

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

ANDRESSA SANTANNA NATEL

**Nitrato na dieta de ruminantes como estratégia nutricional para
mitigação de metano entérico**

Piracicaba

2016

ANDRESSA SANTANNA NATEL

**Nitrato na dieta de ruminantes como estratégia nutricional para
mitigação de metano entérico**

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

**Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear
na Agricultura da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências**

**Área de Concentração: Energia Nuclear na
Agricultura e no Ambiente**

Orientador: Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla

Piracicaba

2016

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Natel, Andressa Santanna

Nitrato na dieta de ruminantes como estratégia nutricional para mitigação de metano entérico / Andressa Santanna Natel; orientador Adibe Luiz Abdalla. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.

122 p.: il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo.

1. Ácidos graxos 2. Efeito estufa 3. Fermentação 4. Gases 5. Metamoglobinemia animal 6. Ovinos 7. Rúmen 8. Suplementos nitrogenados para animais I. Título

CDU 599.735 : 636.085.2

Aos meus pais, **Luiz Carlos** (*in memoriam*) e **Vera Lúcia**, fonte de minha coragem e capacidade de enfrentar as dificuldades da vida.

Ao querido **Rafael Meneghini** que é um pouquinho de saúde, um descanso na loucura.

Dedico

Aos meus tios, **Zita e Ivo**, pelo afeto que sempre dedicaram a mim.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pelo milagre de todos os dias.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura - Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização do meu doutorado em uma instituição tão valorosa.

À Universidade Federal do Paraná e Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina e Veterinária e Zootecnia pela minha formação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de Doutorado e pela reserva técnica (Processo 2012/02592-0) que foi fundamental para o desenvolvimento deste projeto.

À GRASP Indústria & Comércio LTDA (Curitiba, PR, Brasil) por ceder o produto utilizado na minha pesquisa.

Ao professor e orientador Dr. Adibe Luiz Abdalla por ser mais que um orientador, ser um exemplo a ser seguido.

Ao professor e supervisor Dr. Jorge Madsen, *Copenhagen University*, pelos ensinamentos, paciência e acolhimento durante minha estada em seu departamento.

Ao Programa de Pós-Graduação e seus funcionários (Fábio, Daiane, Neuda, Sônia, Gilson, Alzira) e aos Professores Helder Louvandini, Regina Monteiro e Concepta McManus por toda a contribuição durante este doutorado.

Ao Doutor e Amigo Rafael Canonenco de Araujo, sumidade em nitrato no Brasil, pelo incentivo inicial na idealização deste trabalho e pelas valorosas contribuições durante a execução do mesmo.

Ao Mestre Tiago Paim pela preciosa ajuda nas análises estatísticas e por sempre estar disposto a rodar os dados a qualquer momento.

À Doutora Patrícia Louvandini pelas realizações das análises de PCR que enriqueceram este trabalho.

Ao zootecnista e produtor Francisco Borborema, **Fazenda Borborema**, pelo empréstimo dos animais *Ile de France* utilizados em uma das fases do projeto.

Aos funcionários e amigos do Laboratório de Nutrição Animal (Lana): Regina Peçanha, Lécio Castilho e Joaquim Everaldo dos Santos, Ana Claudia e Juliano Issakowicz, Lilian Fé, Erika Breda Canova, Heverton Moreira, Paulo Tavares, Adibe Luiz Abdalla Filho, Patrícia Pimentel, Alessandra Romero, Sammy Emmanuele, Tairon Pannunzio, Egon Hion Ieda, Carina Nazato, Fernanda Campos, Dinesh Dhanasekaran, Tiago Paim, Alinne Schumann, Leticia de Abreu Faria, Gabriel Sakita, Linander e Natasha. Obrigado pela ajuda sempre que necessário, pelos sorrisos gratuitos e por deixarem meus dias mais completos.

Às grandes amigas que a vida me deu Karen Yamashiro, Mariana Klank, Marcela Buosi e Adaiana Feltrin. A vida sem vocês é menos colorida.

À minha mãe Vera Lúcia, aos meus irmãos Anderson e Bianca Natel e a minha cunhada Catiane Natel, minha pequena família que sempre me acolhe com um coração tão grande.

Aos meus amados sobrinhos, Pedro Luís e Isabela Cristina, por fazerem minha vida mais alegre. A tia ama vocês cada dia mais!

Ao professor Dr. Rafael Meneghini pela ajuda nos fins de semana, correção de português e estar tão envolvido neste projeto quanto eu. Você me faz uma pessoa melhor.

Ao cão mais amado do mundo, Emílio Meneghini, por me fazer sentir especial a cada abano de rabo. Bichos são de Deus!

A todos que, direta ou indiretamente, ajudaram-me a finalizar esta etapa. Meu muito obrigado!

A curiosidade é um tipo de micuim que provoca coceira na
inteligência e a faz pesquisar.

Rubem Alves 1933- 2014

RESUMO

NATEL, A. S. **Nitrato na dieta de ruminantes como estratégia nutricional para mitigação de metano entérico.** 2016. 122 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

A produção de metano entérico está entre as principais fontes de emissão de gases de efeito estufa dentre as atividades agropecuárias, além de gerar perda energética ao animal de até 12% da energia bruta consumida. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de nitrato de cálcio encapsulado na alimentação de ruminantes como estratégia nutricional a mitigação de metano entérico. O experimento consistiu de duas fases. **Fase I:** Foram testadas dietas suplementadas com produto comercial de nitrato de cálcio encapsulado utilizando a técnica semiautomática de produção de gases *in vitro*. Meio grama de substrato com 50 mL de meio de incubação e 25 mL de inóculo ruminal foram incubados em frascos de vidro (160 mL) à 39 °C por 24 horas para determinação da melhor dieta a ser testada *in vivo*. O primeiro ensaio testou a associação entre a monensina (dietas com e sem adição de monensina) e doses de nitrato encapsulado (0; 1,5 e 3% da matéria seca (MS)) para mitigação de metano *in vitro*. Não foi observada interação entre monensina e nitrato para as variáveis testadas. O segundo ensaio *in vitro* testou a interação do tipo de dieta com duas relações concentrado:volumoso, 20:80 e 80:20, e a inclusão de doses de nitrato encapsulado (0; 1,5; 3 e 4,5% MS). Embora não foi observado efeito associativo entre dieta e nitrato para redução de metano, foi observada mudança nos produtos da fermentação ruminal, com redução de propionato, em decorrência da concorrência de nitrato e propianogênicas por hidrogênio mais escasso em dietas com menor fermentação. **Fase II:** Conforme os resultados obtidos na Fase I, na segunda fase foi avaliado o efeito associativo da relação de concentrado:volumoso da dieta e a dose de nitrato sobre a emissão de metano, constituintes ruminais e toxicidade do nitrato *in vivo*. Utilizou-se seis borregos canulados no rúmen, distribuídos em delineamento experimental quadrado latino 6 x 6, em fatorial 2 x 3. Os fatores foram tipo de dieta (relação concentrado:volumoso 20:80 e 80:20) e inclusão de doses de nitrato encapsulado na dieta (0; 1,5 e 3% MS) em substituição gradual ao farelo de soja, totalizando seis tratamentos. Os teores de substituição do farelo de soja pelo nitrato foram em equivalente proteico de maneira a deixar as dietas isonitrogenadas. Os animais foram adaptados gradualmente a oferta de nitrato dietético para evitar problemas com toxidez. A análise de toxicidade foi avaliada pela taxa de metahemoglobina no sangue dos ovinos 3 horas após a alimentação. Nitrato reduziu a produção de metano em ambas as dietas. Os níveis de metahemoglobina no sangue dos animais não foram alterados pela adição de nitrato. Foi observado efeito associativo entre o tipo de dieta e nitrato para os produtos da fermentação ruminal, como acetato, que aumentou linearmente nas dietas com 80% de concentrado quando nitrato foi adicionado. Concluí-se que nitrato, utilizado de forma segura, é uma promissora estratégia para redução de metano entérico independentemente do tipo de dieta com que está sendo suplementado.

Palavras-chave: Fermentação ruminal. Nitrato encapsulado. Nitrogênio não-proteico. População microbiana. Produção de gases. Ovinos.

ABSTRACT

NATEL, A. S. **Nitrate in the ruminant nutrition as a strategy for mitigation of enteric methane.** 2016. 122 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

Production of enteric methane is among the leading sources of greenhouse gas emissions from agricultural activities and generate energy loss to the animal up to 12% of gross energy consumption. The objective of this study was to evaluate the use of calcium nitrate encapsulated in ruminant feed as a nutritional strategy for mitigation of enteric methane. The experiment consisted of two phases. **Phase I:** tested diets were supplemented with encapsulated calcium nitrate using a semi-automatic *in vitro* gas production technique Half gram of substrate with 50 mL of incubation medium, and 25 mL of rumen fluid were incubated in glass bottles (160 ml) at 39 °C for 24 hours to determine the best diets to be tested *in vivo*. The first trial tested the association between monensin (diets with and without monensin) and encapsulated nitrate levels (0, 1.5 and 3% of dry matter (DM)) for *in vitro* methane mitigation. There was no interaction between monensin and nitrate for the tested variables. The second *in vitro* assay tested the interaction of diet type with two concentrate:forage ratios, 20:80 and 80:20, and the inclusion of encapsulated nitrate levels (0, 1.5, 3 and 4.5% DM). Although it was not observed associative effect between diet and nitrate for reduction of methane, it was observed change in the ruminal fermentation products. **Phase II:** According to the results obtained in Phase I, in the second phase we evaluated the associative effect of concentrate: forage ratio of diet and the dose of nitrate on the methane emission, ruminal constituents and nitrate toxicity *in vivo*. We used six lambs cannulated in the rumen, distributed in Latin square design 6 x 6 in factorial 2 x 3. The factors were type of diet (concentrate:forage ratios 20:80 and 80:20) and inclusion of encapsulated nitrate doses in the diet (0, 1.5 and 3% DM) in the gradual replacement of soybean meal, a total of six treatments. The replacement levels of soybean meal by nitrate were in protein equivalent so as to leave the diets isonitrogenous. The animals were gradually adapted to dietary nitrate supply to avoid problems with toxicity. The analysis of toxicity were evaluated by the rate of methemoglobin in the blood of sheep 3 hours after feeding. Methemoglobin levels in blood of animals were not changed by the addition of nitrate. Associative effect was observed between the type of diet and nitrate for ruminal fermentation products such as acetate, which decreased linearly in the diets with 80% forage when nitrate was added. It can be concluded that nitrate used securely is a promising strategy for reducing enteric methane independently of the type of diet being supplemented.

Keywords: Fermentation. Gas production. Microbial population. Nitrate encapsulated. Non-protein nitrogen. Sheep.

LISTA DE ABREVIações

AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
ATP	Adenosina trifosfato
°C	Grau Celsius
C2	Ácido acético
C3	Ácido propiônico
C4	Ácido butírico
C2:C3	Relação acetato: propionato
Ca	Cálcio
CF	Carboidrato fibroso
CH ₄	Metano
CHOT	Carboidratos totais
CMO	Consumo de matéria orgânica
CMS	Consumo de matéria seca
CNF	Carboidrato não fibroso
CO ₂	Gás carbônico
DNTD	Digestão de nutrientes no trato digestório total
DP	Derivados de purina
EE	Extrato etéreo
EM	Energia metabolizável
FDA	Fibra em detergente ácido
FDN	Fibra em detergente neutro
FP	Fator de partição
G	Gramas
GEE	Gases de efeito estufa
h	Hora
H ₂	Gás Hidrogênio
Hb	Hemoglobina
H ₂ O	Água
H ₂ SO ₄ , N10	Ácido sulfúrico 10 N
kg	Quilogramas

kJ	Quilojoules
L	Litros
Met-Hb	Metahemoglobina
mm	Milímetros
mL	Mililitros
min	Minutos
MM	Matéria mineral
MO	Matéria orgânica
MON	Monensina
MOVD	Matéria orgânica verdadeiramente degradada
MS	Matéria seca
N	Nitrogênio
NH ₃	Amônia
N-NH ₃	Nitrogênio amoniacal
NNP	Nitrogênio não proteico
NO ₂ -	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
PB	Proteína bruta
PCH ₄	Produção de metano
PGT	Produção de gases total
P _L	Regressão linear
P _Q	Regressão quadrática
PNE	Produto nitrato encapsulado
S	Segundos

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
1.1.	Hipóteses	18
1.2.	Objetivos	18
2.	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1.	Impacto da pecuária nas emissões de gases no Brasil	20
2.2.	Efeito do nitrato na fermentação ruminal	21
2.3.	Nitrato e Metahemoglobulinemia	24
2.4.	Alternativas para redução de metano.....	24
3.	INTERAÇÃO ENTRE NITRATO ENCAPSULADO E MONENSINA SOBRE A EMIÇÃO DE METANO <i>IN VITRO</i>	31
3.1.	Introdução.....	33
3.2.	Material e Métodos.....	34
3.3.	Resultados	41
3.4.	Discussão.....	48
3.5.	Conclusão	50
	Referências	51
4.	NITRATO ENCAPSULADO EM DIETAS COM DIFERENTES RELAÇÕES CONCENTRADO:VOLUMOSO ALTERA A FERMENTAÇÃO RUMINAL E A PRODUÇÃO DE METANO <i>IN VITRO</i>	55
3.1	Introdução.....	57
3.2	Material e Métodos.....	58
3.3	Resultados.....	63
3.4	Discussão.....	67
3.5	Conclusão	73
	Referências	73
5.	EMIÇÃO DE METANO ENTÉRICO E CONSTITUINTES RUMINAIS EM OVINOS ALIMENTADOS COM DIETAS COM RELAÇÕES CONCENTRADO : VOLUMOSO CONTRASTANTES SUPLEMENTADAS COM NITRATO ENCAPSULADO.....	78
5.1.	Introdução.....	80
5.2.	Material e Métodos.....	81
5.3.	Resultados	90
5.4.	Discussão.....	103
5.5.	Conclusão	114
	Referências	114
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	122

1. INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com questões ambientais relacionadas ao desenvolvimento de pecuária sustentável tem sido foco de discussões e pesquisas visando fomentar soluções para a redução da emissão de gases de efeito estufa (GEE) como o metano (CH_4).

O metano é um gás naturalmente emitido pelos ruminantes durante o processo de digestão dos alimentos. Além do CH_4 , durante a fermentação ruminal são geradas grandes quantidades de ácidos graxos de cadeia curta, amônia e compostos indesejáveis como nitrato (NO_3^-), gás carbônico (CO_2) e hidrogênio (KOZLOSKI, 2009).

O hidrogênio (H_2), formado durante a produção de ácido acético e butírico, reage com o CO_2 e é removido do rúmen como CH_4 . Assim, uma das estratégias estudadas para reduzir a produção de metano entérico é fornecer alternativo aceptores de elétrons que consumam, de forma mais eficaz, equivalentes redutores produzidos durante a fermentação de modo a redimensionar o fluxo de elétrons da redução de CO_2 a CH_4 (ANDERSON; RASMUSSEN, 1998).

Nitrato, por exemplo, tem maior afinidade por H_2 do que o CO_2 . Deste modo, quando o NO_3^- está presente no rúmen, a formação de nitrito e amônia é favorecida sobre a produção de metano (UNGERFELD; KOHN, 2006). Além do benefício ambiental, outra vantagem do NO_3^- é a utilização da amônia gerada no anabolismo de aminoácidos das bactérias, importante fonte de nitrogênio para crescimento bacteriano (VAN ZIJDERVELD et al., 2010). Adicionalmente, a redução do NO_3^- é mais eficiente, energeticamente, que a metanogênese (GUO; SCHAEFER; GUO, 2009).

Apesar dos benefícios do uso do NO_3^- na alimentação de ruminantes, há preocupação com relação ao potencial efeito tóxico do nitrito, produto intermediário da redução de nitrato a amônia, ao animal (LENG, 2008), especialmente quando incluído em grandes quantidades na dieta com o objetivo de suprir a demanda ruminal por nitrogênio não-proteico (NNP). Embora, já seja conhecido que a adaptação gradual dos ruminantes evite os problemas com intoxicação, ainda não há um protocolo definido de adaptação a inclusão deste produto na dieta de ruminantes. O uso de nitrato de uma forma protegida, encapsulado, poderia diminuir a toxicidade do NO_3^- , ou seja, reduzir a acumulação de NO_2^- no rúmen (LEE et al., 2015b).

Em relação ao exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial do uso de nitrato encapsulado na dieta de ruminantes em substituição ao farelo de soja, como inibidor de metanogênese e minimizador do impacto ambiental.

1.1. Hipóteses

O presente estudo apresenta as seguintes hipóteses:

- A inclusão de nitrato de cálcio encapsulado na dieta de ruminantes reduz produção de metano ruminal por possibilitar uma via alternativa a metanogênese para eliminação de hidrogênio;
- A inclusão de nitrato em dietas com elevada relação de concentrado, comparada a dietas com elevada relação de fibra, possibilita maior redução de metano uma vez que o metano será reduzido por duas vias. Redução da metanogênese pela inclusão de nitrato que possibilita uma via alternativa para escape do hidrogênio o que compete com a formação de metano. Maior produção de propionato pela adição de concentrado, reduzindo a relação acetato:propionato, resultando em menor liberação de hidrogênio no meio.
- A inclusão de nitrato na dieta muda a microbiota ruminal, estimulando o crescimento de outras bactérias, nitrato e nitrito redutoras, e reduzindo o número de metanogênicas ruminais em decorrência da intoxicação por nitrito ou redução de H^+ do meio. A elevada relação de concentrado reduz a população de protozoários no rúmen.
- O perfil de ácidos graxos de cadeia curta é modificado em dietas com elevada relação de concentrado, produzindo mais propionato. Porém, a inclusão de nitrato nestas dietas reduz a produção de propionato pois nitrato compete com formação de ácido propiônico por hidrogênio.
- Adaptação prévia dos ruminantes com inclusão gradual de nitrato na dieta evita a intoxicação por acúmulo de nitrito no organismo.

1.2. Objetivos

Objetiva-se avaliar o uso de produto a base de nitrato de cálcio encapsulado como mitigador de metano entérico em ruminantes associado a outra alternativa nutricional mitigadora de metano, monensina ou alta proporção de concentrado, usando ovinos como espécie de modelo animal, sobre as características de fermentação ruminal, com ênfase na produção de gás metano, produção de ácidos graxos de cadeia curta e população microbiana, assim como definir a melhor quantidade de produto nitrato encapsulado (PNE) que pode ser fornecida para ovinos, com respeito à toxicidade e poder de mitigação de metano entérico.

Para avaliar a melhor dose de produto nitrato encapsulado associada a monensina ou alto teor de concentrado a ser utilizada na dieta de ruminantes em função do processo fermentativo e mitigação de metano ruminal, primeiramente, foram realizados dois ensaios *in vitro* de produção de gases. No primeiro foram testadas doses de inclusão de PNE (0, 1,5 % e 3 % da matéria seca) em dietas com e sem adição de monensina sódica; no segundo foi avaliado dose de inclusão de PNE (0, 1,5 %, 3 % e 4,5 % da matéria seca) em função a relação concentrado:volumoso da dieta (20:80 e 80:20). Em ambos ensaios foram avaliadas as seguintes variáveis: degradabilidade da matéria seca e orgânica, produção líquida de gases totais, produção líquida de gás metano, fermentação microbiana ruminal (pH, concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) e de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC).

Dietas com relações concentrado:volumoso de 20:80 e 80:20 adicionadas das doses de PNE selecionadas (0; 1,5 e 3 % da matéria seca da dieta) foram ofertadas a ovinos Santa Inês com objetivo de avaliar digestibilidade e grau de toxicidade das dietas e constituintes ruminais por meio da investigação das seguintes variáveis: concentração de metahemoglobina, fermentação ruminal (pH, N-NH₃, AGCC), população microbiana (*Selenomonas ruminantium*, *Veillonella parvula*, *Campylobacter fetus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes*, fungos anaeróbicos, Arqueas metanogênicas e protozoários), emissão de metano entérico, digestibilidade aparente e balanço de nitrogênio.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Impacto da pecuária nas emissões de gases no Brasil

O desafio da agricultura para um futuro próximo é produzir alimento para uma população em crescimento de forma mais sustentável e mais adaptável às mudanças climáticas. Essas são as premissas da nova agenda de desenvolvimento sustentável pós-2015 (ONU, 2015). Aplicando esse conceito à pecuária, a questão é identificar alimentos estratégicos que reduzam a produção de metano entérico persistentemente sem afetar a produtividade (LUND et al., 2014) e consumindo menos recursos ambientais, sem deixar de considerar os custos ao produtor.

As emissões diretas totais da agropecuária brasileira são de aproximadamente 440 milhões de toneladas de CO₂ equivalente (Mt CO₂-eq), unidade métrica que converte o potencial de aquecimento global de gases que provocam o efeito estufa (INSTITUTO DE MANEJO E CERTIFICAÇÃO FLORESTAL E AGRÍCOLA – IMAFLORA, 2014). O crescimento das emissões da agropecuária acompanha a expansão agrícola e o aumento da produtividade e demanda por alimentos (BRASIL, 2013).

A fermentação entérica do rebanho de ruminantes é responsável por 56% das emissões de gases de efeito estufa (GEE) do setor de agropecuária nacional (IMAFLORA, 2014). A cadeia de ruminantes movimenta R\$ 167,5 bilhões por ano (BRASIL, 2013), gerando aproximadamente 7 milhões de empregos (IBGE, 2012). A expectativa é que o rebanho nacional cresça em torno de 11 % (BRASIL, 2013) chegando a 225 milhões de cabeças de bovinos até 2023. Isso resultará numa emissão de 380 Mt CO₂e pela pecuária.

Os gases emitidos pelo setor de agropecuária são: o monóxido e dióxido de carbono e óxido de nitrogênio (CO, CO₂ e NO) produzido pelo uso da terra, especialmente desmatamento e queima de resíduos; o óxido nitroso (N₂O) originário dos dejetos animais e uso de fertilizantes nitrogenados (IMAFLORA, 2014) e o metano (CH₄) proveniente, principalmente, da fermentação entérica (BEAUCHEMIN; MCGINN, 2005) e manejo de dejetos.

Os ruminantes são responsáveis por 17 % das emissões globais de CH₄ e 3,3 % das emissões globais de gases de efeito estufa. Já o CH₄ emitido do esterco, tanto de ruminantes quanto de não-ruminantes, contribui com 2,0 e 0,4 % das emissões globais de metano e de gases de efeito estufa, respectivamente (KNAPP et al., 2014).

Dentro do inventário brasileiro de emissões de gases, como consequência do tamanho do rebanho nacional, a emissão de CH₄ por ruminantes representa 18 % das emissões nacionais, sendo 16,54 % proveniente da fermentação entérica e 1,45 % do manejo de dejetos, fazendo do Brasil o quarto maior emissor no setor de agropecuária do mundo (IMAFLOA, 2014). Ressaltando que o processo de fermentação que ocorre em grandes ruminantes, bovinos e bubalinos, resulta na liberação de 60 a 160 kg de CH₄/ano, já em pequenos ruminantes, caprinos e ovinos, de 10 a 16 kg de CH₄/ano (FREIRE et al., 2015).

O CH₄ possui um potencial de aquecimento 25 vezes maior que o CO₂, o que causa um impacto negativo na formação da camada de ozônio (ALUWONG; WUYEP; ALLAM, 2011). Desta forma, para aumentarmos o rebanho brasileiro com uma perspectiva de baixa emissão de CO₂-eq, é fundamental que novas práticas para mitigação de GEE sejam incorporadas na pecuária.

2.2. Efeito do nitrato na fermentação ruminal

A produção de CH₄ gera perdas energéticas ao animal, variando entre 2 e 12% da energia bruta total consumida (VAN SOEST, 1994). Em ovinos essa perda pode ser de 3 a 10% da energia bruta variando conforme o tipo de dieta e o nível de alimentação (NRC, 1985). Em contrapartida, a geração de CH₄ pelas Arqueas é vital ao equilíbrio ruminal.

No rúmen, bactérias, protozoários e fungos convertem o alimento ingerido em aminoácidos, açúcares e, como produto final, amônia e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), principalmente ácido acético, propiônico e butírico que são utilizados pelo hospedeiro como fonte de energia. Adicionalmente, esses microrganismos também produzem compostos indesejáveis como nitrato, dióxido de carbono e hidrogênio (KOZLOSKI, 2009).

As vias metabólicas de produção do acetato e butirato pelos microrganismos ruminais são as principais produtoras de hidrogênio. O hidrogênio molecular é importante produto da fermentação, pois hidrogênio livre no ambiente ruminal é utilizado para reduzir dióxido de carbono a metano por meio de Arqueas metanogênicas (KOZLOSKI, 2009), evitando o acúmulo de hidrogênio e mantendo o processo de digestão anaeróbica eficiente.

Assim, produção de CH₄ ruminal é uma via metabólica necessária aos ruminantes para manter as concentrações adequadas de hidrogênio no rúmen, pois o acúmulo de íons H⁺ acarreta em inibição dos sistemas enzimáticos, principalmente dos processos que envolvem a nicotinamida adenosina difosfato (NADH + H⁺ ↔ NAD⁺) (MCALLISTER;

NEWBOLD, 2008). Portanto, o hidrogênio é o composto chave para controlar a produção de CH_4 (JEYANATHAN; MARTIN; MORGAVI, 2013). Entre as diferentes estratégias estudadas para diminuir a produção de CH_4 ruminal, uma via alternativa para consumir hidrogênio, que o redimensione longe da via metanogênica seria uma opção.

Nitrato atua como um acceptor de elétrons que pode agir como dissipador de hidrogênio alternativo para o dióxido de carbono por ter maior afinidade por H_2 do que o CO_2 . Deste modo, quando o nitrato está presente no rúmen, a formação de nitrito (NO_2) e NH_3 é favorecida sobre a produção de metano (UNGERFELD; KOHN, 2006).

Além do benefício ambiental, outra vantagem do nitrato é a utilização da amônia gerada no anabolismo de aminoácidos das bactérias, importante fonte de nitrogênio (N) para crescimento bacteriano (VAN ZIJDERVELD et al., 2010), fazendo com que possa haver substituição de parte da proteína da dieta por fonte de nitrogênio não proteico (LEWIS, 1951b; VAN ZIJDERVELD et al., 2010; LI et al., 2013).

Nos ruminantes, a via predominante do metabolismo de nitrato no rúmen é dividida nas etapas assimilatórias e dissimilatórias que convertem o nitrato em nitrito e, posteriormente, em amônia (LENG, 2008). A amônia gerada é absorvida pelo sangue, convertida em ureia no fígado e, posteriormente, eliminada na urina. Este metabolismo ocorre sempre que a quantidade de nitrato está em equilíbrio e não existe acúmulo de nitrito (SEZER et al., 2011).

A redução do nitrato é mais eficiente energeticamente que a metanogênese (GUO; SCHAEFER; GUO, 2009). A conversão de nitrato à amônia consome menos energia (-598 kJ) do que CO_2 a CH_4 e água (-131 kJ) proporcionando contenção de energia bruta ao animal (LENG; PRESTON, 2010). Ademais, relatos de experimentos *in vitro* (ANDERSON; RASMUSSEN, 1998; GUO; SCHAEFER; GUO, 2009) afirmam que a adição de nitrato na dieta aumentou a produção microbiana de proteína bruta.

Nitrato tem sido relatado por sua eficácia e persistência em reduzir metano. Em ensaios *in vitro*, houve reduções de 70 % com a adição de 12mmol de nitrato em relação ao controle (ZHOU; YU; MENG, 2012). Em ensaios *in vivo*, há relatos de redução na produção de metano (L/dia) de 32 % em ovinos alimentados com dietas contendo 2,6 % da matéria seca (MS) em nitrato (VAN ZIJDERVELD et al., 2010). Em experimento com bovinos Holandês alimentados com diferentes níveis de inclusão de nitrato (0; 0,6; 1,2; 1,8; 2,4 e 3 %), a redução na produção de metano chegou até 28 % (NEWBOLD et al., 2014). Já em ovinos Santa Inês a adição de nitrato encapsulado (4,5 % MS) resultou em redução de 33 % na

produção de metano (EL-ZAIAT et al., 2015). Em todos os estudos *in vivo* acima, a adição de nitrato não influenciou o consumo de matéria seca dos animais, tampouco o ganho de peso.

Em uma compilação de dados de 33 trabalhos, Lee e Beauchemin (2014) relataram que a produção de metano entérico (CH_4 g/kg MS consumida) foi reduzida com o aumento do consumo diário de nitrato ($\text{g NO}_3^-/\text{kg}$ de peso vivo) de modo dose- resposta.

O modo de ação do nitrato sobre a população microbiana, em especial Arqueas metanogênicas, não é claro mas, possivelmente, o nitrato ou nitrito podem ser tóxicos para as metanogênicas e protozoários ou provocar deficiência de hidrogênio (fonte de energia para as metanogênicas) reduzindo assim a população de metanogênicas e, conseqüentemente, a produção de CH_4 (LEE; BEAUCHEMIN, 2014).

A adição de nitrato resultou em redução das metanogênicas em ensaio *in vitro* (ZHOU; YU; MENG, 2012) e inibição de *F. succinogenes*, bactérias celulolíticas, em culturas *in vitro* não adaptadas ao nitrato (HULSHOF et al., 2012), redução no número de protozoários em ovinos Santa Inês alimentados com 4,5 % de nitrato encapsulado (EL-ZAIAT et al., 2014).

Por outro lado, bactérias redutoras de nitrato e nitrito *Veillonella parvula*, *Wolinella succinogenes* e *Selenomonas ruminantium* aumentaram quando nitrato esteve presente na dieta (IWAMATO et al., 2002; ASANUMA; YOKOYAMA; HINO, 2014; ZHAO et al., 2015).

