partir de leite sem alcalóides proveniente dos animais suplementados com bagaço de soja (queijos 0A ou 0%-TB); 2 queijos de leite com alcalóides na proporção de 1 mg/Kg de leite (queijos 1A) e 4 queijos de leite com 3 mg/Kg (queijos 3A) das ovelhas suplementadas com 15% de tremocilha brava (queijos 15%-TB); e ainda 4 queijos de leite com 6 mg/Kg (queijos 6A) e 2 queijos de leite com 7 mg/Kg (queijos 7A) das ovelhas suplementadas com 30% de tremocilha brava (queijos 30%-TB). Os queijos atingiram um peso individual entre 700 e 1000 g classificando-se por isso como "cuncas" de acordo com o Decreto Regulamentar nº39/87.

O RS dos queijos foi bastante semelhante (Figura 5.1.). Só os queijos 1A apresentaram um RS significativamente inferior ($P < 0,001$). Os valores obtidos para este parâmetro são inferiores aos 60,79% referidos por CRUZ (1948) para queijos de Serpa. MACEDO *et al.* (1993) citam teores de RS para o queijo Serra da Estrela entre 51,2% e 68,1%. Também para queijos espanhóis de tecnologia bastante semelhante à do Queijo de Serpa se referem valores semelhantes aos por nós encontrados. Segundo MAYORAL *et al.* (1991) cit. por AMARAL (1996) o Queijo *del Casar* pode apresentar 51,69% (45 dias de cura) a 53,64% (60 dias de cura) de RS. Também no Queijo *de la Serena* GONZALEZ

et al.(1991) cit. por AMARAL (1996) encontraram valores de 57,71% (45 dias) a 38,54% (60 dias de cura).

Como seria de esperar a HRQIMG acompanhou os valores registados para o resíduo seco, tendo igualmente oscilado muito pouco (Figura 5.2.). O valor máximo foi obtido nos queijos 1A e diferiu significativamente dos restantes ($P < 0,001$). Todavia, não se registou qualquer correlação significativa ($P > 0,05$) entre os valores da HRQIMG e o teor em alcalóides do leite. Os valores médios da HRQIMG encontrados nos queijos estudados são da mesma ordem dos propostos pelas normas reguladoras do Queijo de Serpa (61-69% segundo o Decreto Regulamentar nº 39/87 de 29 de Junho). Apesar dos queijos 0%-TB terem registado valores inferiores aos estipulados no regulamento, este afastamento parece não ser significativo. O teor em água do queijo depende principalmente das transformações químicas sofridas pela massa durante a acidificação, da intensidade das operações de esgotamento e, posteriormente, da quantidade de sal utilizada e da duração e condições ambientais em que se processa a cura (HARDY, 1987). De todos estes factores condicionantes do teor em humidade do queijo aquele que, provavelmente, surge como susceptível de maior variação no sistema por nós utilizado, é a intensidade com que se esgotou o soro presente na coalhada, visto que todos os outros factores permaneceram constantes. Com efeito, sendo este processo artesanal é natural que diferenças imperceptíveis no esforço efectuado no tratamento mecânico da coalhada (corte, esmagamento e compressão) possam originar valores significativamente diferentes da humidade residual de alguns queijos. Qualquer efeito dos alcalóides presentes no leite sobre este parâmetro, será, aparentemente, de difícil justificação, para o que parece apontar o coeficiente de correlação encontrado (Quadro 5.3.). AMARAL (1996), ao estudar o efeito da etnia das ovelhas sobre a composição química e sensorial de 38 queijos de Serpa com 40 a 55 dias de maturação, também elaborados na queijaria da Herdade da Abóbada, verificou que só metade registou um teor em HRQIMG compreendidos entre 61-69%, conforme exigido pelo regulamento de certificação.

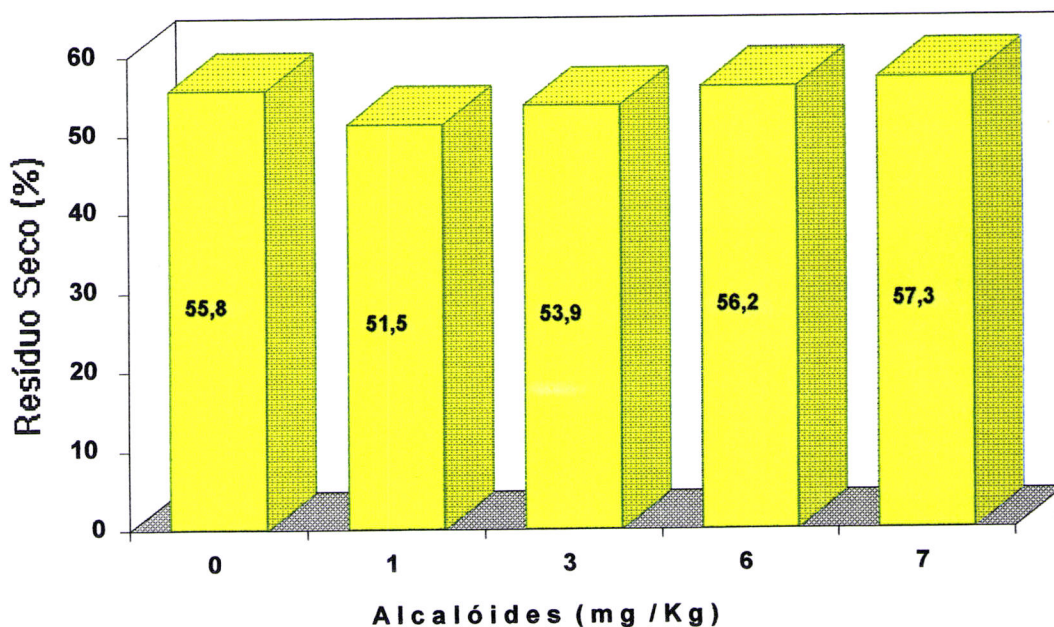


Figura 5.1. Variação do Resíduo Seco (%) de Queijo de Serpa elaborado a partir de leite com 5 concentrações crescentes de alcalóides da tremocilha brava.

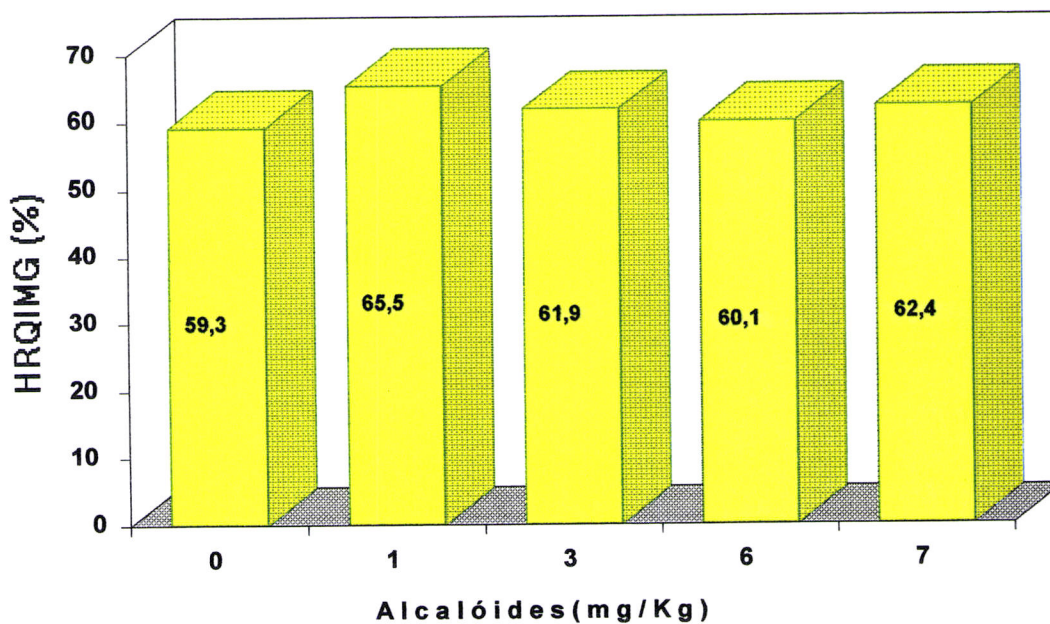


Figura 5.2. Variação da HRQIMG (%) de Queijo de Serpa elaborado a partir de leite com 5 concentrações crescentes de alcalóides da tremocilha brava.

Quadro 5.1. Composição química de Queijo de Serpa obtido a partir de leite sem alcalóides (dieta sem tremocilha), com 1 e 3 mg/Kg (dieta 15%-TB) e com 6 e 7 mg/Kg (dieta 30%-TB). Média e (EPM).

Parâmetros	Alcalóides (mg/Kg leite)					signif.
	0	1	3	6	7	
	n=8	n=2	n=4	n=4	n=2	
Resíduo Seco (%)	55,83 (0,40)	51,50 (0,70)	53,85 (0,33)	56,18 (0,53)	57,25 (1,05)	***
HRQIMG (%)	59,25 (0,45)	65,45 (0,15)	61,93 (0,24)	60,10 (0,59)	62,40 (1,40)	***
Matéria Gorda (%)	25,43 (0,27)	25,80 (1,00)	25,45 (0,48)	27,08 (0,33)	31,55 (0,25)	***
MGRRS (%)	45,55 (0,39)	50,05 (1,25)	47,28 (0,65)	48,20 (0,41)	55,10 (0,60)	***
P B(%)	25,49 (0,42)	21,25 (0,45)	21,23 (1,82)	21,68 (0,27)	17,4 (1,7)	**
N solúvel (%)	1,27 (0,04)	0,80 (0,00)	0,93 (0,03)	0,60 (0,00)	0,58 (0,03)	***
C. Maturação	31,59 (0,85)	24,15 (0,55)	28,48 (2,59)	17,63 (0,23)	22,05 (1,95)	***
Cloretos	1,50 ^a (0,09)	3,15 (0,15)	3,00 (0,07)	3,53 (0,12)	4,50 (0,40)	***
Lupinina (µg/100g)	0 (0,00)	174 (22,94)	282 (33,89)	1120 (125,84)	1016 (145,91)	***

^a n=6

Como se pode observar na figura 5.3. registou-se um aumento do teor em MG dos queijos, com o incremento da concentração de alcalóides no leite ($r=0,71$ para $P<0,001$, com $y=25,06+0,52x$). Porém, só os queijos 7A apresentaram uma concentração em gordura significativamente superior à dos restantes ($P<0,001$). A MGRRS acompanhou igualmente esta tendência, com os queijos 15%-TB e 30%-TB a atingirem valores médios superiores ao controlo (Figura 5.4.).

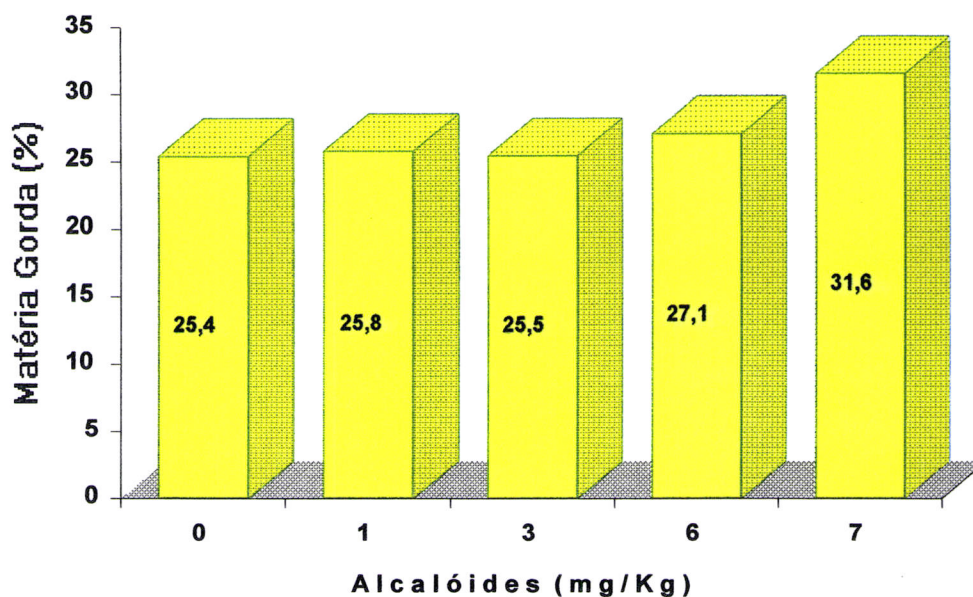


Figura 5.3. Teor em Matéria Gorda de Queijo de Serpa elaborado a partir de leite com 5 concentrações crescentes de alcalóides de tremocilha brava.

Os queijos 7A apresentaram o valor mais elevado ($P<0,001$). Também foi possível estabelecer uma correlação significativa ($P<0,001$) entre este parâmetro e a quantidade de alcalóides presentes no leite ($r=0,68$), manifestando-se esta relação através da equação de regressão linear $Y=45,88 + 0,75x$. Os valores médios da MGRRS dos queijos estudados estão compreendidos dentro dos limites legais definidos para o Queijo de Serpa e que vão de 45 a menos de 60%. Só em 2 dos 10 queijos das ovelhas 0%-TB se registou um valor inferior a 45% de MGRRS.

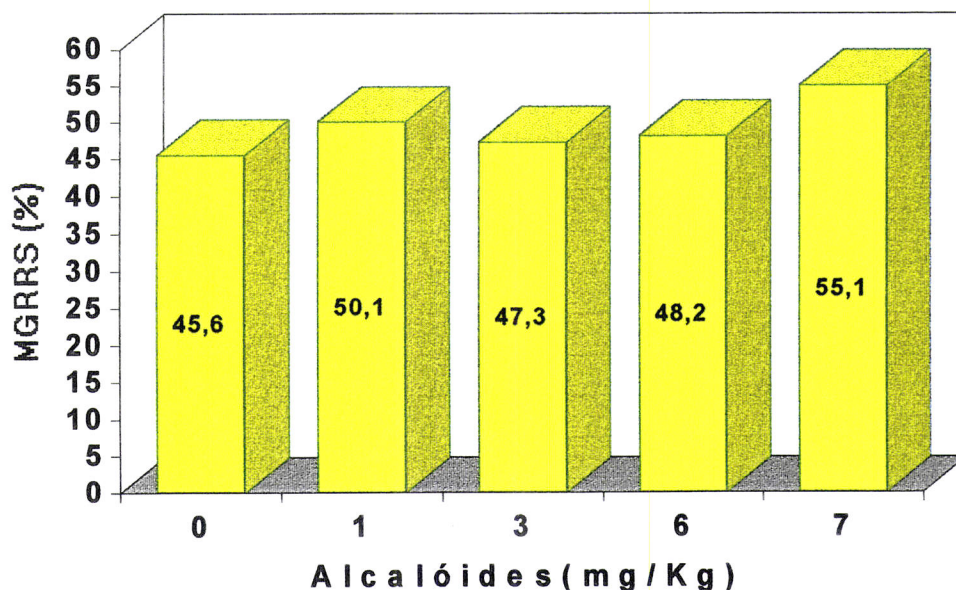


Figura 5.4. Teor em MGRRS de Queijo de Serpa elaborado a partir de leite com 5 concentrações crescentes de alcalóides da tremocilha brava.

Os valores de MG encontrados são semelhantes aos $27,32 \pm 3,06\%$ referidos por AMARAL (1996) em Queijo de Serpa com 40 a 55 dias de cura. SÁ *et al.* (1970) encontraram 22,8% a 25,1% de MG em Queijos de Serpa com 30 dias de cura. De acordo com a revisão feita por MACEDO *et al.* (1993) a MG dos Queijos Serra da Estrela pode variar de 23% a 40%. Para o Queijo *de la Serena* GONZALEZ *et al.* (1991) cit. por AMARAL (1996) obtiveram valores de 30,41% (45 dias de cura) e $35,33 \pm 7,00\%$ (60 dias). Já MAYORAL *et al.* (1991) cit. por AMARAL (1996) determinaram em Queijo *del Casar* teores de $26,33 \pm 2,87\%$ (45 dias) e $26,08 \pm 2,83\%$ (60 dias de cura). Os maiores teores em MG e MGRRS dos queijos feitos com leite das ovelhas 15%-TB e, principalmente, 30%-TB, poderão resultar de uma inibição da actividade microbiana pelos alcalóides. As quantidades de MG no leite dos animais dos três tratamentos, um parâmetro que poderia influenciar consideravelmente a MG do queijo, não diferiram significativamente.

Durante a maturação do queijo desenvolvem-se reacções de lipólise originadas quer pelas lipases próprias do leite quer por lipases microbianas. Os ácidos gordos que se libertam destas reacções são por sua vez utilizados como fonte de energia por muitos microorganismos, principalmente pelos fungos, num processo de degradação oxidativa. Os ácidos gordos são oxidados em beta-cetoácidos e estes descarboxilados para a metilcetona correspondente, com a perda de um átomo de carbono. Tanto os esporos como o micélio são eficientes nesta degradação dos ácidos gordos (ADDA *et al.*, 1991). Por outro lado, esta via metabólica representa para a restante flora microbiana uma destoxificação do meio, visto que a acumulação de ácidos gordos provenientes da lipólise tem um efeito inibidor sobre o seu desenvolvimento (CHOISY *et al.*, 1987). A revisão efectuada por MACEDO *et al.* (1993) sobre a população fúngica do Queijo da Serra aponta para valores de até $1,43 \cdot 10^8$ ufc, principalmente dos géneros *Geotrichum*, *Penicilium* e *Aspergillus*. De acordo com MUZQUIZ (1992), os alcalóides quinolizidínicos mesmo em baixas concentrações são tóxicos para alguns fungos, como é o caso de *Pytium aphanidermatum*. Também WINK (1984) assinala a actividade inibidora da esparteína e da lupanina sobre sete diferentes espécies de fungos e MONIELLO *et al.* (não publicado) referem o efeito inibidor da esparteína sobre alguns fungos. Assim, o maior teor em gordura dos queijos 30%-TB poderia reflectir uma inibição da população fúngica pelos alcalóides.

Todos os queijos elaborados com o leite das ovelhas suplementadas com tremocilha brava atingiram teores médios em proteína bruta inferiores aos 25,45% registados no tratamento testemunha (Figura 5.5.), tendo esta diminuição sido mais acentuada nos queijos 3A, 6A e 7A ($P < 0,01$). Estimou-se uma correlação de -0,70 ($P < 0,001$) entre este parâmetro e o teor em alcalóides no leite, com $y = 24,73 - 0,80x$. O valor de 17,40% registado nos queijos 7-A constitui uma concentração bastante baixa se comparada com os valores encontrados por AMARAL (1996) em 38 Queijos de Serpa com um tempo de maturação semelhante. Só 8% destes queijos apresentaram uma concentração proteica inferior a 17%. Excluindo estes, o valor médio dos queijos estudados situou-se em 28%, valor que se aproxima bastante do obtido nos queijos do nosso tratamento testemunha. Também CRUZ

(1948) encontrou um teor proteico de 23,45% para o Queijo de Serpa e GONZALEZ *et al.*(1991) e MAYORAL *et al.* (1991) cit. por AMARAL (1996) determinaram um teor de 24% de PB para queijos *de la Serena* e *del Casar*. O anormal teor proteico registado nos queijos 7A poder-se-á dever à relativamente elevada concentração de alcalóides presentes no leite. A concentração proteica do leite que lhes deu origem foi semelhante às dos restantes.

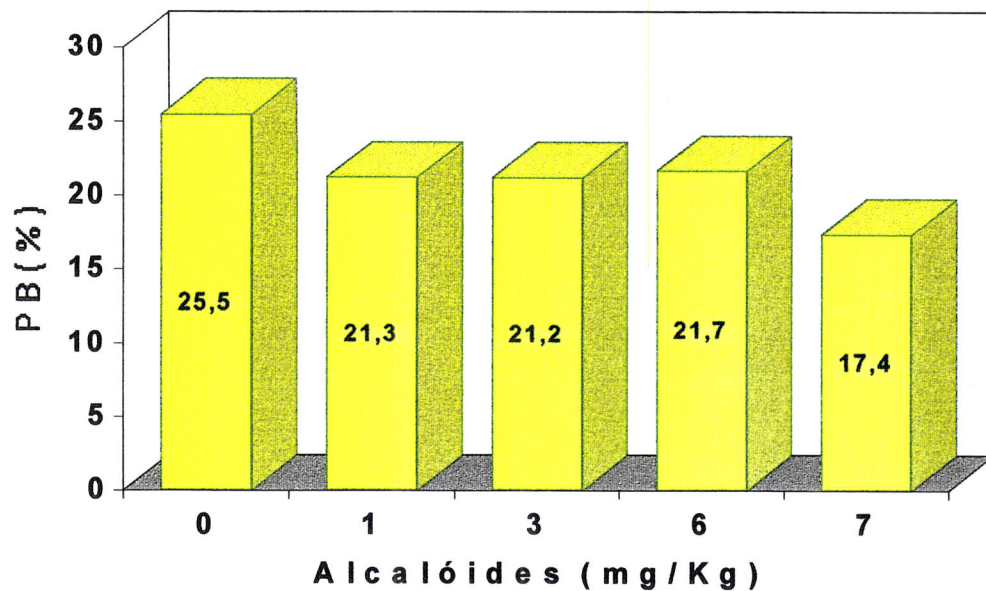


Figura 5.5. Variação do teor em proteína bruta em Queijo de Serpa elaborado a partir de leite com 5 concentrações crescentes de alcalóides da tremocilha brava.

Os alcalóides poderiam ter inibido a flora acidificante, durante o processo de coagulação, o que provocaria uma diminuição do coágulo formado, com perda de caseína durante o dessoramento. As fermentações lácticas jogam um papel decisivo no processo de caseificação devido à sua acção sobre a coagulação (GOBIN, 1995). A superfície das micélias de caseína no leite contém moléculas de caseína K, carregadas positivamente e por isso hidrofílicas, que impedem a agregação das micélias. No início da caseificação

desenvolve-se uma flora acidificante que produz ácido láctico, mais especificamente, iões de hidrogénio. Estes, ao ligarem-se à caseína K neutralizam as suas cargas negativas e permitem a agregação das micélias e a formação do coágulo (MOGENSEN, 1991). Assim, qualquer substância que iniba a flora acidificante é susceptível de alterar o normal processo da coagulação com perda de moléculas de caseína que se mantêm solúveis no soro do leite. Os mais altos teores de MG que se registaram nos queijos dos animais 15 e 30%-TB poderiam resultar, inclusivamente, de uma perda de caseína durante o dessoramento, com o correspondente aumento da proporção de gordura retida no coágulo.

A concentração de azoto solúvel nos queijos 15%-TB e 30%-TB também foi inferior à do tratamento testemunha ($P < 0,001$) (Figura 5.6.). Determinou-se um coeficiente de correlação de $-0,90$ ($P < 0,001$) podendo a relação entre este parâmetro e os alcalóides presentes no leite ser descrita pela equação de regressão $y = 1,21 - 0,10x$.

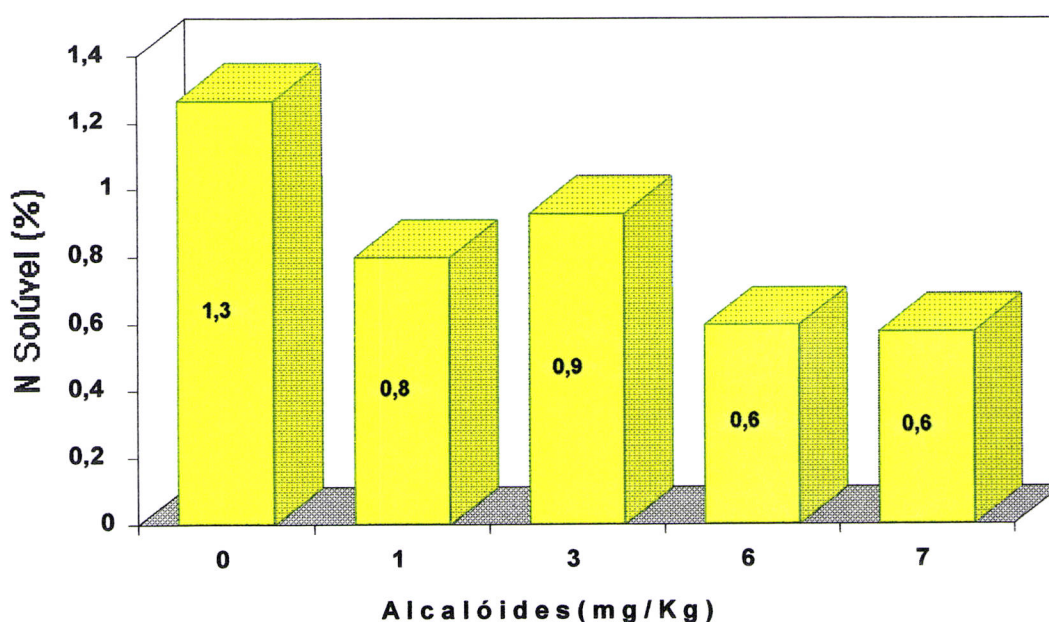


Figura 5.6. Variação da concentração de azoto solúvel em Queijo de Serpa elaborado a partir de leite com 5 concentrações crescentes de alcalóides da tremocilha brava.

O teor em N solúvel presente nos queijos 0%-TB e 15%-TB é bastante semelhante aos obtidos por AMARAL (1996) em Queijo de Serpa com 45 dias de maturação, e que variaram entre 0,8 e 1,2. Já a concentração de N solúvel nos queijos 30%-TB (0,6% em todos eles) é bastante inferior à média registada por aquele autor assim como aos 1,8% registados por CRUZ (1948) para o mesmo tipo de queijo. Nesta fracção azotada estão incluídos os produtos da proteólise da caseína pelas enzimas coagulantes (as cinarinas, no caso do cardo), pela plasmina do leite e pelas proteases microbianas, originando-se nestas reacções principalmente péptidos, aminoácidos e N amoniacal. Destacam-se, e estão particularmente bem estudadas, as actividades proteolíticas das bactérias lácticas e dos *Penincilium*. Quanto à formação de N amoniacal ela resulta maioritariamente das reacções de descarboxilação dos aminoácidos por *Micrococcus*, *Streptococcus* e corinéformes (CHOISY *et al.*, 1987). A diminuição do azoto solúvel registada acompanha o decréscimo do teor em PB verificado nos queijos 15 e 30%-TB, mas também pode resultar de uma menor actividade microbiana nestes queijos.

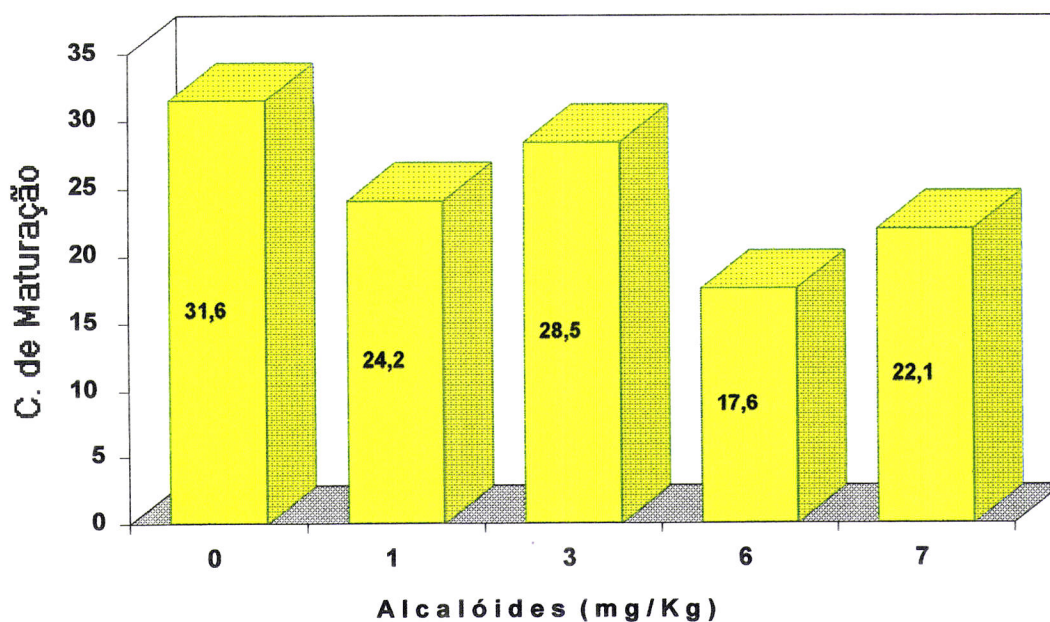


Figura 5.7. Variação do Coeficiente de Maturação de Queijo de Serpa elaborado a partir de leite com 5 concentrações crescentes de alcalóides da tremocilha brava.

O coeficiente de maturação (CM) dos queijos estudados não atingiu o mínimo de 45% estipulado pelo Decreto Regulamentar 39/87 (Figura 5.7.). Os queijos 0%-TB atingiram um CM mais elevado enquanto os queijos 30%-TB se situaram no outro extremo, com CM muito baixos ($P < 0,001$) Entre os queijos testemunha e os 15%-TB não se registaram diferenças significativas ($P > 0,001$). Determinou-se um coeficiente de correlação de $-0,79$ ($P < 0,001$) entre o CM do queijo e a concentração de alcalóides no leite que o originou, relação que é traduzida pela equação $y = 31,05 - 1,76x$. Neste tipo de queijo os valores do CM têm ficado frequentemente aquém do mínimo de 45% exigido pelo regulamento do Queijo de Serpa. Também nenhum dos 38 queijos estudados por AMARAL (1996) atingiu um CM de 45%. O valor atingido por estes queijos, com 40 a 55 dias de maturação, foi de $25,90 \pm 4,35\%$. Também o Queijo *de la Serena* estudado por GONZALEZ *et al.* (1991) cit. por AMARAL (1996) apresenta CM de 28,39% aos 45 dias e 29,52% aos 60 dias e o Queijo *del Casar* valores de 32,66% aos 45 dias e 34,08% aos 60 dias. Os valores encontrados por estes autores aproximam-se bastante dos valores determinados neste trabalho para os queijos 0%-TB e para alguns dos queijos 15%-TB. O CM dos queijos 0A também é semelhante aos valores citados por MACEDO *et al.* (1993) para o Queijo da Serra e que estão compreendidos entre 32 e 56%, embora o autor não refira o período de cura.

O CM de um queijo permite apreciar o grau de maturação que este atingiu durante o processo de cura e é definido pela percentagem de N solúvel relativamente ao teor de N total do queijo. Este parâmetro reflecte o nível de degradação enzimática, principalmente de origem microbiana, sofrido pela coalhada, principalmente a caseína, durante a cura. Por isso, todos os factores que afectem os microorganismos, a produção de enzimas e a actividade enzimática podem influenciar de modo determinante o processo da maturação (CHOISY *et al.*, 1987). Aparentemente os alcalóides contidos no leite retardaram a actividade da flora caseificante originando baixos CM. O valor deste parâmetro determinado para os queijos com máximo teor de alcalóides é, inclusivamente, da mesma ordem do encontrado em queijo fresco.

Apesar de ao leite dos diferentes lotes de ovelhas se ter juntado quantidades semelhantes de sal, verificou-se um aumento significativo ($P < 0,001$) da concentração de cloretos no queijo, à medida que aumentou a quantidade de tremocilha brava nas dietas dos animais (Figura 5.8.). Assim, o valor deste parâmetro variou de 1,5 % nos queijos 0A a 4,5 % nos queijos 7A, sendo de 3,15, 3,00 e 3,53 % nos queijos 1, 3 e 6A. À excepção do teor dos queijos 7A, todos os outros são próximos dos 2-3% que são normalmente encontrados neste tipo de queijo (CRUZ, 1948 e SÁ *et al.* 1970). A maior quantidade de sal presente nos queijos dos animais alimentados com a dose máxima de tremocilha poderia ter, assim, simulado um possível efeito inibidor dos alcalóides sobre a flora, e conduzir só por si ao aparecimento de queijos não maturados. Um excesso de sal no queijo prejudica o processo de maturação visto que impede a actividade microbiana e as reacções enzimáticas a ela associadas, ao indisponibilizar água livre para o desenvolvimento microbiano. Os fenómenos de lipólise e proteólise implicados na génese do gosto e aroma durante a maturação são assim bloqueados e, em virtude disso, um queijo excessivamente salgado requer um maior tempo de afinagem (HARDY, 1987; FURTADO, 1990). Porém, mesmo os relativamente elevados valores de NaCl dos queijos 7A enquadram-se nos encontrados em queijo de Serpa por AMARAL (1996) e nos referidos na revisão efectuada por MACEDO *et al.* (1993) para o queijo da Serra da Estrela. Também MAYORAL *et al.* (1991) cit. por AMARAL (1996), determinou em Queijo *de la Serena* teores em NaCl máximos de 4,51%. No trabalho de AMARAL (1996) nota-se ainda que queijos de Serpa com 4,3 e 4,7% de NaCl obtiveram altas classificações totais (16,32 a 17,26 pontos) e foram aprovados pelo painel de provadores. Ainda de acordo com WEBER e RAMET (1987) um teor de 5% de sal no queijo não afecta significativamente as principais populações microbianas.

A maioria dos queijos provenientes dos animais alimentados com tremocilha apresentaram baixo CM não obstante os seus normais teores em sal. Refira-se ainda, que mesmo nos queijos em que se detectou maior concentração em cloretos, o painel de provadores não notou a existência de concentrações excessivas de sal.

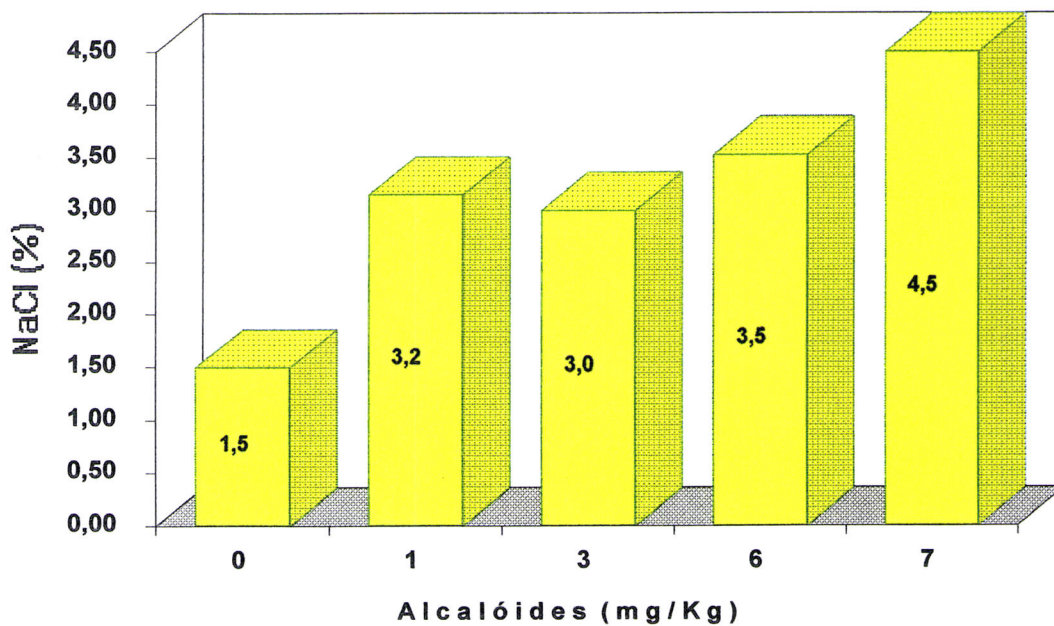


Figura 5.8. Variação do teor em NaCl (%) de Queijo de Serpa elaborado a partir de leite com 5 concentrações crescentes de alcalóides de tremocilha brava.

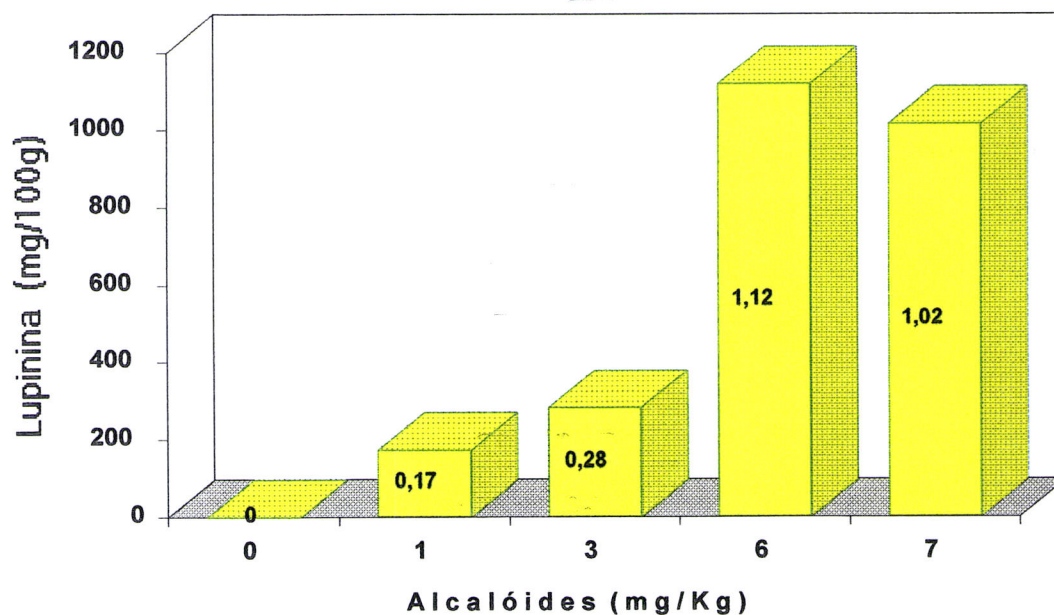


Figura 5.9. Variação do teor em lupinina de Queijo de Serpa elaborado a partir de leite com 5 concentrações crescentes de alcalóides da tremocilha brava.

A maior concentração de cloretos detectada nos queijos 7A pode estar associada a uma deficiente acidificação do leite através da inibição da flora acidificante pelos alcalóides da tremocilha. As enzimas responsáveis pela coagulação, as cinerases do cardo, requerem pH ácido para actuarem (MACEDO *et al.*, 1993) e o próprio ácido láctico participa na formação do coágulo favorecendo a expulsão de humidade da coalhada e do sal nela dissolvido. A acidificação influi de forma determinante na composição química e nas características físicas da coalhada. Por isso, tudo o que contribua para uma deficiente sinérese deverá ser susceptível de contribuir para um enriquecimento da massa em sal. No quadro 5.1. pode verificar-se que os queijos 7A são dos que apresentam maiores teores em HRQIMG.

Como seria de esperar não se detectaram vestígios de alcalóides nos queijos 0%-TB. Nos restantes, o único alcalóide detectado foi a lupinina. Nos queijos 15%-TB encontraram-se 0,174 mg/Kg (1A) e 0,282 mg/Kg (3A) enquanto nos queijos 30%-TB os teores subiram para 1,12 e 1,02 mg/Kg (6A e 7A, respectivamente) (Figura 5.9.). A relação entre este parâmetro e o teor em alcalóides no leite é definido pela equação $y=166,29x-32,83$, sendo $r=0,94$ ($P<0,001$). A quantidade de alcalóides encontrada nos queijo 30%-TB foi significativamente superior à dos queijos 15%-TB ($P<0,001$).

5.3.2. Características microbiológicas

As quantidades de microorganismos mesófilos totais, a flora maioritariamente responsável pelo processo de caseificação, dos queijos estudados apresentam-se na figura 5.10.. No anexo 5.10. são apresentados os valores encontrados, com a respectiva análise de variância. Só o valor deste parâmetro encontrado nos queijos elaborados a partir do leite com maior quantidade de alcalóides foi significativamente inferior ao dos restantes queijos ($P<0,05$). Entre os valores médios destes não se encontraram diferenças significativas ($P>0,05$). O coeficiente de correlação entre este parâmetro e a concentração de alcalóides no leite não se revelou significativa para o nível de probabilidade de 95%, mas entre os logaritmos das u.f.c. de cada queijo e o teor em lupinina do leite determinou-se um $r=0,514$

($P < 0,05$). A quantidade de unidades formadoras de colónias de mesófilos encontrada nos queijos 7A foi 13 vezes inferior à dos queijos testemunha. A quantidade de mesófilos totais detectada em todos os queijos, à excepção dos 7A, é bastante semelhante à encontrada em Queijo de Serpa por AMARAL (1996) ($7,41 \cdot 10^8$).

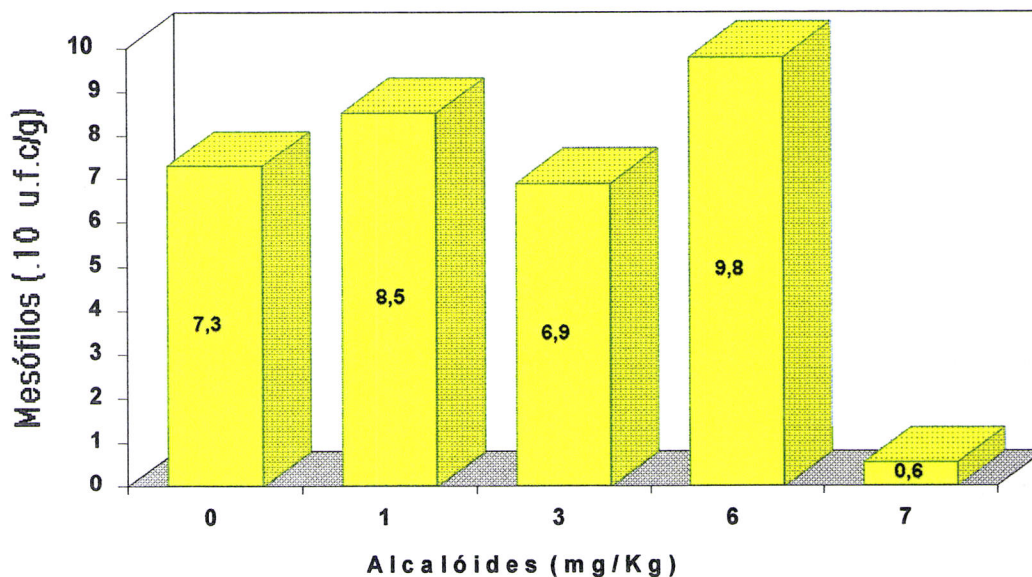


Figura 5.10. Microorganismos mesófilos (10^8 ufc.) de Queijo de Serpa elaborado a partir de leite com 5 concentrações crescentes de alcalóides da tremocilha brava. EPM: 0A- $1,01 \cdot 10^8$; 1A- $0,8 \cdot 10^8$; 3A- $0,58 \cdot 10^8$; 6A- $1,63 \cdot 10^8$; 7A- $0,44 \cdot 10^8$.

Também MAYORAL *et al.*(1991) e GONZALEZ *et al.*(1991) cit. por AMARAL (1996) indicam os valores de $1,15 \cdot 10^8$ a $8,32 \cdot 10^8$ para o Queijo *del Cazar* e $1,41 \cdot 10^8$ para Queijo *de la Serena*, respectivamente. No entanto os últimos autores também observaram para este queijo valores mais baixos - $0,15 \cdot 10^8$ - quando a cura foi mais prolongada e atingiu 60 dias. Este valor aproxima-se já do que foi encontrado nos queijos 7A, embora o período de cura destes tenha sido mais curto. O baixo valor deste parâmetro nos queijos 7A está de acordo com o reduzido valor do CM também encontrado nestes queijos. Nos queijos 6A, embora com um CM ainda mais baixo, registaram-se valores de mesófilos normais, o que deve reflectir o facto de que para além dos mesófilos, também outros

microorganismos participam na maturação do queijo (ADDA *et al.*, 1991) e que também estes poderiam ter sido inibidos por aquela concentração de alcalóides. Segundo WINK (1994) concentrações de lupanina inferiores a 5 mM e de espartefna entre 0,5 e 7 mM inibem a actividade bacteriana *in vitro*. A concentração de alcalóides no leite das ovelhas 30%-TB atingiu um valor médio de 0,03 mM, enquanto nos queijos 7A este valor foi de 0,06 mM. Aparentemente os microorganismos do queijo parecem ser sensíveis a estas baixas concentrações daqueles compostos.

5.3.3. Avaliação sensorial

Os resultados da apreciação organoléptica efectuada pelo Painel de Provedores do Queijo de Serpa aos queijos produzidos a partir do leite dos três grupos de ovelhas podem observar-se no quadro 5.2.. Nos anexos 5.11. a 5.15. são apresentados os valores das pontuações obtidas por cada queijo e respectiva análise de variância. Exceptuando as dos queijos 7A, as pontuações das crostas dos restantes queijos podem classificar-se como de média qualidade (2,8 nos queijos 0A a 3,3 nos 1A e 3A), não diferindo significativamente entre si ($P > 0,001$). A crosta dos queijos 7A registou uma pontuação bastante inferior e muito próxima de zero ($P < 0,001$). Esta baixo valor deveu-se à sua cor muito branca e quase despigmentada, semelhante à do queijo fresco (Figuras 5.11. e 5.12.).

Os queijos 15%-TB revelaram a forma e consistência mais adequada, embora as dos queijos 6A e 0A não tenham diferido significativamente dos 3A (Figura 5.13.) ($P > 0,001$). Os queijos 30%-TB foram os menos apreciados, com os 7A a registar a pontuação mais baixa para este parâmetro ($P < 0,001$). Este facto deveu-se fundamentalmente às arestas salientes e consistência mais dura dos queijos 30%-TB, assemelhando-se bastante o seu formato ao adoptado pela massa recém colocada nos cinchos. Os queijos testemunha foram penalizados pela sua consistência dura. Estabeleceu-se um $r = -0,58$ ($P < 0,01$) entre teor em alcalóides no leite e classificação da forma e consistência e a equação de regressão obtida foi: $y = 3,29 - 0,09.x$.

Quadro 5.2. Avaliação sensorial de Queijo de Serpa obtido a partir de leite sem alcalóides de tremocilha brava (tratamento 0%-TB), com 1 e 3 mg/Kg (15%-TB) e com 6 e 7 mg/Kg (30%-TB). Média e (EPM).

Parâmetros	Alcalóides(mg/Kg leite)					Signif.
	0	1	3	6	7	
	n=8	n=2	n=4	n=4	n=2	
Crosta	2,80 (0,09)	3,30 (0,20)	3,30 (0,14)	2,93 (0,14)	0,70 (0,00)	***
Forma	3,10 (0,05)	3,40 (0,00)	3,50 (0,07)	2,85 (0,06)	2,05 (0,05)	***
Pasta	4,60 (0,09)	5,05 (0,05)	5,18 (0,03)	4,30 (0,07)	2,95 (0,05)	***
Sabor/Aroma	4,10 (0,10)	4,20 (0,20)	4,88 (0,09)	4,15 (0,06)	2,30 (0,60)	***
Classificação Final	14,60 (0,13)	15,95 (0,45)	16,83 (0,16)	14,20 (0,21)	8,05 (0,05)	***



Figura 5.11. Da esquerda para a direita: queijo 30% - TB, 15%-TB e 0%-TB.

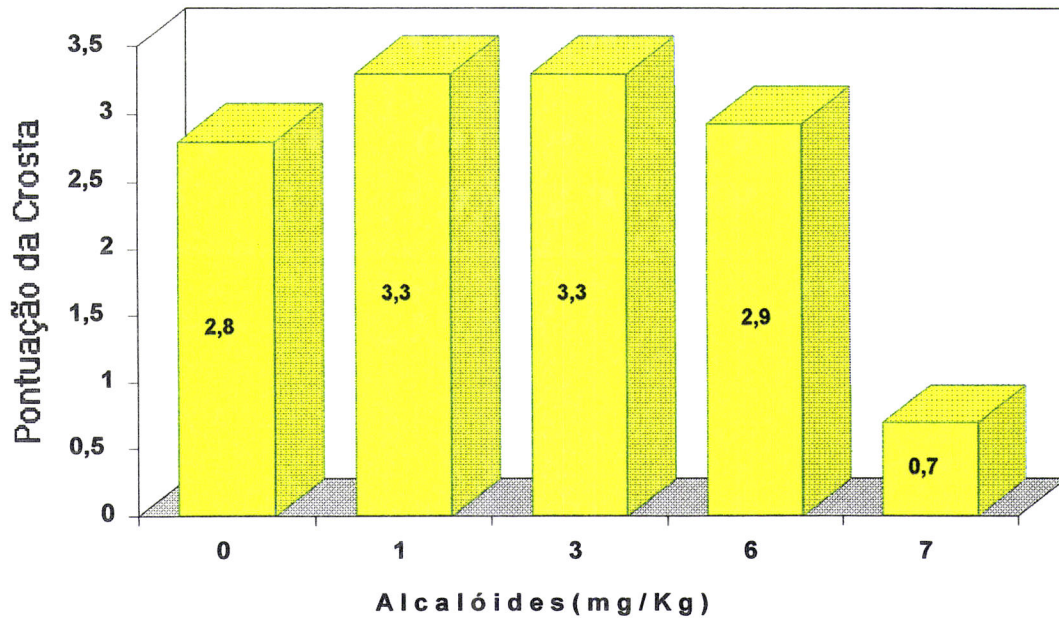


Figura 5.12. Classificação da crosta de Queijo de Serpa elaborado a partir de leite com 5 concentrações crescentes de alcalóides da tremocilha brava.