Os produtos da fermentação ruminal também foram modificados com a adição de nitrato. A adição de 2 % de nitrato na dieta de vacas leiteiras aumentou a proporção de acetato em detrimento de propionato e butirato (FARRA; SATTER, 1971). Tendência ($P = 0,09$) para aumento de acetato e redução de propionato também foram relatados por Nolan et al. (2010) em ovinos e observadas por Hulshof et al. (2012) em novilhos.

Lee et al. (2015b) não observaram efeito da adição de doses de nitrato (0, 1, 2 e 3 %) na dieta de bovinos alimentados *ad libitum* sobre os AGCC, mas observaram efeito linear positivo para pH ruminal. Contudo, em outro experimento, quando a dieta foi restringida a 75 %, os mesmos autores observaram comportamento quadrático para acetato e butirato com a inclusão de níveis crescentes de nitrato (0; 1; 2; 2,9; 3; 3,9; 4,8 e 5,8 %), sem efeito para pH ruminal.

O efeito do nitrato sobre o pH já foi descrito por Lewis (1950a). O pH ótimo para a redução de nitrato e nitrito são 6,2 e 5,6, respectivamente. Na presença de hidrogênio, o nitrato é reduzido a amônia com o consumo de hidrogênio, de acordo com a equação:

$\text{KNO}_3 + 4\text{H}_2 \leftrightarrow \text{NH}_3 + 2\text{H}_2\text{O} + \text{KOH}$. Desta forma, os produtos da redução do nitrato são amônia, água e uma base, a qual possivelmente auxilia na elevação do pH ruminal.

2.3. Nitrato e Metahemoglobulinemia

Apesar dos benefícios do uso do nitrato na alimentação de ruminantes, há uma preocupação com relação ao potencial efeito tóxico do nitrito, produto intermediário da redução de nitrato a amônia, ao animal (LENG, 2008), especialmente quando incluído em grandes quantidades na dieta com o objetivo de suprir a demanda ruminal por nitrogênio não-proteico (NNP).

Os microrganismos do rúmen reduzem rapidamente nitrato a nitrito, mas a taxa de redução de nitrito a amônia é mais lenta, o que pode gerar acúmulo de nitrito e possível intoxicação (IWAMOTO; ASANUMA; HINO, 1999). Esse acúmulo proporciona absorção de nitrito pela corrente sanguínea que se ligará a hemoglobina formando metahemoglobina.

A metahemoglobinemia é uma condição causada pela oxidação do ferro férrico da hemoglobina, tornando a molécula incapaz de transportar oxigênio, ocorrendo assim anóxia celular (VAN ZIJDERVELD et al., 2011).

Contudo, muitos estudos (VAN ZIJDERVELD et al., 2010; NOLAN et al., 2010; EL-ZAIAT et al., 2014; LEE et al., 2015b) indicam que, se o animal, consumindo alimento *ad libitum*, for adaptado ao consumo de nitrato, o potencial tóxico é reduzido por possibilitar adaptação da microbiota ruminal para reduzir nitrato a amônia, embora ainda sejam necessários mais estudos para a indicação de um protocolo de adaptação ao uso de nitrato nas dietas de ruminantes.

2.4. Alternativas para redução de metano

Alguns alimentos e aditivos podem reduzir a produção de metano por vias diferentes. Como exemplos, a maior relação de concentrado na dieta pode aumentar a produção de propionato, diminuindo H_2 que seria convertido a metano, ou uso de modificadores ruminais, como a monensina, que indiretamente inibem as metanogênicas (KNAPP et al., 2014).

Estequiometricamente, dietas com maior relação de concentrado captam mais H_2 para converter fumarato a propionato (NEWBOLD et al., 2005). Desta forma, a formação de propionato consome mais H_2 diminuindo a disponibilidade de H_2 para a produção de CH_4 .

A elevação da proporção de grãos na dieta reduziu 29 % a emissão de metano em comparação a dietas com cevada (9,2 vs 13,1 CH₄ g/kg de CMS, respectivamente) evidenciando a eficiência mitigadora da elevada relação de concentrado na dieta (BEAUCHEMIN; MCGINN, 2005).

Benzaar, Pomar e Chiquette (2014), testando estratégias para redução de emissão de metano, observaram aumento na produção de metano em dietas com proporção de 0 e 20 % de concentrado e, em seguida, redução em maiores relações de concentrado:volumoso (50:50, 70:30).

A monensina, modificador ruminal, tem sido utilizada na alimentação de ruminantes por aumentar a eficiência alimentar (RUSSELL; STROBEL, 1989). A monensina é mais eficiente contra bactérias gram-positivas, produtoras de hidrogênio, que contra as gram-negativas (TEDESCHI; FOX; TYLUTKI, 2003; MORAIS; BERCHIELLI; REIS, 2006). A monensina, reduzindo gram-positivas, indiretamente, reduz a metanogênese.

O efeito inibitório da monensina sobre as Arqueas metanogênicas, microrganismos gram-positivas, está associado a capacidade do modificador ruminal em ligar cátions, como sódio, e formar complexos lipofílicos para atravessar a membrana celular das bactérias e protozoários, alterando a permeabilidade da membrana celular, ocasionando um aumento da pressão osmótica e morte dos microrganismos (MORAIS; BERCHIELLI; REIS, 2006). Esse processo é facilitado nas bactérias gram-positivas devido sua parede celular simples, diferindo das paredes celulares duplas nas gram-negativas (MORAIS; BERCHIELLI; REIS, 2006).

O efeito metanogênico está associado à inibição das Arqueas metanogênicas ou das populações de bactérias que produzem H₂, contribuindo para a alteração na fermentação de acetato para propionato (NEWBOLD et al., 1988). Outro efeito provável é a inibição do crescimento de protozoários ciliados (MCALLISTER et al., 1996). A suplementação com monensina em dietas de bovinos pode diminuir de 27 a 30 % a emissão de metano entérico por duas a quatro semanas, dependendo do conteúdo de energia da dieta (GUAN, 2006).

Riviera et al. (2010) observaram alterações na produção de AGCC com menor relação acetato:propionato e redução na população total de protozoários com o uso de monensina, mas nenhum efeito sobre a produção de metano.

A interação entre monensina (MON) e nitrato foi testada por Berndt et al. (2012). O tratamento NO₃⁻ com MON resultou em redução de 28% do níveis metahemoglobina no sangue por quantidade de NO₃⁻ e em redução de 27% no CMS quando comparado ao tratamento de NO₃⁻ sem monensina.

REFERÊNCIAS

- ALUWONG, T.; WUYEP, P.; ALLAM, L. Livestock–environment interactions: methane emissions from ruminants. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, p. 1265-1269, 2011.
- ANDERSON, R. C.; RASMUSSEN, M. A. Use of a novel nitrotoxin metabolizing bacterium to reduce ruminal methane production. **Bioresource Technology**, Essex, v. 64, p. 89-95, 1998.
- ASANUMA, N.; YOKOYAMA, S.; HINO, T. Effects of nitrate addition to a diet on fermentation and microbial populations in the rumen of goats, with special reference to *Selenomonas ruminantium* having the ability to reduce nitrate and nitrite. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, p. 378-384, 2014. doi: 10.1111/asj.12307
- ASANUMA, N.; IWAMOTO, M.; KAWATO, M.; HINO, T. Numbers of nitrate-reducing bacteria in the rumen as estimated by competitive polymerase chain reaction. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, p. 199–205, 2002.
- BARNETT, A. J. G.; BOWMAN, I. B. R. In vitro studies on the reduction of nitrate by rumen liquor. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 8, n. 4, p. 243-248, 1957.
- BEAUCHEMIN, K. A.; MCGINN, S. M. Methane emissions from feedlot cattle fed barley or corn diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, p. 653-661, 2005.
- BENCHAAAR, C.; POMAR, C.; CHIQUETTE, J. Evaluation of dietary strategies to reduce methane production in ruminants: A modelling approach. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 81, p. 563-574, 2014.
- BERNDT, A.; CAMPOS, G. P.; SILVA, G.; APAJALAHTI, J.; RINTTILÄ, T.; PERDOK, H. Ouso de nitrato com monensina não afeta o nível de metemoglobina no sangue de bovinos de corte alimentados com dietas de alto concentrado In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 22., 2012, Cuiabá, MT. **Anais...** Cuiabá, MT: Universidade Federal de Mato Grosso, 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do Agronegócio: Brasil 2012/2013 a 2022/2023**. Brasília, DF: MAPA/Assessoria de Gestão Estratégica, 2013. 96 p. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/projeções%20-%20versao%20atualizada.pdf. Acesso em: 29 dez. 2015.
- COTTLE, D.; ECKARD, R. Modelling the reduction in enteric methane from voluntary intake versus controlled individual animal intake of lipid or nitrate supplements. **Animal Production Science**, Victoria, v. 54, p. 2121-2131, 2014.
- EL-ZAIAT, H. M.; ARAUJO, R. C.; SOLTAN, Y. A.; MORSY, A. S.; LOUVANDINI, H.; PIRES, A. V.; PATINO, H. O.; CORREA, P. S.; ABDALLA, A. L. Encapsulated nitrate and cashew nut shell liquid on blood and rumen constituents, methane emission, and growth performance of lambs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 92, p. 2214-2224, 2014.

FREIRE, A. P. A.; SILVA, F. L. M.; POLIZEL, D. M.; SUSIN, I. Nitrato na alimentação de ruminantes mitiga a produção de metano. **Ciencia Veterinária nos Trópicos**, Recife, v. 18, p. 6-12, 2015

FARRA, P. A.; SATTER, L. D. Manipulation of the ruminal fermentation. III. Effect of nitrate on ruminal volatile fatty acid production and milk composition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 54, p. 1018–1024, 1971.

GUAN, H.; WITTENBERG, K. M.; OMINSKI, K. H.; KRAUSE, D. O. Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 84, p. 1896-1906, 2006.

GUO, W. S.; SCHAEFER, D. M.; GUO, X. X. Use of nitrate-nitrogen as a sole dietary nitrogen source to inhibit ruminal methanogenesis and to improve microbial nitrogen synthesis *in vitro*. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, Seoul, Korea, v. 22, p. 542-549, 2009.

HULSHOF, R. B. A.; BERNDT, A.; GERRITS, W. J. J.; DIJKSTRA, J.; VAN ZIJDERVELD, S. M.; NEWBOLD, J. R.; PERDOK, H. B. Dietary nitrate supplementation reduces methane emission in beef cattle fed sugarcane bases diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 90, p. 2317-2323, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção agrícola municipal (1990 – 2011)**. Disponível em: [http://www.Sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.Asp?c=1612\\$p=11&i=p](http://www.Sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.Asp?c=1612$p=11&i=p). Acesso em: 29 dez. 2015.

INSTITUTO DE MANEJO E CERTIFICAÇÃO FLORESTAL E AGRÍCOLA – IMAFLORA. **Análise da evolução das emissões de GEE no Brasil (1990-2012): setor agropecuário**. São Paulo : Observatório do Clima, 2014. 32 p. Disponível em: https://www.imaflora.org/downloads/biblioteca/53fb8083b4e88_SEEG_Agropecuaria.pdf. Acesso em: 29 dez. 2015.

IWAMOTO, M.; ASANUMA, N.; HINO, T. Effect of nitrate combined with fumarate on methanogenesis, fermentation, and cellulose digestion by mixed ruminal microbes *in vitro*. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, p. 471–478, 1999.

JEYANATHAN, J.; MARTIN, C.; MORGAVI, D. P. The use of direct-fed microbials for mitigation of ruminant methane emissions: a review. **Animal**, Cambridge, v. 8, p. 250-261, 2013.

KNAPP, J. R.; LAUR, G. L.; VADAS, P. A.; WEISS, W. P.; TRICARICO, J. M. Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, p. 3231–3261, 2014.

KOSLOSKI, G. V. **Bioquímica dos ruminantes**. 2. ed. Santa Maria: UFSC, 2009. 216 p.

LEE, C.; BEAUCHEMIN, K. A. A review of feeding supplementary nitrate to ruminant animals: Nitrate toxicity, methane emissions, and production performance. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 94, p. 557–570, 2014.

LEE, C.; ARAUJO, R. C.; KOENIG, K. M.; BEAUCHEMIN, K. A. Effects of encapsulated nitrate on enteric methane production, and nitrogen and energy utilization in beef heifers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 93, p. 2391-2404, 2015a. doi: 10.2527/jas2014-8845.

LEE, C.; ARAUJO, R. C.; KOENIG, K. M.; BEAUCHEMIN, K. A. Effects of encapsulated nitrate on eating behavior, rumen fermentation, and blood profile of beef heifers fed restrictively or *ad libitum*. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 93, p. 2405-2418, 2015b. doi: 10.2527/jas2014-8851.

LENG, R. A.; PRESTON, T. R. Further considerations of the potential of nitrate as a high affinity electron acceptor to lower enteric methane production in ruminants. **Livestock Research for Rural Development**, Cali, v. 22, n. 12, 2010. Disponível em: <http://www.lrrd.org/lrrd22/12/leng22221.htm>.

LENG, R. A. **The potential of feeding nitrate to reduce enteric methane production in ruminants**. A Report to the Department of Climate Change. Commonwealth Government of Australia, Canberra. Australia. 2008. 82 p. Disponível em: <http://www.penambulbooks.com/Downloads/Leng-Final%20Modified%20%2017-9-2008.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2015.

LEWIS, D. The metabolism of nitrate and nitrite in the sheep. 2. Hydrogen donors in nitrate reduction by rumen micro-organisms in vitro. **The Biochemical Journal**, London, v.49, p.149-153, 1951.

LI, L.; DAVIS, J.; NOLAN, J.; HEGARTY, R. An initial investigation on rumen fermentation pattern and methane emission of sheep offered diets containing urea or nitrate as the nitrogen source. **Animal Production Science**, Victoria, v. 52, p. 653-659, 2012.

LI, L.; SILVEIRA, C. I.; NOLAN, J. V.; GODWIN, I. R.; LENG, R. A.; HEGARTY, R. S. Effect of added dietary nitrate and elemental sulfur on wool growth and methane emission of Merino lambs. **Animal Production Science**, Victoria, v. 53, p. 1195–1201, 2013.

LUND, P.; DAHL, R.; YANG, H. J.; HELLWING, A. L. F.; CAO, B. B.; WEISBJERG, M. R. The acute effect of addition of nitrate on in vitro and in vivo methane emission in dairy cows. **Animal Production Science**, Victoria, v. 54, p. 1432-1435, 2014.

McALLISTER, T. A.; NEWBOLD, C. J. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, East Melbourne v. 48, p. 7-13, 2008.

McALLISTER, T. A.; OKINE, E. K.; MATHISON, G. W.; CHENG, K. J. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 76, p. 231-243, 1996.

MORAIS, J. A. S.; BERCHIELLI, T. T.; REIS, R. A. Aditivos. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 2006. p. 111-140.

NEWBOLD, J. R.; VAN ZIJDERVELD, S. M.; HULSHOF, R. B. A.; FOKKINK, W. B.; LENG, R. A.; TERCENIO, P.; POWERS, W. J.; VAN ADRICHEM, P. S. J.; PATON, N. D.; PERDOK, H. B. The effect of incremental levels of dietary nitrate on methane emissions in Holstein steers and performance in Nellore bulls. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 92, p. 5032-5040, 2014.

NEWBOLD, C. J.; LÓPEZ, S.; NELSON, N.; OUDA, J. O.; WALLACE, R. J.; MOSS, A. R. Propionate precursors and other metabolic intermediates as possible alternative electron acceptors to methanogenesis in ruminal fermentation *in vitro*. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 94, p. 27-35, 2005.

NOLAN, J. V.; HEGARTY, R. S.; HEGARTY, J.; GODWIN, I. R.; WOODGATE, R. Effects of dietary nitrate on fermentation, methane production and digesta kinetics in sheep. **Animal Production Science**, Victoria, v. 50, n. 8, p. 801-806, 2010.

RIVERA, A. R.; BERCHIELLI, T. T.; MESSANA, J. D.; VELASQUEZ, P. T.; FRANCO, A. V. M.; FERNANDES, L. B. Fermentação ruminal e produção de metano em bovinos alimentados com feno de capim-tifton 85 e concentrado comaditivo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, p. 617-624, 2010.

RUSSELL, J. B.; STROBEL, H. J. Mini-review: the effect of ionophores on ruminal fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 55, p. 1-6, 1989.

SEZER, K.; ALBAY, M. K.; OZMEN, O.; HALIGUR, M.; SAHINDURAN, S.; MOR, F.; KÖKER, A. Haematological, biochemical and thyroid gland investigations in pregnant cows and in calves chronically intoxicated with nitrate. **Revue de Médecine Vétérinaire**, Toulouse, v. 162, p. 223-228, 2011.

TEDESCHI, L. O.; FOX, D. G.; TYLUTKI, T. P. Potential environmental benefits of ionophores in ruminant diets. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 32, p. 1591-1602, 2003.

UNGERFELD, E. M.; KOHN, R. A. The role of thermodynamics in the control of ruminal fermentation. In: SEJRSEN, T.; PLUND, H.; NIELSEN, D. M. O. (Ed.). **Ruminant physiology: digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress**. Wageningen: Wageningen Academic Published, 2006. p. 55-85.

VAN ZIJDERVELD, S. M.; FONKEN, B.; DIJKSTRA, J.; GERRITS, W. J. J.; PERDOK, H. B.; FOKKINK, W.; NEWBOLD, J. R. Effects of a combination of feed additives on methane production, diet digestibility, and animal performance in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, p. 1445-1454, 2011.

VAN ZIJDERVELD, S. M.; GERRITS, W. J. J.; APAJALAHTI, J. A.; NEWBOLD, J. R.; DIJKSTRA, J.; LENG, R. Nitrate and sulfate: effective alternative hydrogen sinks for mitigation of ruminal methane production in sheep. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, p. 5856-5866, 2010.

ZHAO, L.; MENG, Q.; REN, L.; ZHANG, X.; HUO, Y.; ZHOU, Z. Effects of nitrate addition on rumen fermentation, bacterial biodiversity and abundance. **Asian-Australasian Journal Animal Science**, Seoul, Korea, v. 28, p. 1433-1441, 2015.

ZHOU, Z.; YU, Z.; MENG, Q. Effects of nitrate on methane production, fermentation, and microbial populations in in vitro ruminal cultures. **Bioresource Technology**, Essex, v. 103, p. 173-179, 2012.

3. INTERAÇÃO ENTRE NITRATO ENCAPSULADO E MONENSINA SOBRE A EMISSÃO DE METANO *IN VITRO*

Resumo: Alternativas envolvendo a manipulação da fermentação ruminal tem sido usadas para reduzir ou desviar a produção de metano entérico. Entre eles, destacam-se os aditivos que afetam diretamente metanogênese como a monensina, e suplementos que permitem vias bioquímicas alternativas para desviam H_2 da produção de metano, tais como nitrato. Com o foco em alternativas nutricionais que manipulam fermentação ruminal, o objetivo deste estudo foi avaliar a associação entre o nitrato de cálcio encapsulado e monensina sobre a mitigação de metano entérico *in vitro*. Foi utilizado delineamento em blocos completamente casualizado, em esquema fatorial 2 x 3, os fatores estudados incluem duas doses de adição de monensina (0 e 2,08 mg / ml em líquido tamponado rúmen) e três doses de produto de nitrato de cálcio encapsulado (PNE: 0, 1,5 e 3,0% em MS da dieta). O substrato consistia em 50% de feno de Tifton 85 (*Cynodon* spp) e 50% de concentrado. Nitrato encapsulado substituiu o farelo de soja de maneira a deixar as dietas isoproteicas (15% PB). Após 24 horas de incubação, não foi observada interação entre PNE e monensina ($P > 0,05$) para as variáveis testadas, com exceção para abundância relativa de *Fibrobacter succinogenes* que aumentou linearmente ($P < 0,01$) em dietas com monensina (0,96; 1,23 e 1,97%) quando PNE foi adicionado (0, 1,5 e 3% MS, respectivamente). A adição de PNE resultou em redução linear ($P < 0,01$) para a produção de metano (12,1; 9,3 e 6,1 mL / g MOVD, EPM = 1,239), sem afetar a matéria orgânica verdadeiramente degradada (MOVD). O fator de partição aumentou linearmente ($P = 0,03$) em dietas suplementadas com doses crescentes de PNE (1,67; 1,84 e 1,99 mg MOVD / mL PG) sugerindo aumento da produção da biomassa microbiana. Nitrato aumentou linearmente ($P < 0,01$) a expressão relativa de *Wionella succinogenes*, bactérias ligadas a redução de nitrato. A adição de monensina reduziu a concentração dos ácidos butírico, isobutírico e valérico ($P < 0,05$) e possibilitou o aumento na concentração de isovalérico, sem alterar ($P = 0,56$) a produção de ácidos graxos de cadeia curta. Os resultados demonstraram que nitrato é uma estratégia viável para a redução de metano sem afetar a degradabilidade da matéria orgânica. Mas não foi observado efeito acumulativo na redução de metano decorrentes do uso de nitrato aliando com monensina.

Palavras-chave: gases de efeito estufa, hidrogênio, metanogênese, mitigação

Interaction between encapsulated nitrate and monensin inclusion in methane emissions *in vitro*

Abstract: Alternatives involving the manipulation of ruminal fermentation have been used to reduce or divert the production of enteric methane. Among them, we highlight additives that directly affect methanogens such as monensin, and supplements that allow alternative biochemical pathways that deviate H₂ from the methane production, such as nitrate. With the focus on nutritional alternatives that manipulate rumen fermentation, we assessed in this study the association between encapsulated nitrate and monensin to mitigate enteric methane *in vitro*. There were six treatments in randomized complete block design in a 2 x 3 factorial arrangement with two levels of monensin (0 and 2.08 mg/mL of buffered rumen fluid) and three levels of encapsulated nitrate product (NP: 0, 1.5 and 3.0% in dietary DM). The substrate consisted of 50% Tifton 85 hay (*Cynodon* spp) and 50 % concentrate. Encapsulated nitrate replaced soybean meal to achieve isonitrogenous diets (15% CP). After 24 h of incubation, there was no ENP and monensin interaction ($P > 0.05$) for any variable measured, except for relative abundance of *F. succinogenes* that increased linearly ($P < 0.01$) in diets with monensin (0.96, 1.23 and 1.97%) when ENP was added (0, 1.5 and 3% DM, respectively). The addition of ENP resulted in linear decreasing ($P < 0.01$) in methane production (12.1, 9.3 and 6.1 mL / g TDOM, SE = 1.239), however the treatments did not affect the value of the truly degraded organic matter (TDOM). The partitioning factor (PF) increased linearly ($P = 0.03$) in diets with increasing doses of ENP (1.67; 1.84 and 1.99 mg TDOM / mL GP) demonstrating increased production of bacterial biomass. Nitrate reduced linearly ($P < 0.01$) the population of *W. succinogenes*, attached bacteria to nitrate reduction. The monensin reduced the concentration of butyric, isobutyric and valeric acids ($P < 0.05$) and allowed the increase in the concentration of isovaleric without changes ($P = 0.56$) on total production of short chain fatty acids. The results showed that nitrate is a viable strategy for methane reduction, without affecting the degradability of the organic matter. But it was not observed cumulative effect in the reduction of methane arising from the use of nitrate allying with monensin.

Additional keywords: greenhouse gas, hydrogen sink, methanogenesis, mitigation

3.1. Introdução

A produção de metano no rúmen é parte inerente do processo digestivo dos ruminantes (BEAUCHEMIN et al., 2008). Para reduzir ou redirecionar a produção de metano entérico, têm-se utilizado alternativas que envolvem a manipulação da fermentação ruminal como o uso de aditivos que tenham ação direta sobre os microrganismos metanogênicos (BEACON, 1998). Outra forma é o uso de suplementos que possibilitem vias metabólicas alternativas para o escoamento do H_2 e que possam ser competitivas com a produção de metano (UNGERFELD; KOHN, 2006).

O uso de ionóforos, como a monensina, é capaz de reduzir a produção de metano, propiciando ao animal uma maior eficiência na conversão de energia (BEACON, 1998). A monensina atua sobre a microbiota ruminal diminuindo a concentração de bactérias Gram-positivas, produtoras de metano, podendo diminuir a emissão de metano entérico entre 27 a 31% (GUAN, 2006). Monensina promove a seleção de bactérias formadoras de succinato promovendo o aumento do propionato (CHEN; WOLIN, 1979), aumentando a relação acetato:propionato na fermentação ruminal (STROBEL; RUSSELL, 1989) e reduzindo o metano (BEAUCHEMIN et al., 2008).

Por outro lado, o nitrato tem maior afinidade por H_2 do que o CO_2 (LENG, 2008). Deste modo, quando o nitrato está presente no rúmen, a redução deste a nitrito e amônia é favorecida sobre a produção de metano (UNGERFELD; KOHN, 2006). Nitrato dietético tem sido investigado devido à redução de metano entérico e vem ganhando atenção pela persistência em mitigar metano ao mesmo tempo em que serve de fonte de nitrogênio não proteico (VAN ZIJDERVELD et al., 2010; VAN ZIJDERVELD et al., 2011; LI et al., 2013, EL-ZAIAT et al., 2014; LEE et al., 2015a; 2015b). Em revisão de trabalhos que utilizaram nitrato em dietas para ruminantes, Lee e Beachemin (2014) observaram que todos os estudos revisados relataram redução significativa nas emissões de metano de animais alimentados com nitrato.

No entanto, o uso de nitrato está sendo utilizado com moderação para redução de metano devido à intoxicação de nitrito que pode ocorrer no animal (LENG, 2008). Porém, se os animais forem aclimatados lentamente ao consumo de nitrato, o acúmulo de nitrito no rúmen é evitado e o potencial de toxicidade é reduzido (LEE; BEAUCHEMIN, 2014). Outra solução é o uso de produtos protegidos por meio de encapsulamento, que promovem a liberação lenta do princípio ativo (NAZZARO et al., 2012) e reduzem a intoxicação (ZHOU; YU; MENG, 2012).

Com o foco em alternativas nutricionais que lidam com a fermentação ruminal, este estudo buscou avaliar a interação entre dois aditivos nutricionais, nitrato e monensina, com objetivo de mitigação de metano e avaliação da degradabilidade dos nutrientes.

3.2. Material e métodos

O ensaio foi realizado entre Janeiro a Maio de 2013 no Laboratório de Nutrição Animal (Lana), Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo (CENA/USP), localizado no município de Piracicaba, São Paulo, Brasil. Todos os procedimentos de uso de animais foram aprovados pela Comissão Interna de Ética Ambiental e Experimentação Animal do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (Protocolo nº 2013-6; Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil).

Delineamento experimental e tratamentos

Foi utilizado delineamento experimental em blocos completamente casualizado em esquema fatorial 2 x 3, sendo dois níveis de monensina (0 e 2,08 mL/L de fluído ruminal) e três doses (0; 1,5 e 3% na MS) de produto nitrato de cálcio encapsulado (PNE). Estimando-se que a doses de PNE corresponderam a 0; 1,0 e 2,0% de NO_3^- na dieta em MS. O substrato consistiu de 50% de Feno de Tifton 85 (*Cynodon* spp) e 50% de concentrado (milho e farelo de soja). O PNE substituiu o farelo de soja em dietas isonitrogenadas (15% PB). As dietas foram moídas a 1 mm em moinho Willey (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil), apenas o nitrato foi incubado na fórmula original encapsulada. Os substratos incubados (dietas experimentais) são apresentados na Tabela 1.

Foram utilizados quatro diferentes inóculos considerados como repetição e dois frascos por inóculo considerados como réplicas. . Para cada inóculo, um branco (garrafa sem substrato, contendo apenas inóculo e meio de incubação) foi incluído em duplicata para correção dos dados de produção de gás e degradabilidade. Um padrão interno constituído de feno de Tifton 85 (substrato com produção de gás conhecida) foi incluído em duplicata por inóculo para monitorar as condições de incubação. Assim, para cada inóculo, foram incubadas 16 garrafas contendo os tratamentos experimentais, branco e padrão interno.

Tabela 1 - Ingredientes e composição química das dietas experimentais (% MS)

Items	Dietas Experimentais ¹		
	0%	1,5%	3%
Ingredientes (%)			
Feno Tifton 85 ²	50,0	50,0	50,0
Milho grão ³	35,2	37,2	39,3
Farelo Soja ⁴	14,8	11,3	7,7
PNE ¹	-	1,5	3,0
Composição química⁵ (em g / 100 g MS)			
MS, % do alimento	91,2	91,2	91,3
MO	94,3	94,1	93,9
PB	15,4	15,4	15,2
EE	2,7	2,7	2,6
FDN	50,3	50,2	50,2
FDA	27,6	27,2	26,8
NO ₃ ⁻⁶	-	1,00	2,01

¹Tratamentos experimentais: Dieta sem Monensina (- MON) e com (+ MON); adição de produto nitrato encapsulado (PNE) a 0; 1,5; 3,0% (% Matéria Seca dietética)

²MS : 92,7; PB: 8,97; FDN: 65,7; FDA: 47,3 (em g / 100 g MS);

³MS : 89,0; PB: 9,79; FDN: 39,4; FDA: 5,18(em g / 100 g MS);

⁴MS : 91,1; PB: 49,7; FDN: 25,3; FDA: 14,2 (em g / 100 g MS);

⁵MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo; FDN: fibra insolúvel em detergente neutro, FDA: fibra insolúvel em detergente ácido (em g / 100 g MS).

⁶NO₃⁻ : Íon nitrato, estimativa da quantidade em % do total de PNE incluso na dieta

A monensina sódica foi acrescentada aos tratamentos experimentais minutos antes da incubação. Uma solução estoque de monensina pura (M5273; Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA; Peso molecular 692,850) foi preparada por diluição 15,6 mg em 1,0 ml de etanol puro, armazenada a -10 °C. Foram adicionados 10 µL de solução estoque em cada frasco (75 mL) momentos antes da incubação, conforme descrito por Araujo et al. (2011). Assim, a concentração final da monensina foi 0,156 mg/75ml de fluido ruminal tamponado (2,08mg/L).

O PNE utilizado no experimento é protegido por uma patente internacional e foi fabricado pela GRASP Ind. & Com. LTDA (Curitiba, PR, Brasil). A fabricação utilizou o sal duplo de nitrato de cálcio e amônio decahidratado [5Ca(NO₃)₂.NH₄NO₃.10H₂O] revestido com uma matriz de liberação controlada. O produto foi concebido para libertar 50, 80 e 100%

de NO_3^- dentro de 4, 12 e 30 h, respectivamente. A composição do PNE era (% MS): 85,17% MS, 16,47% N (102,9% PB-equivalente), 66,86 % NO_3^- e 19,61% Ca.

Condições de incubação

Foi utilizada a técnica *in vitro* de produção de gases (THEODOROU et al., 1994) adaptada ao sistema semiautomático (MAURÍCIO et al., 1999) com modificações propostas pelo Laboratório de Nutrição Animal (BUENO et al., 2005; LONGO et al., 2006), usando transdutor de pressão e data logger (Press Data 800, Lana, CENA / USP, Piracicaba, SP, Brasil).

Meio grama de cada dieta experimental foi adicionado em saquinho de determinação de FDN (#F57 bags; 50 mm x 40 mm; 25 ± 10 μm pore size; ANKOM, Technology Corporation, Fairport, USA) e incubado em frascos de vidro de 160 mL de volume total e head space de 85 mL, com 50 mL de meio de incubação (meio tampão Theodorou descrito em Preston, 1995) e 25 mL de inóculo. Os frascos foram fechados com tampas de borracha de 20 mm (Bellco Glass Inc, Vineland, NJ, USA), misturados manualmente, e incubados à 39 °C em estufa de circulação forçada (Marconi MA35, Piracicaba, SP, Brasil) por 24 h.

A pressão do gás foi medida às 2, 4, 8, 16 e 24 h de incubação. Para determinação da produção de metano, 2 mL de gás foram amostrados em cada tempo de mensuração de pressão, utilizando seringa de 5 mL e armazenados em tubo de vácuo de 10 mL. Após cada amostra de gás, a pressão interna foi aliviada por meio da perfuração e escoamento do gás, os frascos homogeneizados manualmente e recolocados na estufa. Ao término do tempo de incubação, os frascos foram colocados em água fria (4 °C) para cessar a fermentação, os saquinhos com substrato foram retirados dos frascos e também colocados em água a 4 °C.

Preparo do inóculo e do substrato

Oito ovinos Santa Inês machos (60 kg $\pm$ 2,8 kg) castrados e fistulados no rúmen foram utilizados como doadores de inóculo. Cada inóculo foi composto do líquido ruminal de dois doadores diferentes, totalizando quatro inóculos. Os animais foram alimentados individualmente. O alimento era fornecido *ad libitum* duas vezes ao dia (manhã e tarde). A dieta era composta por 50% de feno de Tifton 85 (*Cynodon spp.*) e 50% de concentrado (milho moído, farelo de soja e mistura mineral) com 18% PB e adição de 1% de PNE, com acesso livre a sal mineral e água. Para garantir a população de nitrato e nitrito redutoras no

inóculo incubado foi adicionado à dieta dos doadores 1% de PNE, para garantir a atividade mínima de redução de nitrato e nitrito, bem como, o número de nitrato redutoras no rúmen dos doadores. Como a coleta de inóculo foi realizada antes da alimentação da manhã, possivelmente, o nitrato referente a alimentação do dia anterior já estaria metabolizado, minimizando a influência do nitrato vindo do inóculo na dieta 0% PNE. A proporção 50:50 concentrado:volumoso na dieta foi escolhida para proporcionar uma comunidade microbiana no inóculo capaz de degradar carboidratos fibrosos e não fibrosos. O período de adaptação à dieta foi de 14 dias.

O líquido ruminal e a fração sólida foram coletados em volumes similares (50:50), separadamente de cada animal, antes da alimentação matinal e armazenados em recipientes térmicos pré-aquecidos sob condições anaeróbicas. A fração líquida foi obtida por meio da inserção de sonda de aço inoxidável (tela de 2,5 mm diâmetro) anexado a uma seringa de grande capacidade (60 mL). A fração sólida foi retirada com auxílio de uma pinça de cabo longo. No laboratório, volumes semelhantes de ambas as frações (50:50) foram homogeneizados por 10 segundos utilizando liquidificador e filtrados em três camadas de tecido de algodão. A mistura foi mantida em banho-maria à 39 °C sob fluxo de CO₂ até a inoculação. O inóculo final consistia da mistura do conteúdo ruminal de dois ovinos.

Produção de gás e metano *in vitro*

O volume total de gases foi calculado por equação de regressão definida para as condições locais pela equação abaixo (Equação 1):

$$V = 7,365 \times p \quad (n = 500; R^2 = 0,99); \quad (1)$$

Onde:

V = volume de gás (mL); e p = pressão mensurada (psi). A produção de gás total (PGT), em 24 h de incubação, foi considerada como a somatória parcial da produção de gás em cada intervalo de tempo.

A concentração de metano foi determinada em cromatógrafo gasoso (Shimadzu GC-2014, Tóquio, Japão) equipado com coluna Shincarbon ST 100/120 empacotada (diâmetro externo de 1,5875 mm, diâmetro interno de 1,0 mm e comprimento de 1 m; Ref. número 19809; Restek, Bellefonte, PA, EUA). As temperaturas de coluna, injetor e detector de chama foram 60, 200 e 240 °C, respectivamente. O gás de arraste foi o hélio a um

fluxo de 10 mL/min. Concentrações de metano foram determinadas por calibração externa usando curva analítica (0, 30, 90 e 120 mL/L) preparado com metano puro (White Martins PRAXAIR Gases Industriais Inc., Osasco, SP, Brasil; pureza 99,5 mL/L)

A produção de metano (PCH₄) foi determinada de acordo com Longo et al. (2006) pela equação 2:

$$\text{PCH}_4, \text{ mL} = (\text{PGT}, \text{ mL} + \text{Head space}, 85 \text{ mL}) * \text{concentração de CH}_4, \text{ mL/mL} \quad (2)$$

Os valores de PGT e PCH₄ foram expressos em função da matéria orgânica verdadeiramente degradada (ml/g MOVD).

Degradabilidade ruminal e características fermentativas

Após 24 h de incubação, amostras do conteúdo dos frascos foram coletadas e armazenadas (-20 °C) para posterior análise de N-NH₃, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e população microbiana (-80 °C).

Os saquinhos contendo o substrato foram utilizados para a determinação da matéria seca verdadeiramente degradada (MSVD) após serem tratados com solução em detergente neutro. A matéria orgânica verdadeiramente degradada (MOVD) foi obtida incinerando-se os saquinhos com o resíduo e corrigido com a utilização do branco. A relação entre MOVD (mg) e a produção total de gás (mL) em 24 h foi utilizada como índice de eficiência de síntese microbiana (FP: fator de partição, BLÜMMEL; MAKKAR; BECKER, 1997).

A concentração de N-NH₃ foi analisada por micro-Kjeldahlj por destilação a vapor com solução de tetraborato de sódio (5%), coletado em solução de ácido bórico e determinado por titulação com solução de H₂SO₄ (0,01 N) de acordo com Preston (1995).

Os AGCC foram determinados por cromatografia gasosa, de acordo com Nocek, Hart e Polan (1987); Palmquist e Conrad (1971), com modificações, em cromatógrafo a gás (Shimadzu 2014, Tokio, Japão) equipado com uma coluna GP 10% SP-1200/1 H₃PO₄ 80/100 Chromosorb WAW (Cat. no. 11965; 6' x 1/8'' stainless steel, Supelco, Bellefonte, PA, USA).

O fluido ruminal foi centrifugado a 11000 g (RC 5B PLUS, Sorval, Wilmington, DE, USA) por 40 min à 4 °C. Posteriormente foram coletados 800 µL do sobrenadante e adicionados 100 µL de ácido 2-etil-butírico (padrão interno, MW=116,16; Sigma Chemie GmbH, Steinheim, Germany) e 200 µL de ácido fórmico P.A.

Injetou-se 1 μL de amostra em cromatógrafo gasoso equipado com detector de Ionização de Chama (FID) sob temperatura de 250 °C. As condições de aquecimento de forno foram: 100 °C (3,2 min), 123 °C (10 °C/min; 1,25 min), 126 °C (10 °C/min; 5 min), com duração total da análise de 10,55 minutos. Gás hélio a 25 mL/min foi usado como gás de arraste. No detector, os fluxos de hidrogênio e ar sintético foram mantidos a 40 e 400 mL/min, respectivamente.

A curva de calibração externa foi preparada utilizando uma concentração padrão conhecida de AGCC (acético 99,5%, CAS 64-19-97; propiônico 99%, CAS 04-09-79; isobutírico 99%, CAS 79-31-2; butírico 98,7%, CAS 107-92-6; isovalérico 99%, CAS 503-74-2 e valérico 99%, CAS 109-52-4; Chem Service, West Chester, PA, EUA).

Para a quantificação de protozoários, adicionou-se em recipiente de vidro 2 mL do conteúdo dos frascos após 24 h de incubação e 2 mL de solução contendo formaldeído 40% e cloreto de sódio na proporção 1:1, posteriormente foi realizada a contagem de protozoários de acordo com Dehority, Damron e McLaren (1983). A mistura foi primeiramente homogeneizada com auxílio de um agitador, por 5 s e procedeu-se a contagem em câmara de “Neubauer improved” (medidas internas 20 mm x 26 mm x 0,4 mm) com auxílio de um microscópio com objetiva 45/66 (Olimpus, modelo CH2), tomando-se uma alíquota de 0,01 mL. O valor de contagem de protozoários totais foi transformado para $\text{Log}_{10} (x + 1)$, conforme recomendação de Obispo e Dehority (1992).

A extração do DNA das amostras do inóculo incubado foi realizada utilizando kit comercial PowerLyzer™ PowerSoil (Mo Bio Laboratories, Inc. Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação da abundância relativa dos microrganismos *Selenomonas ruminantium*, *Wolinella succinogenes* e *Campylobacter fetus* (nitrito- e nitrito-redutoras), Arqueas metanogênicas, *Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes* e fungos gerais anaeróbicos foi realizada utilizando primers específicos (Quadro 1) de 16S rDNA por meio da técnica de PCR quantitativo em tempo-real q(PCR) realizadas no Laboratório de Biologia Celular e Molecular (CENA-USP).

A amplificação do DNA foi realizada no equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Life Technologies, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) em solução contendo 5 μL do kit SYBR Green ROX (Invitrogen, Life Technologies, México), 2,5 pmol de cada primer, 1 μL do DNA pré-amplificado e água ultrapura (Milli-Q) autoclavada para um volume final de 10 μL . As condições de amplificação foram: uma pré-incubação a 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 30 s, com coleta de dados de fluorescência e ao final da reação foi incluída uma curva de melting nas seguintes

condições: 95 °C por 15 s, 60 °C por 1 min e 95 °C por 15 s. Todas as amostras, incluindo a curva padrão, foram feitas em triplicata.

Os tamanhos das populações relativas dos grupos microbianos foram expressos como proporção do BACT 16S rDNA. Os valores de ΔC_t foram calculados subtraindo o valor de C_t (limiar de ciclo) do gene alvo a partir do valor C_t do gene de referência (16S rRNA de BACT). A expressão relativa de grupos-alvo foi calculada baseado no cálculo de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Quadro 1 - Iniciadores de PCR para o ensaio de qPCR

Microorganismos	Sequencia dos <i>Primers</i> (5' a 3') ¹	Referência
Bactérias totais	I, CGGCAACGAGCGCAACCC R, CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC	Denman e McSweeney (2006); Denman, Tomkins e McSweeney (2007)
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	I, CGAACGGAGATAATTTGAGTTTACTTAGG R, CGGTCTCTGTATGTTATGAGGTATTACC	
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	I, GTTCGGAATTACTGGGCGTAAA R, CGCCTGCCCCTGAACTATC	
Arqueas metanogênicas	I, TTCGGTGGATCDCARAGRGC R, GBARGTCGWAWCCGTAGAATCC	
<i>Wolinellas succinogenes</i>	I, CTT CTT GCG AAC AGT TAG A R, CTC AAT GTC AAG CCC TGG	Asanuma et al. (2002)
<i>Campylobacter fetus</i>	I, GATAAGAGAGTGCTAGCTTGCTAGAA R, GTTAGCAACTAAATACGTGGGTTG	Yu et al. (2005)
<i>Selenomonas ruminatun</i>	I, TGC GAA TAG TTT TTM GCA A R, CTC AAT GTC AAG CCC TGG	Asanuma et al. (2002)

¹ I, Indicador direto; R, Reverso

Análise estatística

Todos os dados foram testados para análise de variância, utilizando o procedimento MIXED do programa SAS® v93 (*Statistical Analysis System Int., Cary, NC*). A variável resposta foi a média por frasco por inóculo. O modelo inclui o efeito fixo do uso de monensina na dieta, da dose de PNE e a interação entre monensina e dose de PNE. Para dose

foi realizado o teste de regressão, utilizando o procedimento REG (SAS®). As médias foram obtidas pelo comando LSMEANS (SAS®). Os efeitos fixos significativos foram identificados pelo teste F e teste de Tukey-Kramer. Foi declarada diferença estatística quando $P < 0,05$.

3.3. Resultados

Degradabilidade e produção de gases *in vitro*

Após 24 h de incubação, não houve interação ($P > 0,05$) entre monensina e PNE para a produção de gases (PG total e CH₄), degradabilidade da MS e MO e FP. A adição de monensina também não afetou significativamente ($P > 0,05$) essas variáveis (Tabela 2).

Por outro lado, a adição de nitrato inibiu substancialmente ($P < 0,01$) a produção de metano (12,1; 9,3 e 6,1 mL/g MOVD), resultando em redução linear ($y = -1,99 \times \text{PNE} + 12,16$; $R^2 = 0,44$; $P < 0,01$) conforme aumentaram as doses de PNE (0; 1,5 e 3% MS) na dieta (Figura 1), o que correspondeu a uma redução potencial de 23,4 e 49,4% para adição de 1,5 e 3% de PNE, respectivamente, comparada aos meios onde não houve suplementação com PNE (0%).

A proporção de metano, em relação à produção total de gases, seguiu a mesma redução linear para os tratamentos 0, 1,5 e 3% de PNE (10,4; 8,2 e 5,5%, EPM = 1,257, $P < 0,01$) que a produção de CH₄ (mL/g MOVD).

A produção de gases totais em mL/g MSVD e mL/g MOVD não foram alteradas ($P > 0,05$) pela adição de PNE em substituição ao farelo de soja. O FP, expresso em mg MOVD/mL de PG, aumentou linearmente (1,28; 1,31 e 1,46, $P = 0,02$) com a inclusão de 0, 1,5 e 3% de PNE na ração.

Tabela 2 - Efeito da monensina (MON) e de nitrato de cálcio encapsulado (PNE) em ensaio in vitro sobre a matéria orgânica verdadeiramente degradada (MOVD), matéria seca verdadeiramente degradada (MSVD), produção de gases totais (PG), metano (CH₄) e fator de partição (FP)

Item ¹	MON ²		EPM ³	PNE (% MS) ²			EPM ³	Valor- <i>P</i> ⁴				
								MON	PNE	MON x PNE	L	Q
	(-)	(+)		0	1,5	3						
MOVD (g/kg)	540,8	516,9	23,03	521,6	525,9	539,1	24,09	0,10	0,57	0,87	0,31	0,76
MSVD (g/kg)	568,2	545,2	21,66	549,5	553,6	566,9	22,65	0,09	0,54	0,84	0,29	0,74
PGT (mL/g MOVD)	116,9	110,7	7,82	116,3	113,7	111,2	8,16	0,19	0,67	0,94	0,38	0,98
PCH ₄ (mL/g MOVD)	9,62	8,71	1,209	12,10	9,27	6,12	1,697	0,26	<0,01	0,40	0,01	0,63
CH ₄ (%)	8,23	7,87	1,237	10,40	8,15	5,50	1,257	0,63	<0,01	0,52	<0,01	0,61
FP (mg MOVD/mL GP)	1,37	1,33	0,303	1,28	1,31	1,46	0,304	0,42	0,02	0,96	<0,01	0,27

¹MOVD = matéria orgânica verdadeiramente degradada; MSVD = matéria seca verdadeiramente degradada; PGT = produção de gases total; PCH₄ = produção de metano; FP = fator de partição

²Tratamentos experimentais: Dieta sem Monensina (- MON = 0 mL) e com (+ MON = 0,156 mg); adição de produto nitrato encapsulado (PNE) a 0; 1,5; 3,0% (% Matéria seca);

³EPM = erro padrão da média

⁴MON = efeito fixo da monensina (com (+) e sem (-) monensina); PNE = efeito fixo do Produto nitrato encapsulado (0; 1,5 e 3% PNE da Matéria seca); MON* PNE = interação entre MON e PNE, Efeito da adição de PNE: L = linear, Q = quadrático

^{a, b} Médias com diferentes letras na mesma linha indica efeito significativo do tratamento (Teste Tukey, *P*<0,05)

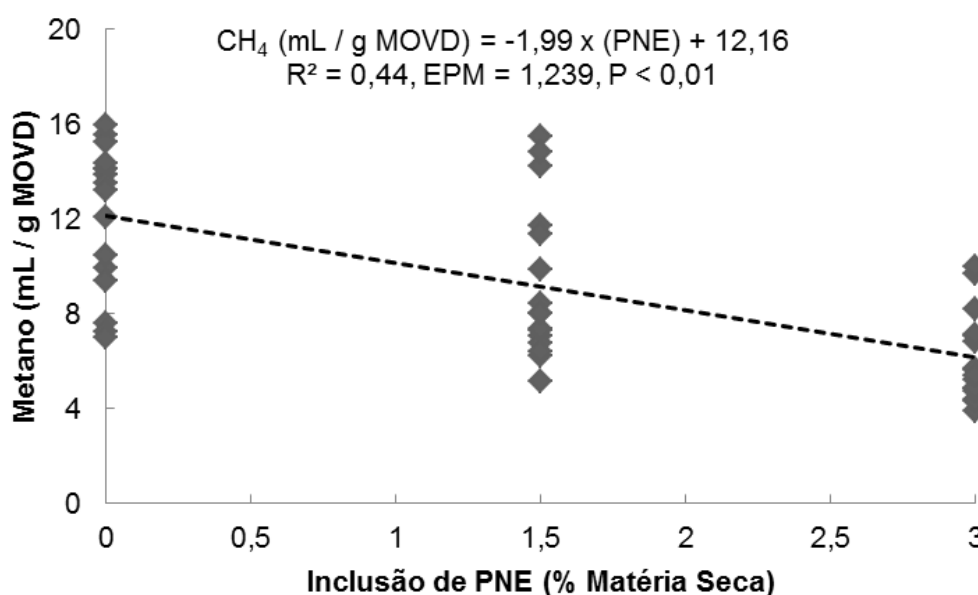


Figura 1 – Média da produção de metano (CH₄ mL/g MOVD) em dietas com inclusão de nitrato de cálcio encapsulado (PNE, 0; 1,5 e 3% MS)

Características ruminais

Pode ser observado na Tabela 3 que os constituintes ruminais não foram influenciados ($P > 0,05$) pela interação entre monensina e suplementação com PNE ($P > 0,05$). Porém, a produção total de AGCC apresentou tendência a interação ($P = 0,08$) entre monensina e PNE, resultando em regressão quadrática ($P_Q = 0,03$). Dietas com monensina apresentaram redução na produção total de AGCC quando suplementadas com 3% de PNE (Figura 2) comparadas às dietas sem suplementação com PNE (0% PNE). Comportamento semelhante foi observado para a produção de acetato que apresentou tendência da adição de PNE ($P = 0,07$) e efeito quadrático ($P_Q = 0,04$) em dietas com monensina suplementadas com nitrato, sendo que a produção de acetato decaiu nestas dietas quando 3% de PNE foi adicionado (48,2; 49,9 e 47,1 mmol / L, para 0; 1,5 e 3% de PNE).

Tabela 3 – Efeito da monensina (MON) e inclusão de nitrato de cálcio encapsulado (PNE) em ensaio *in vitro* sobre os parâmetros de fermentação ruminal

Item ¹	MON ²		EPM ³	PNE (MS %) ²			EPM ³	Valor- <i>P</i> ⁴				
	(-)	(+)		0	1,5	3		MON	PNE	MON*PNE	L	Q
pH	6,83	6,83	0,012	6,83	6,82	6,83	0,014	0,62	0,93	0,74	0,74	0,93
N-NH ₃ (mg/100 mL)	34,4	34,1	0,91	33,5	34,1	35,1	1,01	0,79	0,33	0,08	0,13	0,15
Total AGCC (mmol/L)	74,1	73,4	2,48	74,8	74,2	72,3	2,54	0,56	0,16	0,08	0,41	0,03
Concentração de AGCC (mmol/L)												
Acetato	48,8	48,5	1,22	48,6	48,9	48,3	1,28	0,56	0,80	0,07	0,74	0,56
Propionato	14,9	15,2	0,96	15,5	15,1	14,6	0,98	0,46	0,12	0,53	0,04	0,92
Isobutirato	0,5 ^a	0,4 ^b	0,02	0,5	0,4	0,4	0,02	<0,01	0,01	0,66	0,01	0,92
Butirato	7,6 ^a	7,1 ^b	0,35	7,8	7,5	6,8	0,37	0,04	<0,01	0,24	0,01	0,36
Isovalerato	0,9 ^b	1,0 ^a	0,08	1,0	0,9	0,9	0,08	0,01	<0,01	0,96	0,01	0,97
Valerato	1,3 ^a	1,2 ^b	0,04	1,3	1,3	1,2	0,04	0,01	<0,01	0,44	0,01	0,82
C2:C3	3,30 ^a	3,21 ^a	0,124	3,16	3,27	3,35	0,130	0,21	0,11	0,74	0,03	0,86

¹AGCC = Ácidos graxos de cadeia curta; C2:C3 = relação acetato: propionato;

²Tratamentos experimentais: Dieta sem Monensina (- MON = 0 mL) e com (+ MON = 0,156 mg); adição de produto nitrato encapsulado (PNE) a 0; 1,5; 3,0% (% Matéria Seca);

³EPM = erro padrão da média

⁴MON = efeito fixo da monensina (com (+) e sem (-) monensina); PNE = efeito fixo do Produto nitrato encapsulado (0; 1,5 e 3% PNE na Matéria Seca); MON* PNE = interação entre MON e PNE, Efeito da adição de PNE: L = linear, Q= quadrático

^{a, b} Médias com diferentes letras na mesma linha indica efeito significativo do tratamento (Teste Tukey, *P*<0,05)

A inclusão de monensina nas dietas reduziu ($P < 0,05$) a concentração molar dos ácidos butírico (7,6 vs 7,1), isobutírico (0,5 vs 0,4) e valérico (1,3 vs 1,2) e aumentou a concentração de isovalérico (0,9 vs 1,0) sem alterar significativamente ($P > 0,05$) a relação acetato:propionato, a concentração total de AGCC e a concentração de N-NH₃, comparado a dieta sem adição monensina e com adição de montesina respectivamente (Tabela 3).

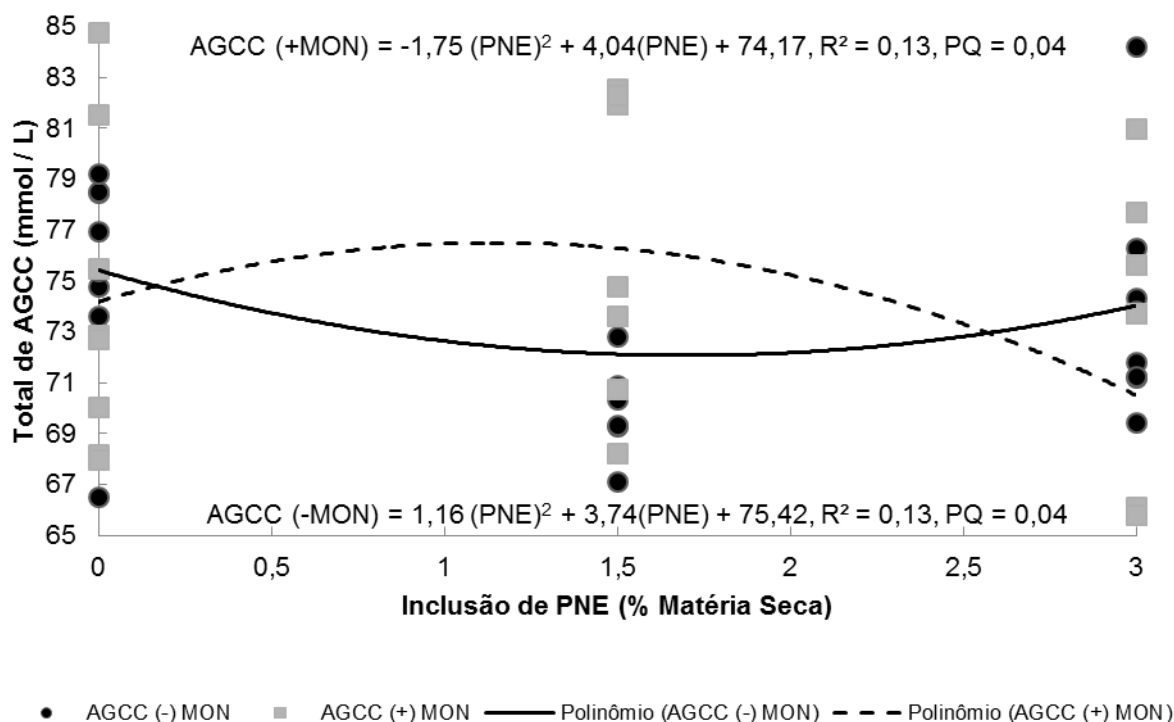


Figura 2 - Interação ($P = 0,08$) entre adição de monensina (com monensina(+MON) e sem monensina(-MON)) e inclusão de nitrato encapsulado (PNE, 0; 1,5 e 3% MS) sobre a produção total de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC).

A adição de PNE alterou a proporção de ácido butírico, que apresentou regressão linearmente negativa (7,8; 7,5 e 6,8 mmol/ L, $P_L < 0,01$) com a elevação da dose de PNE na dieta (0; 1,5 e 3 % NO₃). Isobutírico, valérico e isovalérico também reduziram ($P < 0,05$) suas concentrações com a adição de PNE. Essa alteração no perfil de AGCC pela adição de PNE não teve reflexo na relação produção total de AGCC ($P = 0,16$) nem tampouco na relação acetato:propionato ($P = 0,11$), embora uma maior relação de acetato ($P = 0,04$) foi observada na dieta sem monensina suplementada com 3% de PNE (3,43) em relação a dietas sem PNE (3,18).

População microbiana

O uso de monensina não afetou o número de protozoários ($P = 0,89$) nem mesmo a abundância relativa da população microbiana ($P > 0,05$), exceto *F. succinogenes* que teve sua abundância relativa aumentada ($P = 0,03$) no líquido ruminal incubado com a adição de monensina coletado após 24 horas em comparação a dietas sem monensina (1,72 vs 1,06, respectivamente). Essa bactéria também aumentou ($P = 0,04$) com a inclusão de níveis crescentes de PNE o que resultou em interação entre monensina e PNE ($P < 0,01$) para a abundância de *F. succinogenes* (Tabela 4).

A inclusão de 0, 1,5 e 3% de PNE no substrato aumento linearmente ($P < 0,01$) a abundância da bactéria nitrato/nitrito redutora *W. succinogenes* (1,02; 1,34 e 1,86; $y = 1,726 + 0,032x$; $P < 0,01$) e apresentou tendência a elevação da abundância de *S. ruminantium* (1,02; 1,34 e 1,47; $P = 0,09$), mas não influenciou o número de protozoários nem a expressão relativa de metanogênicas (Tabela 4).

Tabela 4 - Efeito da monensina (MON) e inclusão de nitrato de cálcio encapsulado (PNE) em ensaio *in vitro* sobre a expressão relativa da população microbiana (BACT 16S rDNA, $2^{-\Delta\Delta Ct}$)

Item	MON ¹		EPM ²	PNE (% MS) ¹			EPM ²	Valor- <i>P</i> ³				
								MON	PNE	MON x PNE	L	Q
	(-)	(+)		0	1,5	3						
<i>F. succinogenes</i> (%)	1,06 ^a	1,76 ^b	0,398	0,96	1,23	1,97	0,431	0,03	0,04	0,02	0,01	0,59
<i>R. flavefaciens</i> (%)	1,16	1,27	0,128	1,02	1,16	1,45	0,202	0,38	0,07	0,43	0,02	0,64
<i>A. metanogênicas</i> (%)	1,10	1,04	0,175	0,98	1,07	1,15	0,201	0,84	0,77	0,97	0,49	0,85
<i>S. ruminantium</i> (%)	1,09	1,47	0,270	1,02	1,34	1,47	0,288	0,09	0,58	0,47	0,33	0,71
<i>W. succinogenes</i> (%)	1,72	1,76	0,284	1,02	1,34	2,86	0,329	0,74	<0,01	0,93	0,01	0,28
Protozoários (cel x 10 ⁻⁴ /mL)	2,8	2,7	0,033	2,87	2,35	2,99	0,045	0,89	0,06	0,14	0,67	0,02

¹Tratamentos experimentais: Dieta sem Monensina (- MON = 0 mL) e com (+ MON = 0,156 mg); adição de produto nitrato encapsulado (PNE) a 0; 1,5; 3,0% (% Matéria Seca);

²EPM = erro padrão da média

³MON = efeito fixo da monensina (com (+) e sem (-) monensina); PNE = efeito fixo do Produto nitrato encapsulado (0; 1,5 e 3% PNE, %Matéria Seca); MON* PNE = interação entre MON e PNE, Efeito da adição de PNE: L = linear, Q= quadrático

^{a, b} Médias com diferentes letras na mesma linha indica efeito significativo do tratamento (Teste Tukey, $P < 0,05$)

3.4. Discussão

Após 24 h de incubação houve redução potencial de aproximadamente 50% na produção de metano em dieta suplementada com 3% de PNE comparada à dieta com 0% PNE. O uso de NO_3^- na dieta de ruminantes em média reduz de 16 a 50% a produção de metano (LENG, 2010) podendo chegar a reduções mais altas. No estudo de Zhou, Meng e Yu (2011) os autores relataram redução na produção de metano próxima a 70% com adição de 12 mM de nitrato de sódio em comparação com controle em ensaios *in vitro*. No presente experimento, a redução potencial do metano foi de 23,4 e 49,4 com adição de PNE de 1,5 e 3% (% MS) o que está dentro das reduções propostas por Leng (2010).