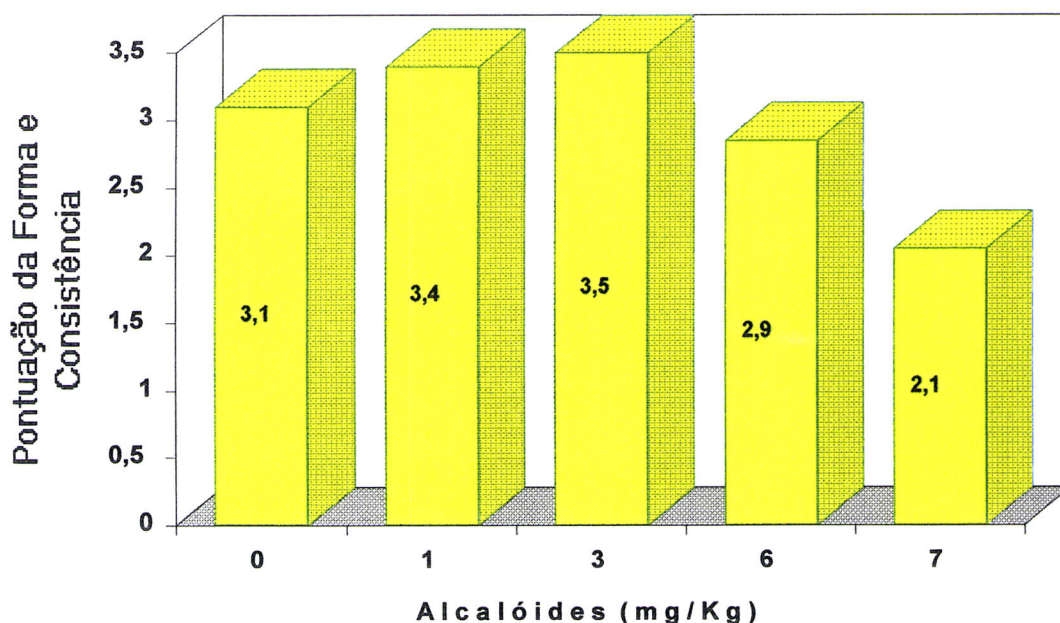


Figura 5.13. Classificação da forma e consistência de Queijo de Serpa elaborado a partir de leite com 5 concentrações crescentes de alcalóides da tremocilha brava.

Segundo as normas regulamentares os queijos 0%-TB, 15%-TB e 6A obtiveram uma classificação média para o parâmetro "textura e cor da pasta", tendo os queijos 3A registado a pontuação máxima (Figura 5.14.). Os queijos 30%-TB foram os menos pontuados, tendo os 7A registado de novo a menor classificação ($P < 0,001$), o que se deveu fundamentalmente à cor muito branca e incharacterística da sua pasta. Registou-se um coeficiente de correlação de $r = -0,56$ ($P < 0,01$) entre a concentração de alcalóides no leite e este parâmetro com a equação de regressão linear $y = 4,88 - 0,13x$.

Os queijos 15%-TB registaram a melhor pontuação no parâmetro "Sabor e Aroma" ($P < 0,001$). Os queijos 0A, 1A e 6A não apresentaram sabor e aroma significativamente diferente ($P > 0,001$). Mais uma vez os queijos 7A registaram a classificação mais baixa ($P < 0,001$) devido a uma pronunciada falta de sabor, bastante próxima da insapidez (Figura 5.15.). Os queijos 0%-TB foram penalizados pelo sabor amargo e a ranço que se desenvolveu em alguns deles.

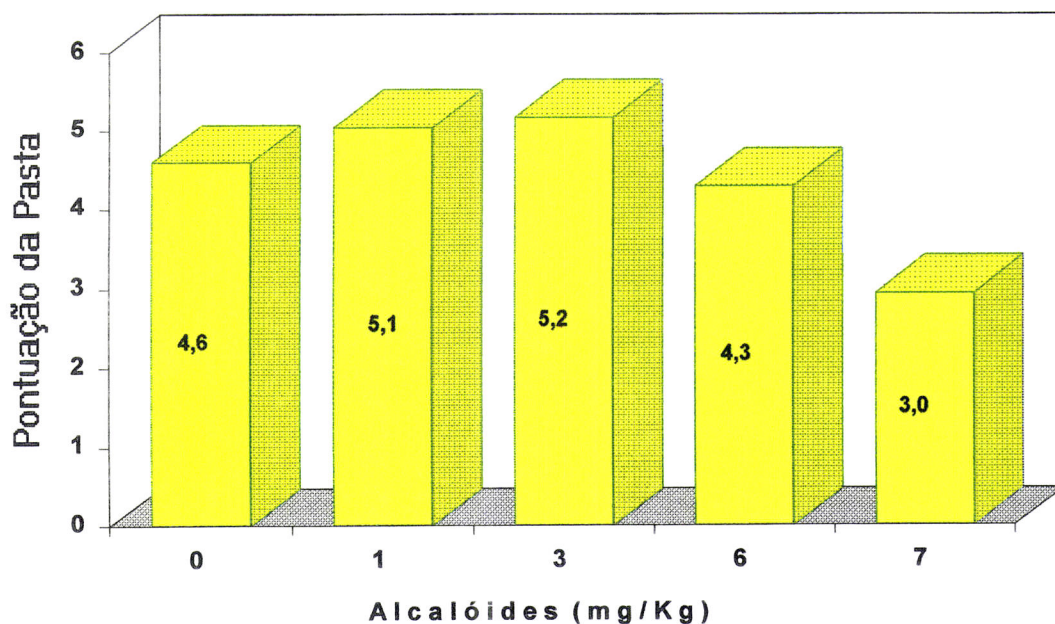


Figura 5.14. Classificação da textura e cor da pasta de Queijo de Serpa elaborado a partir de leite com 5 concentrações crescentes de alcalóides da tremocilha brava.

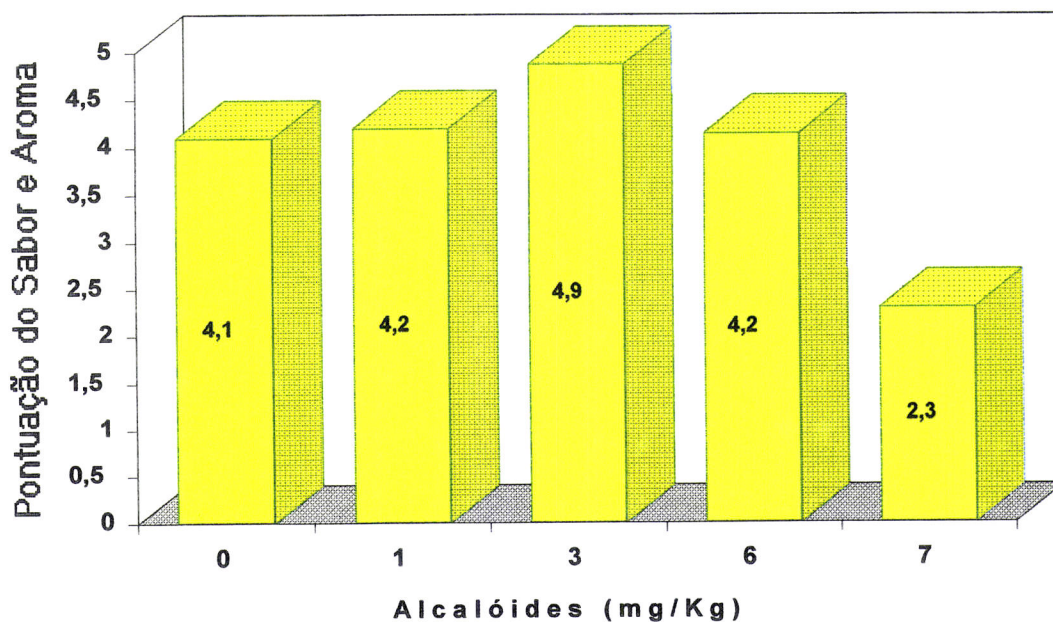


Figura 5.15. Classificação do sabor e aroma de Queijo de Serpa elaborado a partir de leite com 5 concentrações crescentes de alcalóides de tremocilha brava.

Talvez empiricamente, FOURCAND (1992) desaconselha o emprego do leite de cabras consumidoras de tremoços no fabrico de produtos lácteos pelo mau sabor que lhes poderão transmitir. Porém, no presente trabalho não se registou qualquer sabor amargo nos queijos produzidos e que revelaram possuir quantidades consideráveis de lupinina. O nível médio de detecção no Homem para a esparteína é de 0,00085% , para a lupanina 0,0021% e para a 13-hidroxi-lupanina 0,017% (WINK, 1994). O valor máximo de 0,001% de lupinina encontrado nos queijos 30%-TB é superior ao citado para a esparteína, mas inferior aos referidos para os outros alcalóides, o que faz supor que o limiar de detecção para a lupinina, se deva aproximar mais dos registados na lupanina e 13-hidroxi-lupanina. À excepção dos 7A, os queijos apreciados obtiveram uma classificação de 4 no parâmetro sabor e aroma, conforme o exigido regulamentarmente.

Na classificação final dos queijos sobressai a pontuação muito baixa (8,05) obtida pelos queijos 7A ($P < 0,001$), seguidos dos queijos 6A e pelo queijos 0A ($P < 0,01$). A pontuação total destes diferiu significativamente da dos queijos 15%-TB (1A e 3A), para o mesmo nível de probabilidade. No entanto, neste parâmetro todos os queijos, excepto os 7A, seriam aprovados pelo painel de provadores pois a sua classificação final foi igual ou superior a 14 (Figura 5.16.). Os queijos 30%-TB obtiveram a classificação final mais baixa. Registou-se um coeficiente de correlação de -0,50 ($p < 0,05$) e a equação de regressão $y = 15,59 - 0,44x$ entre os valores da classificação final e a concentração de alcalóides no leite.

Como já foi referido, em alguns dos queijos 0A foi notado pelos elementos do painel um sabor excessivamente amargo e a ranço. Enquanto o primeiro defeito se poderia justificar pela actuação proteolítica de bactérias lácticas o segundo talvez esteja ligado à actividade lipolítica de bactérias psicotrófilas, particularmente *Pseudomonas* sp. (RICHARD e AUCLAIR, 1987). As condições de armazenamento a baixas temperaturas a que se sujeitou o leite poderiam favorecer este tipo de acidentes (MOREIRA, 1986). Na medida em que eles só se observaram nos queijos 0%-TB, talvez os alcalóides presentes no leite e na massa dos restantes queijos tenham exercido uma acção protectora contra esta flora anormal, representada pelos microorganismos psicotrófilos. Não seria ainda de excluir

uma diferente composição lipídica do leite e a sua diferente sensibilidade à oxidação (LE JAOUEN, 1987), talvez induzida pela relativamente elevada quantidade de bagaço de soja fornecida às ovelhas, que não se revelaria por isso o suplemento mais adequado para utilizar na dieta testemunha.

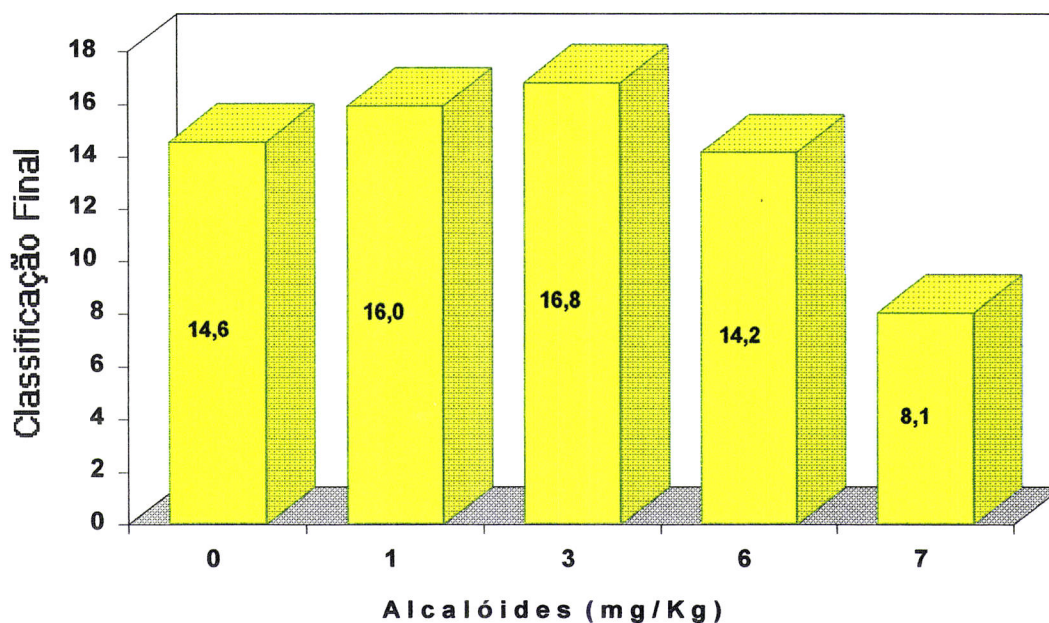


Figura 5.16. Classificação final de Queijo de Serpa elaborado a partir de leite com 5 concentrações crescentes de alcalóides da tremocilha brava.

Excluindo os queijos 0%-TB, constata-se que houve um declínio dos parâmetros sensoriais da qualidade dos queijos dos animais suplementados com 15 e 30% de tremocilha brava. Poderia assim ser posta de parte alguma acção negativa sobre a qualidade do leite, a que a conservação a baixas temperaturas poderia ter conduzido, como seria o caso da oxidação ou a alteração dos equilíbrios salinos. As condições de hermeticidade e obscuridade em que o leite foi armazenado, bem como a rapidez com que foi congelado, também contrariariam esta possibilidade.

No quadro 5.3. apresenta-se uma matriz de correlações entre os parâmetro químicos, microbiológicos e sensoriais dos queijos estudados. Verificou-se uma correlação

significativa (-0,72) entre a porcentagem de tremocilha na dieta e a classificação organoléptica dos queijos dos animais alimentados com 15 e 30% de tremocilha brava. Se os valores das ovelhas 0%-TB forem incluídos obtém-se um valor de r não significativo, o que se deve muito provavelmente às razões já atrás referidas. A ingestão de tremocilha teria igualmente afectado de uma maneira negativa, e altamente significativa, o CM dos queijos, o qual traduz a intensidade da actividade microbiana proteolítica, e o teor em PB do meio. De notar a complementariedade entre este parâmetro e a MGRS, que apresentam coeficientes de correlação semelhantes mas simétricos, o que está muito possivelmente ligado a uma inibição da acidificação com perda de caseína durante o dessoramento e o concomitante aumento da gordura no coágulo. É igualmente relevante a correlação positiva entre a ingestão de tremocilha e a riqueza do queijo em lupinina. Manifestaram-se correlações positivas muito significativas entre as unidades formadoras de colónias de mesófilos detectadas nas pastas e as características sensoriais estudadas, e, por outro lado, uma correlação negativa existente entre a concentração de lupinina no leite e o $\log(u.f.c.)$. Do mesmo modo, revelaram-se significativas e negativas as correlações entre os parâmetros organolépticos e a concentração de lupinina no leite, e de uma maneira superior às correlações entre aqueles parâmetros e os teores em alcalóides totais, o que revela uma maior influência da lupinina sobre a qualidade do queijo. As quantidades deste alcalóide no queijo revelaram-se menos relacionadas com os parâmetros sensoriais do que as concentrações no leite, o que parece apontar para um papel inibidor mais decisivo da lupinina durante o processo inicial da acidificação, concordante com a forte redução da proteína bruta nos queijos 15%-TB e 30%-TB. No que se refere ao teor dos queijos em sal, os valores obtidos apontam para uma forte correlação entre aquele teor e a quantidade de alcalóides existentes no leite (0,886) particularmente a lupinina (0,91). Por outro lado, os valores dos teores em sal no queijo não estão correlacionados significativamente com a pontuação total nem com a concentração microbiana da massa, contrariamente ao que sucede com a quantidade de alcalóides no leite, cuja correlação negativa com os valores daqueles parâmetros é significativa.

Quadro 5.3. Matriz de correlações entre os parâmetros químicos, microbiológicos e sensoriais dos queijos estudados.

VARIÁVEIS	CORRELAÇÕES				
	HRQIMG (%)	MGRRS (%)	PB (%)	CM	NaCl (%)
MGRRS (%)	0,518**	—	—	—	—
PB (%)	-0,611**	-0,682***	—	—	—
CM	-0,241	-0,540*	0,379	—	—
NaCl (%)	0,480*	0,795***	-0,753***	-0,723***	—
Alcalóides no Leite (mg/Kg)	0,203	0,675**	-0,697***	-0,791***	0,886***
Lupinina no Leite (mg/Kg)	0,260	0,771***	-0,737***	-0,757***	0,910***
Lupinina no Queijo (µg/100g)	0,106	0,605**	-0,590**	-0,827***	0,814***
Mesófilos (ufc)	-0,185	-0,480*	0,217	0,100	-0,090
Log (ufc)	-0,136	-0,701***	0,374	0,230	-0,419
Sabor /Aroma	-0,038	-0,621**	0,314	0,207	-0,395
Crosta	0,002	-0,645**	0,388	0,196	-0,356
Forma	0,108	-0,599**	0,355	0,418	-0,420
Pasta	0,117	-0,598**	0,359	0,384	-0,442
Pontuação Total	0,047	-0,659**	0,360	0,294	-0,437
Ingestão de TB (%)	0,359	0,691***	-0,781***	-0,855***	0,927***

Quadro 5.3. Matriz de correlações entre os parâmetros químicos, microbiológicos e sensoriais dos queijos estudados (continuação).

VARIÁVEIS	CORRELAÇÕES				
	Alcalóides no Leite (mg/Kg)	Lupinina no Leite (mg/Kg)	Lupinina no Queijo (µg/Kg)	Mesófilos (u.f.c.)	Mesófilos (log u.f.c.)
MGRRS (%)	—	—	—	—	—
PB (%)	—	—	—	—	—
CM	—	—	—	—	—
NaCl (%)	—	—	—	—	—
Alcalóides no Leite (mg/Kg)	—	—	—	—	—
Lupinina no Leite (mg/Kg)	0,985***	—	—	—	—
Lupinina no Queijo (µg/100g)	0,940***	0,912***	—	—	—
Mesófilos (ufc)	-0,125	-0,248	0,020	—	—
Log (ufc)	-0,383	-0,514*	-0,292	0,853***	—
Sabor / Aroma	-0,381	-0,505*	-0,366	0,622**	0,521*
Crosta	-0,420	-0,543*	-0,393	0,678**	0,624**
Forma	-0,575**	-0,655**	-0,584**	0,568**	0,570**
Pasta	-0,563**	-0,651**	-0,557*	0,625**	0,591**
Pontuação Total	-0,502*	-0,613**	-0,490*	0,603**	0,808***
Ingestão de TB (%)	0,966***	0,946***	0,926***	-0,063	-0,037

Quadro 5.3. Matriz de correlações entre os parâmetros químicos, microbiológicos e sensoriais dos queijos estudados (continuação)

VARIÁVEIS	CORRELAÇÕES					
	Sabor	Crosta	Forma	Pasta	Pontuação Total	Pontuação Total ^a
MGRRS (%)	---	---	---	---	---	---
PB (%)	---	---	---	---	---	---
CM	---	---	---	---	---	---
NaCl (%)	---	---	---	---	---	---
Alcalóides no Leite (mg/Kg)	---	---	---	---	---	---
Lupinina no Leite (mg/Kg)	---	---	---	---	---	---
Lupinina no Queijo (µg/100g)	---	---	---	---	---	---
Mesófilos (ufc)	---	---	---	---	---	---
Log (ufc)	---	---	---	---	---	---
Sabor /Aroma	---	---	---	---	---	---
Crosta	0,853***	---	---	---	---	---
Forma	0,854***	0,898***	---	---	---	---
Pasta	0,901***	0,893***	0,957***	---	---	---
Pontuação Total	0,947***	0,948***	0,953***	0,953***	---	---
Ingestão de TB (%)	-0,295	-0,289	-0,458*	0,442	-0,382	-0,723**

^a Excepto o tratamento 0%-TB.

5.4. Conclusões

Entre as ovelhas que ingeriram tremocilha brava registou-se um decréscimo significativo das qualidades sensoriais dos queijos, directamente proporcional à quantidade de semente ingeridas (15 ou 30%).

Alguns dos queijos que se obtiveram das ovelhas suplementadas com bagaço de soja desenvolveram características sensoriais anormais, embora não suficientes para a sua desclassificação. Os mais elevados coeficientes de maturação destes queijos estão altamente correlacionados com a ausência de alcalóides.

O consumo de tremocilha brava por ovelhas Serra da Estrela provocou um efeito depressor altamente significativo sobre o grau de maturação do queijo, inversamente proporcional à quantidade de semente ingerida.

Os maiores níveis de alcalóides no leite, que ocorreram nos animais que foram suplementados com 30% de tremocilha, originaram queijos com níveis anormalmente baixos de microorganismos caseificantes. Os menores coeficientes de maturação registados nestes queijos devem estar muito provavelmente associados a esta depressão da flora responsável pela acidificação do leite e pela produção da maior parte das enzimas que operam a cura do queijo.

Ao valor de 7 mg de alcalóides (ou 6 mg de lupinina) / Kg de leite, dos animais alimentados com a dose máxima de tremocilha, correspondeu uma queda brusca no valor organoléptico do queijo. Aqueles valores parecem equivaler assim a um limiar a partir do qual a qualidade do queijo seria significativamente afectada.

A acentuada descida na concentração de PB e a significativa subida da MGRS nos queijos das ovelhas alimentadas com tremocilha, deverão resultar de um atraso na acidificação destas coalhadas com perda de caseína na massa e um complementar aumento dos lípidos.

Apesar do teor em sal dos queijos estudados se situar dentro dos limites encontrados na bibliografia para o Queijo de Serpa e outros de fabrico similar, não é de excluir uma influência dos alcalóides na retenção de cloretos na massa do queijo. Um

excesso de sal pode retardar a maturação do queijo, confundindo-se o seu efeito antibiótico com uma possível acção da mesma natureza dos próprios alcalóides. Esta acumulação de cloretos nos queijos provenientes das ovelhas suplementadas com tremocilha brava deveria, por isso, ser estudada mais minuciosamente.

6. Conclusões gerais

Nas nossas condições de sequeiro com solos pobres, ácidos e de textura grosseira, a tremocilha brava assume grande importância para as componentes arbóreas, arvenses e animais dos sistemas de produção agro-pecuária. Enriquece o solo em matéria orgânica e azoto, fornece elevadas quantidades de PB e EM aos ruminantes e, tendo em conta os solos, muitas das vezes esqueléticos, em que vegeta, necessita de poucos cuidados culturais dado ser uma planta autóctone de elevada rusticidade. Os alcalóides produzidos pelo seu metabolismo secundário, longe de constituírem um defeito nestes sistemas de produção, protegem a planta de pragas e da fauna selvagem, actuando como um insecticida natural e enquadrando este cultivo numa agricultura que se pretende cada vez mais respeitadora do ambiente.

Apesar de estarem já estudadas e confirmadas as propriedades anti-microbianas de alguns alcalóides de outras espécies de *Lupinus*, encontrou-se na bibliografia uma grande escassez de trabalhos acerca dos efeitos dos alcalóides da tremocilha brava, quer sobre os microorganismos do rúmen, quer sobre a flora da caseificação. No que respeita a este segundo aspecto, quando a ordenha se prolonga até Maio ou Junho o agostadouro de tremocilha brava pode ajudar o criador a obviar a falta de pastagens, a um baixo custo, tendo em conta que a área de dispersão desta leguminosa no Alentejo coincide com as principais zonas de produção de queijo.

Numa primeira fase do trabalho efectuado, verificou-se que a digestibilidade e a ingestão de dietas, em que a tremocilha brava se usou como suplemento, não diferiram significativamente das de outras dietas isoazotadas, e em que se utilizou como suplemento bagaço de soja ou tremçoço doce vulgar. Tão-pouco se verificou qualquer diferença entre a digestibilidade de cada um destes suplementos. Contrariamente ao que sucede com os cereais, elevadas ingestões de tremoçoços não contribuiriam para um declínio da digestibilidade da fibra, um dos principais componentes da alimentação animal em condições de sequeiro.

Registou-se uma tendência para uma menor ingestão das dietas com tremocilha, embora estatisticamente não significativa, e que poderia estar ligada a um efeito inibidor dos seus alcalóides sobre a actividade microbiana ruminal. O estudo *in vitro* efectuado demonstrou que a esparteína inibe a actividade microbiana ruminal, mas em concentrações que dificilmente deverão ocorrer em condições de campo. Com efeito, não se observou qualquer inibição da actividade microbiana quanto se utilizou, num estudo semelhante, tremocilha brava como substracto.

Pretendeu-se igualmente clarificar o destino dos alcalóides da tremocilha brava em meio ruminal, dada a sua aparente inocuidade para a flora. Apenas o único alcalóide não quinolizidínico presente nesta leguminosa, a gramina, parece sofrer uma forte metabolização pelos microorganismos do rúmen. A sua diferente estrutura química poderá contribuir para esta maior vulnerabilidade. Verificou-se que a concentração de esparteína também diminuiu durante o processo fermentativo, embora de uma maneira menos expressiva, e que os níveis de lupanina sofreram um acréscimo. Este facto, já registado por outros autores, parece indicar que ocorre uma transformação de outro alcalóide, talvez a esparteína, em lupanina. A lupinina, o alcalóide predominante na tremocilha brava utilizada, revelou grande estabilidade face à actividade da flora ruminal *in vitro*.