Esse resultado indicam que NO_3^- agiu como receptor de elétrons mais competitivo que o CO_2 , reduzindo a disponibilidade de H_2 para as metanogênicas. Desta forma, quando nitrato está presente no rúmen, H_2 é eficazmente utilizado na redução de nitrato a nitrito de nitrito a amônia, diminuindo assim a produção de metano (UNGERFELD; KOHN, 2006).

Outra hipótese é a inibição da produção de CH_4 pode ser atribuída à toxicidade direta de nitrito e outros produtos da redução de nitrato a amônia sobre as metanogênicas (BOZIC et al., 2009; SAR et al., 2005), mas, no presente experimento, não foi observada redução na expressão de metanogênicas com a adição de NO_3^- na dieta, indicando que não houve efeito direto do NO_3^- sobre a população de metanogênicas.

Outro fato a ser considerado é que o nitrato, além de esgotar o H_2 do meio, pode inibir as bactérias produtoras de H^+ , como *R. albus* e *R. flavefaciens*, reduzindo a disponibilidade de H_2 (ZHOU; YU; MENG, 2012), assim, quando a produção de H_2 reduz, a metanogênese é diminuída. Contudo, a adição de nitrato não influenciou significativamente as bactérias *R. flavefaciens*, além de que os tratamentos apresentaram semelhante degradação da MO, desta forma descartando a possibilidade de redução de bactérias produtoras de H_2 e por conseguinte redução do H_2 do meio.

Nas condições do presente experimento não foi observado efeito significativo da monensina sobre a redução do metano. Por sua vez, a adição de monensina suplementada com nitrato não promoveu elevação na mitigação de metano. Assim, o sinergismo especulado entre nitrato e monensina não foi confirmado para aumentar a redução de metano.

A monensina modificou os produtos da fermentação ruminal reduzindo a concentração de butirato, isobutirato, isovalerato e valerato, sem alterar a produção total de AGCC e a relação acetato:propionato.

A monensina é mais eficiente contra bactérias gram-positivas (maiores produtoras de hidrogênio, precursor de metano) que contra gram-negativas (CHEN; WOLIN, 1979). Porque a camada externa das gram-negativas é rica em lipopolissacarídeos o que promove maior proteção contra algumas substância (RUSSELL, 2002) como a monensina. Desta forma, monensina aumenta a concentração de propionato e diminui a produção de metano (SCHELLING, 1984). Neste estudo não foi observado aumento na concentrações de propionato com adição de monensina nem redução na produção de CH₄. É possível que a quantidade de monensina utilizada não tenha sido capaz de atuar sobre o metabolismo das bactérias gram-positivas diminuindo sua concentração e, consequentemente, aumentando a relação de gram-negativas, uma vez que o aumento do propionato pelo uso de monensina está relacionado a seleção de bactérias gram-negativas formadores de succinato, que descarboxila succinato para formar propionato (RICHARDSON et al., 1976).

Por outro lado, a redução de butirato pode indicar uma inibição de gram-positivas produtoras de ácido butírico, pois ionóforos inibem a maior produtora de butirato, a bactéria gram-positiva *B. fibrisolvens* (RUSSELL, 2002). A redução na produção de isobutirato e valerato pode estar associada a inibição da atividade dos protozoários do rúmen que são sensíveis à monensina (BERGEN; BATES, 1984). Neste experimento, a adição de monensina proporcionou uma redução numérica, mais não significativa, no número de protozoários após 24h de incubação.

A redução dos isobutírico e isovalérico com a adição da monensina pode estar relacionada ao fato que monensina reduz a desaminação ruminal juntamente com a inibição de bactérias hiperprodutoras de NH₃ (RUSSEL et al, 1988), uma vez que a inibição dos isoácidos indica atenuação da desaminação.

O uso de PNE proporcionou redução na produção de butirato que pode sugerir que altas doses de nitrato impedem a conversão de acetato a butirato. A síntese de butirato ocorre no rúmen a partir do acetato ou de outros compostos que resultem em Acetil-CoA (piruvato e glutamato). Portanto, quando nitrato está presente há competição entre ele e Acetil-CoA por elétrons (FARRA; SATTER, 1971). Quando os elétrons são desviados para a redução de nitrato, a síntese de butirato é diminuída resultando em maior produção de acetato.

Por sua vez, acetado foi reduzido em dietas com monensina suplementadas com 3% de PNE. O decréscimo na produção de acetato pode estar relacionado a redução de bactérias gram-positivas, produtoras de acetato, que além de serem sensíveis a monensina

(RUSSEL; HOULIHAN, 2003) podem ter sido reduzidas por intoxicação por nitrito, quando NO_3^- foi incubado em alta dose (3% PNE). Sabendo que acetato é um liberador de H^+ para o meio, sua redução acarreta na menor produção de CO_2 e H^+ (CALLAWAY et al., 2003), o que contribui para os resultados de menor proporção de metano, em relação a produção total de gases, nas dietas com 3% de PNE.

A produção de isoácidos está relacionada ao catabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada com valina e leucina (RUSSEL, 2002), portanto a redução dos isoácidos com a inclusão crescente de PNE em substituição ao farelo de soja pode indicar menor deaminação decorrente da redução de proteína verdadeira fornecida pelo farelo de soja.

A inclusão de PNE não apresentou efeito significativo sobre a produção total de AGCC e sobre a relação acetato:propionato. Porém, na dieta sem monensina quando foi adicionado 3% de PNE foi observado aumento na relação acetato:propionato em comparação a mesma dieta com 0% de PNE. Esse comportamento sugere que em elevada dose de NO_3^- (2,006%) a redução de NO_3^- competiu pelo uso de H^+ com a propiogênese (VAN ZIJDERVELD et al., 2010) suprimindo a produção de propionato e favorecendo a formação de acetato, o que resultou em elevação na relação acetato:propionato.

As bactérias gram-negativas têm membrana externa que impede que a monensina atinja a membrana celular, sendo, portanto, mais resistentes à monensina que as bactérias gram-positivas (STROBEL; RUSSELL, 1989). Embora monensina não tenha atuado significativamente sobre as gram-positivas, possivelmente a adição de monensina em conjunto com NO_3^- , mais especificamente nitrito, possa ter inibido o desenvolvimento geral da concentração de gram-positivas no meio, consequentemente, aumentando gram-negativas, como *F. succinogenes*.

Nitrato não reduziu o número de protozoários nem inibiu metanogênicas, mas aumentou a proporção relativa de bactérias nitrato e nitrito redutoras como *W. succinogenes*, possivelmente em razão da adição de nitrato na dieta ter possibilitado o aumento de substrato para o crescimento destas bactérias. Aumento de nitrato e nitrito redutoras, *W. succinogenes* e *S. ruminantium*, também foi observado por Lin et al. (2011) com a adição de nitrato na dieta.

3.5. Conclusão

Nitrato encapsulado pode ser usado em substituição ao farelo de soja para mitigação do metano entérico, sem afetar a população microbiana e a degradabilidade da matéria orgânica. Não foi comprovado o efeito da monensina em potencializar a redução de metano

quando adicionada em dietas com nitrato, mas observou-se efeito acumulativo entre nitrato e monensina para redução na produção dos ácidos graxos de cadeia curta, o que sugere menor disponibilidade de energia necessária para o crescimento microbiano e menor síntese de proteína microbiana.

Referências

ARAUJO, R. C.; PIRES A. V.; MOURO, G. B.; ABDALLA, A. L.; SALLAM, S. M. A. Use of blanks to determine in vitro net gas and methane production when using rumen fermentation modifiers. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 166, p. 155-162, 2011.

ASANUMA, N.; IWAMOTO, M.; KAWATO, M.; HINO, T. Numbers of nitrate-reducing bacteria in the rumen as estimated by competitive polymerase chain reaction. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, p. 199–205, 2002.

BEACON, S. E. Effect of the feed additives chlortetracycline, monensin and lasalocid on feedlot performance of finishing cattles, liver lesions and tissue level of chlortetracycline. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 68, p. 1131-1141, 1988.

BEAUCHEMIN, K. A.; KREUZER, M.; O'MARA, F.; MCALLISTER, T. A. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, East Melbourne, v. 48, p. 21-27, 2008.

BERGEN, W. G.; BATES, D. B. Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 58, p. 1465-1483, 1984.

BLÜMMEL, M.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. *In vitro* gas production: a technique revisited. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v.77, p.24-34, 1997.

BOZIC, A. K.; ANDERSON, R. C.; CARSTENS, G. E.; RICKE, S. C.; CALLAWAY, T. R.; YOKOYAMA, M. T.; WANG, J. K.; NISBET, D. J. Effects of the methane-inhibitors nitrate, nitroethane, lauric acid, Lauricidin and the Hawaiian marine algae *Chaetoceros* on ruminal fermentation in vitro. **Bioresource Technology**, Essex, v. 100, p. 4017–4025, 2009.

BUENO, I. C. S.; CABRAL FILHO, S. L. S.; GOBBO, S. P.; LOUVANDINI, H.; VITTI D. M. S. S.; ABDALLA, A. L. Influence of inoculum source in a gas production method. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 123-124, p. 95-105, 2005.

CALLAWAY, T. R.; EDRINGTON, T. S.; RYCHLIK, J. L.; GENOVESE, K. J.; POOLE, T. L.; JUNG, Y. S.; BISCHOFF, K. M.; ANDERSON, R. C.; NISBERT, D. J. Ionophores: their use as ruminant growth promotants and impact on food safety. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, Haverhill, v. 4, p. 43-51, 2003.

CHEN, M.; WOLIN, M. J. Effect of monensin and lasalocidsodium on the growth of methanogenic and rumen saccharolytic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 38, p. 72-77, 1979.

DENMAN, S. E.; MCSWEENEY, C. S. Development of a realtime PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 58, p. 572–582, 2006.

DENMAN, S. E.; TOMKINS, N. W.; MCSWEENEY, C. S. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane, **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 62, p. 313-322, 2007.

DEHORITY, B. A.; DAMRON, W. S.; MCLAREN, J. B. Occurrence of the rumen ciliate *Oligoisotricha bubali* in domestic cattles (*Bos taurus*). **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 45, p. 1394-1397, 1983.

EL-ZAIAT, H. M.; ARAUJO, R. C.; SOLTAN, Y. A.; MORSY, A. S.; LOUVANDINI, H.; PIRES, A. V.; PATINO, H. O.; CORREA, P. S.; ABDALLA, A. L. Encapsulated nitrate and cashew nut shell liquid on blood and rumen constituents, methane emission, and growth performance of lambs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 92, p. 2214-2224, 2014.

FARRA, P. A.; SATTER, L. D. Manipulation of the ruminal fermentation. III. Effect of nitrate on ruminal volatile fatty acid production and milk composition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 54, p. 1018-1024, 1971.

GUAN, H.; WITTENBERG, K. M.; OMINSKI, K. H.; KRAUSE, D. O. Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, p. 1896-1906, 2006.

LEE, C.; ARAUJO, R. C.; KOENIG, K. M.; BEAUCHEMIN, K. A. Effects of encapsulated nitrate on enteric methane production, and nitrogen and energy utilization in beef heifers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 93, p. 2391-2404, 2015a. doi: 10.2527/jas2014-8845.

LEE, C.; ARAUJO, R. C.; KOENIG, K. M.; BEAUCHEMIN, K. A. Effects of encapsulated nitrate on eating behavior, rumen fermentation, and blood profile of beef heifers fed restrictively or *ad libitum*. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 93, p. 2405-2418, 2015b. doi: 10.2527/jas2014-8851

LEE, C.; BEAUCHEMIN, K. A. A review of feeding supplementary nitrate to ruminant animals: Nitrate toxicity, methane emissions, and production performance. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 94, p. 557–570, 2014.

LENG, R. A. Decline in available world resources; implications for livestock production systems in Asia. **Livestock Research for Rural Development**, Cali, v. 20, p. 8, 2008. Disponível em: <http://www.lrrd.org/lrrd20/1/leng20008.htm>.

LENG, R. A. Further considerations of the potential of nitrate as a high affinity electron acceptor to lower enteric methane production in ruminants. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON LIVESTOCK, CLIMATE CHANGE AND RESOURCE DEPLETION, 2010, Pakse, Laos. **Proceedings...** Pakse, Laos: Champasack University, 2010. p. 9–11.

LI, L.; SILVEIRA, C. I.; NOLAN, J. V.; GODWIN, I. R.; LENG, R. A.; HEGARTY, R. S. Effect of added dietary nitrate and elemental sulfur on wool growth and methane emission of Merino lambs. **Animal Production Science**, Victoria, v. 53, p. 1195–1201, 2013.

LIN, M.; SCHAEFER, D. M.; GUO, W. S.; REN, L. P.; MENG, Q. X. Comparisons of in vitro nitrate reduction, methanogenesis, and fermentation acid profile among rumen bacterial, protozoal and fungal fractions. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, Seoul, Korea, v. 24, p. 471–478, 2011.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, Orlando, v. 25, p. 402–408, 2001.

LONGO, C.; BUENO, I. C. S.; NOZELLA, E. F.; GODDOY, P. B.; CABRAL FILHO, S. L. S.; ABDALLA, A. L. The influence of head-space and inoculum dilution on in vitro ruminal methane measurements. **International Congress Series**, Amsterdam, v. 1293, p. 62–65, 2006.

MAURÍCIO, R. M.; MOULD, F. L.; DHANOA, M. S.; OWEN, E.; CHANNA, K. S.; THEODOROU, M. K. A semiautomated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 79, p. 321–330, 1999.

NAZZARO, F.; ORLANDO, P.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R. Microencapsulation in food science and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 23, p. 182–186, 2012.

NOCEK, J. E.; HART, S. P.; POLAN, C. E. Rumen ammonia concentrations as influenced by storage time, freezing and thawing, acid preservative, and method of ammonia determination. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 70, p. 601–607, 1987.

OBISPO, N. E.; DEHORITY, B. A. A most probable number method for enumeration of rumen fungi with studies on factors affecting their concentration in the rumen. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 16, p. 259–270, 1992.

PALMQUIST, D.; CONRAD, H. Origin of plasma fatty acids in lactating cows fed high grain or high fat diets. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 54, p. 1025–1031, 1971.

PRESTON, T. R. **Tropical animal feeding**: a manual for research workers. Rome: FAO, 1995. 126 p. (Animal Production and Health Paper).

RICHARDSON, L. F.; RAUN, A. P.; POTTER, E. L.; COOLEY, C. O.; RATHMACHER, R. P. Effect of monensin on ruminal fermentation in vitro and in vivo. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 43, p. 657–664, 1976.

RUSSELL, J. B.; HOULIHAN, A. J. Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 27, p. 65–74, 2003.

RUSSELL, J. B. **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**. Washington, DC: USDA, ARS, 2002.

RUSSELL, J. B.; STROBEL, H. J. Effects of additives on *in vitro* ruminal fermentation a comparison of monensin and bacitracin, another gram-positive antibiotic. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 66, p. 552-588, 1988.

SAR, C.; MWENYA, B.; SANTOSO, B.; TAKAURA, K.; MORIKAWA, R.; ISOGAI, N.; ASAKURA, Y.; TORIDE, Y.; TAKAHASHI, J. Effect of *Escherichia coli* wild type or its derivative with high nitrite reductase activity on *in vitro* ruminal methanogenesis and nitrate/nitrite reduction. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, p. 644-652, 2005.

SCHELLING, G. T. Monensin mode of action in the rumen. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 58, p. 1518-1527, 1984.

STROBEL, H. J.; RUSSELL, J. B. Non-proton-motiveforce-dependent sodium efflux from the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*: bound versus free pools. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 55, p. 2664-2668, 1989.

THEODOROU, M. K.; WILLIAMS, B. A.; DHANOA, M. S.; McALLAN, A. B.; FRANCE, J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.48, p. 185–197, 1994.

UNGERFELD, E. M.; KOHN, R. A. The role of thermodynamics in the control of rumen fermentation. In: SEJRSEN, K.; HVELPLUND, T.; NIELSEN, M. O. (Ed.). **Ruminant physiology: digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress**. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2006. p. 55–85.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, p. 3583-3597, 1991.

VAN ZIJDERVELD, S. M.; GERRITS, W. J. J.; DIJKSTRA, J.; NEWBOLD, J. R.; HULSHOF, R. B. A.; PERDOK, H. B. Persistency of methane mitigation by dietary nitrate supplementation in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, p. 4028-4038, 2011.

VAN ZIJDERVELD, S. M.; GERRITS, W. J. J.; APAJALAHTI, J. A.; NEWBOLD, J. R.; DIJKSTRA, J.; LENG, R. A.; PERDOK, H. B. Nitrate and sulfate: Effective alternative hydrogen sinks for mitigation of ruminal methane production in sheep. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, p. 5856–5866, 2010.

ZHOU, Z.; MENG, Q.; YU, Z. Effects of methanogenic inhibitors on methane production and abundances of methanogens and cellulolytic bacteria in *in vitro* ruminal cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 77, p. 2634–2639, 2011.

ZHOU, Z.; YU, Z.; MENG, Q. Effects of nitrate on methane production, fermentation, and microbial populations in *in vitro* ruminal cultures. **Bioresource Technology**, Essex, v. 103, p. 173–179, 2012.

4. NITRATO ENCAPSULADO ALTERA A FERMENTAÇÃO RUMINAL E A PRODUÇÃO DE METANO *IN VITRO* EM DIETAS COM DIFERENTES RELAÇÕES CONCENTRADO:VOLUMOSO

Resumo: Nitrato efetivamente reduz a produção de metano ruminal, entretanto, pouco se sabe sobre a interação dele com o tipo de dieta. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da substituição em equivalente proteico do farelo de soja por produto nitrato de cálcio encapsulado (PNE) em dietas com relações concentrado:volumoso contrastantes sobre as características fermentativas e produção de metano utilizando a técnica de produção de gases *in vitro*. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4 para testar os substratos experimentais. Os fatores estudados foram dois tipos de dietas (relações concentrado:volumoso de 20:80 e 80:20) e quatro níveis de PNE (0; 1,5; 3,0 e 4,5% da MS da dieta) substituindo o farelo de soja e mantendo as dietas isonitrogenadas. Nitrato reduziu linearmente ($P < 0,01$) a proporção de metano, em relação a produção total de gases, em ambas as dietas, resultando em regressão linear ($y = 10,15 - 0,709x$, EPM = 0,744, $P < 0,01$) conforme aumentavam os níveis de inclusão de PNE, sem afetar significativamente ($P = 0,60$) a degradabilidade verdadeira da matéria orgânica (DVMO). Houve interação entre a quantidade de concentrado na dieta e a adição de PNE ($P < 0,04$) para a produção de metano (mL/g DVMO), sendo que dietas com alta relação de carboidratos fibrosos apresentaram maior redução potencial de metano (7,51; 6,63; 6,10 e 4,81 mL) comparadas a dietas com alto concentrado (19,4; 17,8; 15,7 e 13,6 mL) quando foi incluído 0; 1,5, 3 e 4,5% de PNE, respectivamente. A produção total de ácidos graxos de cadeia curta foi maior ($P < 0,01$) em dietas com maiores relação de concentrado (77,53 mmol/L) comparadas a dietas com 80% de volumoso (68,65 mmol /L) refletindo maior degradação dos nutrientes. A substituição de farelo de soja por PNE reduziu a emissão de metano em ambas as dietas sem causar prejuízo à degradabilidade da matéria orgânica.

Palavras-chave: ácidos graxos de cadeia curta, fermentação, nitrogênio não proteico, produção de gases.

Encapsulated nitrate changes *in vitro* ruminal fermentation and methane production in diets differing in concentrate:forage ratio

Abstract: Nitrate effectively reduces ruminal methane production, however little is known about its interaction with type of diet. The objective of this study was to evaluate the effects of encapsulated nitrate product (ENP) replacing soybean meal in diets contrasting in concentrate:forage ratio on ruminal fermentation and methane production using the semi-automatic *in vitro* gas production technique. A complete randomized design in a 2 × 4 factorial arrangement was used to test experimental substrates. Factors studied included type of diet (20:80 and 80:20 concentrate:forage ratio) and level of inclusion of encapsulated nitrate (0, 1.5, 3.0, and 4.5% in dietary DM) replacing soybean meal to achieve isonitrogenous diets. Nitrate reduced linearly ($P < 0.01$) the methane relative proportion resulting in linear decreasing ($10,148 - 0,709x$, $SEM = 0.744$, $P < 0.01$) when ENP was added, without significantly affecting ($P = 0.60$) the truly degradability of organic matter (TDOM). There was concentrate and ENP interaction ($P < 0.04$) for methane production (ml / g TDOM), diets with high proportion of fibrous carbohydrate showed a higher methane reduction (7, 51; 6.63; 6.10 and 4.81 ml) compared to diets with higher concentrate (19.4; 17.8; 15.7 and 13.6 mL), with increasing levels of nitrate (0, 1.5, 3 and 4.5% respectively). The total production of short chain fatty acids was higher ($P < 0.01$) in diets with high concentrate (77.53 mmol/L), compared to diets with 80% forage (68.65 mmol / L) reflecting higher degradation of nutrients. The replacement of soybean meal by encapsulated nitrate reduced the emission of methane in both diets without affecting the degradability of organic matter.

Additional keywords: fermentation, gas production, non-protein nitrogen, short-chain fatty acids

3.1 Introdução

Nos ruminantes, o hidrogênio resultante da degradação dos nutrientes precisa ser removido do rúmen para manter o processo de fermentação ruminal e crescimento microbiano (RUSSEL, 2002). Embora essa remoção seja primordial, não é necessário que isso ocorra pelo processo de metanogênese (COTTLE; NOLAN; WIEDEMANN, 2011). Há uma gama de vias bioquímicas alternativas e, em algumas circunstâncias, estas podem ser competitivas com a produção de metano (UNGERFELD; KOHN, 2006). Dentre as possibilidades, o fornecimento de nitrato ao animal está sendo investigado para esse fim (NOLAN et al., 2010; VAN ZIJDERVELD et al., 2010; VAN ZIJDERVELD et al., 2011; HULSHOF et al., 2012; LI et al., 2012; LI et al., 2013; EL-ZAIAT et al., 2014; LEE et al., 2015) por reduzir a produção de metano além de ser fonte de nitrogênio não proteico (NNP) para os ruminantes. Em alimentação contínua com nitrato, certos microrganismos do rúmen reduzem nitrato a nitrito e, posteriormente, este a amônia (LEWIS, 1951; LENG, 2008) estabelecendo rota alternativa à eliminação do hidrogênio.

Entretanto, o uso de nitrato está sendo discutido para mitigação de metano devido à intoxicação por nitrito, que pode ocorrer se o animal não for adaptado ao consumo de nitrato. Contudo, em revisão recente Lee e Beauchemin (2014) concluíram que, quando o animal é gradualmente adaptado ao nitrato na dieta, o acúmulo de nitrito no rúmen é evitado, reduzindo o efeito tóxico.

A composição da dieta tem efeito na comunidade microbiana ruminal, mudando não apenas os principais grupos de bactérias responsáveis pela degradação do substrato, como celulolíticas, proteolíticas e amilolíticas (TAJIMA et al., 2001; BELANCHE et al., 2012), mas também protozoários e Arqueas metanogênicas (POPOVA et al., 2011; DANIELSSON et al., 2012). Consequentemente, dietas com relação concentrado:volumoso distinta resultam em mudança no perfil de AGCC, aumentando propionato e reduzindo acetato e produção de metano (BEAUCHEMIN; MCGIM, 2005; MATSUYAMA; HORIGUCHI; TAKAHASHI, 2000).

O uso suplementar de nitrato também altera a comunidade microbiana, resultando em aumento da população de nitrato e nitrito redutoras (IWAMOTO; ASANUMA; HINO, 2002; LI et al., 2013) e muda os produtos da fermentação ruminal (NOLAN et al., 2010; HULSHOF et al., 2012; LI et al., 2012). Contudo, são poucas as informações existentes sobre a influência que o tipo de dieta pode ter sobre a eficácia de mitigação de metano do mesmo.

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da substituição do farelo de soja por nitrato encapsulado em dietas com relações concentrado:volumoso de 20:80 e 80:20 sobre a emissão de metano e características ruminais.

3.2 Material e métodos

O experimento foi conduzido entre Junho a Setembro de 2013 no Laboratório de Nutrição Animal (Lana), Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo (CENA/USP), localizado no município de Piracicaba, São Paulo, Brasil. Todos os procedimentos de uso de animais foram aprovados pela Comissão Interna de Ética Ambiental e Experimentação Animal do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (protocolo nº 2013-6; Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil).

Delineamento experimental e tratamentos

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4, sendo duas dietas com relações concentrado:volumoso 20:80 e 80:20 e quatro doses (0; 1,5; 3 e 4,5% da MS) do produto nitrato de cálcio encapsulado (PNE). Estima-se que a dose de PNE correspondiam a 0; 1,0; 2,01 e 3,01% de nitrato (NO_3^-) na MS da dieta. O PNE substituiu o farelo de soja em dietas isonitrogenadas (12% PB). As dietas foram formuladas conforme recomendação do NRC (2007) para categoria de ovinos adultos em manutenção e foram moídas a 1 mm em moinho Willey (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil), apenas o PNE foi incubado na forma original encapsulada. Os substratos incubados (dietas experimentais) são apresentados na Tabela 1.

Foram utilizados quatro diferentes inóculos considerados como repetição e dois frascos por inóculo considerados como réplicas. Para cada inóculo, um branco (garrafa sem substrato, contendo apenas inóculo e meio de incubação) foi incluído em duplicata para correção dos dados de produção de gás e degradabilidade. Um padrão interno constituído de feno de Tifton 85 (substrato com produção de gás conhecida) foi incluído em duplicata por inóculo para monitorar as condições de incubação. Assim, para cada inóculo, foram incubadas 20 garrafas contendo a dieta experimental, branco e padrão interno.

Tabela 1 - Ingredientes e composição química dos substratos experimentais (% MS)

Itens	20c:80v ¹				80c:20v ¹			
	0	1,5	3,0	4,5 ¹	0	1,5	3,0	4,5 ¹
Ingredientes (%)								
Feno Tifton 85 ²	80,0	80,0	80,0	80,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Milho grão ³	8,0	10,5	13,0	15,5	69,5	72,0	74,6	75,5
Farelo Soja ⁴	12,0	8,0	4,0	-	10,5	6,5	2,4	-
PNE ¹	-	1,5	3,0	4,5	-	1,5	3,0	4,5
Análise Química⁵ (em g/kg MS)								
MS, base da Matéria original	881,0	880,2	879,3	878,5	883,2	882,4	881,5	880,8
MO	950,7	938,4	926,0	913,7	976,4	964,1	951,8	938,4
PB	120,8	120,5	120,2	120,1	121,3	121,1	120,4	126,0
EE	27,2	27,1	26,0	26,2	27,2	27,2	27,2	28,0
FDN	707,5	706,7	707,6	707,6	463,0	462,9	463,1	460,7
FDA	433,4	430,0	426,7	426,3	147,1	143,8	140,4	138,1
NO ₃ ⁻⁶	-	1,00	2,00	3,01	-	1,00	2,00	3,01

¹ Tratamentos dietas com relação concentrado:volumoso (20c:80v e 80c:20v) e inclusão do Produto nitrato encapsulado (PNE, 0; 1,5; 3 e 4,5% MS);

² MS (Média ± Desvio Padrão): 879,1 ± 0,47; PB: 75,52 ± 1,24; FDN: 807,7 ± 3,7 (em g/kg MS); Desvio Padrão (DP) média de 4 amostras;

³ MS (Média ± DP): 883,03 ± 0,54; PB: 85,45 ± 1,27; FDN: 396,3 ± 54 (em g/kg MS);

⁴ MS (Média ± DP): 892,6 ± 0,41; PB: 446,47 ± 4,66; FDN: 247,9 ± 1,5 (em g/kg MS);

⁵ MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo; FDN: fibra em detergente neutro, FDA: fibra em detergente ácido (em g/kg MS);

⁶ estimativa da quantidade de NO₃⁻ provida pelo PNE (em %).

O PNE utilizado no experimento é protegido por uma patente internacional e foi fabricado pela GRASP Ind. & Com. LTDA (Curitiba, PR, Brasil). A fabricação utilizou o sal duplo de nitrato de cálcio e amônio decahidratado [5Ca(NO₃)₂.NH₄NO₃.10H₂O] revestido com uma matriz de libertação controlada. O produto foi concebido para libertar 50, 80 e 100% de NO₃⁻ dentro de 4, 12 e 30 h, respectivamente. A composição do PNE era (% MS): 85,17% MS, 16,47% N (102,9% PB-equivalente), 66,86 % NO₃⁻ e 19,61% Ca.

Condições de incubação

Foi utilizada a técnica *in vitro* de produção de gases (THEODOROU et al., 1994) adaptada ao sistema semiautomático (MAURÍCIO et al., 1999) com modificações propostas no Laboratório de Nutrição Animal (BUENO et al., 2005 e LONGO et al., 2006), usando transdutor de pressão e data logger (Press Data 800, Lana, CENA/USP, Piracicaba, SP, Brasil).

A incubação foi realizada em frascos de vidro de 160 mL e *head space* de 85 mL, onde foram adicionados 500 mg de dieta experimental, 50 mL de meio de incubação (meio tampão Theodorou descrito em Preston, 1995) e 25 mL de inóculo. Os frascos foram fechados com tampas de borracha de 20 mm (Bellco Glass Inc., Vineland, NJ, USA), misturados manualmente e incubados à 39 °C em estufa de circulação forçada (Marconi MA35, Piracicaba, SP, Brasil) por 24 h.

A pressão do gás foi medida às 2, 4, 8, 16 e 24 h de incubação. Para determinação da produção de metano, 2 mL de gás foram amostrados em cada tempo de mensuração de pressão, utilizando seringa de 5 mL e armazenados em tubo de vácuo de 10 mL. Após cada amostra de gás, a pressão interna foi aliviada, os frascos homogeneizados manualmente e recolocados na estufa. Ao término do tempo de incubação, 24h, os frascos foram colocados em água fria (4 °C) para cessar a fermentação.

Preparação do inóculo e do substrato

Oito ovinos Santa Inês machos (62 kg $\pm$ 3,5 kg), castrados e fistulados no rúmen foram utilizados como doadores de inóculo. Cada inóculo foi composto do líquido ruminal de dois doadores diferentes, totalizando quatro inóculos. Os animais foram alimentados individualmente. O alimento era fornecido *ad libitum* duas vezes ao dia (manhã e tarde). A dieta era composta por 50% de feno de Tifton 85 (*Cynodon* spp.) e 50% de concentrado (milho moído, farelo de soja e mistura mineral) com 18% PB e adição de 1% de PNE, com acesso livre a sal mineral e água.

Para garantir a população de nitrato e nitrito redutoras no inóculo incubado foi adicionado à dieta dos doadores 1% de PNE, para garantir a atividade mínima de redução de nitrato e nitrito, bem como, o número de nitrato redutoras no rúmen dos doadores. Como a coleta de inóculo foi realizada antes da alimentação da manhã, possivelmente, o nitrato referente a alimentação do dia anterior já estaria metabolizado, minimizando a influência do

nitrato vindo do inóculo na dieta 0% PNE. A proporção 50:50 concentrado:volumoso na dieta foi escolhida para proporcionar uma comunidade microbiana no inóculo capaz de degradar carboidratos fibrosos e não fibrosos. O período de adaptação à dieta foi de 14 dias.

O líquido ruminal e a fração sólida foram coletados em volumes similares (50:50), separadamente de cada animal, antes da alimentação matinal e armazenados em recipientes térmicos pré-aquecidos sob condições anaeróbicas. A fração líquida foi obtida por meio da inserção de sonda de aço inoxidável (tela de 2,5 mm diâmetro) anexado a uma seringa de grande capacidade (60 mL). A fração sólida foi retirada com auxílio de uma pinça de cabo longo. No laboratório, volumes semelhantes de ambas as frações (50:50) foram homogeneizados por 10 segundos utilizando liquidificador e filtrados em três camadas de tecido de algodão. A mistura foi mantida em banho-maria a 39 °C sob fluxo de CO₂ até a inoculação. O inóculo final consistia da mistura do conteúdo ruminal de dois ovinos.

Produção de gás e metano *in vitro*

O volume de gás total foi calculado por equação de regressão definida para as condições locais, aplicando a equação 1:

$$V=7,365 \times p \text{ (n=500; } r^2=0,99\text{);} \quad (1)$$

Onde: V= volume de gás (mL); e p = pressão mensurada (psi). A produção de gás total (PGT), em 24 h de incubação, foi considerada como a somatória parcial da produção de gás em cada intervalo de tempo.

A concentração de metano foi determinada em cromatógrafo gasoso (Shimadzu GC-2014, Tóquio, Japão) equipado com uma coluna Shincarbon ST 100/120 micro empacotada (diâmetro externo de 1,5875 mm, diâmetro interno de 1,0 mm e comprimento de 1 m; Ref. número 19809; Restek, Bellefonte, PA, EUA). As temperaturas de coluna, injetor e detector de chama foram 60, 200 e 240 °C, respectivamente. O gás de arraste foi o hélio a um fluxo de 10 mL/min. Concentrações de metano foram determinadas por calibração externa usando curva analítica (0, 30, 90 e 120 mL/L) preparado com metano puro (White Martins PRAXAIR Gases Industriais Inc., Osasco, SP, Brasil; pureza 99,5 mL/L)

A produção de metano (PCH₄) foi determinada de acordo com Longo et al. (2006), sendo (Equação 2):

$$\text{PCH}_4, \text{ mL} = (\text{PGT}, \text{ mL} + \text{Head space}, 85 \text{ mL}) * \text{concentração de CH}_4, \text{ mL/mL} \quad (2)$$

Os valores de PGT e PCH₄ foram expressos em função da matéria orgânica verdadeiramente degradada (mL/g MOVD).

Degradabilidade ruminal e características fermentativas

Após 24 h de incubação, 70 mL de solução detergente neutro (VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991) sem α -amilase foram adicionados em cada frasco e incubados a 105 °C por 3 h. O resíduo dos frascos foi filtrado em cadinhos pré-pesados, lavado com água quente e acetona e seco em estufa à 105 °C por 16 h. A MOVD foi determinada após calcinação a 550 °C por 4 h com correção para o correspondente branco. A relação entre MOVD (mg) e PGT (mL) em 24h foi utilizada como índice de eficiência de síntese microbiana (FP: fator de partição; BLÜMMEL; MAKKAR; BECKER, 1997).

Amostras do conteúdo dos frascos foram coletadas e armazenadas (-20 °C) para posterior análise de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC).

A concentração de N-NH₃ foi analisada por micro-Kjeldahlj por destilação a vapor com solução de tetraborato de sódio (5%), coletado em solução de ácido bórico e determinado por titulação com solução de ácido sulfúrico (0,01 N) de acorfo com Preston (1995).

Os AGCC foram determinados por cromatografia gasosa, de acordo com Nocek, Hart e Polan (1987); Palmquist e Conrad (1971), com modificações, em cromatógrafo a gás (Shimadzu 2014, Tokyo, Japão) equipado com uma coluna GP 10 % SP-1200/1 H₃PO₄ 80/100 Chromosorb WAW (Cat. no. 11965; 6' x 1/8" stainless steel, Supelco, Bellefonte, PA, USA).

O fluido ruminal foi centrifugado 11000 g (RC 5B PLUS, Sorval, Wilmington, DE, USA) por 40 min a 4 °C. Posteriormente foram coletados 800 µL do sobrenadante e adicionados 100 µL de ácido 2-etil-butírico (padrão interno, MW=116,16; Sigma Chemie GmbH, Steinheim, Germany) e 200 µL de ácido fórmico P.A.

Injetou-se 1 µL de amostra em cromatógrafo gasoso equipado com detector de Ionização de Chama (FID) sob temperatura de 250 °C. As condições de aquecimento de forno foram: 100 °C (3,2 min), 123 °C (10 °C/min; 1,25 min), 126 °C (10 °C/min; 5 min), com duração total da análise de 10,55 minutos. Gás hélio à 25 mL/min foi usado como gás de

arraste. No detector, os fluxos de hidrogênio e ar sintético foram mantidos a 40 e 400 mL/min, respectivamente.

A curva de calibração externa foi preparada utilizando uma concentração padrão conhecida de AGCC (Chem Service, West Chester, PA, EUA, acético 99,5%, CAS 64-19-97; propiônico 99%, CAS 04-09-79; isobutírico 99%, CAS 79-31-2; butírico 98,7%, CAS 107-92-6; isovalérico 99%, CAS 503-74-2 e valérico 99%, CAS 109-52-4; Chem Service, West Chester, PA, EUA).

Análise Estatística

Os dados foram testados para análise de variância, utilizando o procedimento MIXED do programa SAS® v93 (*Statistical Analysis System Int., Cary, NC*). A variável resposta foi a média por frasco por inóculo. O modelo incluiu o efeito fixo da dieta, da dose de PNE e do inóculo e a interação entre dieta e dose de PNE. Para dose foi realizado o teste para regressão utilizando o procedimento REG (SAS®). As médias foram obtidas pelo comando LSMEANS (SAS®). Os efeitos fixos significativos foram identificados pelo teste F e teste de Tukey-Kramer. Foi declarada diferença estatística quando $P < 0,05$.

3.3 Resultados

Produção de gás e metano

A relação concentrado:volumoso afetou ($P < 0,01$) a fermentação ruminal. Após 24 h de incubação a dieta com 20v:80c apresentou menores valores médios de PGT e PCH₄ (181,31 e 16,64 mL/g de MOVD) em comparação à dieta com 80c:20v (75,15 e 6,26 mL/g de MOVD, respectivamente) (Tabela 2).

Quando níveis crescentes de PNE (0; 1,5; 3 e 4,5% MS) foram incubados nos substratos foi observada redução linear ($P < 0,01$) para proporção de CH₄, em relação ao total de gases produzidos, tanto em dietas com 80% de volumoso (9,84; 8,58; 7,46 e 6,47%, EPM = 0,744) como em dietas com 80% de concentrado (10,49; 9,58; 8,49 e 7,49%, EPM = 0,744).

Houve interação entre a dieta e dose de PNE ($P = 0,04$) para PCH₄ em mL/g de MOVD (Figura 1). Para os níveis de PNE 0; 1,5; 3,0 e 4,5%, dietas com 20c:80v resultaram em PCH₄ de 7,51; 6,63; 6,1 e 4,81 mL/g de MOVD, enquanto em dietas com 80c:20v foi observado uma PCH₄ de 19,4; 17,8; 15,7 e 13,6 mL/g de MOVD.

Tabela 2 – Efeito das dietas com relação concentrado:volumoso de 20:80 e 80:20 e inclusão de produto nitrato encapsulado (PNE, 0;1,5;3, e 4,5% MS) sobre a produção de gases e degradabilidade do substrato *in vitro*

Item ²	Tratamentos ¹								EPM ³		Valor- <i>P</i> ⁴					
	20:80				80:20											
	0%	1,5%	3%	4,5%	0%	1,5%	3%	4,5%	Dieta	PNE	Dieta	PNE	Dieta*PNE	L	Q	
MOVD (g/kg)	454,3 ^a	447,4 ^a	447,9 ^a	448,0 ^a	760,2 ^b	764,2 ^b	756,7 ^b	746,9 ^b	9,57	10,34	<0,01	0,60	0,72	0,85	0,49	
MSVD (g/kg)	479,6 ^a	474,9 ^a	476,6 ^a	478,9 ^a	766,1 ^b	770,5 ^b	764,5 ^b	755,2 ^b	9,19	9,92	<0,01	0,85	0,64	0,92	0,51	
FDND (g/kg)	340,2 ^{ac}	330,8 ^a	329,2 ^a	310,3 ^b	645,8 ^c	633,6 ^c	668,9 ^d	638,9 ^c	12,68	13,68	<0,01	0,02	0,52	0,17	0,56	
PGT (mL/g MOVD)	76,2 ^a	75,9 ^a	76,4 ^a	71,9 ^b	183,7 ^c	183,3 ^c	181,4 ^c	176,8 ^c	9,06	9,15	<0,01	0,15	0,83	0,41	0,81	
PCH ₄ (mL/g MOVD)	7,51 ^a	6,63 ^b	6,10 ^b	4,81 ^c	19,39 ^d	17,82 ^e	15,70 ^f	13,61 ^g	1,86	1,89	<0,01	<0,01	0,04	0,05	0,68	
CH ₄ , %	9,84 ^{ad}	8,58 ^{bd}	7,46 ^b	6,47 ^c	10,49 ^a	9,58 ^d	8,49 ^b	7,49 ^c	0,730	0,744	<0,01	<0,01	0,89	0,52	0,74	
FP (mg MOVD/mL PGT)	1,27 ^a	1,19 ^{bc}	1,17 ^b	1,24 ^{ac}	1,42 ^d	1,43 ^d	1,40 ^d	1,40 ^d	0,102	0,104	<0,01	0,51	0,54	0,30	0,50	

¹Tratamentos experimentais: relação concentrado:volumoso 20:80 e 80:20, com adição de PNE a 0; 1,5; 3,0 e 4,5% (matéria seca)

²MOVD = matéria orgânica verdadeiramente degradada; MSVD = matéria seca verdadeiramente degradada; FDND= Fibra detergente neutro degradada; PGT = produção de gases total; PCH₄= produção de metano; FP = fator de partição

³EPM = erro padrão da média

⁴Dieta = efeito fixo da dieta (20:80 e 80:20 concentrado: volumoso); NO₃⁻ = efeito fixo do produto nitrato encapsulado (0; 1,5; 3,0, e 4,5 % PNE na matéria seca); Dieta* NO₃⁻ = interação entre dieta e PNE, Efeito da interação: L = linear, Q = quadrático

^{a, b, c, d, e, f, g} Médias com diferentes letras na mesma linha indica efeito significativo do tratamento (Teste Tukey, *P*<0,05)

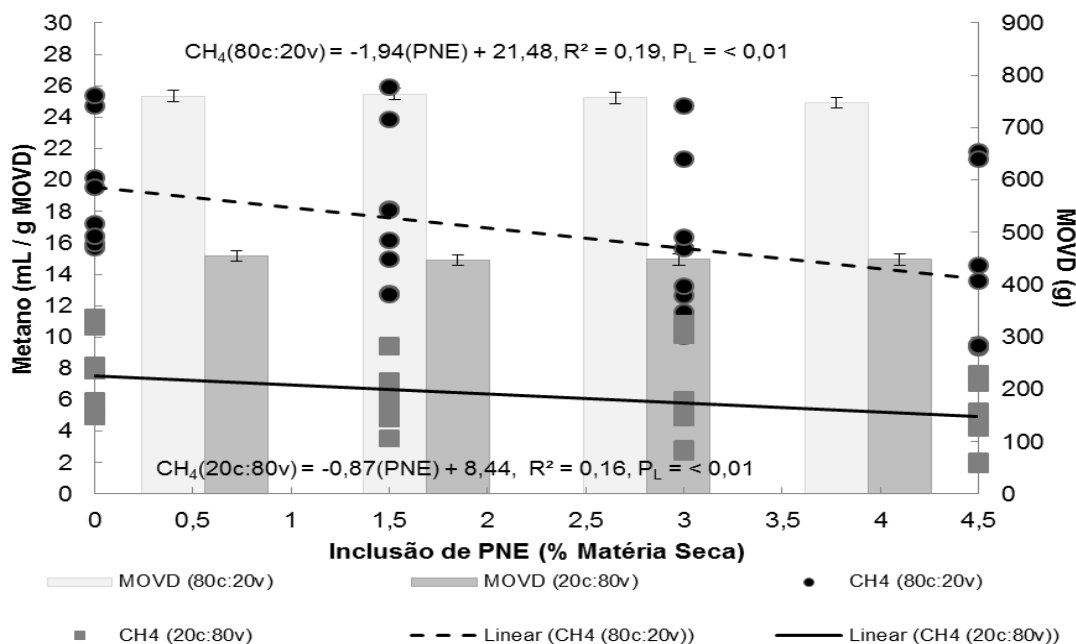


Figura 1 – Efeito das dietas com relações de concentrado:volumos de 20c:80v e 80c:20v e inclusão de doses de PNE (0; 1,5 E 3% MS) para de produção de metano (CH_4 , $P_{dieta} < 0,01$; $P_{PNE} < 0,01$; $P_{dieta*PNE} = 0,04$) e matéria orgânica verdadeiramente degradada (MOVD, $P_{dieta} < 0,01$; $P_{PNE} < 0,60$; $P_{dieta*PNE} = 0,72$). Colunas = MOVD; Linhas = CH_4

Degradabilidade ruminal

Foi observado aumento ($P < 0,01$) para MOVD (757,0 vs 449,4), MSVD (764,07 vs 477,52), FDND (657,56 vs 327,51) e FP (1,41 vs 1,22 mg MOVD/ mL gás) para dieta com 80c:20v em relação a dietas com 20c:80v, respectivamente (Tabela 2). Entretanto, a adição de PNE não afetou ($P > 0,05$) essas variáveis, exceto FDND ($P = 0,02$) que apresentou efeito linear negativo ($P_L = 0,03$) com a adição de 0; 1,5, 3 e 4,5 % de PNE nas dietas com 80% de volumoso (340,2; 330,8; 329,3 e 310,2 g/kg) e dietas com 80% de concentrado (645,8; 635,6; 668,9 e 638,9 g/kg).

Constituintes ruminiais

A relação concentrado:volumoso afetou ($P < 0,05$) o pH ruminal, as concentrações de $N-NH_3$ e a produção de AGCC após 24 h de incubação (Tabela 3). A dieta com 80c:20v apresentou menores valores ($P < 0,01$) de pH ruminal (6,7 vs 6,9, EPM = 0,014, $P < 0,01$) e concentração de $N-NH_3$ (37,4 vs 42,9 mg/100 mL, EPM = 3,243, $P < 0,01$) comparada à dieta com 80v:20c, respectivamente.

Tabela 3 – Efeito das dietas com relação concentrado:volumoso contrastante e inclusão de produto nitrato encapsulado (PNE) sobre o pH, nitrogênio amoniacal (N-NH₃) e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

Tem	Tratamentos ¹								EPM ⁴		Valor- <i>P</i> ⁵				
	20:80				80:20										
	0%	1,5%	3%	4,5%	0%	1,5%	3%	4,5%	Dieta	PNE	Dieta	PNE	Dieta* PNE	L	Q
Ph	6,94 ^{ab}	6,80 ^a	6,93 ^a	6,91 ^b	6,70 ^c	6,79 ^c	6,64 ^{cd}	6,71 ^d	0,014	0,019	0,02	0,56	0,06	0,43	0,06
N-NH ₃ , mg/dL	40,8 ^a	42,7 ^a	43,7 ^b	44,4 ^b	35,2 ^c	37,1 ^c	38,1 ^d	39,0 ^e	0,28	0,29	<0,01	<0,01	0,98	0,88	0,91
Total AGCC ² , mmol/L	69,3 ^a	68,8 ^a	67,7 ^a	68,8 ^a	78,6 ^b	78,2 ^b	77,2 ^{bc}	76,1 ^c	3,78	3,81	<0,01	0,34	0,65	0,97	0,96
Acetato	45,9 ^a	45,6 ^a	44,9 ^a	46,4 ^a	49,0 ^b	49,2 ^b	48,6 ^b	48,5 ^b	1,04	1,88	<0,01	0,53	0,75	0,78	0,90
Propionato	10,7 ^a	10,5 ^b	10,2 ^c	10,1 ^c	13,8 ^d	13,2 ^e	12,8 ^f	12,4 ^g	0,04	0,06	<0,01	<0,01	0,02	0,03	0,60
Butirato	8,8 ^a	8,8 ^a	8,7 ^{ab}	8,6 ^b	12,3 ^d	12,4 ^d	12,4 ^d	11,9 ^c	0,16	0,17	<0,01	0,04	0,61	0,20	0,89
Isobutirato	0,88 ^a	0,90 ^a	0,88 ^a	0,86 ^{ab}	0,84 ^b	0,83 ^b	0,83 ^b	0,79 ^b	0,021	0,044	<0,01	0,21	0,66	0,52	0,33
Valerato	0,78 ^a	0,81 ^a	0,79 ^a	0,76 ^a	0,81 ^a	0,79 ^a	0,79 ^a	0,74 ^a	0,128	0,129	0,71	0,21	0,85	0,49	0,81
Isovalerato	2,1 ^a	2,1 ^a	2,1 ^a	2,0 ^a	1,9 ^a	1,8 ^b	1,8 ^b	1,7 ^b	0,08	0,14	<0,01	0,06	0,76	0,39	0,56
C2:C3 ³	4,37 ^a	4,38 ^a	4,41 ^a	4,61 ^b	3,56 ^c	3,76 ^d	3,80 ^d	3,93 ^e	0,022	0,068	<0,01	0,02	0,55	0,43	0,29

¹Tratamentos experimentais: relação concentrado:volumoso 20:80 e 80:20, com adição de produto nitrato encapsulado, PNE à 0; 1,5; 3,0 e 4,5% (matéria seca)

²Ácidos graxos de cadeia curta

³C2:C3 = relação acetato: propionato

⁴EPM = erro padrão da média

⁵Dieta = efeito fixo da dieta (20:80 e 80:20, concentrado: volumoso); PNE = efeito fixo do produto nitrato encapsulado (0; 1,5; 3,0, e 4,5 % PNE na matéria seca); Dieta* NO₃ = interação entre dieta e PNE, Efeito da interação: L = linear, Q = quadrático

^{a, b, c, d, e, f} Médias com diferentes letras na mesma linha indica efeito significativo do tratamento (Teste Tukey, *P*<0,05)

A produção total de AGCC foi 11,4% maior ($P < 0,01$) em dietas com 80% de concentrado (77,50 vs 68,65 mmol/L) em relação a dietas com 80% de volumoso, com maior ($P < 0,05$) produção de acetato, propionato e butirato (48,8 vs 45,7; 13,1 vs 10,4 e 12,2 vs 8,7 mmol/L, respectivamente), e menor produção de isobutirato e isovalerato (0,82 vs 0,88 e 1,8 vs 2,1). Entretanto, a relação acetato:propionato foi menor ($P < 0,01$) em dieta 80c:20v em comparação a dieta com 20c:80v (3,76 vs 4,44, respectivamente).

A administração de PNE (0; 1,5; 3 e 4,5%) afetou a concentração de N-NH₃ (38,0; 39,9; 41,05 e 41,7 mg / dL, EPM = 0,290, $P < 0,01$) bem como a produção do ácido butírico (10,4; 10,6; 10,5 e 10,2 mmol/L, EPM = 0,07, $P = 0,04$) sem alterar a concentração total de AGCC ($P = 0,07$) e a produção de acetato ($P = 0,53$). Entretanto, houve diferença na relação acetato:propionato ($P < 0,01$) que aumentou tanto em dietas com 80% de volumoso (4,37; 4,38; 4,41 e 4,61) como em dietas com 80% de concentrado (3,56; 3,76; 3,80 e 3,93) com a inclusão de 0; 1,5; 3 e 4,5% de PNE (Tabela 3).

Interação entre relação concentrado:volumoso e adição de PNE foi observada para produção de ácido propiônico em dietas com 80% de concentrado ($P < 0,02$) com efeito linear negativo ($y = 12,24 - 0,22x$, $P = 0,03$) (Figura 2).

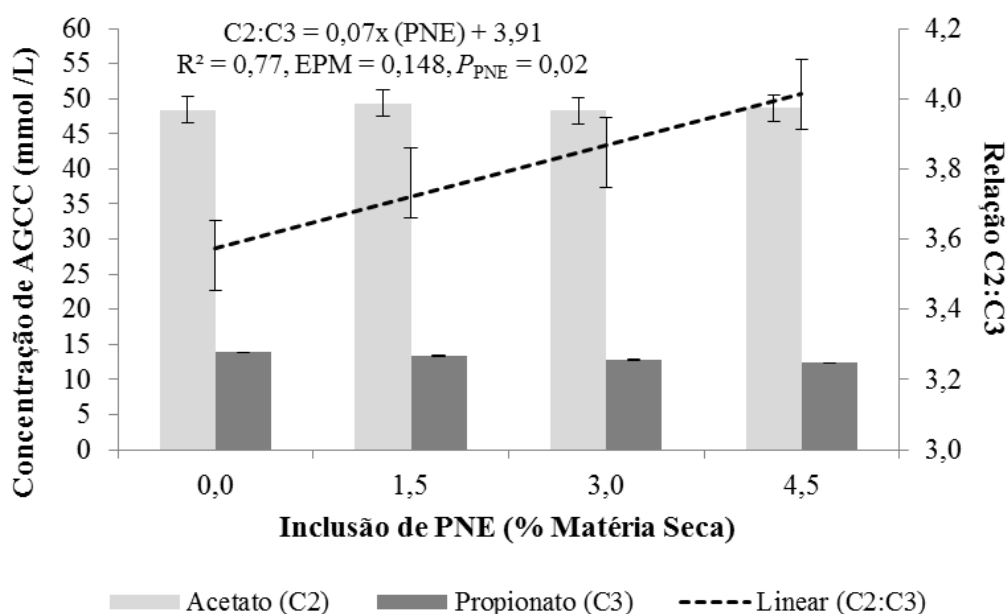


Figura 2 – Concentração de ácido (mmol/L) acético (C2, $P_{\text{dieta}} < 0,01$; $P_{\text{PNE}} = 0,53$; $P_{\text{dieta} \times \text{PNE}} = 0,75$) e propiônico (C3, $P_{\text{dieta}} < 0,01$; $P_{\text{PNE}} < 0,01$; $P_{\text{dieta} \times \text{PNE}} = 0,02$) e relação acetato:propionato (C2:C3, $P_{\text{dieta}} < 0,01$; $P_{\text{PNE}} = 0,02$; $P_{\text{dieta} \times \text{PNE}} = 0,55$) em dietas com relações concentrado:volumoso de 80:20 com adição de doses de produto nitrato encapsulado (PNE, 0; 1,5; 3,0 e 4,5 %)

3.4 Discussão

Produção de gás, metano e degradabilidade

A proporção do concentrado na dieta (em MS) é uma característica que modifica a produção de gases, especialmente metano, pois o tipo de carboidrato tem impacto sobre pH ruminal, população microbiana (TAMMINGA et al., 2007) e degradação do alimento (RIVIERA et al., 2010). Desta maneira, a dieta com 80% de concentrado apresentou valores para PGT em média 58,6% e PCH_4 em média 62,3% maiores que dieta com 80% de volumoso, a maior participação de concentrado também proporcionou resultados elevados para MOVD, MSVD e FDND.

Esse aumento na produção de gases, em especial metano, foi reflexo do aumento na fermentação ruminal (MOE; TYRRELL, 1979). Conforme os carboidratos não fibrosos (CNF como amido e açúcares) presentes nas dietas com 80% de concentrado foram sendo rapidamente fermentados, ocorreu aumento na PGT e AGCC, consequentemente, mais CH_4 foi gerado. Entretanto, indiferente da tipo de carboidrato fermentado, PCH_4 (% e mL/g MOVD) foi reduzida na presença de NO_3^- , mostrando redução linear com a adição de PNE. Esse efeito tem sido mostrado em vários estudos *in vitro* e *in vivo* (ZHOU; YU; MENG, 2011; LUND et al., 2014; EL-ZAIAT et al., 2014; LEE et al., 2015) que avaliam produtos à base de NO_3^- .

O NO_3^- possui dois modos de ação para mitigar metano: 1) NO_3^- age como dreno de hidrogênio competindo com a metanogênese (VAN ZIJDERVELD et al., 2010) e; 2) NO_3^- age diretamente diminuindo o número de microrganismos metanogênicos ruminais devido efeito tóxico dos produtos da desnitrificação do NO_3^- (nitrito, óxido nítrico ou óxido nitroso) (KLÜBER; CONRAD, 1997) ou reduzindo as bactérias produtoras de H^+ (ZHOU; MENG; YU, 2011; ZHOU; YU; MENG, 2012). Em estudo recente foi demonstrado que a redução de metano com uso de NO_3^- , *in vivo* e *in vitro*, está acompanhada de aumento na liberação de H_2 no meio (LUND et al., 2014) o que possibilita a redução NO_3^- a amônia e por sua vez a redução de metano no meio.

Interação entre a dieta e a dose de adição de PNE foi observada para produção de CH_4 (mL/g MOVD). Na presença de NO_3^- , as dietas com 20c:80v que apresentavam elevada relação de carboidrato fibroso (CF) apresentaram menor PCH_4 que dietas com 80c:20v, alto CNF. Essa resposta pode estar relacionada com o fato do CF apresentar

degradação mais lenta quando comparado ao CNF, resultando em menor fermentação e menor disponibilidade de doadores de H_2 , com consequente acúmulo de nitrito no meio.

Assim, embora a razão para a maior redução da PCH_4 (mL/g MOVD) em dietas com 80% de volumoso quando NO_3^- foi incluído na dietas não seja clara, é provável que esteja relacionada ao efeito associativo da menor fermentação observadas nestas dietas decorrente da degradação lenta dos CF, resultando em menor liberação de H_2 , acúmulo dos produtos intermediários da redução de nitrato a amônia, que causaram intoxicação e redução das arqueas metanogênicas e, conseqüentemente, menor produção de CH_4 .

Geralmente, NO_3^- é convertido a amônia pela via assimilatória (LENG, 2008). Assim, quando PNE é ingerido pelo ruminante, as bactérias ruminais rapidamente utilizam o H^+ presente no meio para conversão de NO_3^- a NO_2^- pela redução de NADH, que utiliza apenas 2 H^+ . Por outro lado, a conversão de NO_2^- a NH_3 pela via assimilatória de amonificação do NO_3^- , requer mais 6 H^+ . Quando a disponibilidade do H^+ é reduzida, pode resultar no acúmulo de NO_2^- e outros produtos intermediários. Por essa razão, em baixa taxa de fermentação da matéria orgânica, há acúmulo de NO_2^- no meio ruminal (JONES, 1972).