No estudo seguinte, em que se administrou a ovelhas Serra da Estrela quantidades crescentes de tremocilha na ração, pode considerar-se que se obteve uma confirmação dos resultados obtidos nos trabalhos *in vivo* e *in vitro* anteriormente referidos. Registou-se uma tendência, embora não significativa, para um decréscimo na produção de leite e ingestão de alimento nos animais suplementados com tremocilha, face a um suplemento testemunha constituído por bagaço de soja. O baixo nível produtivo dos animais poderia ter impedido uma manifestação mais explícita de possíveis diferenças provocadas pelos tratamentos. A suplementação com bagaço de soja ou com 15 ou 30% de tremocilha não afectou significativamente a composição química do leite, excepto no que respeita ao seu teor em alcalóides. Encontraram-se alcalóides no leite de todos os animais suplementados com tremocilha, predominantemente lupinina, seguida de quantidades bastante inferiores de

lupanina e esparteína. A ausência de gramina no leite confirma os resultados do estudo *in vitro*, que apontam para a sua metabolização pela flora ruminal. As quantidades de lupinina e lupanina encontradas no leite confirmam igualmente os estudos anteriores e que sugeriam serem moléculas bastante estáveis no rúmen. A presença de quantidades vestigiais de esparteína, no leite, também está de acordo com os resultados do estudo *in vitro*.

O leite obtido foi utilizado na produção de queijo seguindo a tecnologia do Queijo de Serpa. Os resultados das análises químicas, microbiológicas e sensoriais efectuadas aos queijos, permitem supor que dietas em que a quantidade de tremocilha ingerida pelas ovelhas ultrapasse 15 a 30% da MS total, deverão originar acidentes na elaboração do queijo, mediante a inibição da flora caseificante pelos alcalóides presentes no meio. Também não é de excluir uma relação directa entre estas substâncias e uma maior retenção de sal no queijo. Esta relação deveria ser estudada mais pormenorizadamente.

A congelação a que se submeteu o leite de ovelha antes de ir para queijaria, poderia ter afectado os equilíbrios salinos e a estrutura das caseínas e mesmo ter influenciado a flora nele existente e com repercussão no processo de caseificação. Por tudo isto, talvez fosse conveniente aprofundar este estudo recorrendo a uma metodologia que encurtasse o tempo decorrido entre a ordenha e a elaboração do leite, evitando a sua congelação, tal como geralmente se passa em condições de campo.

O presente estudo também poderia ser comparado com outros similares em que se utilizasse a giesta (*Cytisus scoparius* L.), uma leguminosa arbustiva dos nossos solos pobres e ácidos, com altos níveis de esparteína e, em menores quantidades, D-lupanina e hidroxilupanina. Embora empiricamente, suspeita-se que o leite das cabras que consomem giestas fica impróprio para o fabrico de queijo, pelo que convinha averiguar se estes alcalóides quinolizidínicos estariam de facto implicados neste fenómeno.

Sabe-se que a alimentação de pequenos ruminantes com pastagens monoespecíficas retira qualidades sápidas e aromáticas ao leite e também ao queijo. Por outro lado há espécies vegetais cujo consumo afecta negativamente o queijo. Assim, deveriam ser levados a cabo estudos que evidenciassem a contribuição positiva ou negativa das diversas espécies

da nossa flora silvestre para a qualidade dos queijos regionais, uma das grandes riquezas do nosso mundo rural e da nossa cultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, J. M.; CALOURO, M. F. e SOARES, A. M. B., 1982. Tabelas de Valor Alimentar. Forragens Mediterrânicas Cultivadas em Portugal. 1ª contribuição. ISA-UTL.
- ADDA, J.; CZULAK, J.; MOCQUOT, G. e VASSAL, L., 1991. Cheese. In: Meat Science, Milk Science and Technology. World Animal Science. Ed. A. Neimann-Sorensen e D.E. Tribe. Elsevier.p. 373-392.
- ALEXANDER, R. H. e MCGOWAN, M., 1966. The routine determination of *in vitro* digestibility of organic matter in forages - an investigation of the problems associated with continuous large-scale operation. Br. Grassld. Soc., 21: 140-147.
- ALLDEN, W. G. e GEYTENBEEK, P. E., 1984. A comparison of the growth of beef cattle and sheep grazing mature grain legume crops. Animal Production in Australia, 15: 648.
- ALLISON, M. J.; MALOY, S. E. e MATSON, R. R., 1976. Inactivation of *Clostridium botulinum* toxin by ruminal microbes from cattle and sheep. Appl. Environ. Microbiol., 32: 685-688.
- ALONSO, J.L.J., 1984. *Lupinus luteus*. Una espécie de gran enteres agronómico. Agricultura, 628: 914-916.
- AMARAL, O. M. R. P., 1996. Caracterização de Queijo de Serpa Proveniente de Três Genótipos Ovinos. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.
- ANACLETO, M. H. C. e RIBEIRO, J. M. C. R., 1984. Xantina - desidrogenase na avaliação qualitativa da proteína de *Lupinus luteus*. Estação Zootécnica Nacional, policopiado.
- ANDERS, R. F. e JAGO, G. R., 1970. The effect of fatty acids on the metabolism of pyruvate in lactic acid streptococci. J. Dairy Res., 37: 445.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (A O A C), 1990. Official Methods of Analysis. 23ª Ed., Washington.
- ARAGÓN, A.G., 1987. Altramuz, Importancia, potencial y mejora. Pastagens e Forragens, 8(2):1-9.
- ARNOLD, G. M.; HILL, J. L.; MALLER, R. A.; WALLACE, S.R.; CARBO, B.; NAIRN, M.; WOOD, P. M.; WEELDENBERG, J., 1976. Comparison of lupin varieties for nutritive value as dry standing feed for weaner sheep and for incidence of lupinosis. Aust. J. Agric. Res., 27: 423-435.
- ARNOLD, G. W. e WALLACE, S. R., 1977. The comparative nutritive value for weaner sheep of stubble and grain of pea, vetch and lupin crops. Aust. J. Agric. Res., 28: 143-154.
- AZEVEDO, A. L. e CARY, F. C., 1989. Problemas e potencialidades da agricultura

- portuguesa, com ênfase especial para o Alentejo: cooperação luso - alemã entre universidades no domínio da investigação agrária aplicada. Resultados dos Projectos de Investigação Agrária. Vila Real.
- BARILLET, F. e BOCQUIER, F., 1993. Le contexte de production des ovins laitiers en France: principaux objectifs de recherche-développement et conditions de leur mise en oeuvre. INRA Prod. Anim., 6(1): 17-24.
- BATTERHAM, E. S., 1979. *Lupinus albus* cv. Ultra and *Lupinus angustifolius* cv. Unicrop as protein concentrates for growing pigs. Aust. J. Agric. Res., 30: 369-375.
- BAVOUX, F. e FRANCOUAL, C., 1980. Médicaments et allaitement maternel. Pharmacologie et Thérapeutique, 30 (35): 2335-2338.
- BAYOURTHE, C.; KIBELOLAUD, A.; VERNAY, M. e MONCOULON, R., 1994. *In situ* evaluation of ruminal and intestinal nitrogen disappearance of toasted or extruded white lupine seeds. Proceedings of the 7th International Lupin Conference, Évora, p. 452-455.
- BICK, I. R. C., 1985. Alkaloids. In: The Chemistry of Natural Products. Ed. R. H. Thompson. Blackie, Glasgow and London. p. 298-346.
- BENCHAAR, C.; BAYOURTHE, C.; MONCOULON, R. e VERNAY, M., 1991. Digestion ruminale et absorption intestinale des protéines du lupin extrudé chez la vache laitière. Rep. Nutr. Dev., 31: 655-665.
- BIRCK, Y., 1994. Anti-nutritional factors (ANF's) in lupins and in other legume seeds. Pros. and cons.. Proceedings of the 7th International Lupin Conference, Évora, p. 424-429.
- BOCQUIER, F. e CAJA, G., 1993. Recent advances on nutrition and feeding of dairy sheep. Proceedings of the 3th Symposium on Machine Milking in Small Ruminants, Budapest, May 1993. p. 1-28.
- BOLING, J.A.; BUSH, L. P.; BUCKNER, R.C.; PENDLUM, L.C.; BURRUS P. B.; YATES, S. G., ROGOVIN, S. P. e TOOKEY, H.L., 1975. Nutrient digestibility and metabolism in lambs fed added perloline. J. Anim. Sci., 40: 972.
- BOURDON, D.; PEREZ, J.M. e CALMES, R., 1980. Lupin in the feeding of pigs. Energy and protein value and mode of utilization (resumo). Nut. Abs. Rev., 51(7): 497.
- BRIEN, F.D.; BAXTER, R.W.; FINDLAY, J.K.; CUMMING, I.A., 1976. Effect of lupin grain supplementation on ovulation rate and plasma follicle stimulating hormone (FSH) concentration in maiden and mature Merino ewes. Proceedings of the Australian Society of Animal Production, 11: 237-240.
- BRILLOUET, J. M., 1984. Carbohydrates of lupin seed. Proceedings of the 3th International Lupin Conference, La Rochelle: 365 - 383.
- BROQUA, B.; DRILLEAU, L.; GRANIER, J.P.; HUGUET, L.; SIMIANE, M. DE. Utilisation des graines de lupin doux par les chèvres laitières. La Chèvre, 140: 36-43.
- BROQUA, C. e EMILE, J., 1990. Du soja au lupin. La Chèvre, 178: 24 -27.

- BUSH, L. P.; BOLING, J. A.; ALLEN, G. e BUCKNER, R. C., 1972. Inhibitory effects of perloine to rumen fermentation *in vitro*. Crop Sci., 12: 277-279.
- BURACZEWSKA, L.; PASTUSZEWSKA, B.; SMULIKOWSKA, S. e WASILEWKO, J., 1993. Response of pigs, rats and chickens to dietary level of alkaloids of different lupin species. Proceedings of the Second International Lupin Conference, EAAP publication n°70, p. 371-376.
- CABRAL, M.T.; LOPES, F.; SARDINHA, R. A., 1993. Determinação das causas de morte do sobreiro nos concelhos de Santiago do Cacém, Grândola e Sines. Relatório síntese. Silva Lusitana 1(1): 7-24.
- CAMPOS - ANDRADA, M. P., SOUSA, R. B., BARATA, A. e O'NEIL, J.F., 1994. Characterization of a new *Lupinus luteus* L. cultivar non shattering, sweet and resistant to dry conditions. Proceedings of the 7th International Lupin Conference, Évora. p. 131-134.
- CARROUÉE, B.; MUEL, F.; PEYRONNET, C.; GAILLARD, B.; GROSJEAN, F.; WEISS, P., 1992. Utilisation du Lupin Blanc Doux en Alimentation Animale. Collection UNIP-ITCF.
- CARLSON, J. R. e BREEZE, R. G., 1984. Ruminant metabolism of plant toxins with emphasis on indolic compounds. J. Anim. Sci., 58 (4): 1040-1048.
- CARVALHO, I. A., 1989. Controlo Físico-Químico e Microbiológico de Leite e Queijo de Ovelha, Lisboa, DTIA N° 113 Relatórios Científicos e Técnicos - 2, LNETI.
- CASTAING, J.; COUDURE, R.; FEKETE, J.; GROSJEAN, F. e LEUILLET, M., 1982. Utilisation de la graine de lupin doux Kalina chez le porcelet sevré et le porc en croissance-finition. Journées Recherches Porcine en France, 14: 301-317.
- CAZES, J.P., 1984. Utilisation des graines de protéagineux par les ovins. Journée nationale sur les protéagineux. Ed. ITCF. p. 258-267.
- CENTENO, C.P.; YUSTE, P.; RUBIO, L. A.; TREVIÑO, J. e BRENES, A., 1989. Efecto de la inclusion de altramuz (*Lupinus albus*) y flavomicina en dietas para pollos. Archivos de Zootecnia, 39 (143): 15 - 24.
- CHASNOFF, I. J.; LEWIS, D. E. e SQUIRES, L., 1987. Cocaine intoxication in a breast - fed infant. Pediatrics, 80 (6): 836-838.
- CHEEKE, P. R. e KELLY, J D., 1989. Metabolism, toxicity and nutritional implications of quinolizidine (lupin) alkaloids. Proceedings of the First International Workshop on Anti- nutritional Factors in Legume Seeds, Wageningen. p. 189-201.
- CHESSON, A.; STEWART, C. S. e WALLACE, R.J., 1982. Influence of plant phenolic acids on growth and cellulolytic activity of rumen bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 44: 597 - 603.
- CHOISY, C.; DESMAZEAUD, M.; GRIPON, J.C.; LAMBERET, G.; LENOIR, J. e TOURNEUR, C., 1987. Les Phenomenes Microbiologiques et Enzymatiques et la Biochimie de l'Affinage. In: Le Fromage. 2ª Ed. Coord. A. Eck. Ed. Diffusion Lavoisier, Paris. p. 62-100.

- CORREIA, A. A. D., 1981. Bioquímica nos Solos, nas Pastagens e Forragens. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- CORZO, F. C., 1986. El Altramuz Amarillo ("Tramusilla"). Su Cultivo y aprovechamiento en el Andevalo Onubense. Serie Monografias, N°3. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca.
- COSTA, A.F., 1993. Farmacognosia, II vol., 4ª ed.. Fundação Calouste Gulbenkian. Serviços de Educação.
- COWLING, W. A.; ALLEN, J. G. e WOOD, P M., 1988. Resistance to phomopsis stem blight reduces the lupinosis toxicity of narrow-leafed lupin stems. Aust. J. Exp. Agric., 28: 195-202.
- CRAIG, A. M.; LATHAM, C. J.; BLYTHE, L. L.; SCHMOTZER, W.B.; O'CONNOR, O. A., 1992. Metabolism of toxic pyrrolizidine alkaloids from tansy ragwort (*Senecio jacobea*) in ovine ruminal fluid under anaerobic conditions. Applied and Environmental Microbiology, 58(9): 2730-2736.
- CRESPO, D. G., 1975. Pastagens semeadas temporárias e permanentes de sequeiro. In: Factores Elementares do Sequeiro do Sul. Ministério da Agricultura e Pescas.
- CROKER, K. P.; ALLEN, J. G.; PETTERSON, D. S.; MASTERS, H.G. e FRAYNE, R. F., 1979. Utilization of lupin stubbles by merino sheep. Studies of animal performance, rates and time of stocking, lupinosis, liver cooper and zinc and circulating plasma enzymes. Aust. J. Agric. Res., 30: 551-554.
- CRUZ, A.A., 1948. Sobre o queijo de Serpa. Boletim Pecuário, XVI (1): 5-16.
- CULVENOR, C.C., 1973. Alkaloids. In: Chemistry and Biochemistry of herbage, vol. I.Ed. Buttlen, G. W. e Bailey, R.W.. Academic Press, p. 375-419.
- CULVENOR, C.C.; BECK, A.B.; CLARKE, M.; COCKRUM, P. A.; EDGAR, J.A.; FRAHM, J.L.; JAGO, M.V.; LANIGAN, G.W.; PAYNE, A.L.; PETTERSON, J. E.; PETTERSON, D. S.; SMITH, L. W. e WHITE, R.R., 1977. Isolation of toxic metabolites of *Phomopsis leptostromiformis* responsible for lupinosis. Aust. J. Biol. Sci., 30: 269-277.
- DAVIS, G.V. e OFFUTT, M.S., 1975. Nutritive value of sweet white lupine for ruminants. Ark. Agric. Exp. Sta. Bul, 792.
- DAVIS, A. M. e STOUT, D. M., 1986. Anagryne in western american lupines. J. Range Manag., 39(1): 29-30.
- DAWSON, K. A.; ALLISON, M. J. e HARTMAN, P.A., 1980. Isolation and some characteristics of anaerobic oxalate-degrading bacteria from the rumen. Appl. Environ. Microbiol., 30: 833-839.
- DAWSON, K. A. e ALLISON, M. J., 1988. Digestive disorders and nutritional toxicity. In: The Rumen Microbial Ecosystem. Ed.P. N. Hobson, Elsevier Applied Science. p. 445-460.
- DE HARO, A., 1983. La calidad nutritiva de las leguminosas - grano y su control genético.

In: Leguminosas de Grano. Ed. Cubero, J.I. e Moreno, M.T., Mundi-Prensa. p. 211-247.

- DICKINSON, J. O.; COOKE, M.P.; KING, R.R. e MOHAMED, P.A., 1976. Milk transfer of pyrrolizidine alkaloids in cattle. J. Amer. Vet. Med. Assoc., 169 (11): 1192-1196.
- DIRECÇÃO GERAL DA PECUÁRIA (DGP), 1987. Recursos Genéticos. Raças Autóctones - Espécie Ovina e Caprina.
- DIXON, R. M. e HOSKING, B. J., 1992. Nutritional value of grain legumes for ruminants. Nut. Res. Rev., 5: 19-43.
- DUMONT, J. P.; ADDA, J. e ROUSSEAUX, P., 1981. Example of flavour variation within the same type of cheese: Gruyère de Comté. J. Lebensm.-Wiss. Technol., 4: 198.
- EDELSTEN, D., 1989. Composition of milk. In: Meat Science, Milk Science and Technology. Ed. A. Neimann - Sorensen, D.E. Tribe, H. R. Cross e A. J. Overby. World Animal Science B. Disciplinary Approach. Elsevier. p. 175-199.
- ÉMILE, J. C.; HUGUET, L.; HODEN, A.; MALTERRE, C. e MICOL, D., 1988. Sweet lupin seeds for dairy cows and young bulls feedig. Proceedings of the 5 th International Conference, Poznan, p. 383-395.
- ÉMILE, J. C., HUYGHE, C. e HUGUET, L., 1991. Utilisation du lupin blanc doux pour l'alimentation des ruminants: résultats et perspectives. Ann. Zootech., 40: 31-44.
- ERICKSON, J. P., 1985. Lupins show potential as protein source for poultry. Feedstuffs, 11/2: 21.
- FERRAZ, J.F.P., 1993. Encontrada solução para o declínio e morte do sobreiro ? Ao Serviço da Lavoura, 199: 5-7.
- FIORITO, I. M.; BUNTING, L. D.; DAVENPORT, G. M. e BOLING, J. A. 1991. Metabolic and endocrine responses of lambs fed *Acremonium coenophialum*-infected or noninfected tall fescue hay at equivalent intake. J. Anim. Sci., 69: 2108.
- FLETCHER, I. C., 1981. Effects of energy and protein intake on ovulation rate associated with the feeding of lupin grain to merino ewes. Aust. J. Agric. Res., 32:79-87.
- FOOT, J. Z.; MORGAN, J.H. L.; EGAN, J. K.; McINTYRE, J. S., 1980. Grain and protein supplements for grazing sheep and cattle. Animal Prod. Australia, 16: 41.
- FOURCAND, D., 1992. Des yaourts de chèvres, pourquoi pas? La Chèvre, 185: 19-21.
- FRANK, M.; WECKMAN, T.J.; WOOD, T.; WOODS, W. E.; TAI, C. L.; CHANG, S.L.; EWING, A.; BLAKE, J. W.; TOBIN, T., 1990. Equine Vet. J., 22(6): 437-441.
- FURTADO, M. M., 1990. A Arte e a Ciência do Queijo. Publicações Globo. Rural, S.Paulo, Brasil.
- GARDNER, M. R. e Mc DONALD, G. K., 1988. Responses by wheat to lupin, soil amelioration and fertiliser treatments in a solodised solonetz soil. Aust. J. Exp. Agric., 28: 607-615.

- GIGIER, S. e SAUVANT, D., 1984. Les problemes poser par la mesure de la digestibilité d'un aliment concentré. In "La prevision de la valeur énergétique des aliments concentres et des sous-produits assimilés. Cycle approfondi d'alimentation animale, 31/12/84. Institut National Agronomique Paris-Grignon - Chaire de Zootechnie. p. 1-30.
- GIOVANNI, R., 1981. Utilisation du pois et du lupin en remplacement du tarteau de soja par l'agneau en croissance et à l'engraissement (resumo). Nut. Abst. Rev., 52 (8): 480.
- GLADSTONES, J. S., 1988. More important problems in *Lupinus angustifolius* breeding. Proceedings of the 5th International Lupin Conference, Poznan. p. 15-24.
- GOBIN, F., 1995. Difficultés de caillage. Maîtriser l'acidification. La Chèvre, 206: 39-40.
- GODFREY, N. W.; MERCY, A. R.; EMMS, Y. e PAYNE, H., 1985. Tolerance of growing pigs to lupin alkaloids (resumo). Herbage Abs., 56(9): 619.
- GOERING, H.K. e VAN SOEST, P.J., 1970. Forage Fiber Analysis. USDA Agricultural Handbook, nº 379.
- GOMEZ, K. A. e GOMEZ, A. A., 1984. Statistical Procedures for Agricultural Research. 2ª Ed. Ed. John Wiley & Sons. Wiley-Interscience Publication.
- GONZÁLEZ, V.; FERNÁNDEZ, E. e FRUTOS, M.V.H., 1984. Sustitución de la torta de soja y de girasol por harina de altramuz dulce (*Lupinus luteus* L. var. Multolupa) en raciones para cebo intensivo de corderos. Ensayos preliminares. A. Y. M. A., 25 (3), 161-166.
- GROSJEAN, F., 1984. Conditions de d'incorporation du lupin blanc doux dans les aliments pour porcs charcutiers. Proceedings of the IIIrd International Lupin Conference, La Rochelle, France: 635-636.
- GUDMUNDSSON, Ó e RUNOLFSSON, S., 1986. Autumn grazing of finishing lambs on annual lupine under sub-arctic conditions. Proceedings of the 37th Annual Meeting of the EAAP., 397.
- GUDMUNDSSON, O.; THORSSON, J. e THORHALLSDOTTIR, A.G., 1992. Sheep grazing on lupine under humid northern conditions. Proceedings of 1st Circumpolar Agriculture Conference, Yuron, Canada, p. 17-18.
- GUDMUNDSSON, O. e THORSSON, J., 1994. Grazing sheep on lupin (*Lupinus nootkatensis*) in cold climatic regions. Proceedings of the 7 th International Lupin Conference, Évora. p. 459-461.
- GUERRERO, A., 1983. El cultivo de las leguminosas de grano. In: "Leguminosas de grano". Ed. J. I. Cubero e M.T. Moreno, Ediciones Mundi-Prensa, p. 121-174.
- GUESSOUS, F., 1990. Caracterisation des ressources agricoles mediterraneenes. Cours de Master en Production Animale. Estação Zootécnica Nacional.
- GUILLAUME, J.; CHENIEUX, J. C. e RIDEAU, M., 1979. Feeding value of *Lupinus albus* L., in chicken diets (with emphasis on the role of alkaloids). Nut. Abst. Rev., 50(6): 289.

- GUILLAUME, B.; OTTERBY, D. E.; LINN, J. G. e STERN, M. D., 1987. Comparison of sweet white lupin seeds with soybean meal as a protein supplement for lactating dairy cows. J. Dairy Sci., 70: 2339-2348.
- GULEWICZ, K.; PERETIATKOWICZ, M; BRATEK- WIEWIÓROWSKA, M.D. e WIEWIÓROWSKI, M., 1994. Bitter Lupin seeds and straw as raw materials in ecological agriculture. Proceedings of the 7 th International Lupin Conference, Évora. p. 312-332.
- GUSTAFSSON, A. H. e PALMQUIST, D. L., 1993. Diurnal variation of rumen ammonia, serum urea, and milk urea in dairy cows at high and low yields. J. Dairy Sci., 76: 475-484.
- HALE, O.M. e MILLER, J. D., 1985. Effects of either sweet or semi-sweet blue lupine on performance of swine. J. Anim. Sci., 60(4): 989-997.
- HANNAH, S. M.; PATERSON, J. A.; WILLIAMS, J.E.; KERLEY, M. S. e MINER, J. L., 1990. Effects of increasing dietary levels of endophyte - infected tall fescue seed on diet digestibility and ruminal kinetics in sheep. J. Anim. Sci., 68: 1693.
- HARDY, J., 1987. L'activité de l'eau et le salage des fromages. In: Le Fromage. 2° ed.. Coord. A. Eck. Diffusion Lavoisier, Paris. p. 37-61.
- HARFOOT, C. G. e HAZLEWOOD, G. P., 1988. Lipid Metabolism in the Rumen. In: The Rumen Microbial Ecosystem. Ed. P.N. Hobson. Elsevier Applied Science.
- HARTMANN, T., 1988. Secondary Metabolism of Lupins: Biosynthesis, translocation and accumulation of the quinolizidine alkaloids. Proceedings of the 5 th International Lupin Conference, Poznan. p. 64-78.
- HAWTHORNE, W. A. e FROMM, G. M., 1977. Effect of hay plus crushed or whole lupin grain on the growth and carcass fat cover of heifers and lambs (resumo). Nut. Abs. Rev., 47(12): 893.
- HAYWOOD, P. E. e CHEM, C., 1978. The detection and identification of lupanine in horse urine. Irish Vet. J., 32: 11.
- HEMKEN, R. W.; JACKSON Jr., J. A. e BOLING, J. A., 1984. Toxic factors in tall fescue. J. Anim. Sci., 58(4): 1011-1015.
- HENDERSSON, C.W.L., 1989. Lupin as a biological plough: evidence for, and effects on wheat growth and yield. Aust. J. Exp. Agric., 29: 99-102.
- HERBERT, D.; PHILIPS, P. J. e STRANGE, R. E., 1971. Chemical analysis of microbial cells. In: Methods in Microbiology. Ed. Norris e Ribbons, vol 5B, 210.
- HILL, G.D., 1977. The composition and nutritive value of lupin feed. Nutrition Abstract and Reviews, 47(8): 511-529.
- HILL, G.D., 1986. Recent Developments in the use of lupins in animal and human nutrition. Proceedings of the 4 th International Lupin Conference: 40-63.
- HILL, G. D., 1990. The utilization of lupins in animal nutrition. Proceedings of the 6 th

- International Lupin Conference, Temuco, p. 68-91.
- HILL, G. D., KITESSA, S. M., NICOL, A. M., 1993. The acceptability of Russel lupins to sheep. Proceedings of the 7th International Lupin Conference, Évora: 462-465.
- HILL, G. D. e PASTUSZEWSKA, B., 1993. Lupin alkaloids and their role in animal nutrition. Proceedings of the Second International Workshop on Anti-nutritional Factors in Legume Seeds. EAAP publication n°70, p. 343-362.
- HILL, G. D., 1994. The potential of perennial lupins for grazing. Proceedings of the 7th International Lupin Conference, Évora. p. 435-443.
- HUGUET, L.; HODEN, A.; MALTERRE, C.; GEAY, Y.; MICOL, D.; BERTIN, G. e MOURGUET, A., 1983. Utilisation des graines de lupin doux par les vaches laitières et les taurillons (resumo). Dairy Sci. Abs., 46 (10): 739.
- HULT, K.; TEILING, A. e GATENBECK, S., 1976. Degradation of ochratoxin A by a ruminant. Appl. Environ. Microbiol., 32: 443-444.
- HUNGATE, R. E., 1966. The Rumen and Its Microbes. Academic Press.
- HYND, 1986. Grain legumes in animal production systems in South Australia. Proceedings of the Australian Society Of Animal Production, 16: 26.
- INRA, 1981. Alimentacion de los rumiantes. Ed. INRA, Versailles.
- JAMES, L.F.; STREET, J. C. e BUTCHER, J.E., 1967. *In vitro* degradation of oxalate and of cellulose by rumen ingesta from sheep fed *Halogeton glomeratus*. J. Anim. Sci., 26: 1438-1444.
- JÉCSAI, J.; SZELÉNYI-GALÁNTAI, M. e JUHÁSZ, B., 1986. Antinutritive effect of different lupin species on the protein metabolism of rats (resumo). Nut. Abs. Rev., 57 (4): 250.
- JOHNSON, J. C.; MILLER, J. D. e BEDELL, D. M., 1986. Tifwhite-78 lupine seed as a feedstuff for cattle. J. Dairy Sci., 69: 142-147.
- JONES, R.J. e MEGARRITY, R.G., 1983. Comparative toxicity responses of goats fed on *Leucaena leucocephala* in Australia and Hawaii. Aust. J. Agric. Res., 34: 781-790.
- JONES, R. T.; DRUMMOND, G. R.; CHATHAM, R. O., 1981. *Heliotropium europaeum* poisoning of pigs. Aust. Vet. J., 57 (8): 396.
- KAFETZIS, D. A.; SIAFAS, C. A.; GEORGAKOPOULOS, P. A. e PAPANATOS, C. J., 1981. Passage of cephalosporins and amoxicillin into the breast milk. Acta Paediatr. Scand., 70: 285-288.
- KAUFMANN, W., 1982. Variation in der Zusammensetzung des Rohstoffes Milch unter besonderer Berücksichtigung des Harnstoffgehaltes. Milchwissenschaft, 37:6-9.
- KAY, D. E., 1979. Legumbres Alimenticios. Editorial Acribia.
- KEELER, R. F., 1984. Teratogens in plants. J. Anim. Sci., 58 (4): 1029-1039.
- KENNEY, P.A., 1980a. Intake and production of lambs fed rations of oats with varying amounts

- of lupins. Anim. Prod. Aust., 13: 253-256.
- KENNEY, P.A., 1980b. Use of cereal-lupin grain mixtures in drought feeds for lambing ewes. Anim. Prod. Aust., 13: 473.
- KENNEY, P.A., 1981. Production by wethers fed oats, wheat and lupins, with dry annual pasture in north-eastern Victoria. Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb., 21 (112): 480-484.
- KENNEY, P. A. e ROBERTS, G.B., 1987. Productivity of ewes grazing lupin stubbles at mating in north-eastern Victoria. Aust. J. Exp. Agric., 27: 619-624.
- KNIGHT, T.W.; OLDHAM, C.M. e LINDSAY, D.R., 1975. Studies in ovine infertility in agricultural regions in Western Australia: the influence of a supplement of lupin (*Lupinus angustifolius* cv. Uniwhite) at joining on the reproductive performance of ewes. Aust. J. Agric. Res., 26: 567-575.
- KNIGHT, T.W., 1980. Effects of diet and liveweight on ovulation rates in Romney ewes. Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production, 40: 38-42.
- KRAUER, B, 1983. Les médicaments dans le lait. Médecine et Hygiène, 1509.
- KUNG Jr., L.; MACIOROWSKI, K.; POWELL, K. M.; WEIDNER, S. e ELEY, C. L., 1991. Lupin as a protein supplement for growing lambs. J. Anim. Sci., 69: 3398-3405.
- KYBELOLAUD, A. R.; VERNAY, M.; BAYOURTHE, C.; MONCOULON, R. e CROS, P., 1991. Estimation *in situ* chez le ruminant de la valeur azotée du lupin en fonction de la qualité du broyage et de la taille des particules. Ann. Zootech., 40: 247-257.
- LACASSAGNE, L., 1984. Valeur nutritive du lupin doux en alimentation animale. Actes du 3^{ème} Congrès International du Lupin, La Rochelle, p. 422-452.
- LACASSAGNE, L., 1988. Alimentation des volailles: substitus au torteau de soja. INRA Prod. Anim., 1(1): 47-57.
- LAI, P.; PISANU, S. e DELITALA, L.F., 1983. Antimicrobial activity of milk from sheep fed *Thymus herba barona* Loisel. Latte, 8: 442.
- LANÇA, A. J. C., 1987. Levantamento do Valor Nutritivo das Forragens Conservadas Produzidas na Região Sul do País - 2^a Contribuição. Trabalho de fim de curso. Universidade de Évora.
- LANÇA, A. J. C., 1992. Estudo do Valor alimentar de um Agostadouro de Tremocilha (*Lupinus luteus* L.), em Ovinos Merino Branco. Tese de mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa.
- LE JAOUEN, 1987. Le Report du Caille. In: Le Fromage, 2^o ed. Coord.A. Eck. Ed. Diffusion Lavoisier, Paris. p. 249-258.
- LLOYD, C.E. e DAVIES, H.L., 1992. Effect of supplementing sheep with oat grain on their intake, digestion, and nitrogen balance when fed chopped carpet grass (*Axonopus affinis* Chase) hay. Aust. J. Exp. Agric., 32: 163-165.
- LOVKOVA, M. Y.; BUZUK, G.N. e KUZ'MICHEVA, N. A., 1984. Major and trace elements and accumulation of quinoline alkaloids (resumo). Herbage Abs., 55(2): 373.

- MACEDO, A.C.; MALCATA, F.X. e OLIVEIRA, J.C., 1993. The technology, chemistry, and microbiology of Serra Cheese: a review. J. Dairy Sci., 76: 1725-1739.
- MADRUGA, M.G.S.S. e BORBA, A.E.S., 1994. Feeding value of lupin (*Lupinus albus*). Proceedings of the 7th International Lupin Conference, Évora. p. 466-467.
- MARTINS, A.P.L.; VASCONCELOS, M.M.P. e CARREIRA, D.F.C., 1992. Caracterização do leite de ovelha da região de Azeitão. Colectânea da Sociedade Portuguesa de Ovinotecnia e Caprinotecnia, 3 (1): 85-98.
- MASSON, C., 1981. Utilisation des graines protéagineuses dans l'alimentation de la chèvre en début de lactation. Ann. Zootech., 30(4): 435-441.
- MAY, M.G., OTTERBY, D.E., LINN, J.G. e HANSEN, W.P., 1993. Lupins (*Lupinus albus*) as a protein supplement for lactating Holstein dairy cows. J. Dairy Sci., 76: 2682-2691.
- MBWILE; R. P. e WIKTORSSON, H., 1982. Fodder supply to dairy cows during dry season in Tanzania: comparative evaluation of three silages and lupin green forage. Journal of Agricultural Science Cambridge, 99: 651-658.
- McDONALD, P.; EDWARDS, R. A. e GREENHALGH, J. F. D., 1986. Nutricion Animal. 3ª Ed. Ed. Acribia.
- MEEKER, J. E. e KILGORE, W. W., 1987. Identification and quantification of the alkaloids of *Lupinus latifolius*. J. Agric. Food Chem., 35: 431-433.
- MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD (MAFF), 1975. Bulletin 33. Energy Allowances and Feeding Systems for Ruminants. The Hillingdon Press, Uxbridge, 79 pp.
- MOGENSEN, G., 1991. Cultured Milk Products. In: Meat Science, Milk Science and Technology. World Animal Science. Ed. A. Neimann-Sorensen e D.E. Tribe. Elsevier. p. 289-308.
- MOINET, M.L., 1997. L'ensilage réhabilité ? Scienc & Vie, 963: 24.
- MOLINA, E.; SANZ, R.; BOZA, J. e AGUILERA, J., 1983. Utilizacion de la semilla de altramuz blanco (*Lupinus albus* cv. Multulupa) en dietas para pollos en crecimiento, como sustitutivo de la torta de soja. Estudio de su valor energetico. Archivos de Zootecnia, 32(124): 295.
- MONIELO, G.; RICHARDSON, A. J. e STEWART, C.S., s.d.. Effects of the plant metabolites saponin, coumarin and sparteine on attachment, cellulolysis and fermentation of glucose by the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* Strain RE1. Rowet Research Inst., Aberdeen, UK.
- MOREIRA, M., 1986. Problemas da Refrigeração do Leite no Sector da Produção de Queijo e da Saúde Pública. In: Problemática da Produção de Queijos de Ovelha e Cabra. Filagro, 11-12 Abril de 1986. DGP-MAPA.
- MOZEJKO-TOCZKO, M., 1960. Rozklad lupaniny przez *Pseudomonas lupanini*. Acta Micro. Polonica, 9: 157-171.
- MUKIZIRA, E. A.; PHILLIP, L. E. e MITARU, B. N., 1995. The effect of feeding diets

- containing intact or partially detoxified lupin on voluntary intake and milk production by Friesian dairy cows. Anim. Sci., 60: 169-175.
- MUINDI, P. J. e RUNDGREN, M., 1981. Investigations on the protein quality and alkaloid content of *Lupinus albus* L. cv. Kalina grown in Tanzania. Nut. Reports Int., 23 (3): 391-399.
- MURRAY, P. J. e ROWE, J. B., 1984. A comparison of lupin and barley grain as supplementary feeds. Proceedings of the Australian Society of Animal Production, 15: 724.
- MUZQUIZ, M.; BOUTHELIER, V.; BURBANO, C.; GUILLEN, A. M.; ASER, C.G.; MARIN, A. R., 1982. Resultados analíticos del contenido en grasa, proteína, fibra e alcaloides de diversas espécies e variedades del género *Lupinus* L.. Proceedings of the Second International Lupin Conference, Torremolinos: 173-181.
- MUZQUIZ, M., 1992. Nutritive and anti-nutritive substances in lupins. In: *Lupinus mutabilis* : its adaptation and production under European pedoclimatic conditions. Ed. Commission of the European Communities, Report EUR 14102 EN, p.11-45.
- NATIVIDADE, J.V., 1950. Subercultura. Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas, Lisboa.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC), 1995. Nutrient Requirement of Sheep. National Academy of Sciences, Washington DC.
- NELSON, P. e DELANE, R., 1990. Producing Lupins in Western Australia. Western Australia Department of Agriculture, Bulletin 4179.
- NORMA INTERNACIONAL FIL-IDF 4:1958. Determination of dry matter in cheese and processes cheese.
- NORMA PORTUGUESA NP-2015(1983) - Queijos. Determinação do teor de matéria gorda. Técnica de Van Gulik. Processo corrente.
- OH, H. K.; JONES, M. B. e LONGHURST, W. M., 1968. Comparison of rumen microbial inhibition resulting from various essential oils isolated from relative unpalatable plant species. Appl. Microbiol., 16: 39-44.
- OHNHAUS, E.E.; McMANUS, M. E.; SCHWARZ, D.M. e THORGEIRSSON, S. S., 1985. Kinetics of sparteine metabolism in rat and rabbit liver microsomes. Biochem. Pharm., 34: 439-440.
- OLTNER, R. e WIKTORSSON, H., 1983. Urea concentrations in milk and blood as influenced by feeding varying amounts of protein and energy to dairy cows. Livestock Prod. Sci., 10: 457-467.
- ORIVE, R. e TEMPRANO, F., 1983. Simbiosis rhizobium - leguminosa. In: "Leguminosas de Grano". Ed. J. I. Cubero e M.T. Moreno, Ediciones Mundi-Prensa, p. 69-94.
- PALFII, F. YU.; TYCHKA, B.D.; KOTLYAROV, A.I.; KOTSYUMBAS, I.; KOTSYUMBAS, I. G., 1983. Morphologico-functional state of the liver and kidney of young bulls given a meal from perennial alkaloid - containing lupin (resumo). Nut. Abs. Rev., 55 (8): 442.

- PANTER, K. E. e KEELER, R.F., 1990. Conium, lupinus, and nicotiana alkaloids: fetal effects and potential for residues in milk. Veterinary and Human Toxicology, 32 Supp. 1990: 89-94.
- PAPADOYANNIS, I. N. e VON BAER, D., 1993. Analytical techniques used for alkaloid analysis in legume seeds. Proceedings of the Second International Workshop on Anti-nutritional Factors in Legume Seeds. EAAP publication n° 70, p. 131-145.
- PARDO, E.M. e GARCIA, C.R., 1984. Praderas e Forrajes. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- PATERSON, J.; FORCHERIO, C.; LARSON, B.; SAMFORD, M. e KERLEY, M., 1995. The effects of fescue toxicosis on beef cattle productivity. J. Anim. Sci., 73: 889-898.
- PEREIRA, M.; BELO, C.C. e RIBEIRO, J.F., 1996. Estudo da produção de leite em pastagens de sequeiro. Estação Zootécnica Nacional-Departamento de Ovinotecnia.
- PINTO, P. A., 1994. The role of *Lupinus luteus* in a portuguese environment friendly agroforestry system. Proceedings of the 7th International Lupin Conference, p. 290-294.
- PORTER, J. K.; STUEDEMANN, J. A.; THOMPSON Jr., F. N. e LIPHAM, L.P., 1990. Neuroendocrine measurements in steers grazed on endophyte-infected fescue. J. Anim. Sci., 68: 3285.
- PORTUGAL, A. V., 1989. Intensive beef production. Ruminant Production in the Dry Subtropics: Constraints and Potentials. EAAP, publi. n°38. Pudoc Wageningen.
- POTKANSKY, A; FRANKIEWICZ, A.; KRAJNA, J. e GULEWICZ, K, 1993. Effect of application of partly debittered blue lupin seed on rearing results of piglets. Boletín Informativo del Lupino, 16: 13 - 19. Ed. Secretaria General de la Asociacion Internacional del Lupino, Córdoba.
- PRESTON, T. R. e LENG, R. A., 1987. Matching Ruminant Production Systems with Available Resources in the Tropics and Sub-Tropics. Penambule Books; Armidale.
- PRIDDIS, C. R., 1983. Capillary gas chromatography of lupin alkaloids. J. Chromatography, 261: 95-101.
- PURROY, A.; ECHAIDE, H.; MUÑOZ, F.; ARANA, A. e MENDIZABAL, J. A., 1992. The effect of protein level and source of legume seeds on the growth and fattening of lambs. Livestock Production Science, 34: 93-100.
- PURSER, D. B., 1981. Nutritional value of mediterranean pastures. In: Grazing Animals. World Animal Science, B. Elsevier. p 159-178.
- QUEMERE, P.; FEKETE, J.; LEUILLET, M. e WILLEQUET, F., 1984. Utilisation de la graine de lupin blanc doux Kalina par le porcelet sevré. Influence du taux de incorporation et du mode de présentation. Journées Recherche Porcine en France, 16 : 409-415.
- RADFORD, H. M.; DONEGAN, S. e SCARAMUZZI, R. J., 1980. The effect of supplementation with lupin grain on ovulation rate and plasma gonadotrophin levels in adult merino ewes. Animal Production in Australia, 13: 457.
- RAYMOND, F. e SEROUX, M., 1984. Utilisation du lupin blanc doux en complement de

l'ensilage de maïs pour l'engraissement de taurillons. Actes du 3ème Congrès International du Lupin, La Rochelle, p. 633-634.

- RAZAKA, E. L., 1992. Incidence des Alcaloides Quinolizidiniques sur l'Utilization digestive des Matières Azotées des graines de lupin: *L. mutabilis* et *L. albus*. Tese de doutoramento. Instituto Nacional Politécnico de Toulouse, França.
- REGO, M. C. N. F. e TOMAZ, I. L., 1991. *Phomopsis leptostromiformis* (Kuhn) Bubák agente duma micose do *Lupinus* spp. e duma micotoxicose de alguns animais. Vida Rural, 5/91: 1517.
- RICHARD, J. e AUCLAIR, J., 1987. La flore microbienne du lait cru destiné à la fromagerie. In: *Le Fromage*. 2º ed. Coord. A. Eck. Diffusion Lavoisier, Paris.p. 126-133.
- RITAR, A.J. e ADAMS, N.R., 1988. Increased ovulation rate but not FSH or LH concentration in ewes supplemented with lupin grain. Proceedings of the Australian Society of Animal Production, 17: 310-313.
- ROBB, J. G.; LABEN, R. C.; WALKER, H. G. e HERRING, V., 1973. Castor meal in dairy rations. J. Dairy Sci., 57: 443-450
- RODENAS, I.; MUZQUIZ, M.; BOUTHELIER, V.; MARTINEZ, R.; GUILLEN, A.M., 1982. Valoración de los azucares presentes en variedades de cinco especies del género *Lupinus*. Proceedings of the Second International Lupin Conference, Torremolinos: 220-224.
- ROWE, J. B.; BROWN, G.; RALPH, I.G.; FERGUSON, J.; WALLACE, J. F., 1989. Supplementary feeding of young Merino sheep, grazing wheat stubble, with different amounts of lupin, oat or barley grain. Aust. J. Exp. Agric., 29: 29-35.
- RYBICKA, H., 1964. Rozklad spartein i lupininy. Acta Agrobot. Pol., 50: 36-37.
- SÁ, F. V.; MACHADO, B. R.; PINTO, O. P. R.; CRUZ, I. M. V.; CARNEIRO, M. J. D.; BARBOSA, M. M. A. e REIS, M. M. C., 1970. Maturação em queijos de ovelha Serra e Serpa.. Química e Biologia 6. INII-Lisboa.
- SÁ, M. V. e SÁ, F. V., 1979. As Vacas Leiteiras. Colecção Técnica Agrária. Clássica Editora.
- SALGUEIRO, T.A., 1984. Proteaginosas para a alimentação animal. Série técnica, nº14. D.G.A..
- SALGUEIRO, T. A., 1986. Estratégias alimentares para ovinos em pastoreio no Verão e Outono. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, 81(479): 293-302.
- SEARA, G., 1994. Queijos do Alentejo. In: Os Queijos Tradicionais do Alentejo. Coord. C. P. de Oliveira. Ed. Programa das Artes e Ofícios Tradicionais . Instituto de Financiamento e Apoio ao Desenvolvimento da Agricultura e Pescas.p. 117-166.
- SHULTZ, T.A.; COLLAR, C. A.; BATH, D. L. e AHMADI, A., 1993. Rumen digestion of various dairy feedstuffs compared in testes. California Agriculture, 47 (3): 29-31.
- SIMON, W., 1958. Helv. Chim. Acta, 41: 1835.
- SMART, W.L., 1986. Adoption of lupins in the low rainfall wheatbelt of western Australia.

Proceedings of the 4th International Lupin Conference:312.

- SMITH, G. H., 1986. Lupin as a supplement for sheep and cattle consuming poor quality dry roughage. Proceedings of the 4th International Lupin Conference, Geraldton, p. 319.
- SMITH, G.H. e WARREN, B., 1986. Supplementation to improve the production of yearling steers grazing poor quality forage. 2-The effects of oats, supplementary nitrogen, lupins and cottonseed meal. Aust. J. Exp. Agric., 26: 7-12.
- SMITH, G. H. e REEVES, T. G., 1988. Crop and livestock integration in Southern Australia. Proceedings of the Australian Society of Animal Production, 17: 117-119.
- SOUSA, R. F. X. B., 1983. Características das Proteínas de Reserva da Tremocilha (*Lupinus luteus* L.). Tese de doutoramento. Instituto Superior de Agronomia.
- STEWART, R. e OLDHAM, C. M., 1986. Feeding lupins to ewes for four days during the luteal phase can increase ovulation rate. Proceedings of the Australian Society of Animal Production, 16: 367-369.
- STRAHAN, S.R.; HEMKEN, R.W.; JACKSON Jr., J.A.; BUCKNER, R.C.; BUSH, L. P. e, SIEGEL M. R., 1987. Performance of lactating dairy cows fed tall fescue forage. J. Dairy Sci., 70: 1228-1234.
- SUTERLAND, S. R. D. e MARTIN, G. B., 1980. The effect of a supplement of lupin seed on the testicular size and LH profiles of merino and booroola rams. Animal Production in Australia, 13: 459.
- TATCHER, H.P., 1982. Impact of lupinosis on sheep grazing lupin stubbles in North-east Victoria. Proceedings of the Australian Society of Animal Production, 14: 483-486.
- TAVERNER, M. R., 1975. Sweet lupin seed meal as a protein source for growing pigs. Anim. Prod., 20: 413-419.
- TELENI, E.; KING, W. R.; ROWE, J. B. e McDONALD, G.H., 1989. Lupin and energy yielding nutrients in ewes. 1- Glucose and acetate biokinetics and metabolic hormones in sheep feed a supplement of lupin grain. Aust. J. Agric. Res., 40: 913-924.
- TERRATS, H. P., 1986. Altramuces de la Peninsula Ibérica y Islas Baleares. Comunicaciones INIA, 67. Ministério de Agricultura Pesca y Alimentacion, Madrid.
- TISSERAND J. L. e LAWRENCE, A., 1979. Utilisation de graines protéagineuses (féverole, pois, lupin) en remplacement du tourteau de soja dans l'alimentation des agneaux. 30th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Harrogate, England.
- TILLEY, J.M.A. e TERRY, R.A., 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. J. Br. Grassld. Soc., 18: 104-111.
- TUCKER, R.E. e BUSH, L.P., 1992. Ruminant and physiological responses to endophyte-infected tall fescue. J. Anim. Sci., 70, Supl.1: 291.
- URBACH, G., 1990. Effect of feed on flavor in dairy foods. J. Dairy Sci., 73: 3639-3650.
- VALENTINE, S. C. e BARTSCH, B. D., 1987. Fermentation of hammermilled barley,

- lupin, pea and faba bean grain in the rumen of dairy cows. Anim. Feed. Sci. Tech., 16: 261-271.
- VAN KEMPEN, G. J. M.; BEELEN, G. M.; KUYPERS, A. W.A.H., 1993. Alkaloid toxicity of *Datura* fox seeds in pigs. Proceedings of the Second International Workshop on Anti-nutritional Factors in Legume Seeds, E A A P publication n°70, p. 367-370.
- VAN SOEST, P. J., 1982. Nutritional Ecology of the Ruminant. O & B Books, Inc. Oregon, USA
- VELDMAN, A.; MEIJS, J.A.C.; BORGREEVE, G.J. e HEERES-VAN DER TOL, J. J., 1992. Carry-over of aflatoxin from cows' food to milk. Anim. Prod., 55: 163-168.
- VELEZ, J.; REGATO, J.; FERRO, J.P.; SANTOS, J.; PATANITA, M.;PENACHO, J. e PARREIRA, A., 1994. Study of *Lupinus* species as an alternative to poor luvisols of Baixo Alentejo. Proceedings of the 7 th International Lupin Conference, Évora. p. 400-405.
- VON BAER, D., 1977. Procedimiento rápido para la determinación de los alcalóides totales en *Lupinus mutabilis* con púrpura de bromo cresol (BKP). Proyecto Lupino, Informe n° 3. Institutos Nacionales de Salud - Instituto de Nutrición, Lima, Peru.
- VORHERR, H., 1974. Management of normal pregnancy, labor and puerperium. Drug excretion in breast milk. Postgrad. Med., 556: 97.
- WAHNON, J. S., 1952. Tremoços. Valor da rama na sideração e da semente na alimentação. Melhoramento, 5: 53-75.
- WATSON, M.J.; HODGE, R.W. e KAT, C., 1984. Ruminal fermentation of wheat or lupins in sheep. Proceedings of the Nutrition Society of Australia, 9: 139.
- WEBER, F. e RAMET, J. P., 1987. Technologie comparee de l'affinage des differents types de fromage. In: Le Fromage. Coord. Eck, A..Diffusion Lavoisier, Paris. p 291-307.
- WESTENDORF, M. L.; MITCHEL, G. E.; TUCKER, R.E.; BUSH, L. P.; PETROSKI, R. J.; POWELL, R. G., 1993. In vitro and in vivo ruminal and physiological responses to endophyte - infected tall fescue. J. Dairy Sci., 76: 555-563.
- WHITE, M.J., 1987. Applying australian technology in the Alentejo and its comercial advantages. Pastagens e Forragens, 8(2): 51-63.
- WIEWÍOROWSKI, M. e SKOLIK, J., 1963. Über die korrelation zwischen basizitat und molekulstruktur bei einigen lupinus-alkaloiden und ihren derivaten. Bulletin de l'Académie Polonaise des Sciences. Série des Sciences Chimiques, vol. XI (2): 69-75
- WINK, M., 1984. Biochemistry and chemical ecology of lupin alkaloids. Proceedings of the 3th International Lupin Conference:326-343.
- WINK, M., 1987. Quinolizidine alkaloids: biochemistry, metabolism, and function in plants and cells suspension cultures. Planta Medica, 53: 509-514.
- WINK, M., 1990. Plant breeding: low or high alkaloid content ? Proceedings of the 6 th International Lupin Conference, Temuco: 326-334.
- WINK, M., 1994. Biological activities and potential applications of lupin alkaloids. Proceedings of

the 7th International Lupin Conference, Évora: 161 - 178.