O acúmulo de NO_2^- no meio pode apresentar efeito indireto sobre os microrganismos ruminais, em especial celulolíticos (HALL; GADDY; HOBBS, 1960) e metanogênicos (KLUBER; CONRAD, 1998), ocasionando redução de suas atividades. Assim, quando PNE esteve presente em dietas com alta fibra, foi observada menor produção de metano devido redução da atividade das metanogênicas e diminuição da degradabilidade da fibra (celulose), com consequente redução na fermentação e na produção de metano. No presente estudo, embora não foi mensurada a abundância da população microbiana, foi observado menor degradabilidade da FDN em dietas com 80% de volumoso em comparação a dietas com 80% concentrado que reduziu com a suplementação com PNE, possivelmente pela redução das bactérias fibrolíticas.

Marais et al. (1988) demonstraram redução na digestibilidade *in vitro* do capim Quicuío (*Pennisetum clandestinum*) quando NO_3^- foi adicionado. Sugeriram que esse resultado poderia ser devido ao acúmulo de nitrito, a inibição do sistema de transporte de elétrons de certos microrganismos e limitação da produção de ATP. Barnett e Bowman (1957) reportaram acúmulo de nitrito durante estudo *in vitro* de redução de NO_3^- com celulose como substrato, mas não com glicose, sugerindo que fontes de carboidrato prontamente disponíveis na ração poderiam reduzir a toxicidade do NO_3^- , porque nitrito não se acumularia.

Por outro lado, ao calcularmos a eficiência de mitigação do metano, ou seja a redução do metano observada frente a redução do metano teórica, observamos que essa foi maior numericamente em dietas com 80% de concentrado.

Estequiometricamente, 1 mol de NO_3^- ou 62g de NO_3^- , em dieta de ovinos poderia reduzir a produção de metano em 1 mol ou 22,4 L (LENG, 2010), se supostamente essa redução acontecesse, isso garantiria que todo NO_3^- adicionado na dieta seria reduzido a amônia (LI et al., 2013). No presente experimento, foram adicionadas doses crescentes de aproximadamente 5,01; 10,03 e 15,04 mg de NO_3^- em 500mg de substrato, que, conforme a condição acima, teoricamente deveria reduzir a produção de metano em 3,36; 6,44 e 10,08 mL. Porém, a redução de CH_4 observada foi menor: 0,85; 1,43 e 2,7 mL em dietas com 20c:80v e 1,57; 3,69 e 5,76 mL em dietas com 80c:20v, que representam em média 24% e 52%, respectivamente, do potencial estequiométrico esperado, sugerindo que menor quantidade de NO_3^- foi reduzida à amônia pelos microrganismos ruminais em dietas com 20c:80v.

Desta forma, a eficiência de mitigação de metano (redução de metano observado / redução de metano teórico x 100, LEE et al., 2015a) calculada para adição de 1,5; 3 e 4,5 % de PNE nas dietas de 80% de volumoso foi de 25,3; 22,2 e 26,8 enquanto para as dietas com 80% de concentrado foi de 46,7; 57,3 e 57,1%. Demonstrando que, embora dietas com alto concentrado não tenham reduzido a PCH_4 por matéria orgânica degradada, foram eficientes em mitigar metano. Esses resultados vão de encontro a afirmação de Li et al (2013), os autores afirmam que concentrado aumenta o potencial de atenuação de CH_4 quando NO_3^- é adicionado a dieta.

Constituintes ruminais

Dietas com alto teor de concentrado resultaram em menor pH devido ao maior esgotamento do tampão. De acordo com Slyter (1976) dietas pobres em fibra, que apresentam altas taxas de digestão e produção de AGCC, requerem maior grau de tamponamento no sistema ruminal para evitar a diminuição do pH.

Com adição de PNE, dietas com 80 % de volumoso apresentaram maior concentração de N-NH_3 comparadas a dietas com 80 % de concentrado, sugerindo que uma rota dissimilatória de redução de nitrato a amônia pode ter sido utilizada, uma vez que, em altas concentrações de amônia e nitrato no meio, esta via é estimulada (COLE; BROWN, 1980).

Como a redução dissimilatória não é afetada pela amônia, há rápida conversão de nitrato a amônia ocorrendo mesmo em altas concentrações de amônia (LENG, 2008). Entretanto, a baixa taxa de degradação da matéria orgânica das dietas com baixo carboidrato fermentável (20 % concentrado), resultou em menor disponibilidade de ATP. Assim, menor quantidade de amônia foi utilizada para a síntese celular microbiana, ocorrendo acúmulo maior de amônia em dietas com 80% de volumoso. Já dietas com 80% de concentrado dispunham de maior aporte de energia (amido) que possibilitou mais formação de amônia para crescimento microbiano e, conseqüentemente, diminuiu a concentração de N-NH_3 .

Um possível sinergismo entre a liberação lenta do NO_3^- , devido ao encapsulamento, e o elevado teor de CNF da dieta (80 % concentrado) pode também ter contribuído para a utilização da amônia para síntese microbiana e menor acúmulo de N-NH_3 no meio. O encapsulamento permitiu redução mais lenta do nitrato a amônia, o concentrado possibilitou maior aporte de ATP, assim os microrganismos presentes puderam utilizar mais eficientemente a amônia gerada da redução de nitrato.

O tipo de carboidrato predominante na dieta, amido ou fibra, resultou em mudança na fermentação ruminal e na conversão de AGCC. Dietas com 80% de concentrado, carboidrato rapidamente fermentescível, resultaram em maior MOVD e conseqüente aumento na produção dos ácidos acético, propiônico e butírico, resultando em maiores concentrações de AGCC totais, possivelmente, devido ao aumento do crescimento microbiano que melhorou a fermentação do carboidrato e, posteriormente, elevou a produção de metano.

Em dietas com alto amido, ocorre preferencial desenvolvimento de bactérias amilolíticas, que produzem elevada quantidade de ácido propiônico (RUSSEL, 2002). Neste estudo dietas com 80% de concentrado proporcionaram um aumento de 20% na produção de ácido propiônico quando comparada a dietas com elevada quantidade de fibra, resultando em menor relação acetato:propionato nestas dietas, conseqüentemente, menor perda de energia na forma de metano.

O alto teor de concentrado na dieta promoveu, em média, aumento de 28 % na produção de ácido butírico comparado a dietas com baixa teor de concentrado. A principal via para síntese de butirato no rúmen é a partir do acetato, resultando em regeneração de co-fatores oxidativos. Provavelmente, dietas com alto carboidrato fermentável possibilitaram maior aporte de H^+ que garantiu menor competição por elétrons pelas bactérias redutoras, permitindo o prosseguimento do processo fermentativo (FAHEY JUNIOR; BERGER, 1993) para ambos os ácidos, acetato e butirato. Estes resultados podem ter contribuído para maior

PCH₄ nestas dietas, uma vez que acetato e butirato estão associados a maior produção de metano, por serem fornecedores de H⁺.

As baixas produções de isovalerato, isobutirato e N-NH₃ nas dietas com 80% de concentrado podem indicar redução da atividade ou população de protozoários (DOHME et al., 1999) e maior taxa de absorção de AGCC por bactérias celulolíticas (NOFTSGER et al., 2003), uma vez que os AGCC são utilizados como fonte de energia para esses microrganismos. Essa hipótese é reforçada pela maior produção de massa microbiana, comprovada pelo FP, 15 % maior em dietas com 80% de concentrado quando comparadas as dietas com 80% de volumoso.

Maior relação acetato:propionato foi observada em dietas com 20 % de concentrado. A proporção molar dos AGCC é principalmente influenciada pela relação concentrado:volumoso na dieta (ANNISON; ARMSTRONG, 1970). Assim, quanto mais carboidratos fibrosos estão presentes na dieta, maior é a relação acetato:propionato.

A ingestão de PNE teve efeito sobre a produção de ácido butírico. Observamos redução na produção de butirato na dose de 4,5% de PNE em dietas com 80 % de concentrado. A síntese de butirato ocorre no rúmen a partir do acetato ou de outros compostos que resultem em Acetil-CoA (piruvato e glutamato). Com adição de elevada dose de PNE, houve competição entre NO₃⁻ e Acetil-CoA por elétrons (FARRA; SATTER, 1971). Assim, os elétrons são desviados para a redução de nitrato, ocorrendo uma diminuição na síntese de butirato.

No trabalho de Li et al. (2012) também foi observado declínio na concentração molar de ácido butírico com adição de 3 % de produto a base de nitrato de cálcio, porém, com considerável aumento na concentração molar de acetato.

Foi observada interação entre dieta e dose de PNE para produção de ácidos propiônico. Quando PNE foi adicionado, maior produção de propionato ocorreu em dietas com 80 % de concentrado. Estequiometricamente, dietas com maior relação de concentrado captam mais H⁺ para converter fumarato a propionato (NEWBOLD et al., 2005), contudo, a adição de nitrato competiu com o uso de H⁺ com a propiogênese (VAN ZIJDERVELD et al., 2010) reduzindo os níveis de produção de propionato. Quando hidrogênio é removido pelo nitrato, as concentrações celulares de NADH são reduzidas e NAD⁺ aumenta suprimindo a produção de propionato e favorecendo a formação de acetato, com elevação na fermentação dos carboidratos (SUTHERLAND, 1977).

Em decorrência na mudanças no padrão de propionato com a inclusão de PNE, a relação entre acetato:propionato diferiu entre os tratamentos apresentando aumento linear com

a inclusão de nitrato. Sar et al. (2005) atribuíram a mudança na relação acetato:propionato ao aumento na produção de amônia a partir da redução do nitrato, fato também observado neste estudo, o que resulta em mudança na fermentação para redução de AGCC.

3.5 Conclusão

Sem considerar a relação concentrado:volumoso da dieta, a inclusão do produto nitrato encapsulado reduziu a produção de metano sem afetar negativamente a degradabilidade da matéria orgânica *in vitro*, mas afetou a degradabilidade da fibra. Embora, dietas com 80% de concentrado apresentaram uma maior produção de metano que dietas com 80% de volumoso, resultados decorrentes da maior degradação da matéria orgânica do concentrado e consequentemente da maior fermentação. As dietas com elevada relação de concentrado apresentaram eficiência de mitigação de metano de 52% já dietas com 80% de volumoso de 24%, o que demonstra o potencial do concentrado em reduzir o metano na presença de nitrato. Esse resultado indica que, a união de duas estratégias para redução de metano, alto amido e nitrato, apresentaram efeito positivo para redução de metano *in vitro*.

Referências

- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the AOAC**. 16. ed. Arlington: AOAC International, 1995. v.1, p.1-30,
- BARNETT, A. J. G.; BOWMAN, I. B. R. *In vitro* studies on the reduction of nitrate by rumen liquor. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 8, n. 4, p. 243-248, 1957.
- BEAUCHEMIN, K. A.; MCGINN, S. M. Methane emissions from feedlot cattle fed barley or corn diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, p. 653-661, 2005.
- BELANCHE, A.; DE LA FUENTE, G.; PINLOCHE, E.; NEWBOLD, C. J.; BALCELLS, J. Effect of diet and absence of protozoa on the rumen microbial community and on the representativeness of bacterial fractions used in the determination of microbial protein synthesis. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 90, p. 3924-3936, 2012.
- BLÜMMEL, M.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. *In vitro* gas production: a technique revisited. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 77, p. 24-34, 1997.
- BUENO, I. C. S.; CABRAL FILHO, S. L. S.; GOBBO, S. P.; LOUVANDINI, H.; VITTI, D. M. S.; ABDALLA, A. L. Influence of inoculum source in a gas production method. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 123-124, p. 95-105, 2005.

COLE, J. A.; BROWN, C. M. Nitrite reduction to ammonia by fermentative bacteria: a short circuit in the biological nitrogen cycle. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 7, p. 65-72, 1980.

COTTLE, D. J.; NOLAN, J. V.; WIEDEMANN, S. G. Ruminant enteric methane mitigation: a review **Animal Production Science**, Victoria, v. 51, p. 491-514, 2011.

DANIELSSON, R.; SCHNÜRER, A.; ARTHURSON, V.; BERTILSSON, J. Methanogenic population and CH₄ production in Swedish dairy cows fed different levels of forage. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 78, p. 6172-6179, 2012.

DOHME, F. The role of the rumen ciliate protozoa for methane suppression caused by coconut oil. **Letters in Applied Microbiology**, Hoboken, v. 29, p. 187-192, 1999.

EL-ZAIAT, H. M.; ARAUJO, R. C.; SOLTAN, Y. A.; MORSY, A. S.; LOUVANDINI, H.; PIRES, A. V.; PATINO, H. O.; CORREA, P. S.; ABDALLA, A. L. Encapsulated nitrate and cashew nut shell liquid on blood and rumen constituents, methane emissions, and growth performance of lambs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 92, p. 2214-2224, 2014.

FAHEY JUNIOR, G. C.; BERGER, L. L. Los carbohidratos en la nutrición de los rumiantes. In: CHURCH, D. C. (Ed.). **El rumiante: fisiología digestiva y nutrición**. Zaragoza: Acribia, 1993. p. 305-337.

FARRA, P. A.; SATTER, L. D. Manipulation of the ruminal fermentation. III. Effect of nitrate on ruminal volatile fatty acid production and milk composition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 54, p. 1018-1024, 1971.

HALL, O. G.; GADDY, C. D.; HOBBS, C. S. Effect of nitrates and nitrites upon forage utilization by the rumen microorganisms *in vitro* and upon ration digestibility by lambs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 19, p. 1305, 1960. Abstract.

HULSHOF, R. A.; BERNDT, A.; GERRITSW, J. J.; DIJKSTRA, J.; VAN ZIJDERVELD, S. M.; NEWBOLD, J. R.; PERDOK, H. B. Dietary nitrate supplementation reduces methane emission in beef cattle fed sugarcane based diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 90, p. 2317-2323, 2012.

IWAMOTO, M.; ASANUMA, N.; HINO, T. Ability of *Selenomonas ruminantium*, *Veillonella parvula*, and *Wolinella succinogenes* to reduce nitrate and nitrite with special reference to the suppression of ruminal methanogenesis. **Anaerobe**, Amsterdam, v. 8, p. 209-215, 2002.

JONES, G. A. Dissimilatory metabolism of nitrate by the rumen microbiota. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 18, p. 1783-1787, 1972.

KLUBER, D. H.; CONRAD, R. Effects of nitrate, nitrite, NO, and N₂O on methanogenesis and other redox processes in anoxic rice field soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 25, p. 301-318, 1998.

LEE, C.; ARAUJO, R. C.; KOENIG, K. M.; BEAUCHEMIN, K. A. Effects of encapsulated nitrate on enteric methane production, and nitrogen and energy utilization in beef heifers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 93, p. 2391-2404, 2015a. doi: 10.2527/jas2014-8845.

LEE, C.; ARAUJO, R. C. ; KOENIG, K. M. ; BEAUCHEMIN, K. A. Effects of encapsulated nitrate on eating behavior, rumen fermentation, and blood profile of beef heifers fed restrictively or *ad libitum*. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 93, p. 2405-2418, 2015b. doi: 10.2527/jas2014-8851.

LEE, C.; BEAUCHEMIN, K. A. A review of feeding supplementary nitrate to ruminant animals: Nitrate toxicity, methane emissions, and production performance. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 94, p. 557–570, 2014.

LENG, R. A. Decline in available world resources; implications for livestock production systems in Asia. **Livestock Research for Rural Development**, Cali, v. 20, p. 8, 2008. Disponível em: <http://www.lrrd.org/lrrd20/1/leng20008.htm>.

LENG, R. A. Further considerations of the potential of nitrate as a high affinity electron acceptor to lower enteric methane production in ruminants. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON LIVESTOCK, CLIMATE CHANGE AND RESOURCE DEPLETION, 2010, Pakse, Laos. **Proceedings...** Pakse, Laos: Champasack University, 2010. p. 9–11.

LEWIS, D. The metabolism of nitrate and nitrite in the sheep. 2. Hydrogen donors in nitrate reduction by rumen micro-organisms *in vitro*. **The Biochemical Journal**, London, v. 49, p. 149-153, 1951a.

LEWIS, D. The metabolism of nitrate and nitrite in the sheep. 1. The reduction of nitrate in the rumen of the sheep. **The Biochemical Journal**, London, v. 49, p. 175-180, 1951b.

LI, L.; DAVIS, J.; NOLAN, J.; HEGARTY, R. An initial investigation on rumen fermentation pattern and methane emission of sheep offered diets containing urea or nitrate as the nitrogen source. **Animal Production Science**, Victoria, v. 52, p. 653-659, 2012.

LI, L.; SILVEIRA, C. I.; NOLAN, J. V.; GODWIN, I. R.; LENG, R. A.; HEGARTY, R. S. Effect of added dietary nitrate and elemental sulfur on wool growth and methane emission of Merino lambs. **Animal Production Science**, Victoria, v. 53, p. 1195-1201, 2013.

LONGO, C.; BUENO, I. C. S.; NOZELLA, E. F.; GODDOY, P. B.; CABRAL FILHO, S. L. S.; ABDALLA, A. L. The influence of headspace and inoculum dilution on *in vitro* ruminal methane measurements. **International Congress Series**, Amsterdam, v. 1293, p. 62-65, 2006.

LUND, P.; DAHL, R.; YANG, H. J.; HELLWING, A. L. F.; CAO, B. B.; WEISBJERG, M. R. The acute effect of addition of nitrate on *in vitro* and *in vivo* methane emission in dairy cows. **Animal Production Science**, Victoria, v. 54, p. 1432-1435, 2014.

MARAIS, J. P.; THERION, J. J.; MACKIE, R. I.; KISTNER, A.; DENNISON, C. Effect of nitrate and its reduction products on the growth and activity of the rumen microbial population. **British Journal Nutrition**, London, v. 59, p. 301-313, 1988.

MATSUYAMA, H.; HORIGUCHI, K.; TAKAHASHI, T. Control of methane production from expiratory gas by ruminal dosing with mechanical stimulating goods in Holstein steer. In: Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies, 9.; Biennial Conference of the Australian Society of Animal Production, 23., Sydney, Australia. **Proceedings...** Seoul, Korea: Asian-Australasian Association of Animal Production Societies, 2000. p. 215.

MOE, P. W.; TYRRELL, H. F. Methane production in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 62, p. 1583-1586, 1979.

NEWBOLD, C. J.; LÓPEZ, S.; NELSON, N.; OUDA, J. O.; WALLACE, R. J.; MOSS, A. R. Propionate precursors and other metabolic intermediates as possible alternative electron acceptors to methanogenesis in ruminal fermentation *in vitro*. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 94, p. 27-35, 2005.

NOCEK, J. E.; HART, S. P.; POLAN, C. E. Rumen ammonia concentrations as influenced by storage time, freezing and thawing, acid preservative, and method of ammonia determination. **Journal of Dairy Science**, Lnacaster, v. 70, p. 601-607, 1987.

NOFTSGER, S. M. Effects of 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid (HMB) on microbial growth in continuous culture. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, p. 2629-2636, 2003.

NOLAN, J. V.; HEGARTY, R. S.; HEGARTY, J.; GODWIN, I. R.; WOODGATE, R. Effects of dietary nitrate on fermentation, methane production and digesta kinetics in sheep. **Animal Production Science**, Victoria, v. 50, p. 801-806, 2010.

PALMQUIST, D.; CONRAD, H. Origin of plasma fatty acids in lactating cows fed high grain or high fat diets. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 54, p. 1025-1031, 1971.

POPOVA, M.; MARTIN, C.; EUGÈNE, M.; MIALON, M. M.; DOREAU, M.; MORGAVI, D. P. Effect of fibre- and starch-rich finishing diets on methanogenic Archaea diversity and activity in the rumen of feedlot bulls. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 166, p. 113-121, 2011.

PRESTON, T. R. **Tropical animal feeding**: a manual for research workers. Rome: FAO, 1995. 126 p. (Animal Production and Health Paper).

RIVERA, A. R.; BERCHIELLI, T. T.; MESSANA, J. D.; VELASQUEZ, P. T.; FRANCO, A. V. M.; FERNANDES, L. B. Fermentação ruminal e produção de metano em bovinos alimentados com feno de capim-tifton 85 e concentrado comaditivo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, p. 617-624, 2010.

RUSSELL, J. B. **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**. Washington, DC: USDA, ARS, 2002.

SAR, C.; MWENYA, B.; SANTOSO, B.; TAKAURA, K.; MORIKAWA, R.; ISOGAI, N.; ASAKURA, Y.; TORIDE, Y.; TAKAHASHI, J. Effect of *Escherichia coli* wild type or its derivative with high nitrite reductase activity on *in vitro* ruminal methanogenesis and nitrate/nitrite reduction. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, p. 644-652, 2005.

SLYTER, L. L. Influence of acidosis on rumen function. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 43, p. 910-929, 1976.

SUTHERLAND, T. M. **The control and manipulation of rumen fermentation**. Armidale, NSW: University of New England, 1977. 1029 p. (Recent Advances in Animal Nutrition in Australia).

TAJIMA, K.; AMINOV, R. I.; NAGAMINE, T.; MATSUI, H.; NAKAMURA, M.; BENNO, Y. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 67, p. 2766-2774, 2001.

TAMMINGA, S.; BANNINK, A.; DIJKSTRA, J.; ZOM, R. **Feeding strategies to reduce methane loss in cattle**. Wageningen: Animal Science Group, 2007. (Report, 34).

THEODOROU, M. K.; WILLIAMS, B. A.; DHANOA, M. S.; MCALLAN, A. B.; FRANCE, J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 48, p. 185-197, 1994.

UNGERFELD, E. M.; KOHN, R. A. The role of thermodynamics in the control of rumen fermentation. In: SEJRSEN, K.; HVELPLUND, T.; NIELSEN, M. O. (Ed.). **Ruminant physiology: digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress**. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2006. p. 55-85.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, p. 3583-3597, 1991.

VAN ZIJDERVELD, S. M.; GERRITS, W. J. J.; APAJALAHTI, J. A.; NEWBOLD, J. R.; DIJKSTRA, J.; LENG, R. A.; PERDOK, H. B. Nitrate and sulfate: Effective alternative hydrogen sinks for mitigation of ruminal methane production in sheep. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, p. 5856-5866, 2010.

VAN ZIJDERVELD, S. M.; GERRITS, W. J. J.; DIJKSTRA, J.; NEWBOLD, J. R.; HULSHOF, R. B. A.; PERDOK, H. B. Persistency of methane mitigation by dietary nitrate supplementation in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, p. 4028-4038, 2011.

ZHOU, Z.; YU, Z.; MENG, Q. Effects of nitrate on methane production, fermentation, and microbial populations in *in vitro* ruminal cultures, **Bioresource Technology**, Essex, p. 123-125, 2011.

ZHOU, Z.; YU, Z.; MENG, Q. Effects of nitrate on methane production, fermentation, and microbial populations in *in vitro* ruminal cultures. **Bioresource Technology**, Essex, v. 103 p. 173-179, 2012.

5. EMISSÃO DE METANO ENTÉRICO E CONSTITUINTES RUMINAIS EM OVINOS ALIMENTADOS COM DIETAS COM RELAÇÕES CONCENTRADO:VOLUMOSO CONTRASTANTES SUPLEMENTADAS COM NITRATO ENCAPSULADO

Resumo: A proposta deste estudo foi investigar o efeito de dietas para ovinos com relações concentrado:volumoso 80:20 e 20:80 suplementadas com adição de nitrato encapsulado sobre a produção de metano entérico, digestibilidade aparente, constituintes ruminais e toxidez do nitrato. Seis ovinos Santa Inês canulados foram distribuídos em delineamento experimental em quadrado latino 6 x 6 em esquema fatorial 2 x 3. Os fatores considerados foram dois tipos de dieta (relações concentrado:volumoso 20:80 vs 80:20) e inclusão de produto nitrato encapsulado (PNE) a 0 %, 1,5 % e 3 %, correspondendo a doses de 0; 11,7 e 24,2 g de nitrato (NO_3^-) na base seca, em substituição o farelo de soja de maneira que as dietas permanecessem isonitrogenadas. O período experimental foi dividido em 6 subperíodos, cada subperíodo contava com 18 dias de adaptação e sete dias de coleta de dados. Entre os subperíodos, os animais eram alimentados apenas com feno de Tifton 85 (*Cynodon* spp) picado durante três dias. Os animais foram gradualmente adaptados ao consumo de NO_3^- com acréscimo de 0,5 % do PNE na ração total a cada três dias até chegar aos níveis desejados 1,5 % e 3 %. O consumo de matéria seca (CMS, $P = 0,26$) e os níveis de metahemoglobina ($P = 0,27$) não foram afetados pela adição de PNE. Foram observados, em média, baixos níveis de metahemoglobina no sangue (3,2; 4,7 e 5,5%; 3h após alimentação para as doses de 0; 1,5 e 3% de PNE, respectivamente) com o aumento da dose de NO_3^- . Quando 3 % de PNE foi colocada em dietas com 80 % de concentrado, ocorreu redução ($P < 0,05$) de 29 % na produção de metano diária (g / dia) em comparação a dieta com 0 % PNE (12,4 vs 17,6 g CH_4 /dia, respectivamente). A relação concentrado:volumoso afetou ($P = 0,01$) a proporção de bactérias *F. succinogenes* no fluido ruminal coletado (0,318 para 80 % volumoso vs 0,115 para 80 % concentrado). Houve interação ($P < 0,05$) entre dieta e inclusão de PNE para *Campylobacter fetus* ($P < 0,01$), sendo que esta aumentou linearmente ($y = 1,66 + 9,95x$, $P = 0,02$) em dietas com 80 % de volumoso com a adição de PNE (1; 5,51 e 57,04 para 0; 1,5 e 3,0 % PNE). A proporção de acetato sofreu interação ($P = 0,03$) entre dieta e dose de PNE com efeito quadrático ($P < 0,01$) reduzindo na dose de 3% de PNE. Concluiu-se que NO_3^- , utilizado de forma segura, é uma estratégia útil para mitigação de metano; no entanto, os efeitos associativos das duas estratégias testadas, nitrato e concentrado para reduzir a produção de metano por ingestão de matéria seca não foi confirmado.

Palavras-chave: Ácidos graxos de cadeia curta, consumo, metahemoglobina, nitrogênio não proteico, população microbiana ruminal, toxicidade do nitrato

Enteric methane emission and ruminal component in sheep fed diets differing in concentrate:forage ratio supplemented with encapsulated nitrate

Abstract: This study investigated the effects of sheep diets with contrasting concentrate:forage ratio diets and increasing encapsulated nitrate addition on *in vivo* enteric methane production, apparent digestibility, ruminal component and nitrate toxicity. Six rumen cannulated Santa Inês sheep were distributed in a 2 x 3 factorial arrangement according to a 6 x 6 Latin Square design. Factors were type of diet (20:80 vs 80:20 concentrate:forage ratio) and inclusion of encapsulated nitrate product (ENP) at 0, 1.5 and 3.0 % (0; 11.7 and 24.2 g NO₃⁻ in dietary DM). The ENP replaced soybean meal to achieve isonitrogenous diets. Each period consisted of 18 days for adaptation and seven days for data collection. Among the sub-periods, the animals were fed only chopped Tifton 85 (*Cynodon* spp) hay for three days. In each sub-period, the animals were gradually adapted to the consumption of NO₃⁻ with an increase of 0.5% of the total ration ENP every three days to reach the desired levels 1.5% and 3%. The dry matter intake (DMI; $P = 0.26$) and methemoglobin levels ($P = 0.27$) were not affected by the addition of ENP. There were observed on average lower levels of methemoglobin in the blood (3.2, 4.7 and 5.5%, 3 hours after feeding, to 0, 1.5 and 3% ENP) with increasing level of NO₃⁻. When 3% of ENP was used on diets with 80% concentrate, there was decreased ($P < 0.05$) of 29% in the production of methane per day (g/day) in the diet compared with 0% ENP (12.4 vs 17.6 g CH₄/day, respectively). The concentrate to forage ratio affected ($P = 0.01$) the proportion of *F. succinogenes* bacteria in the collected rumen fluid (0.318 to 80% bulky vs 0.115 to 80% concentrate). There was an interaction ($P < 0.05$) between diet and inclusion of ENP for *Campylobacter fetus* ($P < 0.01$), and this increased linearly ($y = 1.66 + 9.95x$, $P = 0.02$) in diets with 80% forage with the addition of ENP (1; 5.51 and 57.04 for 0, 1.5 and 3.0% ENP). The proportion of acetate showed interaction ($P = 0.03$) between diet and ENP dose with a quadratic effect ($P < 0.01$). It was concluded that NO₃⁻, used safely, is a useful strategy for methane mitigation, however, the associative effects of two tested strategies, nitrate and concentrated, to reduce methane per dry matter intake was not confirmed.

Additional keywords: short-chain fatty acids, intake, methemoglobin, non-protein nitrogen, ruminal microbial population, nitrate toxicity

5.1. Introdução

A contribuição de metano para as emissões de gases de efeito estufa, bem como para perda da energia bruta total consumida pelo ruminante, 6 a 18 % da energia bruta da dieta (PEDREIRA; PRIMAVESI, 2006), tem levado a comunidade científica a investigar modos de ação para reduzir a emissão desse gás. Sabendo que a dieta dos ruminantes tem grande efeito sobre a produção de metano entérico (MOSS; JOUANY; NEWBOLD, 2000), busca-se avaliar distintos compostos biológicos e químicos que inibam a metanogênese.

Entre os compostos químicos, a suplementação com nitrato em dietas para ruminantes tem sido estabelecida para a redução de metano (SILIVONG; PRESTON; LENG, 2011), pois tem ação direta sobre a metanogênese (VAN ZIJDERVELD et al., 2010), apresenta menor gasto energético ao animal (LENG; PRESTON, 2010), causa mudança no sentido da produção de propionato no rúmen (ANDERSON et al., 2010), podendo ainda ser utilizado como fonte de nitrogênio não proteico pelos animais (LI et al., 2013).