WITTENBERG, K. M.; DUYNISVELD, G. W. e TOSI, H. R., 1992. Comparison of alkaloid content and nutritive value for tryptamine and beta-carboline-free cultivars of reed canary grass (*Phalaris arundinacea* L.). Can. J. Anim. Sci., 72: 903- 909.

WITTENBURG, H. e NEHRING, K., 1965. Effect of pure *Lupinus* alkaloidson the animal organism: the action of lupanine on rats. Pharmazie, 20: 156-158.

ANEXOS

Anexo 1.1. Digestibilidade da MO observada em cada período experimental para as 4 dietas e respectiva análise de variância e significância.

Período	Suplementos			T.F.E.
	B. de Soja	Tremocilha	Tremoço	
1	70,92	72,74	73,24	75,55
2	69,69	70,12	72,09	78,27
3	70,35	72,89	76,21	79,20
4	71,17	72,16	75,13	77,09
Média	70,53	71,98	74,17	77,53
EPM	0,29	0,55	0,80	0,68

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Carneiros	3	3,39	1,13	0,66 ns
Períodos	3	10,23	3,41	1,99 ns
Dietas	3	111,11	37,04	21,57**
Erro	6	10,30	1,72	
Total	15	135,00		

cv=1,78 %. ns= não significativo, ** = P< 0,01

Anexo 1.2. Digestibilidade da PB observada em cada período experimental para as 4 dietas e respectiva análise de variância e significância.

Período	Suplementos			T.F.E.
	B. de Soja	Tremocilha	Tremoço	
1	76,06	77,23	77,16	75,30
2	73,54	69,49	77,43	80,19
3	74,44	74,74	79,45	80,24
4	77,33	77,33	78,58	77,72
Média	75,34	74,27	78,16	78,36
EPM	0,73	1,45	0,46	1,02

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Carneiros	3	23,41	7,80	1,74 ns
Períodos	3	11,84	3,95	0,88 ns
Dietas	3	50,11	16,70	3,72 *
Erro	6	26,94	4,49	
Total	15	112,30		

cv=2,77%. ns= não significativo, * = P< 0,05

Anexo 1.3. Digestibilidade do NDF observada em cada período experimental para as 4 dietas e respectiva análise de variância e significância.

Período	Suplementos			T.F.E.
	B. de Soja	Tremocilha	Tremoço	
1	65,37	70,44	67,29	68,28
2	64,84	69,50	62,64	71,99
3	62,39	67,96	74,01	78,24
4	66,81	69,55	69,85	76,60
Média	64,85	69,36	68,45	73,78
EPM	0,80	0,45	2,06	1,96

Origem da Variação	G.L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Carneiros	3	34,16	11,39	1,00 ns
Períodos	3	39,98	13,33	1,17 ns
Dietas	3	161,70	53,89	4,72 ns
Erro	6	68,48	11,41	
Total	15	304,30		

cv=4,89%. ns= não significativo, * = P< 0,05

Anexo 1.4. Digestibilidade do ADF observada em cada período experimental para as 4 dietas e respectiva análise de variância e significância.

Período	Suplementos			T.F.E.
	B. de Soja	Tremocilha	Tremoço	
1	61,32	67,61	70,16	68,39
2	59,22	66,18	62,97	72,10
3	61,90	65,11	74,59	79,26
4	61,38	66,62	70,54	77,72
Média	60,96	66,38	69,57	74,37
EPM	0,51	0,45	2,09	2,18

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Carneiros	3	21,91	7,30	0,63 ns
Períodos	3	61,97	20,66	1,78 ns
Dietas	3	380,50	126,82	10,92 **
Erro	6	69,66	11,61	
Total	15	534,00		

cv=5,02 %. ns= não significativo, ** = P< 0,01

Anexo 1.5. Ingestão média de MS (g/Kg^{0,75}) observada em cada período experimental para as 4 dietas estudadas e respectiva análise de variância e significância.

Período	Tratamentos			Trem. F.E.
	B. de Soja	Tremocilha	Tremoço	
1	49,48	30,70	45,45	36,94
2	40,47	34,18	42,86	53,15
3	39,79	46,93	35,98	40,87
4	37,87	39,12	35,72	38,20
Média	41,90	37,73	40,00	42,29
EPM	2,24	3,05	2,13	3,21

Origem da Variação	G. de L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Carneiros	3	269,50	89,84	3,67 ns
Períodos	3	50,19	16,73	0,68 ns
Dietas	3	52,31	17,44	0,71 ns
Erro	6	146,70	24,46	
Total	15	518,18		

cv=12,22%. ns= não significativo.

Anexo 1.6. N ingerido (g/animal/dia) em cada período experimental para cada uma das dieta e respectivas análises de variância e significância.

Período	Suplementos			T.F.E.
	B. de Soja	Tremocilha	Tremoço	
1	31,38	18,13	28,43	24,44
2	22,80	23,99	29,23	34,53
3	24,49	27,61	18,42	24,51
4	24,44	27,11	24,62	21,18
Média	25,78	24,21	25,17	26,16
EPM	1,65	1,89	2,14	2,51

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Carneiros	3	188,21	62,74	7,44 *
Períodos	3	35,45	11,82	1,40 ns
Dietas	3	8,72	2,91	0,34 ns
Erro	6	50,59	8,43	
Total	15	282,97		

cv=11,46 %. ns= não significativo, * = P< 0,05

Anexo 1.7. N fecal (g/animal/dia) em cada período experimental para cada uma das dietas e respectivas análises de variância e significância.

Período	Suplementos			T.F.E.
	B. de Soja	Tremocilha	Tremoço	
1	7,51	4,13	6,49	6,04
2	6,03	7,32	6,60	6,84
3	6,26	6,97	3,79	4,84
4	5,54	6,61	5,27	4,72
Média	6,34	6,26	5,54	5,61
EPM	0,36	0,63	0,57	0,44

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Carneiros	3	8,71	2,90	4,28 *
Períodos	3	3,89	1,30	1,91 ns
Dietas	3	2,11	0,70	1,04 ns
Erro	6	4,07	0,68	
Total	15	18,79		

cv=13,88 %. ns= não significativo, * = P< 0,05

Anexo 1.8. N urinário (g/animal/dia) em cada período experimental para cada uma das dietas e respectivas análises de variância e significância.

Período	Suplementos			T.F.E.
	B. de Soja	Tremocilha	Tremoço	
1	18,24	11,15	18,99	18,49
2	16,05	17,06	21,57	22,40
3	16,29	17,62	13,68	20,77
4	18,71	20,26	18,33	14,29
Média	17,32	16,52	18,14	18,97
EPM	0,58	1,66	1,42	1,52

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Carneiros	3	98,32	32,77	34,66 ***
Períodos	3	15,33	5,11	5,40 *
Dietas	3	13,48	4,49	4,75 ns
Erro	6	5,68	0,95	
Total	15	132,81		

cv=5,49 %. ns= não significativo, * = P< 0,05; *** = P<0,001.

Anexo 1.9. N retido (g/animal/dia) em cada período experimental para cada uma das dietas e respectivas análises de variância e significância.

Período	Suplementos			T.F.E.
	B. de Soja	Tremocilha	Tremoço	
1	5,63	2,85	2,94	-0,09
2	0,72	-0,39	1,06	5,29
3	1,94	3,02	0,95	-1,10
4	0,19	0,23	1,02	2,17
Média	2,12	1,43	1,49	1,57
EPM	1,06	0,76	0,42	1,23

Origem da Variação	G.L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Carneiros	3	10,24	3,41	0,58 ***
Períodos	3	8,64	2,88	0,49 *
Dietas	3	1,22	0,41	0,07 ns
Erro	6	35,36	5,89	
Total	15	55,46		

cv=147,09 %. ns= não significativo, * = P< 0,05; *** = P<0,001.

Anexo 1.10. Digestibilidade da MO dos suplementos observada em cada uma das 4 dietas e respectivas análises de variância e significância.

Período	Suplementos			T.F.E.
	B. de Soja	Tremocilha	Tremoço	
1	100,00	100,00	95,11	93,19
2	99,76	94,08	90,95	99,03
3	100,00	100,00	100,00	100,00
4	100,00	100,00	99,68	100,00
Média	99,94	98,52	96,44	98,06
EPM	0,05	1,28	1,86	1,42

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Carneiros	3	21,95	7,32	1,05 ns
Períodos	3	49,99	16,66	2,40 ns
Dietas	3	25,04	8,35	1,20 ns
Erro	6	41,65	6,94	
Total	15	138,64		

cv= 2,68 %. ns= não significativo.

Anexo 1.11. Digestibilidade da PB dos suplementos observada em cada uma das 4 dietas e respectivas análises de variância e significância.

Período	Suplementos			T.F.E.
	B. de Soja	Tremocilha	Tremoço	
1	91,85	97,03	89,92	85,86
2	87,52	80,21	91,32	92,82
3	86,03	84,79	90,00	88,52
4	91,37	88,88	91,23	89,72
Média	89,19	87,73	90,62	89,23
EPM	1,24	3,09	0,33	1,25

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Carneiros	3	63,97	21,32	1,28 ns
Períodos	3	40,27	13,42	0,80 ns
Dietas	3	16,71	5,57	0,33 ns
Erro	6	100,10	16,68	
Total	15	221,05		

cv= 4,58 %. ns= não significativo.

Anexo 1.12. Digestibilidade da NDF dos suplementos observada em cada uma das 4 dietas e respectivas análises de variância e significância.

Período	Suplementos			T.F.E.
	B. de Soja	Tremocilha	Tremoço	
1	75,71	100,00	83,32	79,17
2	67,13	97,03	52,35	92,44
3	32,55	85,93	100,00	100,00
4	100,00	95,26	97,30	100,00
Média	68,85	94,56	83,24	92,90
EPM	12,09	2,63	9,46	4,25

Origem da Variação	G.L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Carneiros	3	659,13	219,71	0,53 ns
Períodos	3	1048,05	349,35	0,85 ns
Dietas	3	1670,75	556,92	1,36 ns
Erro	6	2463,84	410,64	
Total	15	5841,77		

cv= 23,87 %. ns= não significativo.

Anexo 1.13. Digestibilidade da ADF dos suplementos observada em cada uma das 4 dietas e respectivas análises de variância e significância.

Período	Suplementos			T.F.E.
	B. de Soja	Tremocilha	Tremoço	
1	94,28	100,00	100,00	89,09
2	59,15	97,44	75,34	98,53
3	100,00	91,00	100,00	100,00
4	100,00	97,67	100,00	100,00
Média	88,36	96,53	93,84	96,91
EPM	8,51	1,67	5,34	2,28

Origem da Variação	G.L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Carneiros	3	163,29	54,43	0,37 ns
Períodos	3	705,56	235,19	1,61 ns
Dietas	3	186,63	62,21	0,43 ns
Erro	6	874,11	145,69	
Total	15	1929,59		

cv = 12,85 %. ns = não significativo.

Anexo 2.1. Produção de gás (ml) *in vitro* por microorganismos do rúmen submetidos a 6 concentrações crescentes de esparteína, após 6 horas de fermentação. e respectivas análises de variância e significância.

Período	Esparteína (mM)					
	0	1	2	3	4	5
1	380	320	333	288	268	220
2	103	110	98	90	80	68
3	105	110	100	85	83	80
4	128	95	90	88	58	68
Média	179	159	155	138	122	109
EPM	58	47	51	43	42	32

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Períodos	3	199400,70	66466,89	138,70 ***
Concentrações	5	13222,33	2644,47	5,52 *
Erro	15	7188,33	479,22	
Total	23	219811,30		

cv = 15,23 %. * = P < 0,05; P < 0,001.

Anexo 2.2. Produção de gás (ml) *in vitro* por microorganismos do rúmen, submetidos a 6 concentrações crescentes de esparteína, após 12 horas de fermentação. e respectivas análises de variância e significância.

Período	Esparteína (mM)					
	0	1	2	3	4	5
1	485	450	453	445	438	420
2	423	385	368	388	385	375
3	293	380	350	308	293	265
4	500	460	463	423	398	373
Média	427	419	409	391	379	358
EPM	42	18	25	26	27	29

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Períodos	3	66823,79	22274,60	29,00 ***
Concentrações	5	13600,71	2720,14	3,54 *
Erro	15	11522,46	768,16	
Total	23	91946,96		

cv = 6,98 %. * = P < 0,05; *** = P < 0,001.

Anexo 2.3. Produção de gás (ml) *in vitro* por microorganismos do rúmen, submetidos a 6 concentrações crescentes de esparteína, após 24 horas de fermentação e respectivas análises de variância e significância.

Período	Esparteína (mM)					
	0	1	2	3	4	5
1	573	552	552	537	532	535
2	560	550	535	555	548	543
3	615	610	600	555	588	588
4	663	630	623	633	625	603
Média	603	586	578	570	573	567
EPM	20	18	18	19	18	14

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Períodos	3	28208,46	9402,82	59,77 ***
Concentrações	5	3439,38	687,88	4,37 *
Erro	15	2359,79	157,32	
Total	23	34007,63		

cv = 2,16 %. * = P < 0,05; *** = P < 0,001.

Anexo 2.4. Valores do pH do suco ruminal incubado *in vitro* e submetido a 6 concentrações crescentes de esparteína, no início da fermentação e respectivas análises de variância e significância.

Período	Esparteína (mM)					
	0	1	2	3	4	5
1	7,00	7,08	7,10	7,13	7,18	7,20
2	7,48	7,48	7,50	7,50	7,55	7,60
3	7,23	7,28	7,33	7,33	7,35	7,35
4	7,40	7,41	7,38	7,42	7,42	7,26
Média	7,28	7,31	7,33	7,35	7,38	7,35
EPM	0,09	0,08	0,07	0,07	0,07	0,08

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Períodos	3	0,51	0,17	57,01 ***
Concentrações	5	0,02	0,005	1,56 ns
Erro	15	0,04	0,003	
Total	23	0,58		

cv = 0,75 %. ns = não significativo; *** = P < 0,001.

Anexo 2.5. Valores do pH do suco ruminal incubado *in vitro* e submetido a 6 concentrações crescentes de esparteína, após 6 horas de fermentação, e respectivas análises de variância e significância.

Período	Esparteína (mM)					
	0	1	2	3	4	5
1	6,30	6,40	6,38	6,68	6,65	6,80
2	7,05	7,10	7,00	7,10	7,10	7,08
3	7,00	7,05	7,00	7,05	6,95	7,13
4	7,10	7,18	7,22	7,36	7,28	7,80
Média	6,86	6,93	6,90	7,05	7,00	7,20
EPM	0,16	0,16	0,16	0,12	0,12	0,18

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Períodos	3	1,96	0,65	41,50 ***
Concentrações	5	0,30	0,06	3,87 *
Erro	15	0,24	0,02	
Total	23	2,50		

cv = 1,81 %. * = P < 0,05; *** = P < 0,001.

Anexo 2.6. Valores do pH do suco ruminal incubado *in vitro* e submetido a 6 concentrações crescentes de esparteína, após 12 horas de fermentação e respectivas análises de variância e significância.

Período	Esparteína (mM)					
	0	1	2	3	4	5
1	5,80	5,80	5,85	5,85	5,90	5,95
2	6,05	6,35	6,38	6,25	6,38	6,38
3	6,85	6,70	6,75	6,80	6,95	6,90
4	5,99	6,08	6,04	6,38	6,41	6,36
Média	6,17	6,23	6,26	6,32	6,41	6,40
EPM	0,20	0,17	0,17	0,17	0,19	0,17

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Períodos	3	2,87	0,96	93,36 ***
Concentrações	5	0,18	0,04	3,50 *
Erro	15	0,15	0,01	
Total	23	3,21		

cv = 1,59 %. * = P<0,05; ***= P<0,001.

Anexo 2.7. Valores do pH do suco ruminal incubado *in vitro* e submetido a 6 concentrações crescentes de esparteína, após 24 horas de fermentação. e respectivas análises de variância e significância.

Período	Esparteína (mM)					
	0	1	2	3	4	5
1	5,65	5,65	5,65	5,68	5,70	5,65
2	5,45	5,55	5,55	5,53	5,60	5,63
3	5,50	5,48	5,50	5,50	5,48	5,50
4	5,58	5,66	5,62	5,68	5,72	5,58
Média	5,55	5,59	5,58	5,60	5,63	5,59
EPM	0,04	0,04	0,03	0,04	0,05	0,03

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Períodos	3	0,11	0,04	22,73 ***
Concentrações	5	0,01	0,003	1,65 ns
Erro	15	0,02	0,002	
Total	23	0,15		

cv = 0,80 %. ns = não significativo; ***= P<0,001.

Anexo 2.8. Valores do N-NH₃ no suco ruminal incubado *in vitro* e submetido a 6 concentrações crescentes de esparteína, no início da fermentação. e respectivas análises de variância e significância.

Período	Esparteína (mM)					
	0	1	2	3	4	5
1	51,19	58,64	54,91	47,03	50,27	55,39
2	59,27	60,51	58,65	60,04	58,17	57,25
3	58,42	62,97	63,29	62,13	62,18	63,30
4	42,35	45,38	49,10	43,07	41,67	43,52
Média	52,88	56,88	56,49	53,07	53,07	54,87
EPM	3,44	3,41	2,60	4,09	3,93	3,54

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Períodos	3	1119,11	373,04	67,04 ***
Concentrações	5	65,68	13,14	2,36 ns
Erro	15	83,47	5,56	
Total	23	1268,26		

cv = 4,32 %. ns = não significativo; ***= P<0,001.

Anexo 2.9. Valores do N-NH₃ no suco ruminal incubado *in vitro* e submetido a 6 concentrações crescentes de esparteína, após 6 horas de fermentação e respectivas análises de variância e significância.

Período	Esparteína (mM)					
	0	1	2	3	4	5
1	35,39	32,58	33,04	37,94	39,58	42,12
2	55,39	61,23	61,45	56,32	53,98	58,64
3	53,91	53,98	61,43	57,25	58,39	59,10
4	40,30	32,35	40,40	38,54	33,25	34,21
Média	46,25	45,04	49,08	47,51	46,30	48,52
EPM	4,30	6,41	6,32	4,64	5,13	5,36

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Períodos	3	2633,73	877,91	71,74 ***
Concentrações	5	46,92	9,38	0,77 ns
Erro	15	183,55	12,24	
Total	23	2864,19		

cv = 7,42 %. ns = não significativo; ***= P< 0,001.

Anexo 2.10. Valores do N-NH₃ no suco ruminal incubado *in vitro* e submetido a 6 concentrações crescentes de esparteína após 12 horas de fermentação, e respectivas análises de variância e significância.

Período	Esparteína (mM)					
	0	1	2	3	4	5
1	25,13	28,85	24,66	27,90	28,85	28,62
2	40,02	45,47	45,16	42,35	43,74	44,37
3	45,84	47,00	49,49	49,30	51,20	52,08
4	25,60	26,53	24,65	28,62	27,93	26,77
Média	34,15	36,96	35,99	37,04	37,93	37,96
EPM	4,51	4,66	5,72	4,56	4,95	5,32

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Períodos	3	2337,40	779,13	312,46 ***
Concentrações	5	41,21	8,24	3,31 *
Erro	15	37,40	2,49	
Total	23	2416,01		

cv = 4,30 %. * = P<0,05; ***= P< 0,001.

Anexo 2.11. Valores do N-NH₃ no suco ruminal incubado *in vitro* e submetido a 6 concentrações crescentes de esparteína, após 24 horas de fermentação e respectivas análises de variância e significância.

Período	Esparteína (mM)					
	0	1	2	3	4	5
1	36,30	33,50	34,92	36,07	35,83	33,98
2	26,53	21,88	27,46	25,60	29,09	24,90
3	31,51	37,70	41,42	38,49	37,47	35,84
4	21,88	21,78	21,43	22,34	22,35	22,68
Média	29,06	28,72	31,31	30,63	31,19	29,35
EPM	2,70	3,52	3,77	3,40	3,00	2,83

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Períodos	3	933,12	311,04	70,54 ***
Concentrações	5	25,85	5,17	1,17 ns
Erro	15	66,15	4,41	
Total	23	1025,11		

cv = 4,30 %. ns= não significativo; ***= P< 0,001.

Anexo 2.12. Produção de gás (ml) pelos microorganismos do rúmen incubados *in vitro* a partir de um substracto constituído por 5 g (MS) de tremocilha brava ou tremocilha doce *Topaz*, após 6 horas de fermentação. e respectivas análises de variância e significância.

Período	Substractos	
	Tremocilha Brava	Tremocilha <i>Topaz</i>
1	435	388
2	450	408
3	443	393
4	380	348
Média	427	384
EPM	11	14

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Períodos	3	4933,38	1644,46	52,83 ***
Substractos	1	3655,13	3655,13	117,43 ***
Erro	3	93,38	31,13	
Total	7	8681,88		

cv = 1,37 % ***= P<0,001.

Anexo 2.13 Produção de gás (ml) pelos microorganismos do rúmen incubados *in vitro* a partir de um substracto constituído por 5 g (MS) de tremocilha brava ou tremocilha doce *Topaz*, após 12 horas de fermentação. e respectivas análises de variância e significância.

Período	Substractos	
	Tremocilha Brava	Tremocilha <i>Topaz</i>
1	640	610
2	638	610
3	668	635
4	645	560
Média	648	604
EPM	14	6

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Períodos	3	2414,50	804,836	2,14 ns
Substractos	1	3872,00	3872,00	10,31 *
Erro	3	1127,00	375,67	
Total	7	7413,50		

cv = 3,10 % ns=não significativo; *= P<0,05.

Anexo 2.14 Produção de gás (ml) pelos microorganismos do rúmen incubados *in vitro* a partir de um substracto constituído por 5 g (MS) de tremocilha brava ou tremocilha doce *Topaz*, após 24 horas de fermentação. e respectivas análises de variância e significância.

Período	Substractos	
	Tremocilha Brava	Tremocilha <i>Topaz</i>
1	805	800
2	780	788
3	808	798
4	833	715
Média	807	775
EPM	18	9

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Períodos	3	1228,38	409,46	0,24 ns
Substractos	1	1953,13	1953,13	1,15 ns
Erro	3	5103,38	1701,13	
Total	7	8284,88		

cv = 5,21 % ns=não significativo.

Anexo 2.15 Produção de gás (ml) pelos microorganismos do rúmen incubados *in vitro* a partir de um substracto constituído por 10 g (MS) de tremocilha brava ou tremocilha doce *Topaz*, após 6 horas de fermentação. e respectivas análises de variância e significância.

Período	Substractos	
	Tremocilha Brava	Tremocilha <i>Topaz</i>
1	615	633
2	695	678
3	705	658
4	663	580
Média	670	637
EPM	18	18

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Períodos	3	7534,38	2511,46	2,71 ns
Substractos	1	2080,13	2080,13	2,25 ns
Erro	3	2775,38	925,13	
Total	7	12389,88		

cv = 4,66 %. ns=não significativo.

Anexo 2.16 Produção de gás (ml) pelos microorganismos do rúmen incubados *in vitro* a partir de um substracto constituído por 10 g (MS) de tremocilha brava ou tremocilha doce *Topaz*, após 12 horas de fermentação. e respectivas análises de variância e significância.

Período	Substractos	
	Tremocilha Brava	Tremocilha <i>Topaz</i>
1	875	985
2	953	980
3	965	983
4	960	948
Média	938	974
EPM		

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Períodos	3	2228,38	742,79	0,54 ns
Substractos	1	2556,13	2556,13	1,87 ns
Erro	3	4092,38	1364,13	
Total	7	8876,88		

cv = 3,86 %. ns=não significativo.

Anexo 2.17. Produção de gás (ml) pelos microorganismos do rúmen incubados *in vitro* a partir de um substracto constituído por 10 g (MS) de tremocilha brava ou tremocilha doce *Topaz*, após 24 horas de fermentação. e respectivas análises de variância e significância.

Período	Substractos	
	Tremocilha Brava	Tremocilha <i>Topaz</i>
1	1185	1273
2	1225	1333
3	1188	1233
4	1238	1248
Média	1209	1272
EPM	19	11

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Períodos	3	5041,38	1680,46	1,74 ns
Substractos	1	7875,13	7875,13	8,17 ns
Erro	3	2891,38	963,79	
Total	7	15807,88		

cv = 2,50 %. ns=não significativo.

Anexo 2.18. Produção de gás (ml) pelos microorganismos do rúmen incubados *in vitro* a partir de um substracto constituído por 15 g (MS) de tremocilha brava ou tremocilha doce *Topaz*, após 6 horas de fermentação. e respectivas análises de variância e significância.

Período	Substractos	
	Tremocilha Brava	Tremocilha <i>Topaz</i>
1	713	700
2	798	813
3	765	660
4	698	655
Média	744	707
EPM	32	20

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Períodos	3	18661,50	6220,50	4,70 ns
Substractos	1	2664,50	2664,50	2,01 ns
Erro	3	3969,50	1323,17	
Total	7	25295,50		

cv = 5,02 %. ns=não significativo.

Anexo 2.19. Produção de gás (ml) pelos microorganismos do rúmen incubados *in vitro* a partir de um substracto constituído por 15 g (MS) de tremocilha brava ou tremocilha doce *Topaz*, após 12 horas de fermentação. e respectivas análises de variância e significância.

Período	Substractos	
	Tremocilha Brava	Tremocilha <i>Topaz</i>
1	920	1045
2	1045	1140
3	955	953
4	858	960
Média	945	1025
EPM	38	34

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Períodos	3	36597,00	12199,00	7,74 ns
Substractos	1	12800,00	12800,00	8,12 ns
Erro	3	4729,00	1576,33	
Total	7	54126,00		

cv = 4,03 %. ns=não significativo.

Anexo 2.20. Produção de gás (ml) pelos microorganismos do rúmen incubados *in vitro* a partir de um substracto constituído por 15 g (MS) de tremocilha brava ou tremocilha doce *Topaz*, após 24 horas de fermentação. e respectivas análises de variância e significância.

Período	Substractos	
	Tremocilha Brava	Tremocilha <i>Topaz</i>
1	1208	1365
2	1300	1390
3	1145	1178
4	1060	1290
Média	1178	1306
EPM	41	44

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Períodos	3	47117,00	15705,67	4,34 ns
Substractos	1	32512,50	32512,50	8,98 ns
Erro	3	10856,50	3618,83	
Total	7	90486,00		

cv = 4,84 %. ns=não significativo.

Anexo 2.21. Valores do pH registados nos fermentadores com 5 g (MS) de tremocilha brava ou tremocilha doce *Topaz*, no início da fermentação e respectivas análises de variância e significância.

Período	Substractos	
	Tremocilha Brava	Tremocilha <i>Topaz</i>
1	7,08	7,08
2	7,16	7,06
3	7,21	7,21
4	7,07	7,19
Média	7,13	7,14
EPM	0,03	0,03

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Períodos	3	0,019	0,006	1,53 ns
Substractos	1	$5,00 \times 10^{-3}$	$5,00 \times 10^{-3}$	0,012 ns
Erro	3	0,012	0,004	
Total	7	0,031		

cv = 0,89 %. ns=não significativo.

Anexo 2.22. Valores do pH registados nos fermentadores com 5 g (MS) de tremocilha brava ou tremocilha doce *Topaz*, após 6 horas de fermentação, e respectivas análises de variância e significância.

Período	Substractos	
	Tremocilha Brava	Tremocilha <i>Topaz</i>
1	6,78	6,85
2	6,61	6,65
3	6,87	6,86
4	6,92	6,92
Média	6,82	6,80
EPM	0,05	0,06

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Períodos	3	0,095	0,032	46,37 ***
Substractos	1	0,001	0,001	1,83 ns
Erro	3	0,002	0,001	
Total	7	0,098		

cv = 0,38 %. ns=não significativo. *** = P<0,001.

Anexo 2.23. Valores do pH registados nos fermentadores com 5 g (MS) de tremocilha brava ou tremocilha doce *Topaz*, após 12 horas de fermentação, e respectivas análises de variância e significância.

Período	Substractos	
	Tremocilha Brava	Tremocilha <i>Topaz</i>
1	6,71	6,79
2	6,77	6,88
3	6,88	6,90
4	6,75	6,82
Média	6,78	6,85
EPM	0,02	0,03

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Períodos	3	0,02	0,007	10,31 ***
Substractos	1	0,01	0,01	14,00 *
Erro	3	0,002	0,0007	
Total	7	0,03		

cv = 0,39 %. * = P<0,05. *** = P<0,001.

Anexo 2.24. Valores do pH registados nos fermentadores com 5 g (MS) de tremocilha brava ou tremocilha doce *Topaz*, após 24 horas de fermentação, e respectivas análises de variância e significância.

Período	Substractos	
	Tremocilha Brava	Tremocilha <i>Topaz</i>
1	6,85	6,62
2	6,62	6,78
3	6,63	6,76
4	6,62	6,77
Média	6,61	6,73
EPM	0,03	9,60.10 ⁻³

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Períodos	3	0,01	0,005	3,12 ns
Substractos	1	0,03	0,03	19,20 *
Erro	3	0,005	0,002	
Total	7	0,05		

cv = 0,58 %. ns=não significativo. * = P<0,05.

Anexo 2.25. Valores do pH registados nos fermentadores com 10g (MS) de tremocilha brava ou tremocilha doce *Topaz*, no início da fermentação, e respectivas análises de variância e significância.

Período	Substractos	
	Tremocilha Brava	Tremocilha <i>Topaz</i>
1	6,99	7,06
2	7,04	7,03
3	7,10	7,13
4	7,07	7,18
Média	7,05	7,10
EPM	0,03	0,02

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Períodos	3	0,02	0,005	4,10 ns
Substractos	1	0,005	0,005	3,75 ns
Erro	3	0,004	0,001	
Total	7	0,03		

cv = 0,52 %. ns=não significativo.

Anexo 2.26. Valores do pH registados nos fermentadores com 10g (MS) de tremocilha brava ou tremocilha doce *Topaz*, após 6 horas de fermentação, e respectivas análises de variância e significância.

Período	Substractos	
	Tremocilha Brava	Tremocilha <i>Topaz</i>
1	6,03	6,02
2	5,87	5,98
3	6,00	6,17
4	6,05	6,31
Média	5,99	6,12
EPM	0,07	0,04

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Períodos	3	0,07	0,02	3,57 ns
Substractos	1	0,04	0,04	5,48 ns
Erro	3	0,02	0,006	
Total	7	0,12		

cv = 1,32 %. ns=não significativo.

Anexo 2.27. Valores do pH registados nos fermentadores com 10g (MS) de tremocilha brava ou tremocilha doce Topaz, após 12 horas de fermentação, e respectivas análises de variância e significância.

Período	Substractos	
	Tremocilha Brava	Tremocilha Topaz
1	6,04	6,18
2	5,95	6,20
3	5,98	6,10
4	5,94	6,30
Média	5,98	6,20
EPM	0,04	0,02

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Períodos	3	0,008	0,003	0,43 ns
Substractos	1	0,09	0,09	15,39 *
Erro	3	0,02	0,006	
Total	7	0,12		

cv = 1,29 %. ns=não significativo. *=P<0,05.

Anexo 2.28. Valores do pH registados nos fermentadores com 10g (MS) de tremocilha brava ou tremocilha doce Topaz, após 24 horas de fermentação, e respectivas análises de variância e significância.

Período	Substractos	
	Tremocilha Brava	Tremocilha Topaz
1	5,88	6,06
2	5,83	6,08
3	5,89	5,98
4	5,81	6,21
Média	5,85	6,08
EPM	0,04	0,02

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Períodos	3	0,006	0,002	0,24 ns
Substractos	1	0,11	0,11	12,35 *
Erro	3	0,03	0,009	
Total	7	0,14		

cv = 1,55 %. ns=não significativo. *=P<0,05.

Anexo 2.29. Valores do pH registados nos fermentadores com 15g (MS) de tremocilha brava ou tremocilha doce Topaz, no início da fermentação, e respectivas análises de variância e significância.

Período	Substractos	
	Tremocilha Brava	Tremocilha Topaz
1	7,09	7,01
2	6,99	6,97
3	7,00	7,04
4	7,06	7,08
Média	7,04	7,03
EPM		

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Períodos	3	0,009	0,003	2,19 ns
Substractos	1	0,0002	0,0002	0,14 ns
Erro	3	0,004	0,001	
Total	7	0,01		

cv = 0,53 %. ns=não significativo.

Anexo 2.30. Valores do pH registados nos fermentadores com 15g (MS) de tremocilha brava ou tremocilha doce Topaz, após 6 horas de fermentação, e respectivas análises de variância e significância.

Período	Substractos	
	Tremocilha Brava	Tremocilha Topaz
1	5,46	5,59
2	5,90	5,53
3	5,27	5,55
4	5,25	5,57
Média	5,47	5,56
EPM	0,01	0,13

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Períodos	3	0,12	0,04	0,82 ns
Substractos	1	0,02	0,02	0,32 ns
Erro	3	0,15	0,05	
Total	7	0,29		

cv = 4,07 %. ns=não significativo.

Anexo 2.31. Valores do pH registados nos fermentadores com 15g (MS) de tremocilha brava ou tremocilha doce Topaz, após 12 horas de fermentação, e respectivas análises de variância e significância.

Período	Substractos	
	Tremocilha Brava	Tremocilha Topaz
1	5,58	5,85
2	5,48	5,81
3	5,30	5,55
4	5,16	5,76
Média	5,38	5,74
EPM	0,06	0,08

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Períodos	3	0,12	0,04	3,02 ns
Substractos	1	0,26	0,26	20,04 *
Erro	3	0,04	0,01	
Total	7	0,42		

cv = 2,06 %. ns=não significativo.

Anexo 2.32. Valores do pH registados nos fermentadores com 15g (MS) de tremocilha brava ou tremocilha doce Topaz, após 24 horas de fermentação e respectivas análises de variância e significância.

Período	Substractos	
	Tremocilha Brava	Tremocilha Topaz
1	5,63	5,66
2	5,52	5,52
3	5,40	5,55
4	5,38	5,92
Média	5,48	5,66
EPM	0,08	0,05

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Períodos	3	0,05	0,02	0,51 ns
Substractos	1	0,06	0,06	2,10 ns
Erro	3	0,09	0,03	
Total	7	0,20		

cv = 3,16 %. ns=não significativo.

Anexo 3.1. Variação da concentração de lupinina ($\mu\text{g/ml}$) no suco ruminal incubado *in vitro* e respectivas análises de variância e significância.

	Horas		
	0	24	48
	67,90	61,23	60,75
	38,84	79,90	34,49
	85,31	32,71	90,73
	39,19	63,21	86,75
	71,35	42,07	60,62
	69,49	88,48	65,43
	57,15	86,26	48,99
	61,75	81,52	56,17
	66,24	62,58	50,12
	63,46	54,88	55,29
	47,86	76,73	64,53
	56,75	63,01	67,54
	65,33	63,56	83,93
	85,30	50,38	89,00
	93,82	60,42	87,03
	78,17	44,24	75,51
Média:	65,49	63,20	67,30
EPM:	3,79	3,93	4,05

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Horas	2	135,50	67,75	0,26 ns
Erro	45	11838,04	263,07	
Total	47	11973,54		

cv = 24,83 %. ns=não significativo.

Anexo 3.2. Variação da concentração de esparteína ($\mu\text{g/ml}$) no suco ruminal incubado *in vitro*. e respectivas análises de variância e significância.

	Horas		
	0	24	48
	7,58	7,39	4,33
	7,29	9,72	6,75
	8,42	8,11	8,05
	8,37	8,57	6,85
	7,80	8,40	5,58
	7,86	6,05	5,47
	8,40	4,42	6,65
	8,39	8,50	7,50
	8,54	8,14	6,63
	8,44	5,64	6,91
	7,50	8,56	7,73
	8,50	5,99	5,67
	8,47	8,40	8,51
	8,50	7,50	8,57
	11,68	5,41	8,48
	8,51	7,43	8,55
Média:	8,39	7,39	7,02
EPM:	0,24	0,36	0,31

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Horas	2	16,17	8,09	5,12 *
Erro	45	71,05	1,58	
Total	47	87,22		

cv = 16,54 %. * = $P < 0,05$.

Anexo 3.3. Variação da concentração de gramina ($\mu\text{g/ml}$) no suco ruminal incubado *in vitro*. e respectivas análises de variância e significância.

	Horas		
	0	24	48
	3,76	0,44	0,00
	4,71	0,68	0,00
	4,53	0,73	0,35
	4,47	0,85	0,00
	5,15	1,57	0,00
	3,29	0,82	0,28
	2,63	0,12	0,39
	4,94	0,79	0,26
	7,07	0,38	0,19
	5,59	0,25	0,30
	5,59	0,36	0,00
	7,99	0,00	0,24
	7,35	0,31	0,45
	5,24	0,18	0,00
	6,50	0,00	0,00
	6,78	0,41	0,00
Média:	5,35	0,49	0,15
EPM:	0,36	0,10	0,04

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Horas	2	270,38	135,19	166,72 ***
Erro	45	36,49	0,81	
Total	47	306,87		

cv = 45,05 %. ***= P<0,001.

Anexo 3.4. Variação da concentração de lupanina ($\mu\text{g/ml}$) no suco ruminal incubado *in vitro* e respectivas análises de variância e significância.

	Horas		
	0	24	48
	5,61	3,98	10,83
	1,41	2,83	3,48
	2,02	4,79	9,47
	1,03	1,11	10,51
	0,62	4,28	10,54
	5,73	7,58	9,36
	3,52	14,46	5,61
	2,38	5,37	9,18
	2,19	7,11	8,52
	5,99	8,90	6,72
	4,45	7,28	6,62
	3,71	7,41	6,93
	3,17	7,55	8,65
	6,66	7,12	7,07
	6,78	8,19	9,49
	6,21	9,16	8,73
Média:	3,84	6,69	8,23
EPM:	0,51	0,74	0,49

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Horas	2	158,75	79,37	13,322 ***
Erro	45	268,10	5,96	
Total	47	426,84		

cv = 38,99 %. ***= P<0,001.

Anexo 3.5. Variação da concentração de alcalóides ($\mu\text{g/ml}$) no suco ruminal incubado *in vitro*. e respectivas análises de variância e significância.

	Horas		
	0	24	48
84,86	73,04	75,91	
52,25	93,14	44,72	
100,28	46,34	108,60	
53,07	73,73	104,11	
84,92	56,32	76,74	
86,36	102,94	80,55	
71,70	105,26	61,64	
77,46	96,17	73,12	
84,03	78,21	65,46	
83,47	69,66	69,22	
65,39	92,93	78,88	
76,95	76,41	80,39	
84,32	79,82	101,54	
105,71	65,18	104,63	
118,79	74,02	104,99	
99,67	61,23	92,80	
Média:	83,08	77,77	82,71
EPM:	4,30	4,05	4,45

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Horas	2	280,35	140,18	0,45 ns
Erro	45	14065,67	312,57	
Total	47	14346,02		

cv = 21,78 %. ns=não significativo.

Anexo 4.1. Ingestão de MS/Kg^{0,75} de ovelhas Serra da Estrela suplementadas com 0, 15 ou 30% de tremocilha brava e respectivas análise de variância e significância..

Blocos	0% TB	15% TB	30% TB
1	90,52	93,44	55,52
2	60,67	47,51	77,40
3	88,44	60,44	75,48
4	64,44	71,08	52,15
5	54,56	82,25	85,49
6	86,88	60,03	59,84
Média	74,25	69,13	67,65
EPM	5,99	6,22	5,06

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Blocos	5	775,38	155,08	0,55 ns
Tratamentos	2	144,19	72,09	0,25 ns
Erro	10	2834,29	283,43	
Total	17	3753,86		

cv=23,93%. ns=não significativo.

Anexo 4.2. Estimativa da energia metabolizável (Mcal/d) ingerida por ovelhas Serra da Estrela suplementadas com 0, 15 ou 30% de tremocilha brava e respectivas análises de variância e significância..

Blocos	0% TB	15% TB	30% TB
1	3,85	4,30	2,57
2	2,46	2,17	2,97
3	3,68	2,66	3,01
4	2,66	3,24	2,61
5	2,44	2,94	3,62
6	3,00	2,49	2,56
Média	3,02	2,97	2,89
EPM	0,23	0,28	0,15

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Blocos	5	2,03	0,41	1,15 ns
Tratamentos	2	0,05	0,02	0,07 ns
Erro	10	3,53	0,35	
Total	17	5,60		

cv= 20,09%. ns=não significativo.

Anexo 4.3. Estimativa da energia metabolizável (Mcal/d) consumida por ovelhas Serra da Estrela suplementadas com 0, 15 ou 30% tremocilha brava e respectivas análises de variância e significância..

Blocos	0% TB	15% TB	30% TB
1	3,30	3,77	2,91
2	2,64	2,67	2,80
3	2,75	2,37	2,35
4	2,63	2,55	2,65
5	2,38	2,26	2,76
6	2,17	2,20	2,12
Média	2,65	2,64	2,60
EPM	0,14	0,22	0,11

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Blocos	5	2,27	0,45	7,25 **
Tratamentos	2	0,007	0,003	0,07 ns
Erro	10	0,62	0,06	
Total	17	2,90		

cv=9,51 %. ns=não significativo. **= P<0,01.

Anexo 4.4. Estimativa do balanço energético (Mcal/d) em ovelhas Serra da Estrela suplementadas com 0, 15 ou 30% de tremocilha brava e respectivas análises de variância e significância.

Blocos	0% TB	15% TB	30% TB
1	0,57	0,53	-0,35
2	-0,18	-0,50	0,18
3	0,93	0,28	0,66
4	0,03	0,69	-0,04
5	0,06	0,68	0,86
6	0,82	0,29	0,44
Média	0,37	0,33	0,29
EPM	0,17	0,17	0,17

Origem da Variação	G.L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Blocos	5	1,28	0,26	1,43 ns
Tratamentos	2	0,02	0,01	0,05 ns
Erro	10	1,79	0,18	
Total	17	3,09		

cv=128,07%. ns=não significativo.

Anexo 4.5. Estimativa da PB (g/d) ingerida por ovelhas Serra da Estrela suplementadas com 0, 15 ou 30% de tremocilha brava e respectivas análises de variância e significância.

Blocos	0% TB	15% TB	30% TB
1	317	344	207
2	203	173	239
3	303	213	242
4	219	259	210
5	201	235	291
6	248	191	206
Média	249	236	233
EPM	18,40	22,80	12,26

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Blocos	5	13670,28	2734,06	1,17 ns
Tratamentos	2	855,11	427,56	0,18 ns
Erro	10	23319,56	2331,96	
Total	17	37844,94		

cv=20,21 %. ns=não significativo.

Anexo 4.6. Estimativa da PB (g/d) consumida por ovelhas Serra da Estrela suplementadas com 0, 15 ou 30% de tremocilha brava e respectivas análises de variância e significância.

Blocos	0% TB	15% TB	30% TB
1	125	139	117
2	106	109	109
3	110	99	98
4	106	106	110
5	101	93	110
6	89	96	93
Média	106	107	106
EPM	4,38	6,26	3,31

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Blocos	5	1975,78	395,16	7,60 **
Tratamentos	2	2,78	1,39	0,03 ns
Erro	10	519,89	51,99	
Total	17	2498,44		

cv=6,77 %. ns=não significativo.

Anexo 4.7. Estimativa do balanço proteico (g/d) em ovelhas Serra da Estrela suplementadas com 0, 15 ou 30% de tremocilha brava e respectivas análises de variância e significância.

Blocos	0% TB	15% TB	30% TB
1	192	205	90
2	97	64	130
3	193	114	144
4	113	153	100
5	100	142	181
6	159	95	113
Média	142	129	126
EPM	16,68	18,35	12,36

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Blocos	5	8262,50	1652,50	0,85 ns
Tratamentos	2	889,00	444,50	0,23 ns
Erro	10	19389,00	1938,90	
Total	17	28540,50		

cv=33,23%. ns=não significativo.

Anexo 4.8. Alteração de peso vivo de ovelhas Serra da Estrela suplementadas com 0, 15 ou 30 % de tremocilha brava e respectivas análises de variância e significância.

Blocos	0% TB	15% TB	30% TB
1	0,50	-2,00	0,00
2	1,00	0,00	-2,40
3	0,75	5,00	-2,50
4	4,00	-1,90	4,00
5	1,50	0,30	-0,50
6	3,00	4,50	1,00
Média	1,79	0,98	-0,07
EPM	0,52	1,14	0,90

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Blocos	5	27,30	5,46	0,93 ns
Tratamentos	2	10,42	5,21	0,88 ns
Erro	10	58,88	5,89	
Total	17	96,60		

cv=268,78%. ns=não significativo.

Anexo 4.9. Produção de leite (g/d) de ovelhas Serra da Estrela suplementadas com 0, 15 ou 30 % de tremocilha brava e respectivas análises de covariância e significância.

Blocos	Covariável (X) e Variável (Y)	0% TB	15% TB	30% TB
1	X*	1100	1165	730
	Y**	766	985	548
2	X	690	710	730
	Y	461	351	463
3	X	613	636	655
	Y	423	259	268
4	X	543	503	611
	Y	402	289	456
5	X	440	444	470
	Y	195	101	262
6	X	390	231	429
	Y	263	294	82
Média	X	629	615	604
	Y	418	380	347
EPM	X	95	118	48
	Y	74	115	64

* Média do período de pré-experimental. ** Média do período experimental.

Origem da Variação	g.l.	S.P.C.*			Y ajustado por X			
		XX	XY	YY	g.l.	SQ	QM	F
Total	17	912159,8	809959,9	836946,4				
Repetições	5	706303,8	654006,2	662416,4				
Tratamentos	2	439,1	1105,6	15506,8				
Erro	10	205416,9	154848,1	159023,2	9	42295,1	4699,5	
Tratamento + Erro	12	205856,0	155953,7	174530,0	11	56381,7		
Tratamento Ajustado					2	14086,6	7043,3	1,5 ns

cv=17,95 %. ns=não significativo. *= Soma dos produtos cruzados.

Anexo 4.10. Teor em Sólidos Totais (%) do leite de ovelhas Serra da Estrela suplementadas com 0, 15 ou 30 % de tremocilha brava e respectivas análises de variância e significância.

Blocos	0% TB	15% TB	30% TB
1	22,06	18,65	22,15
2	21,83	20,33	21,00
3	20,42	23,10	18,28
4	20,46	18,03	23,42
5	23,59	18,59	17,50
6	18,85	16,32	17,96
Média	21,20	19,17	20,05
EPM	0,61	0,86	0,92

Origem da Variação	G.de L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Blocos	5	23,72	4,74	1,00 ns
Tratamentos	2	12,46	6,23	1,32 ns
Erro	10	47,26	4,73	
Total	17	83,44		

cv=10,79%. ns=não significativo.

Anexo 4.11. Teor em PB (%) do leite de ovelhas Serra da Estrela suplementadas com 0, 15 ou 30 % de tremocilha brava e respectivas análises de variância e significância.

Blocos	0% TB	15% TB	30% TB
1	8,13	6,07	6,61
2	6,97	6,38	7,00
3	7,23	7,62	6,28
4	6,81	6,73	7,45
5	7,53	6,48	5,61
6	6,72	6,20	5,45
Média	7,23	6,58	6,35
EPM	0,20	0,21	0,28

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Blocos	5	1,85	0,37	0,96 ns
Tratamentos	2	2,52	1,26	3,26 ns
Erro	10	3,86	0,39	
Total	17	8,24		

cv=9,25 %. ns=não significativo.

Anexo 4.12. Teor em gordura (%) do leite de ovelhas Serra da Estrela suplementadas com 0, 15 ou 30 % de tremocilha brava e respectivas análises de variância e significância.

Blocos	0% TB	15% TB	30% TB
1	9,21	6,99	10,51
2	10,27	8,90	9,00
3	8,21	11,14	6,86
4	8,61	6,12	11,27
5	11,86	6,93	6,69
6	6,90	6,32	7,82
Média	9,18	7,73	8,72
EPM	0,64	0,72	0,71

Origem da Variação	G.L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Blocos	5	9,99	2,00	0,48 ns
Tratamentos	2	6,52	3,26	0,78 ns
Erro	10	41,89	4,19	
Total	17	58,41		

cv=23,96%. ns=não significativo.

Anexo 4.13. Teor em ácido láctico (%) do leite de ovelhas Serra da Estrela suplementadas com 0, 15 ou 30 % de tremocilha brava e respectivas análises de variância e significância.