Apesar dos benefícios do uso do nitrato na alimentação de ruminantes, há preocupação com relação ao potencial efeito tóxico ao animal devido ao nitrito, produtor intermediário da redução do nitrato, formado no rúmen (LENG, 2008). Contudo, os estudos que visam avaliar teores de inclusão deste produto na dieta têm demonstrado que o nitrato pode ser seguramente incluído na alimentação, desde que os animais sejam gradativamente adaptados à dieta (LEE; BEACHEMING, 2014).

Por conseguinte, a dieta base sobre a qual o animal é alimentado parece ser importante para auxiliar na mitigação de metano. A relação volumoso:concentrado da dieta influencia a metanogênese, pois modifica a relação acetato:propionato no rúmen interferindo na quantidade de H^+ disponível (HEGARTY, 1999), age sobre a atividade das metanogênicas, protozoários (RODRIGUES; CAMPOS, 2007) e bactérias celulolíticas (BROSSARD et al., 2004). Desta forma, maior quantidade de carboidrato não fibroso na dieta pode aumentar a digestibilidade dos nutrientes e a eficiência do metabolismo energético, diminuindo a emissão de metano.

Mas vale lembrar que a adição de elevada quantidade de alimento concentrado na dieta de ruminantes pode apresentar limitações econômicas devido ao custo desse alimento, em especial o farelo de soja (SANTOS; CAVALIERI; MODESTO, 2001), além de apresentar possíveis consequências metabólicas aos animais (BROWN; PONCE; PULIKANI, 2006). A substituição de fontes de proteína verdadeira, como farelo de soja, por fontes de nitrogênio não proteico, como nitrato, podem ser uma estratégia promissora para aumentar a eficácia do

sistema de produção de ruminantes, reduzindo perda de energia ao animal e os custos com concentrado para o produtor (PAIXÃO et al., 2006), além de apresentar benefícios ambientais decorrentes da redução na metanogênese.

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da taxa de inclusão de doses de produto nitrato encapsulado, em substituição ao farelo de soja, em duas dietas bases com relações concentrado:volumoso 80:20 e 20:80 sobre a produção de metano, constituintes ruminais e grau de toxicidade do nitrato em ovinos Santa Inês.

5.2. Material e métodos

O experimento foi conduzido entre Junho e Dezembro de 2013 no Laboratório de Nutrição Animal, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, localizado em Piracicaba, São Paulo, Brasil. Todos os procedimentos de uso de animais foram aprovados pela Comissão Interna de Ética Ambiental e Experimentação Animal (protocolo 2013-6, CENA, USP, SP, Brasil).

Animais, Delineamento Experimental e Tratamentos

Seis ovinos Santa Inês canulados ($61,61 \pm 2,45$ kg ao início do período experimental) foram alojados em baias individuais (150 x 110 x 120 cm) de piso emborrachado com acesso a água e cocho de alimentação. Esses animais foram distribuídos em delineamento experimental em quadrado latino 6 x 6 em esquema fatorial 2 x 3. Como fatores foram considerados o tipo de dieta com duas relações concentrado:volumoso (20:80 e 80:20) e três doses de inclusão (0 %; 1,5 % e 3 % da MS) de um produto comercial de nitrato encapsulado (PNE) totalizando seis tratamentos.

O período experimental teve duração de 168 dias distribuídos em seis subperíodos de 25 dias cada, sendo 18 dias iniciais para adaptação dos animais às dietas propostas e sete dias para colheita de dados: seis dias para mensuração de consumo de matéria seca e digestibilidade, concomitantes com dois dias de mensuração de metano e um dia para mensuração de metahemoglobina; e um dia para colheita de conteúdo ruminal e urina *spot*. Entre os subperíodos foi estipulado um período de branco de três dias, quando apenas feno de Tifton 85 (*Cynodon spp*) picado foi fornecido para os animais.

Para reduzir o potencial de toxidez do nitrito, durante a adaptação de cada subperíodo os ovinos foram gradualmente adaptados ao consumo de nitrato com acréscimo de 0,5% do PNE na ração a cada três dias até chegar aos níveis desejados 1,5% e 3%. A quantidade de concentrado também foi aumentada gradualmente neste período a fim de evitar problemas com acidose ruminal (Figura 1).

A ração foi fornecida como mistura total duas vezes ao dia em cocho individual, sendo 60 % pela manhã e 40 % à tarde. O PNE foi misturado manualmente na ração total no momento da alimentação. A pesagem de cada animal foi realizada no primeiro e no 18º dia de cada subperíodo antes da alimentação da manhã.

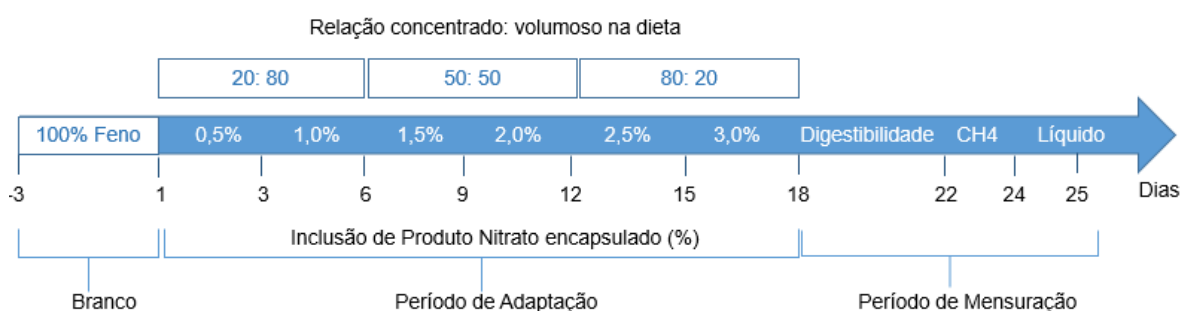


Figura 1 - Cronograma de execução de cada subperíodo experimental

O volumoso utilizado foi feno de Tifton 85 (*Cynodon spp.*) picado em partículas superiores a 3 mm. O milho foi moído em peneira com crivo 1 mm utilizando-se um moedor.

O concentrado proteico era composto de milho moído, farelo de soja e mistura mineral. As doses de PNE (0; 1,5 % e 3 % da MS) correspondiam à 0; 11,1 e 22,4 g de NO_3^- na dieta (% MS), respectivamente. A inclusão do PNE ocorreu substituindo o farelo de soja do concentrado em equivalente proteico (Tabela 1). As dietas foram formuladas conforme exigências do NRC (2007) para ovinos em manutenção.

O PNE que foi utilizado no experimento é protegido por patente internacional e foi fabricado pela GRASP Ind. & Com. LTDA (Curitiba, PR, Brasil). A fabricação utilizou o sal duplo de cálcio e nitrato de amônio, deca-hidrato revestido com uma matriz de liberação controlada. O produto foi concebido para liberar 50, 80 e 100 % de nitrato dentro de 4, 12 e 30 h, respectivamente. Composição de PNE (% MS): 85% de MS, 16,47% N (102,9% PB-equivalente), 66,86% NO_3^- , e 19,61% Ca.

Tabela 1 - Ingredientes e composição química das dietas experimento (% MS)

Items	Tratamento ¹					
	20:80			80:20		
	0%	1,5%	3,0%	0%	1,5%	3,0%
Ingredientes						
Feno Tifton 85 ²	80	80	80	20	20	20
Milho Grão ³	5,7	7,0	8,0	66,6	68,3	70
Farelo de Soja ⁴	12,3	9,5	7,0	11,4	8,2	5,0
Mistura mineral ⁵	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
PNE	-	1,5	3,0	-	1,5	3,0
Composição Química⁶						
MS, base do alimento	91,0 ± 0,39	90,9 ± 0,50	90,9 ± 0,86	89,3 ± 0,58	89,2 ± 0,76	89,1 ± 0,74
MO	93,7 ± 0,21	93,2 ± 0,25	93,3 ± 0,55	96,4 ± 0,78	95,9 ± 0,37	95,7 ± 0,42
PB	10,4 ± 0,02	10,4 ± 0,02	10,4 ± 0,08	10,5 ± 0,04	10,5 ± 0,02	10,5 ± 0,04
FDN	74,3 ± 1,38	72,3 ± 3,17	72,8 ± 2,82	45,5 ± 4,25	45,4 ± 1,75	42,3 ± 2,92
FDA	37,3 ± 1,79	35,6 ± 4,04	36,5 ± 3,06	14,4 ± 2,36	14,7 ± 2,32	13,4 ± 1,25
EE	3,1 ± 0,61	3,0 ± 0,57	3,2 ± 0,92	4,2 ± 1,15	4,2 ± 0,58	4,5 ± 0,45
Cálcio (%)	0,61	0,67	0,56	0,59	0,62	0,70
Fósforo	0,32	0,31	0,30	0,36	0,32	0,36
ED, MJ/kg MS	16,06	15,28	15,26	16,14	15,94	15,78
Nitrato (NO ₃) ⁷	-	11,1 ± 0,12	22,3 ± 0,09	-	11,2 ± 0,05	22,4 ± 0,05

¹ Relação concentrado:volumoso (20:80 e 80:20) e Inclusão do Produto nitrato encapsulado (PNE:0; 1,5 e 3% da MS);

² MS (Média ± Desvio Padrão): 879,1 ± 0,47; PB: 75,52 ± 1,24; FDN: 815,3 ± 7,3 (em g/1000g MS);

³ MS (Média ± Desvio Padrão): 883,03 ± 0,54; PB: 82,45 ± 1,27; FDN: 396,3 ± 54 (em g/1000g MS);

⁴ MS (Média ± Desvio Padrão): 892,6 ± 0,41; PB: 446,47 ± 4,66; FDN: 259,3 ± 1,6 (em g/1000g MS);

⁵ Composição do produto: Cálcio 120,00g/Kg; Fósforo 87,00g/Kg; Sódio 147,00g/Kg; Enxofre 18,00g/Kg; Cobre 590,00mg/Kg; Cobalto 40,00mg/Kg; Cromo 20,00mg/Kg; Ferro 1800,00mg/Kg; Iodo 80,00mg/Kg; Manganês 1300,00mg/Kg; Selênio 15,00mg/Kg; Zinco 3800,00mg/Kg; Molibdênio 300,00mg/Kg; Flúor (máx.) 870,00mg/Kg.

⁶ MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; PB: proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro, FDA: fibra em detergente ácido; EE: extrato etéreo; CNF: carboidratos não fibrosos (em g/1000g MS); ED = energia digestível

⁷ Estimativa da quantidade de NO₃⁻ provida do PNE (em g/1000g MS).

Consumo de Matéria Seca

O consumo individual foi calculado pela diferença entre a dieta total oferecida e a sobra. Diariamente pela manhã (8:00h) as sobras da dieta de cada baia foram coletadas e pesadas em balança eletrônica com precisão de 5 g para obtenção do consumo de matéria seca (CMS) por animal. Amostras da dieta total e das sobras (10%) de cada animal foram colhidas entre o 19º- e 24º- dia de cada subperíodo. Todas as amostras foram armazenadas individualmente a -20 °C até a análise química. A quantidade ofertada era ajustada de acordo

com as sobras diárias, evitando-se sobras superiores a 10% do total ofertado para garantir o consumo voluntário máximo pelos animais e evitar desperdícios. Amostras do concentrado e do feno de Tifton 85 utilizados foram também coletadas para análise química.

Ensaio de digestibilidade aparente

Entre o 18º- e o 24º- dia de cada subperíodo experimental, os animais foram alojados em gaiolas metabólicas adaptadas para coleta de metano (CH_4) para mensurar a digestibilidade aparente dos nutrientes pelo método da colheita total de fezes por seis dias (19º- ao 24º-). Diariamente (8:00h) antes da refeição matinal, as sobras e as fezes foram coletadas, pesadas e uma amostra representativa de 10% da produção fecal e das sobras foram colhidas e armazenadas a -20°C para posterior análise química.

Colheita de urina

O volume total de urina foi coletado diariamente, entre o 19º- ao 24º- dia de cada subperíodo em frasco contendo aproximadamente 100 mL de ácido sulfúrico a 10% (H_2SO_4 , 10 N) para reduzir o pH abaixo de 3 e prevenir a volatilização da amônia. A acidificação da urina foi mensurada pela verificação do pH em potenciômetro digital (Tecnal® modelo TEC-2, São Paulo, Brasil). Durante esse período, às 8:00 h, a produção total de urina foi mensurada em proveta graduada e retirada uma amostra de 10%, armazenada a -20°C . Ao final dos seis dias, o pool de urina individual foi descongelado e uma alíquotas de urina (10%) foi armazenada em freezer (-20°C) para determinação da concentração de nitrogênio total (N total).

Colheita de sangue e fluido ruminal

No 18º- dia de cada subperíodo, três horas após a alimentação da manhã, foi colhida uma amostra de sangue de cada ovino (5 mL) via punção da veia jugular e recolhida em tubo “vacutainer” (K2 EDTA, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) contendo anticoagulante (oxalato de potássio) e antiglicolítico (fluoreto de sódio) para dosagem de metahemoglobina (Met-Hb), segundo metodologia descrita por Sato (2005).

No 25º- dia os animais voltaram às baias e amostras do fluido ruminal (50 mL) foram colhidas por meio de cânula ruminal. As colheitas foram realizadas 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas

após o fornecimento da ração. Em cada horário, uma amostra da fração líquida foi obtida por meio da inserção de sonda de aço inoxidável (tela de 2,5 mm diâmetro) anexado a uma seringa de grande capacidade (60 mL). Após a determinação do pH, foram retiradas quatro alíquotas de 10 mL do fluído ruminal. Duas alíquotas foram armazenadas em frascos e congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior análise de N amoniacal (N-NH_3) e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). A terceira alíquota foi congelada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para análise de microrganismos por PCR. A quarta amostra foi resfriada ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) e ao fim do dia foi realizada uma amostra compostas de todos os horários de coleta para posterior contagem do número de protozoários.

Mensuração da emissão de metano pela técnica das câmaras semiabertas

A produção de metano (L/dia, temperatura e pressão padrão) foi mensurada em gaiolas metabólicas adaptadas (ABDALLA et al., 2008) com as laterais cobertas, com exceção da parte inferior, com folhas de polietileno de 0,3 mm de espessura. Orifícios de 5 cm de diâmetro foram deixados na parte dianteira e traseira da câmara para circulação de ar. Uma bomba de escape foi ligada ao orifício traseiro da câmara a fim de remover o ar anterior a um fluxo de 133 L/min (medido por um anemômetro-CE Instrutherm AD-250, São Paulo, Brasil). O ar de saída foi amostrado em balão de 5 L (revestido com película de alumínio), a 100 mL/min usando uma bomba peristáltica. Temperatura e umidade foram medidas em intervalos regulares (2 h) e um ventilador foi colocado no interior da câmara para manter o ar em circulação e os níveis de CO_2 confortáveis para o animal.

Os animais permaneciam nas gaiolas por sete dias, sendo que nos últimos dois dias foram coletadas amostras de gás individual (ABDALLA et al., 2012). Após 23 horas de coleta, 10 mL da amostra de gás foram coletadas dos balões, armazenadas em tubos de vácuo e enviadas ao laboratório para a determinação da concentração de CH_4 por cromatografia gasosa.

Análises laboratoriais e cálculos

Depois de descongeladas, as amostras de mistura total das rações ofertadas, das sobras e das fezes foram secas em estufa de ventilação forçada a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 72 horas. Em seguida, todas as amostras foram moídas em moinho tipo Willey (Marconi, Piracicaba, Brasil) com peneiras com crivos de 1,0 mm e seguiram para análise química no Laboratório de Nutrição Animal (Lana - CENA/USP).

Foram realizadas análises de matéria seca (MS) por secagem a 105 °C por 24 h (Método 930.15, AOAC, 1995), extrato etéreo (EE) usando o sistema de extração ANKOM (modelo XT10I, New York, USA) e matéria mineral (MM) por incineração a 550 °C por 9 h (Método 942.05, AOAC, 1995). Por análise sequencial, foram determinadas na mesma amostra fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) utilizando sacos de filtro (ANKOM #57) em um analisador de fibra (Tecnal, São Paulo, Brasil). Para determinação de FDN utilizou-se α -amilase. Os valores de FDN e FDA foram corrigidos para cinzas de acordo com os procedimentos descritos por Van Soest, Robertson, Lewis (1991) e adaptados por Mertens (2002).

A matéria orgânica (MO) foi calculada pela diferença entre MS e MM. Os teores de carboidratos totais (CHOT) foram calculados segundo Sniffen, O'Connor e Van Soest (1992) e os teores de carboidratos não fibrosos (CNF) pela diferença entre CHOT e FDN. O teor de energia metabolizável (EM) foi obtido segundo Sniffen et al (1992). Cálcio (Ca) e fósforo (P) foram extraídos da dieta e suas concentrações foram determinadas no laboratório de Química analítica (CENA/ USP). O teor de energia da ração em mistura total foi determinado utilizando bomba calorimétrica (Parr Oxygen Bomb Calorimeter 6200, Moline, Illinois, USA).

O teor de Nitrogênio (N) total nas amostras de urina foi determinado pelo método micro-Kjeldahl (Método 981.10; AOAC, 1995). As amostras de urina passaram por digestão e posteriormente o N-total das amostras foi determinado por destilação a vapor com solução de hidróxido de sódio (12 N), coletado em solução de ácido bórico e determinado por titulação com solução de ácido sulfúrico (0,05 N). Já nas amostras das ofertas e do pool de sobras e fezes, o N-total foi determinado pelo método de Dumas utilizando o Leco FP 528 (Leco Corporation, St. Joseph, MI). O total de proteína bruta (PB) da oferta, sobra, fezes e urina foram calculados multiplicando-se o conteúdo de N por 6,25.

Digestibilidade Aparente e Balanço de Nitrogênio

A digestibilidade dos nutrientes no trato digestório total (DNTD) e o balanço de nitrogênio foram calculados pelas seguintes fórmulas (Equação 1, 2 e 3):

$$\text{Digestibilidade aparente de X} = \frac{\text{Consumo de X} - \text{Excreção de X}}{\text{Consumo de X}} \quad (1)$$

Onde:

X = unidade dietética avaliada.

$$N_{\text{retido}} \text{ (g / dia)} = (N_{\text{ingerido}} - N_{\text{Excretado}}); \quad (2)$$

$$\text{Retenção de N (\% } N_{\text{consumido}}) = (N_{\text{retido}} / N_{\text{consumido}}); \quad (3)$$

Onde:

N_{retido} , N_{ingerido} , $N_{\text{excretado}}$ representam, respectivamente, as quantidades médias diárias de nitrogênio absorvido pelo animal, ingerido no alimento oferecido, excretados nas fezes e na urina.

Metahemoglobina

A análise de meta-hemoglobina (Met-Hb) foi realizada dentro de 30 minutos após a coleta de acordo com a técnica de Sato (2005) com leitura em espectrofotômetro (BioTeck® Instruments, Inc, Winooski, Vermont, USA). O procedimento baseia-se em um fenômeno que a máxima absorbância de ácido fraco de Met-Hb em 630 nm desaparece pela adição de cianeto e a concentração de Met-Hb pode ser facilmente determinada pelas mudanças de absorbância induzidas antes e depois da adição de ferricianeto de potássio (Analar, BDH, N° 1680) a amostra.

Constituintes Ruminais

Imediatamente após a coleta do líquido ruminal, o pH ruminal foi mensurado utilizando potenciômetro digital (Tecnal® modelo TEC-2, São Paulo, Brasil).

A concentração de $N-NH_3$ ruminal foi analisada por micro-Kjeldahl por destilação a vapor com solução de tetraborato de sódio (5%), coletado em solução de ácido bórico e determinado por titulação com solução de H_2SO_4 (0,01 N) de acordo com Preston (1995).

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) do líquido ruminal foram determinados por meio da técnica de cromatografia gasosa, de acordo com Nocek, Hart e Polan (1987), Palmquist e Conrad (1971), com modificações.

O fluido ruminal foi centrifugado (11000 rpm por 40 min a $-4^\circ C$) para remoção das partículas. Em seguida, foram coletados 800 μL do sobrenadante e adicionados

100 µL de ácido 2-etil-butírico (padrão interno, MW=116,16; Sigma Chemie GmbH, Steinheim, Germany) e 200 µL de ácido fórmico P.A.

Após o preparo, um microlitro da amostra foi injetado em cromatógrafo a gás (Shimadzu-2014, Tokyo, Japan) acoplado a um detector de Ionização de Chama (FID) sob temperatura de 250 °C, com uma coluna GP 10 % SP-1200/1 H₃PO₄ 80/100 Chromosorb WAW (Cat. n°. 11965, 6' x 1/8" stainless steel, Supelco, Bellefonte, PA, USA). A temperatura de aquecimento do forno foi 150 °C por 3,2 min, 123 °C (10 °C/min por 1,25 min), 126 °C (10 °C/min por 5 min), totalizando 10,55 min de análise. Gás hélio a 25 mL/min foi usado como gás de arraste. No detector, os fluxos de hidrogênio e ar sintético foram mantidos a 40 e 400 mL/min, respectivamente.

A curva de calibração externa foi preparada utilizando uma concentração padrão conhecida de AGCC (acético 99,5 %, CAS 64-19-97; propiônico 99 %, CAS 04-09-79; isobutírico 99 %, CAS 79-31-2; butírico 98,7 %, CAS 107-92-6; isovalérico 99 %, CAS 503-74-2 e valérico 99 %, CAS 109-52-4, Chem Service, West Chester, PA, EUA).

A extração do DNA das amostras de líquido ruminal coletadas individualmente quatro horas após a alimentação foi realizada utilizando kit comercial PowerLyzer™ PowerSoil (MoBio) de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação da abundância relativa dos microrganismos *Selenomonas ruminatium*, *Veillonella parvula* e *Campylobacter fetus* (nitrito- e nitrito-redutoras), Arqueas metanogênicas, *Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes* e fungos gerais anaeróbicos foi realizada utilizando *primers* específicos (Quadro1) de 16S rDNA por meio da técnica de PCR quantitativo em tempo-real (qPCR) realizadas no Laboratório de Biologia Celular e Molecular (CENA-USP).

A amplificação do DNA foi realizada no equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Life Technologies) em solução contendo 5 µL do kit SYBER Green ROX (Invitrogen), 2,5 pmol de cada *primer*, 1 µL do DNA pré-amplificado e água ultrapura (Milli-Q) autoclavada para um volume final de 10 µL. As condições de amplificação foram: uma pré-incubação a 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 30 s, com coleta de dados de fluorescência e ao final da reação foi incluída uma curva de melting nas seguintes condições: 95 °C por 15 s, 60 °C por 1 min e 95 °C por 15 s. Todas as amostras, incluindo a curva padrão, foram feitas em triplicata.

Os tamanhos das populações relativas dos grupos microbianos foram expressos como proporção do BACT 16S rDNA. Os valores de ΔC_t foram calculados subtraindo o valor de C_t (limiar de ciclo) do gene alvo a partir do valor C_t do gene de referência (16S rRNA de

BACT). A expressão relativa de grupos-alvo foi calculada baseado no cálculo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Quadro 1 - Iniciadores de PCR para o ensaio de qPCR

Microorganismos	Sequencia dos <i>Primers</i> (5' a 3') ^a	Referência
Bacterias totais	F, CGGCAACGAGCGCAACCC R, CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC	Denman e McSweeney (2006); Denman, Tomkins e McSweeney (2007)
<i>Ruminococcus Flavefaciens</i>	F, CGAACGGAGATAATTTGAGTTTACTTAGG R, CGGTCTCTGTATGTTATGAGGTATTACC	
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	F, GTTCGGAATTACTGGGCGTAAA R, CGCCTGCCCCTGAACTATC	
Arqueas metanogênicas	F, TTCGGTGGATCDCARAGRGC R, GBARGTCGWAWCCGTAGAATCC	
<i>Veillonella parvula</i>	F, CTT CTT GCG AAC AGT TAG A R, CTC AAT GTC AAG CCC TGG	Asanuma et al.(2002)
<i>Campylobacter fetus</i>	F, GATAAGAGAGTGCTAGCTTGCTAGAA R, GTTAGCAACTAAATACGTGGGTTG	Yu et al.(2005)
<i>Na</i>	F, TGC GAA TAG TTT TTM GCA A R, CTC AAT GTC AAG CCC TGG	Asanuma et al. (2002)

^a F, Forward; R, Reverso

Para a contagem de protozoários, foram retirados 2 mL do pool das amostras de líquido ruminal e misturados a 4 mL de solução salina Methylgreen formalina (MFS) e armazenadas a temperatura ambiente. O número total de protozoários foi contado usando câmara de “Sedgwick-Rafter” (medidas internas 50 mm x 20 mm x 01 mm, capacidade 01mL) com auxílio de um microscópio com objetiva 45/66 (Olympus, modelo CH2), tomando-se uma alíquota de 0,01 mL de acordo com o procedimento descrito por Dehority, Damron e McLaren (1983). O valor da contagem de protozoários totais foi transformado para $\text{Log}_{10}(x + 1)$, conforme recomendações de Obispo e Dehority (1992).

Metano entérico

A concentração de metano foi determinada por cromatografia gasosa (Shimadzu 2014, Tokyo, Japan) equipada com coluna Shincarbon ST 100/120 micro empacotada (1,5875 mm x 1,0 mm x 1 m; Ref. número 19809; Restek, Bellefonte, PA, EUA). A temperatura da coluna, do injetor e do detector de ionização de chama foram 60, 200 e 240 °C, respectivamente. Hélio a 10 mL/min foi utilizado como gás de arraste. As concentrações de metano foram determinadas por calibração externa por meio da construção de uma curva analítica (0, 30, 90 e 120 mL/ L) preparado com metano puro (White Martins PRAXAIR Gases Industriais Inc., Osasco, SP, Brasil; pureza 99,5 mL/L). A emissão de metano foi calculada em g/dia e g/Kg MS consumida.

Análise Estatística

Todos os dados foram testados para análise de variância, utilizando o procedimento GLM do programa SAS® v93 (Statistical Analysis System Int., Cary, NC). O modelo inclui o efeito fixo da dieta, da dose de PNE e a interação entre dose de PNE e dieta. Os dados de AGCC, pH e N-NH₃ também foram analisados para efeito de tempo como medida repetida e interação entre tempo e tratamento. Contrastes ortogonais foram aplicados para determinar a diferença entre tratamento controle (0% PNE) e tratamento com inclusão de PNE (1,5 e 3% MS) para as variáveis de metano e o efeito linear e quadrático da dose de PNE para todas as variáveis. As médias foram obtidas pelo comando LSMEANS (SAS®) e a comparação usou o teste F e teste Tukey-Kramer quando existiu um efeito significativo. Houve diferença estatística quando $P < 0,05$.

5.3. Resultados

Metano entérico

Durante a mensuração de CH₄ na gaiola, o consumo de matéria seca (CMS) não foi afetado ($P = 0,19$) pela dieta, nem tampouco pela suplementação com PNE ($P = 0,62$) como pode ser observado na Tabela 2. A digestibilidade aparente da MO, no mesmo período,

foi afetada ($P = 0,03$) pela quantidade de concentrado na dieta, mas não pela suplementação com PNE ($P = 0,16$). Dieta com relação concentrado volumoso de 80c:20v apresentou digestibilidade da MO 6% maior (0,740 kg/dia) quando comparada a dieta com 20c:80v (0,695 kg/dia).

A produção diária de CH_4 (g/dia) foi afetada ($P = 0,049$) pela adição de doses crescentes de PNE (0; 1,5 e 3% MS) reduzindo linearmente (17,5; 15,4 e 13,8, $y = 17,15 - 1,17x$, $P = 0,04$). Emissões de CH_4 g/kg de CMS seguiram a mesma resposta linear ($y = 15,00 - 0,61x$, $P = 0,04$) que emissões diárias de CH_4 (g/dia) com suplementação de PNE (15,13; 13,35 e 12,56 g /kg CMS). Nas dietas com alta relação de concentrado (80c:20v) foi observada tendência a contraste significativo ($P = 0,09$) para produção de CH_4 g/dia entre o tratamento controle (0% PNE) e a média dos tratamentos com PNE (17,98 vs 14,17 g/dia). Não houve interação entre tipo de dieta e suplementação com PNE para as variáveis relacionadas à produção de metano entérico.

Metahemoglobina

A taxa de Met-Hb no sangue após 3 h da alimentação não foi afetada ($P > 0,05$) em dietas com 20c:80v (3,46; 3,48 e 4,81, EPM = 1,001, $P = 0,27$) nem dietas com 80c:20v (3,67; 5,08 e 5,17, EPM = 1,521, $P = 0,27$) com a adição de 0; 1,5 e 3% de PNE (Figura 2).

A maior taxa de Met-Hb foi observado para a inclusão da dose de 3% de PNE nas dietas (5,5) em comparação as demais doses de PNE testadas 0 e 1,5% (3,2 e 4,8, respectivamente). Quando observadas as taxas de Met-Hb de cada animal dentro de cada tipo de dieta, dietas com 80% de concentrado suplementadas com 3% de PNE resultaram, numericamente, na maior taxa de metahemoglobina no sangue (17,2%).