Blocos	0% TB	15% TB	30% TB
1	0,30	0,24	0,26
2	0,26	0,27	0,28
3	0,32	0,27	0,23
4	0,24	0,28	0,25
5	0,25	0,27	0,24
6	0,26	0,20	0,23
Média	0,27	0,25	0,25
EPM	0,01	0,01	0,01

Origem da Variação	G. de L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Blocos	5	$3,83 \cdot 10^{-3}$	$7,65 \cdot 10^{-4}$	1,09 ns
Tratamentos	2	$1,77 \cdot 10^{-3}$	$8,84 \cdot 10^{-4}$	1,26 ns
Erro	10	$7,03 \cdot 10^{-3}$	$7,03 \cdot 10^{-4}$	
Total	17	$1,26 \cdot 10^{-2}$		

cv=10,28%. ns=não significativo.

Anexo 4.14. Teor em lactose (%) do leite de ovelhas Serra da Estrela suplementadas com 0, 15 ou 30 % de tremocilha brava e respectivas análises de variância e significância.

Blocos	0% TB	15% TB	30% TB
1	4,02	4,89	4,33
2	3,74	4,34	4,00
3	4,28	3,64	4,45
4	4,34	4,48	3,86
5	3,50	4,50	4,50
6	4,37	3,10	4,00
Média	4,04	4,16	4,26
EPM	0,13	0,25	0,10

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Blocos	5	0,55	0,11	0,42 ns
Tratamentos	2	0,15	0,07	0,28 ns
Erro	10	2,62	0,26	
Total	17	3,32		

cv=12,33%. ns=não significativo

Anexo 4.15. Teor em caseína (%) do leite de ovelhas Serra da Estrela suplementadas com 0, 15 ou 30 % de tremocilha brava e respectivas análises de variância e significância.

Blocos	0% TB	15% TB	30% TB
1	6,90	5,51	5,77
2	6,11	5,64	6,00
3	6,08	6,17	5,47
4	5,78	6,02	6,29
5	6,34	6,13	4,91
6	5,90	5,65	5,33
Média	6,19	5,85	5,65
EPM	0,15	0,11	0,19

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Blocos	5	0,40	0,08	0,40 ns
Tratamentos	2	0,87	0,44	2,02 ns
Erro	10	2,16	0,22	
Total	17	3,42		

cv=7,87 %. ns=não significativo.

Anexo 4.16. Teor em cinzas (%) do leite de ovelhas Serra da Estrela suplementadas com 0, 15 ou 30 % de tremocilha brava e respectivas análises de variância e significância.

Blocos	0% TB	15% TB	30% TB
1	0,89	0,91	1,00
2	0,87	0,87	0,91
3	0,91	0,97	0,94
4	0,81	0,95	1,00
5	0,95	1,10	0,94
6	0,97	1,00	0,96
Média	0,90	0,97	0,96
EPM	0,02	0,03	0,01

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Blocos	5	$2,46 \cdot 10^{-2}$	$4,92 \cdot 10^{-3}$	1,63 ns
Tratamentos	2	$1,58 \cdot 10^{-2}$	$7,92 \cdot 10^{-3}$	2,62 ns
Erro	10	$3,02 \cdot 10^{-2}$	$3,02 \cdot 10^{-3}$	
Total	17	$7,07 \cdot 10^{-2}$		

cv=5,84 %. ns=não significativo.

Anexo 4.17. Teor em cálcio (%) do leite de ovelhas Serra da Estrela suplementadas com 0, 15 ou 30 % de tremocilha brava e respectivas análises de variância e significância.

Blocos	0% TB	15% TB	30% TB
1	0,25	0,25	0,18
2	0,16	0,14	0,25
3	0,20	0,23	0,14
4	0,25	0,16	0,30
5	0,24	0,14	0,20
6	0,21	0,23	0,14
Média	0,22	0,19	0,20
EPM	0,01	0,02	0,02

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Blocos	5	$7,29 \cdot 10^{-3}$	$1,46 \cdot 10^{-3}$	0,46 ns
Tratamentos	2	$2,18 \cdot 10^{-3}$	$1,09 \cdot 10^{-3}$	0,34 ns
Erro	10	$3,18 \cdot 10^{-2}$	$3,18 \cdot 10^{-3}$	
Total	17	$4,12 \cdot 10^{-2}$		

cv=27,64 %. ns=não significativo.

Anexo 4.18. Teor em fósforo (%) do leite de ovelhas Serra da Estrela suplementadas com 0, 15 ou 30 % de tremocilha brava e respectivas análises de variância e significância.

Blocos	0% TB	15% TB	30% TB
1	0,16	0,12	0,12
2	0,13	0,12	0,16
3	0,13	0,13	0,12
4	0,15	0,13	0,16
5	0,14	0,12	0,15
6	0,13	0,12	0,12
Média	0,14	0,12	0,14
EPM	$5,00 \cdot 10^{-3}$	$2,00 \cdot 10^{-3}$	$8,00 \cdot 10^{-3}$

Origem da Variação	G.L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Blocos	5	$1,03 \cdot 10^{-3}$	$2,06 \cdot 10^{-4}$	1,03 ns
Tratamentos	2	$1,01 \cdot 10^{-3}$	$5,06 \cdot 10^{-4}$	2,54 ns
Erro	10	$1,99 \cdot 10^{-3}$	$1,99 \cdot 10^{-4}$	
Total	17	$4,03 \cdot 10^{-3}$		

cv=10,53 %. ns=não significativo.

Anexo 4.19. pH do leite de ovelhas Serra da Estrela suplementadas com 0, 15 ou 30 % de tremocilha brava e respectivas análises de variância e significância.

Blocos	0% TB	15% TB	30% TB
1	6,63	6,54	6,71
2	6,69	6,97	6,66
3	6,49	6,67	6,93
4	6,76	6,66	6,83
5	6,84	6,65	6,63
6	6,66	7,33	6,93
Média	6,68	6,80	6,78
EPM	0,04	0,11	0,05

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Blocos	5	0,21	0,04	1,10 ns
Tratamentos	2	0,05	0,03	0,69 ns
Erro	10	0,39	0,04	
Total	17	0,65		

cv=2,91 %. ns=não significativo.

Anexo 4.20. Teor em ureia (mg/Kg) do leite de ovelhas Serra da Estrela suplementadas com 0, 15 ou 30 % de tremocilha brava e respectivas análises de variância e significância.

Blocos	0% TB	15% TB	30% TB
1	445	519	544
2	555	649	535
3	641	508	459
4	582	652	415
5	539	601	477
6	574	583	584
Média	556	585	502
EPM	24	23	23

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Blocos	5	12993,11	2598,62	0,56 ns
Tratamentos	2	21259,11	10629,56	2,28 ns
Erro	10	46591,56	4659,16	
Total	17	80843,78		

cv=12,46 %. ns=não significativo.

Anexo 4.21. Teor em alcalóides (mg/Kg) do leite de ovelhas Serra da Estrela suplementadas com 0, 15 ou 30 % de tremocilha brava e respectivas análises de variância e significância.

Blocos	0% TB	15% TB	30% TB
1	-	3,21	8,79
2	-	1,74	5,00
3	-	0,94	2,68
4	-	2,11	3,74
5	-	3,25	8,72
6	-	0,07	4,36
Média	-	1,89	5,55
EPM	-	0,47	0,97

Origem da Variação	G.L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Blocos	5	33,97	6,79	4,43 ns
Tratamentos	1	40,25	40,25	26,23 **
Erro	5	7,67	1,53	
Total	11	81,90		

cv=33,32 %. ns=não significativo; **=P<0,01.

Anexo 4.22. Teor em lupinina (mg/Kg) do leite de ovelhas Serra da Estrela suplementadas com 0, 15 ou 30 % de tremocilha brava e respectivas análises de variância e significância.

Blocos	0% TB	15% TB	30% TB
1	-	1,96	8,43
2	-	1,62	4,00
3	-	0,73	2,05
4	-	1,63	3,37
5	-	2,25	5,87
6	-	0,07	4,12
Média	-	1,38	4,61
EPM	-	0,30	0,84

Origem da Variação	G.L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Blocos	5	19,35	3,87	2,12 ns
Tratamentos	1	31,24	31,24	17,12 **
Erro	5	9,12	1,82	
Total	11	59,72		

cv= 45,16 %. ns=não significativo; **=P<0,01.

Anexo 4.23. Teor em lupanina (mg/Kg) do leite de ovelhas Serra da Estrela suplementadas com 0, 15 ou 30 % de tremocilha brava e respectivas análises de variância e significância.

Blocos	0% TB	15% TB	30% TB
1	-	1,24	0,35
2	-	$8,90 \cdot 10^{-2}$	1,00
3	-	0,20	0,63
4	-	0,49	0,17
5	-	1,00	2,86
6	-	0,00	0,24
Média	-	0,50	0,90
EPM	-	0,19	0,38

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Blocos	5	4,16	0,83	1,74 ns
Tratamentos	1	0,47	0,47	0,98 ns
Erro	5	2,39	0,48	
Total	11	7,02		

cv= 98,69 %. ns=não significativo.

Anexo 4.24. Teor em esparteína (mg/Kg) do leite de ovelhas Serra da Estrela suplementadas com 0, 15 ou 30 % de tremocilha brava e respectivas análises de variância e significância.

Blocos	0% TB	15% TB	30% TB
1	-	0,00	$1,50 \cdot 10^{-2}$
2	-	$2,50 \cdot 10^{-2}$	0,00
3	-	0,00	0,00
4	-	0,00	0,20
5	-	0,00	0,00
6	-	0,00	0,00
Média	-	$4,17 \cdot 10^{-3}$	$4,63 \cdot 10^{-2}$
EPM	-	$4,00 \cdot 10^{-3}$	0,03

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Blocos	5	$1,67 \cdot 10^{-2}$	$3,34 \cdot 10^{-3}$	1,04 ns
Tratamentos	1	$5,33 \cdot 10^{-3}$	$5,33 \cdot 10^{-3}$	1,67 ns
Erro	5	$1,60 \cdot 10^{-2}$	$3,20 \cdot 10^{-3}$	
Total	11	$3,80 \cdot 10^{-2}$		

cv= 224,00 %. ns=não significativo.

Anexo 4.25. Taxa de recuperação da lupinina (%) no leite de ovelhas Serra da Estrela suplementadas com 15% ou 30% de tremocilha brava e respectivas análises de variância e significância.

Blocos	0% TB	15% TB	30% TB
1	-	$7,20 \cdot 10^{-2}$	0,10
2	-	$3,50 \cdot 10^{-2}$	$6,30 \cdot 10^{-2}$
3	-	$9,00 \cdot 10^{-3}$	$1,60 \cdot 10^{-2}$
4	-	$2,40 \cdot 10^{-2}$	$2,40 \cdot 10^{-2}$
5	-	$4,00 \cdot 10^{-2}$	$7,20 \cdot 10^{-2}$
6	-	$3,00 \cdot 10^{-4}$	$8,00 \cdot 10^{-3}$
Média	-	$3,10 \cdot 10^{-2}$	$4,70 \cdot 10^{-2}$
EPM	-	0,01	0,01

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Blocos	5	0,01	$2,01 \cdot 10^{-3}$	23,91 **
Tratamentos	1	$7,79 \cdot 10^{-4}$	$7,79 \cdot 10^{-4}$	9,26 *
Erro	5	$4,21 \cdot 10^{-4}$	$8,42 \cdot 10^{-3}$	
Total	11	$1,13 \cdot 10^{-2}$		

cv= 23,46 %. *=P<0,05; **=P<0,01..

Anexo 4.26. Taxa de recuperação da lupanina (%) no leite de ovelhas Serra da Estrela suplementadas com 15% ou 30% de tremocilha brava e respectivas análises de variância e significância.

Blocos	0% TB	15% TB	30% TB
1	-	1,16	$9,80 \cdot 10^{-2}$
2	-	$4,50 \cdot 10^{-2}$	0,45
3	-	$6,30 \cdot 10^{-2}$	0,12
4	-	0,17	$2,90 \cdot 10^{-2}$
5	-	0,41	0,83
6	-	0,00	$1,10 \cdot 10^{-2}$
Média	-	0,31	0,26
EPM	-	0,12	$8,50 \cdot 10^{-2}$

Origem da Variação	G.L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Blocos	5	0,77	0,15	1,04 ns
Tratamentos	1	$8,22 \cdot 10^{-3}$	$8,22 \cdot 10^{-3}$	$5,58 \cdot 10^{-2}$ ns
Erro	5	0,74	0,15	
Total	11	1,51		

cv= 135,95 %. ns=não significativo.

Anexo 4.27. Taxa de recuperação da esparteína (%) no leite de ovelhas Serra da Estrela suplementadas com 15% ou 30% de tremocilha brava e respectivas análises de variância e significância.

Blocos	0% TB	15% TB	30% TB
1	-	0,00	$3,00 \cdot 10^{-3}$
2	-	$9,00 \cdot 10^{-3}$	$1,60 \cdot 10^{-2}$
3	-	0,00	0,00
4	-	0,00	$2,40 \cdot 10^{-2}$
5	-	0,00	0,00
6	-	0,00	0,00
Média	-	$1,50 \cdot 10^{-3}$	$7,17 \cdot 10^{-3}$
EPM	-	$1,00 \cdot 10^{-3}$	$4,00 \cdot 10^{-3}$

Origem da Variação	G.L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Blocos	5	$3,80 \cdot 10^{-4}$	$7,59 \cdot 10^{-3}$	1,72 ns
Tratamentos	1	$9,63 \cdot 10^{-3}$	$9,63 \cdot 10^{-3}$	2,18 ns
Erro	5	$2,21 \cdot 10^{-4}$	$4,41 \cdot 10^{-3}$	
Total	11	$6,97 \cdot 10^{-4}$		

cv= 135,95 %. ns=não significativo.

Anexo 5.1. Resíduo Seco (%) de Queijo de Serpa obtido a partir de leite com quantidades crescentes de alcalóides de tremocilha brava.

	Alcalóides(mg/Kg leite)				
	0	1	3	6	7
	57,70	52,20	53,70	54,90	58,30
	56,90	50,08	53,60	57,20	56,20
	55,40		54,80	55,70	
	55,10		53,30	56,90	
	54,30				
	56,60				
	54,90				
	55,70				
Média=	57,25	51,50	53,85	56,18	57,25
EPM=	0,40	0,70	0,33	0,53	1,05

Origem da Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Tratamento	4	50,00	12,50	10,98***
Erro	15	17,08	1,14	
Total	19	67,08		

cv=1,93%. ***=P<0,001.

Anexo 5.2. HRQIMG (%) de Queijo de Serpa obtido a partir de leite com quantidades crescentes de alcalóides de tremocilha brava.

	Alcalóides (mg/Kg leite)				
	0	1	3	6	7
	57,90	65,30	62,60	61,40	61,00
	57,50	65,60	61,70	58,60	63,80
	59,70		61,50	60,50	
	60,30		61,90	59,90	
	60,80				
	57,90				
	60,00				
	59,90				
Média=	59,25	65,45	61,93	60,10	62,40
EPM=	0,45	0,15	0,24	0,59	1,40

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Tratamento	4	74,45	18,61	13,83***
Erro	15	20,19	1,35	
Total	19	94,64		

cv=1,91%. ***=P<0,001.

Anexo 5.3. Matéria Gorda (%) de Queijo de Serpa obtido a partir de leite com quantidades crescentes de alcalóides de tremocilha brava.

	Alcalóides (mg/Kg leite)				
	0	1	3	6	7
	27,00	26,80	26,00	26,50	31,80
	25,00	24,80	24,80	27,00	31,30
	25,30		26,50	26,80	
	25,50		24,50	28,00	
	24,80				
	25,00				
	24,80				
	26,00				
Média=	25,43	25,80	25,45	27,08	31,55
EPM=	0,27	1,00	0,48	0,33	0,25

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Tratamento	4	66,80	16,70	24,80***
Erro	15	10,10	0,67	
Total	19	76,90		

cv=3,11%. ***=P<0,001.

Anexo 5.4. MGRRS (%) de Queijo de Serpa obtido a partir de leite com quantidades crescentes de alcalóides de tremocilha brava.

	Alcalóides (mg/Kg leite)				
	0	1	3	6	7
	46,80	51,30	48,40	48,30	54,50
	43,90	48,80	46,30	47,20	55,70
	45,70		48,40	48,10	
	46,30		46,00	49,20	
	45,70				
	44,10				
	45,20				
	46,70				
Média=	45,55	50,05	47,28	48,20	55,10
EPM=	0,39	1,25	0,65	0,41	0,60

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Tratamento	4	158,93	39,73	30,70***
Erro	15	19,41	1,29	
Total	19	178,34		

cv=2,38%. ***=P<0,001.

Anexo 5.5. PB (%) de Queijo de Serpa obtido a partir de leite com quantidades crescentes de alcalóides de tremocilha brava.

	Alcalóides (mg/Kg leite)				
	0	1	3	6	7
	25,90	21,70	21,10	21,00	15,70
	26,20	20,80	16,60	21,70	19,10
	25,50		25,50	22,30	
	24,20		21,70	21,70	
	23,60				
	26,80				
	26,80				
	24,90				
Média=	25,49	21,25	21,23	21,68	17,40
EPM=	0,42	0,45	1,82	0,27	1,70

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Tratamento	4	135,38	33,84	8,96 **
Erro	15	56,63	3,78	
Total	19	192,01		

cv=8,58%. **=P<0,01.

Anexo 5.6. N solúvel (%) de Queijo de Serpa obtido a partir de leite com quantidades crescentes de alcalóides de tremocilha brava.

	Alcalóides (mg/Kg leite)				
	0	1	3	6	7
	1,40	0,80	1,00	0,60	0,55
	1,40	0,80	0,90	0,60	0,60
	1,30		0,90	0,60	
	1,10		0,90	0,60	
	1,10				
	1,20				
	1,30				
	1,35				
Média=	1,27	0,80	0,93	0,60	0,58
EPM=	0,04	0,00	0,03	0,00	0,03

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Tratamento	4	1,63	0,41	53,94 ***
Erro	15	0,11	7,56.10 ⁻³	
Total	19	1,75		

cv=9,15%. ***=P<0,001.

Anexo 5.7. Coeficiente de Maturação de Queijo de Serpa obtido a partir de leite com quantidades crescentes de alcalóides de tremocilha brava.

	Alcalóides (mg/Kg leite)				
	0	1	3	6	7
	34,60	23,60	30,30	18,20	24,00
	34,20	24,70	34,60	17,60	20,10
	32,50		22,50	17,10	
	28,90		26,50	17,60	
	29,70				
	28,50				
	31,00				
	33,30				
Média=	31,59	24,15	28,48	17,63	22,05
EPM=	0,85	0,55	2,59	0,23	1,95

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Tratamento	4	588,36	147,09	17,03 ***
Erro	15	129,59	8,64	
Total	19	717,96		

cv=11,10%. ***=P<0,001.

Anexo 5.8. Teor em cloretos de Queijo de Serpa obtido a partir de leite com quantidades crescentes de alcalóides de tremocilha brava.

	Alcalóides (mg/Kg leite)				
	0	1	3	6	7
	1,30	3,00	2,90	3,50	4,90
	1,30	3,30	2,90	3,70	4,10
	1,90		3,00	3,20	
	1,50		3,20	3,70	
	1,50				
	1,50				
Média=	1,50	3,15	3,00	3,53	4,50
EPM=	0,09	0,15	0,07	0,12	0,40

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Tratamento	4	18,43	4,61	71,94 ***
Erro	13	0,83	0,06	
Total	17	19,26		

cv=9,03%. ***=P<0,001.

Anexo 5.9. Teor em lupinina ($\mu\text{g}/100\text{g}$) de Queijo de Serpa obtido a partir de leite com quantidades crescentes de alcalóides de tremocilha brava.

	Alcalóides (mg/Kg leite)				
	0	1	3	6	7
	0,00	151,07	315,74	1393,60	1162,34
	0,00	196,94	288,12	1090,03	870,51
	0,00		184,94	792,85	
	0,00		338,42	1205,08	
	0,00				
	0,00				
	0,00				
	0,00				
Média=	0,00	174,00	281,80	1120,39	1016,42
EPM=	0,00	22,94	33,89	125,84	145,91

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Tratamento	4	4273819,00	1068455,00	64,77 ***
Erro	15	247432,50	16495,50	
Total	19	4521251,00		

cv=32,15%. ***=P<0,001.

Anexo 5.10. Flora mesófila (unidades formadoras de colónias) de Queijo de Serpa obtido a partir de leite com quantidades crescentes de alcalóides de tremocilha brava.

Alcalóides (mg/Kg leite)					
	0	1	3	6	7
	1,02.10 ^y	6,10.10 ^s	8,60.10 ^s	1,24.10 ^y	1,20.10 ^y
	1,02.10 ^y	7,70.10 ^s	1,00.10 ^y	1,20.10 ^y	9,90.10 ^y
	1,02.10 ^y		7,20.10 ^s	5,30.10 ^s	
	4,00.10 ^s		8,30.10 ^s	9,50.10 ^s	
	8,50.10 ^s				
	3,90.10 ^s				
	4,40.10 ^s				
	7,00.10 ^s				
Média=	7,30.10 ^s	6,90.10 ^s	8,53.10 ^s	9,80.10 ^s	5,55.10 ^y
EPM=	1,01.10 ^s	8,00.10 ^y	5,76.10 ^y	1,63.10 ^s	4,35.10 ^y

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Tratamento	4	1,22.10 ¹⁸	3,06.10 ¹⁷	4,82 *
Erro	15	9,52.10 ¹⁷	6,35.10 ¹⁰	
Total	19	2,17.10 ¹⁸		

cv=34,37%. * =P<0,05

Anexo 5.11. Classificação da forma de Queijo de Serpa obtido a partir de leite com quantidades crescentes de alcalóides de tremocilha brava.

Alcalóides (mg/Kg leite)					
	0	1	3	6	7
	3,10	3,50	2,90	2,90	0,70
	3,20	3,10	3,50	2,90	0,70
	2,80		3,50	3,30	
	2,60		3,20	2,60	
	2,60				
	2,50				
	2,60				
	2,80				
Média=	2,78	3,30	3,28	2,93	0,70
EPM=	0,09	0,20	0,14	0,14	0,00

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Tratamento	4	10,24	2,56	37,28 ***
Erro	15	1,03	0,07	
Total	19	11,27		

cv=9,53 %. ***=P<0,001.

Anexo 5.12. Classificação da crosta de Queijo de Serpa obtido a partir de leite com quantidades crescentes de alcalóides de tremocilha brava.

Alcalóides (mg/Kg leite)					
	0	1	3	6	7
	3,20	3,40	3,30	3,00	2,10
	3,20	3,40	3,60	2,80	2,00
	3,10		3,60	2,90	
	2,90		3,50	2,70	
	3,20				
	3,00				
	2,90				
	3,30				
Média=	3,10	3,40	3,50	2,85	2,05
EPM=	0,05	0,00	0,07	0,06	0,05

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Tratamento	4	3,23	0,81	44,11 ***
Erro	15	0,28	0,02	
Total	19	3,51		

cv=4,43 %. ***=P<0,001.

Anexo 5.13. Classificação da pasta de Queijo de Serpa obtido a partir de leite com quantidades crescentes de alcalóides de tremocilha brava.

	Alcalóides (mg/Kg leite)				
	0	1	3	6	7
	4,50	5,10	5,20	4,50	2,90
	4,40	5,00	5,10	4,20	3,00
	4,20		5,20	4,30	
	4,90		5,20	4,20	
	4,50				
	4,90				
	4,60				
	4,80				
Média=	4,60	5,05	5,18	4,30	2,95
EPM=	0,09	0,05	0,03	0,07	0,05

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Tratamento	4	7,45	1,86	53,97 ***
Erro	15	0,52	0,03	
Total	19	7,97		

cv=4,10 %. ***=P<0,001.

Anexo 5.14. Classificação do sabor/aroma de Queijo de Serpa obtido a partir de leite com quantidades crescentes de alcalóides de tremocilha brava.

	Alcalóides (mg/Kg leite)				
	0	1	3	6	7
	3,90	4,40	5,10	4,20	2,40
	4,00	4,00	4,80	4,30	2,20
	3,90		4,90	4,00	
	4,20		4,70	4,10	
	4,70				
	3,90				
	4,20				
	4,00				
Média=	4,10	4,20	4,88	4,15	2,30
EPM=	0,10	0,20	0,09	0,06	0,10

Origem da Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Tratamento	4	8,91	2,23	44,12 ***
Erro	15	0,76	0,05	
Total	19	9,67		

cv=5,49 %. ***=P<0,001.

Anexo 5.15. Classificação total de Queijo de Serpa obtido a partir de leite com quantidades crescentes de alcalóides de tremocilha brava.

	Alcalóides (mg/Kg leite)				
	0	1	3	6	7
	14,80	16,40	16,50	14,50	8,10
	14,80	15,50	17,10	14,20	8,00
	13,90		17,10	14,50	
	14,70		16,60	13,60	
	15,00				
	14,40				
	14,30				
	14,90				
Média=	14,60	15,95	16,83	14,20	8,05
EPM=	0,13	0,45	0,16	0,21	0,05

Origem da Variação	G.de L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
Tratamento	4	109,41	27,35	185,03 ***
Erro	15	2,22	0,15	
Total	19	111,63		

cv=2,66 %. ***=P<0,001.