Tabela 2 - Interação entre dietas com relação concentrado:volumoso 20:80 e 80:20 e inclusão de produto nitrato encapsulado (PNE) sobre a emissão de metano entérico, consumo e digestibilidade em ovinos

Item ²	Tratamento ¹						EPM ³	Valor- <i>P</i> ⁴					
	20:80			80:20				Ctl vs PNE	Dieta	PNE	Dieta*PNE	L	Q
	0%	1,5%	3%	0%	1,5%	3%							
CMS, kg / dia	1,069 ^a	1,123 ^{ab}	1,127 ^{ab}	1,315 ^b	1,247 ^{ab}	1,083 ^a	0,198	0,69	0,19	0,62	0,35	0,51	0,74
CMO, kg / dia	1,001 ^a	1,043 ^a	1,052 ^a	1,268 ^b	1,195 ^{ab}	1,039 ^a	0,196	0,55	0,08	0,59	0,33	0,48	0,78
MOD, kg / dia	0,698 ^a	0,677 ^a	0,710 ^{ab}	0,771 ^b	0,705 ^{ab}	0,743 ^b	0,023	0,22	0,03	0,16	0,57	0,87	0,35
PCH ₄ , g / dia	16,71 ^a	15,45 ^b	14,88 ^b	17,57 ^a	15,38 ^b	12,37 ^c	0,901	0,09	0,64	0,05	0,52	0,04	0,98
PCH ₄ g / kg CMS	15,88 ^a	14,36 ^b	14,12 ^b	14,35 ^b	13,32 ^{bc}	12,44 ^c	1,371	0,44	0,22	0,03	0,97	0,04	0,85
PCH ₄ g / kg MOD	25,01 ^a	22,97 ^a	21,18 ^a	22,63 ^a	21,90 ^a	17,85 ^a	2,383	0,13	0,24	0,21	0,89	0,15	0,75

¹Tratamentos experimentais: relação concentrado:volumoso 20:80 e 80:20, com adição de produto nitrato encapsulado (PNE) à 0; 1,5; 3,0 e 4,5% (matéria seca)

²CMS = consumo de matéria seca, mensurada nos dias da avaliação de metano; CMO = consumo de matéria orgânica; MOD = matéria orgânica digerida; CH₄= metano

³EPM = erro padrão da média

⁴Ctl vs PNE = Dietas sem PNE (0%) vs Dietas com PNE (1,5 + 3 %); Dieta = efeito fixo da dieta (20: 80 e 80: 20 concentrado: volumoso); PNE = efeito fixo do Produto nitrato encapsulado (0, 1,5 e 3,0% PNE em base da MS); Dieta* PN = interação entre dieta e PNE; Efeito da adição de PNE: L = Efeito linear; Q = efeito quadrático

^{a, b, c} Médias com diferentes letras na mesma linha indica efeito significativo do tratamento (Teste Tukey, $P < 0,05$)

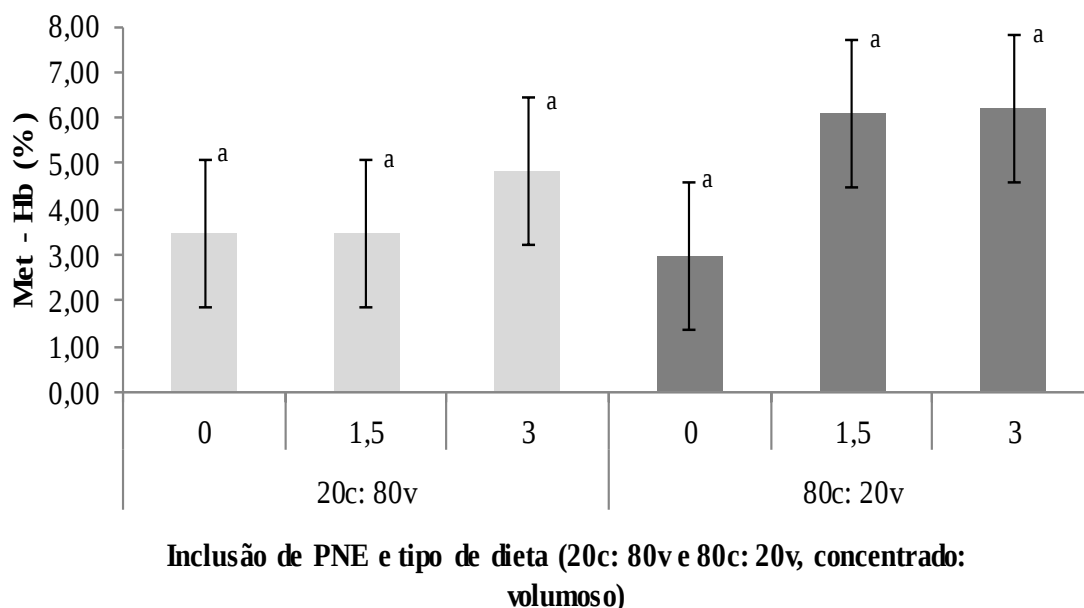


Figura 2 - Efeito da relação concentrado:volumoso (20:80 e 80:20, concentrado:volumoso) e inclusão de produto nitrato encapsulado (PNE, 0; 1,5 e 3% MS) sobre os níveis de Metahemoglobina (Met – Hb) de ovinos ($P_{\text{dieta}} = 0,32$; $P_{\text{PNE}} = 0,23$; $P_{\text{dieta} \times \text{PNE}} = 0,55$, EPM = 1,415)

Consumo e Digestibilidade aparente dos nutrientes

O consumo (exceto de N) e a digestibilidade aparente de nutrientes no trato digestório total de ovinos, baseados no método de coleta total de fezes, não foram afetados ($P > 0,05$) pela suplementação com PNE na dieta, da mesma forma que não apresentaram interação significativa ($P > 0,05$) entre tipo de dieta e suplementação com PNE (Tabela 3). O consumo de nutrientes por unidade de peso metabólico ($\text{kg PV}^{0,75}$), foi testado mas não resultou em efeito significativo ($P > 0,05$) para os tratamentos.

A relação concentrado:volumoso da dieta afetou ($P < 0,01$) o consumo de MS, MO, FDA e EM, assim como a digestibilidade aparente ($P < 0,01$) de MS, MO e FDN (Tabela 3). Em dietas com 80c:20v foram observados maiores ($P < 0,05$) resultados para CMS (1,290 vs 1,106 kg) de CMO (1,270 vs 1,050 kg) e CEM (3,711 vs 2,879 Mcal) do que em dietas com 20c:80v, respectivamente. A digestibilidade da MS (0,772 vs 0,593 kg), da MO (0,745 vs 0,622 kg) e da FDN (0,756 vs 0,570 kg) também foi maior ($P < 0,05$) em dietas com 80% de concentrado em comparação a dietas com 80% de volumoso.

O consumo de CNF foi maior ($P = 0,02$) nas dietas com 80c:20v, alto carboidrato fermentescível, comparada às dietas com 20c:80v, alta quantidade de fibra (0,208 x 0,088 kg / dia, respectivamente), mas essa diferença não foi observada na digestibilidade do CNF.

Consumo e Excreção de N

O consumo de N foi afetado pelo tipo de dieta ($P = 0,04$). Animais ingerindo dietas com relação concentrado:volumoso de 80c:20v consumiram 13% mais N comparados aos animais que receberam dietas com relação 20c:80v (21,1 vs 18,3 g / dia, respectivamente) (Tabela 4).

A excreção de N urinário e a retenção de N tenderam a serem maiores ($P = 0,06$) em dietas com 80% concentrado (7,8 e 6,7 g / dia) do que em dietas com 80% de volumoso (6,7 e 5,9 g / dia, respectivamente). O balanço de N foi positivo para todos os tratamentos, não diferindo ($P > 0,05$) entre eles (Tabela 4).

A suplementação com PNE não alterou ($P > 0,05$) o consumo, excreção ou retenção de N. Foi observada interação entre dieta e dose de PNE ($P = 0,02$) para excreção de N fecal (Tabela 4). Para os níveis de 0; 1,5 e 3% de PNE, em dieta com relação concentrado:volumoso de 80:20 a excreção de N fecal foi de 6,1; 5,2 e 8,1 g/dia enquanto dietas com relação 20c:80v foi de 8,0; 6,6 e 5,6 g/dia, respectivamente. Assim, a quantidade de concentrado na dieta mudou a retenção de N fecal conforme foi incluído nitrogênio não proteico na dieta.

Tabela 3 - Efeito das dietas com relação concentrado:volumoso 20:80 e 80:20 e inclusão de produto nitrato encapsulado (PNE) sobre ao consumo e a digestibilidade aparente dos nutrientes em ovinos

Item ²	Tratamento ¹						EPM ³	Valor- <i>P</i> ⁴				
	20: 80			80: 20				Dieta	PNE	Dieta*PNE	L	Q
	0%	1,5%	3%	0%	1,5%	3%						
Consumo, kg/dia												
MS	1,075 ^a	1,107 ^{ab}	1,135 ^{ab}	1,281 ^{ab}	1,205 ^{ab}	1,384 ^b	0,065	<0,01	0,26	0,47	0,36	0,43
MO	1,023 ^a	1,046 ^a	1,080 ^{ab}	1,262 ^{ab}	1,187 ^{ab}	1,360 ^b	0,064	<0,01	0,25	0,52	0,36	0,39
PB	0,117 ^a	0,115 ^a	0,107 ^a	0,132 ^a	0,120 ^a	0,145 ^a	0,009 ^a	0,10	0,68	0,26	0,84	0,48
FDN	0,779 ^a	0,777 ^a	0,825 ^a	0,833 ^a	0,774 ^a	0,911 ^a	0,068	0,15	0,31	0,74	0,42	0,37
FDA	0,379 ^a	0,392 ^a	0,429 ^a	0,178 ^b	0,199 ^b	0,187 ^b	0,038	<0,01	0,55	0,51	0,52	0,54
CNF	0,071 ^a	0,105 ^{ab}	0,088 ^{ab}	0,216 ^b	0,207 ^{ab}	0,200 ^{ab}	0,036	0,02	0,89	0,75	0,92	0,72
EM, Mcal	2,705 ^a	2,704 ^a	3,229 ^{ab}	3,679 ^{ab}	3,852 ^{ab}	3,799 ^b	0,302	<0,01	0,48	0,69	0,41	0,57
Digestibilidade, kg/dia												
MS	0,594 ^a	0,597 ^a	0,589 ^a	0,755 ^b	0,766 ^b	0,795 ^b	0,018	<0,01	0,62	0,43	0,36	0,89
MO	0,620 ^a	0,626 ^a	0,619 ^a	0,780 ^b	0,790 ^b	0,818 ^b	0,017	<0,01	0,56	0,45	0,32	0,92
PB	0,644 ^a	0,645 ^a	0,587 ^a	0,597 ^a	0,621 ^a	0,669 ^a	0,034	0,89	0,93	0,17	0,73	0,85
FDN	0,578 ^a	0,564 ^a	0,569 ^a	0,722 ^b	0,732 ^b	0,781 ^b	0,029	<0,01	0,55	0,46	0,65	0,64
FDA	0,463 ^a	0,468 ^a	0,517 ^a	0,412 ^a	0,383 ^a	0,334 ^a	0,051	0,08	0,96	0,56	0,86	0,91
CNF	0,738 ^a	0,937 ^a	1,138 ^a	1,190 ^a	1,002 ^a	1,071 ^a	0,158	0,22	0,67	0,24	0,57	0,76

¹Tratamentos experimentais: relação concentrado:volumoso 20:80 e 80:20, com adição de produto nitrato encapsulado (PNE) à 0; 1,5; 3,0 e 4,5% (matéria seca)

²CMS = matéria seca, MO = matéria orgânica, PB = proteína bruta, FDN = fibra em detergente neutro, FDA = fibra em detergente ácido, CNF = carboidrato não fibroso; EM = energia metabolizável (estimada)

³EPM = erro padrão da média

⁴Ctl vs PNE = Dietas sem PNE (0%) vs Dietas com PNE (1,5 + 3 %); Dieta = efeito fixo da dieta (20: 80 e 80: 20 concentrado: volumos); PNE = efeito fixo do Produto nitrato encapsulado (0, 1,5 e 3,0% PNE em base da MS); Dieta* PN = interação entre dieta e PNE; Efeito da adição de PNE: L = Efeito linear; Q = efeito quadrático

^{a, b, c} Médias com diferentes letras na mesma linha indica efeito significativo do tratamento (Teste Tukey, $P < 0,05$)

Tabela 4 – Efeito das dietas com relação concentrado:volumoso 20:80 e 80:20 e inclusão de produto nitrato encapsulado (PNE) sobre o balanço de nitrogênio (N).

Item	Tratamento ¹						EPM ²	Valor- <i>P</i> ³				
	20: 80			80: 20				Dieta	PNE	Dieta*PNE	L	Q
	0%	1,5%	3%	0%	1,5%	3%						
N _{consumido} , g	18,69 ^a	18,64 ^a	17,61 ^a	20,89 ^{ab}	19,45 ^{ab}	22,95 ^b	1,076	0,04	0,72	0,35	0,74	0,53
N _{excretado} , g	14,65 ^a	13,21 ^a	12,37 ^a	14,68 ^a	12,71 ^a	15,88 ^a	1,081	0,38	0,39	0,31	0,62	0,37
N _{fecal} , g	8,00 ^a	6,60 ^b	5,58 ^c	6,09 ^{bc}	5,52 ^c	8,12 ^a	0,738	0,69	0,29	0,02	0,84	0,45
N _{urinário} , g	6,65 ^a	6,61 ^a	6,79 ^a	8,59 ^b	7,49 ^a	7,46 ^a	0,910	0,06	0,68	0,64	0,63	0,74
N _{retido} , g / dia	4,04 ^a	5,43 ^a	5,23 ^a	6,21 ^b	6,74 ^b	7,37 ^b	0,783	0,05	0,53	0,90	0,36	0,86
N _{retido} / N _{consumido} , g	0,21 ^a	0,29 ^a	0,27 ^a	0,29 ^a	0,38 ^a	0,33 ^a	0,090	0,37	0,68	0,85	0,48	0,27

¹Tratamentos experimentais: relação concentrado:volumoso 20:80 e 80:20, com adição de produto nitrato encapsulado (PNE) à 0; 1,5; 3,0 e 4,5% (matéria seca)

²EPM = erro padrão da média

³Ctl vs PNE = Dietas sem PNE (0%) vs Dietas com PNE (1,5 + 3 %); Dieta = efeito fixo da dieta (20: 80 e 80: 20 concentrado: volumoso); PNE = efeito fixo do Produto nitrato encapsulado (0, 1,5 e 3,0% PNE em base da MS); Dieta* PN = interação entre dieta e PNE, Efeito da adição de PNE: L = Efeito linear; Q = efeito quadrático

^{a, b, c} Médias com diferentes letras na mesma linha indica efeito significativo do tratamento (Teste Tukey, $P < 0,05$).

Constituintes Ruminiais

A quantidade de concentrado na dieta afetou ($P < 0,01$) o pH ruminal (médio, mínimo e máximo), a produção total de AGCC, a proporção individual de AGCC como proporção do total de AGCC produzido e a relação acetato: propionato (C2: C3) (Tabela 5).

Em dietas com relação concentrado:volumoso de 80:20 foi observado menor ($P < 0,01$) pH ruminal médio (5,9 vs 6,5), maior ($P < 0,01$) produção total de AGCC (95,3 vs 84,1 mmol /L) e tendência a maior ($P = 0,07$) concentração de N-NH₃ (18,7 vs 15,8 mg/dL) comparada a dietas com 20c:80v, respectivamente.

A relação concentrado:volumoso alterou ($P < 0,05$) os produtos da fermentação ruminal, dietas com 80 concentrado:20 volumoso resultaram em maior ($P < 0,01$) proporção de ácido propiônico (23,6 vs 16,1%, $P = 0,01$) comparando a dietas com relação concentrado:volumoso 20:80. Contudo, a elevada relação de fibra na dieta com 80% de volumoso conferiu elevada ($P < 0,03$) proporção de ácido acético (73,8 vs 62,3%, $P < 0,01$) o que resultou em maior ($P < 0,01$) relação acetato:propionato (4,62 vs 2,92) nestas dietas em relação as dietas com 80% de concentrado.

Aumentos lineares foram observados para pH ruminal médio (6,15; 6,25 e 6,34, $y = 0,063x + 6,17$; EPM = 0,065, $P = 0,02$) e mínimo (5,94; 6,03 e 6,10, $y = 0,051x + 5,96$; EPM = 0,068, $P = 0,05$) com a inclusão de doses crescentes de PNE na dieta (0; 1,5 e 3% da MS). Essas variáveis, assim como concentração média de N-NH₃, também apresentaram interação ($P < 0,01$) entre tratamento e tempo de mensuração (Tabela 5).

Numericamente, o menor pH médio observado foi de 5,61, na tratamento com relação concentrado:volumos de 80c:20v com 0% de inclusão de PNE, 4 horas após a alimentação e o maior pH médio foi 6,73, no tratamento 20c:80v com 3% de PNE, 2 horas após a alimentação (Figura 3).

Na Tabela 5 podemos observar que a inclusão de PNE não afetou a proporção de propionato ($P = 0,12$), mas promoveu mudança ($P < 0,05$) na fermentação ruminal. A produção de AGCC foi modificada de forma quadrática ($P_Q = 0,05$) reduzindo com a inclusão de 3% de PNE em dietas com 80% de volumoso (82,4; 85,7 e 84,2 mmol / L) e dietas com 80% de concentrado (97,3; 98,6 e 89,9 mmol / L). A relação acetato:propionato aumentou linearmente (3,52; 3,89 e 3,91, EMP = 0,183, $P_L < 0,01$), enquanto a proporção de butirato decresceu linearmente (9,3; 8,6 e 7,6 mol%, EPM = 0,435, $P_L < 0,01$) com a inclusão de doses crescentes de PNE (0; 1,5 e 3% MS) nas dietas.

Tabela 5 – Efeito das dietas com relação concentrado:volumoso 20:80 e 80:20 e inclusão de produto nitrato encapsulado (PNE) sobre o pH ruminal, nitrogênio amoniacal (N-NH₃) e concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) em ovinos

Item ²	Tratamento ¹						EPM ³	Valor- <i>P</i> ⁴					
	20: 80			80: 20				Dieta	PNE	Dieta*PNE	Hora	L	Q
	0%	1,5%	3%	0%	1,5%	3%							
pH													
Médio	6,52 ^a	6,52 ^a	6,60 ^a	5,79 ^b	5,98 ^{bc}	6,09 ^c	0,065	<0,01	0,02	0,23	0,01	0,03	0,65
Mínimo	6,36 ^a	6,38 ^a	6,43 ^a	5,53 ^b	5,69 ^{bc}	5,78 ^c	0,068	<0,01	0,05	0,38	0,04	0,04	0,61
Máximo	6,62 ^a	6,63 ^a	6,74 ^a	6,11 ^b	6,16 ^b	6,40 ^{ab}	0,105	<0,01	0,14	0,68	0,09	0,15	0,52
NH ₃ -N, mg / dL	16,65 ^{ab}	15,42 ^a	15,22 ^a	16,58 ^{ab}	17,99 ^{ab}	19,88 ^b	1,542	0,07	0,81	0,33	<0,01	0,13	0,51
Total AGCC, mmol / L	82,39 ^a	85,67 ^a	84,20 ^a	97,28 ^b	98,62 ^b	89,92 ^b	4,012	<0,01	0,03	0,06	0,42	0,07	0,05
Proporção do total de AGCC (%)													
Acetato	72,23 ^a	74,16 ^b	74,89 ^b	60,68 ^c	61,21 ^c	65,06 ^d	1,767	<0,01	<0,01	0,03	0,04	<0,01	0,93
Propionato	16,63 ^a	15,83 ^a	15,87 ^a	24,30 ^b	24,04 ^b	22,47 ^b	2,143	0,01	0,12	0,43	0,78	0,04	0,87
Isobutirato	0,89 ^a	0,62 ^a	0,59 ^b	0,38 ^b	0,42 ^b	0,52 ^b	0,090	<0,01	0,01	<0,01	0,01	0,01	0,12
Butirato	7,45 ^a	7,11 ^a	6,40 ^a	11,08 ^b	10,15 ^{bc}	8,76 ^c	0,517	<0,01	<0,01	0,07	0,01	<0,01	0,77
Isovalerato	1,93 ^{ab}	1,49 ^a	1,45 ^a	2,32 ^b	2,67 ^b	2,12 ^{ab}	0,242	<0,01	0,02	0,01	0,07	0,01	0,54
Valerato	0,87 ^{ab}	0,78 ^a	0,77 ^a	1,23 ^b	1,49 ^b	1,05 ^{ab}	0,130	<0,01	0,01	0,01	0,22	0,01	0,02
C2: C3 ³	4,39 ^a	4,74 ^a	4,76 ^a	2,65 ^b	3,04 ^b	3,08 ^b	0,392	<0,01	<0,01	0,09	0,24	0,01	0,10

¹Tratamentos experimentais: relação concentrado:volumoso 20:80 e 80:20, com adição de produto nitrato encapsulado (PNE) à 0; 1,5; 3,0 e 4,5% (matéria seca)

²pH, nitrogênio amoniacal, ácidos graxos de cadeia curta = foi a média do dia por ovino, análise estatística levou em consideração a hora (7 pontos no dia) como medida repetida no tempo

³EPM = erro padrão da média

⁴Ctl vs PNE = Dietas sem PNE (0%) vs Dietas com PNE (1,5 + 3 %); Dieta = efeito fixo da dieta (20: 80 e 80: 20 concentrado: volumos); PNE = efeito fixo do Produto nitrato encapsulado (0, 1,5 e 3,0% PNE em base da MS); Dieta* PN = interação entre dieta e PNE, ; Hora = efeito da hora de coleta (7 tempos); Efeito da adição de PNE: L = Efeito linear; Q = efeito quadrático

^{a, b, c, d} Médias com diferentes letras na mesma linha indica efeito significativo do tratamento (Teste Tukey, $P < 0,05$)

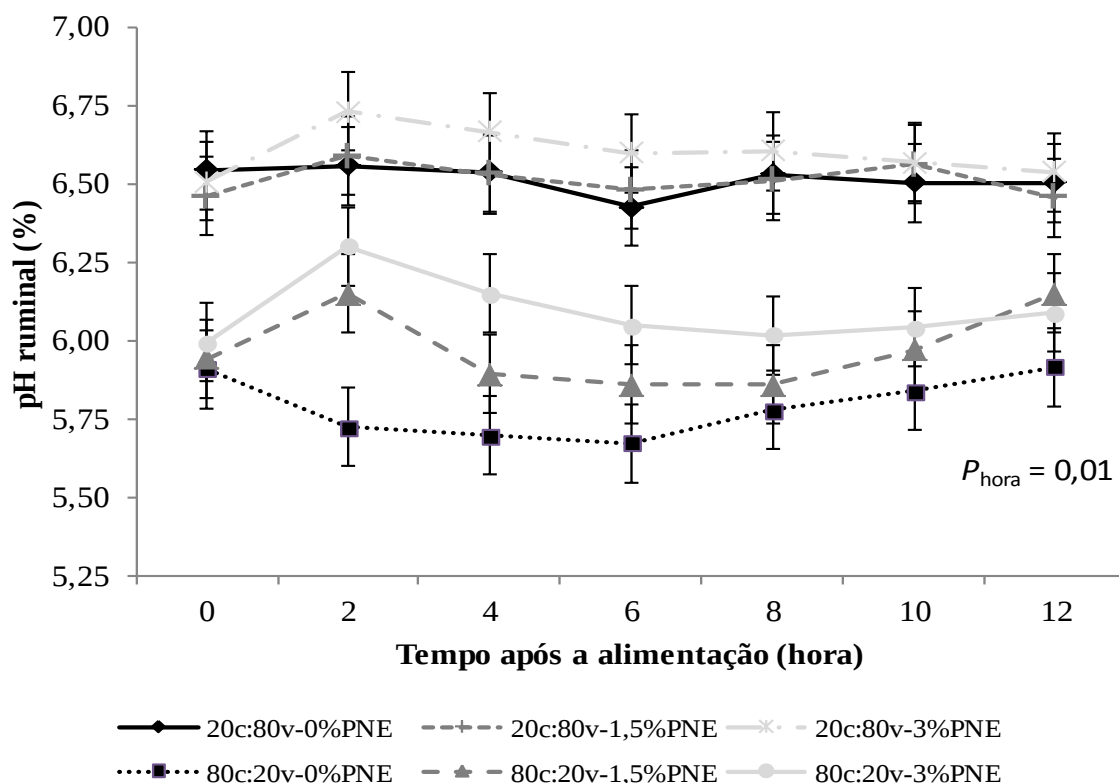


Figura 3 - Efeito das dietas com relações concentrado:volumoso de 20:80 e 80:20 e inclusão de produto nitrato encapsulado (PNE, 0; 1,5 e 3% MS) sobre o valor de pH ruminal ($P_{\text{dieta}} < 0,01$; $P_{\text{PNE}} = 0,02$; $P_{\text{dieta} \times \text{PNE}} = 0,23$; $\text{EPM} = 0,065$) de ovinos após a alimentação

Interação significativa ($P < 0,05$) foi observada entre dieta e dose de PNE para os ácidos acético ($P_L = 0,03$), isobutírico ($P_L < 0,01$), isovalérico ($P_L = 0,01$) e valérico ($P_Q = 0,01$). Quando NO_3^- foi incluído nas dietas (0; 11 e 22 g/kg MS) houve aumento nos valores de acetato tanto em dietas com 80% de volumoso (72,2; 74,2 e 74,9 mol%) como em dietas com 80% de concentrado (60,7; 61,2 e 65,1 mol%). A proporção de ácido valérico aumentou com inclusão de 1,5% de PNE em relação a dose 0% e voltou a reduzir na inclusão da dose máximos de PNE (3%) em dietas com relação concentrado:volumoso de 80:20 (1,26; 1,52 e 0,98 % para 0; 1,5 e 3% de PNE, respectivamente).

Os produtos da fermentação ruminal, ácido acético, isobutírico e butírico sofreram interação ($P < 0,01$) entre tratamento e tempo de coleta, na Figura 4 pode ser observado a produção do acetato e o pH ruminal médio ao longo do tempo em decorrência do tratamento.

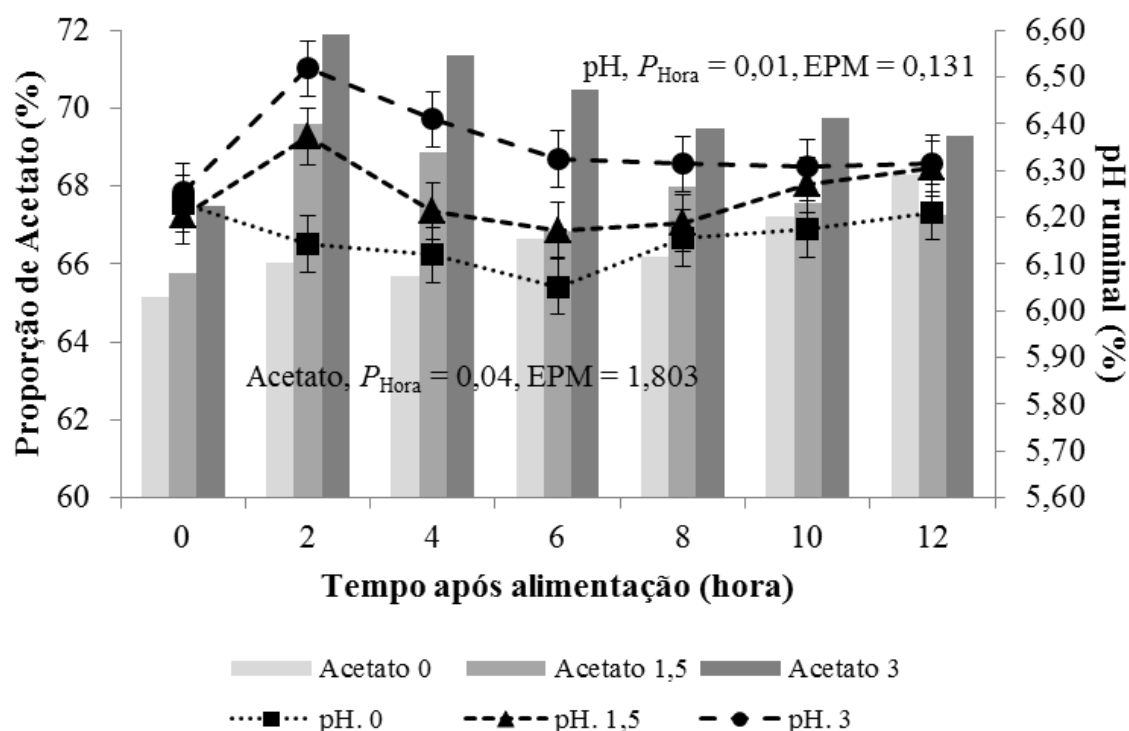


Figura 4 - Efeito da inclusão de produto nitrato encapsulado (PNE, 0; 1,5 e 3% MS) sobre a proporção ruminal (mol %) de acetato ($P_{\text{PNE}} < 0,01$; EPM = 1,767) e pH ruminal médio ($P_{\text{PNE}} = 0,02$; EPM = 0,065) ao longo do período de mensuração

População Microbiana

O PCR quantitativo mostrou que dietas com 80% de volumoso apresentaram aumento ($P = 0,01$) na proporção relativa de *F. succinogenes* em relação a dietas com 80% concentrado (0,31 e 0,14%, respectivamente) (Figura 5). Dietas com relação concentrado:volumoso de 80:20 resultaram em aumento ($P < 0,01$) no número de protozoários ($31,4 \times 10^{-5}$ vs $10,1 \times 10^{-5}$ cel / mL) em relação a dietas com 20c:80v (Tabela 6).

A suplementação com PNE (0; 1,5 e 3% MS) não aumentou o número de protozoários, mas resultou em aumento linear (1; 2,02 e 4,93%, EPM = 0,908, $P_L = 0,02$) na expressão relativa de Arqueas metanogênicas da fração de bactérias coletadas do rúmen de ovinos após 4 horas da alimentação (Tabela 6).

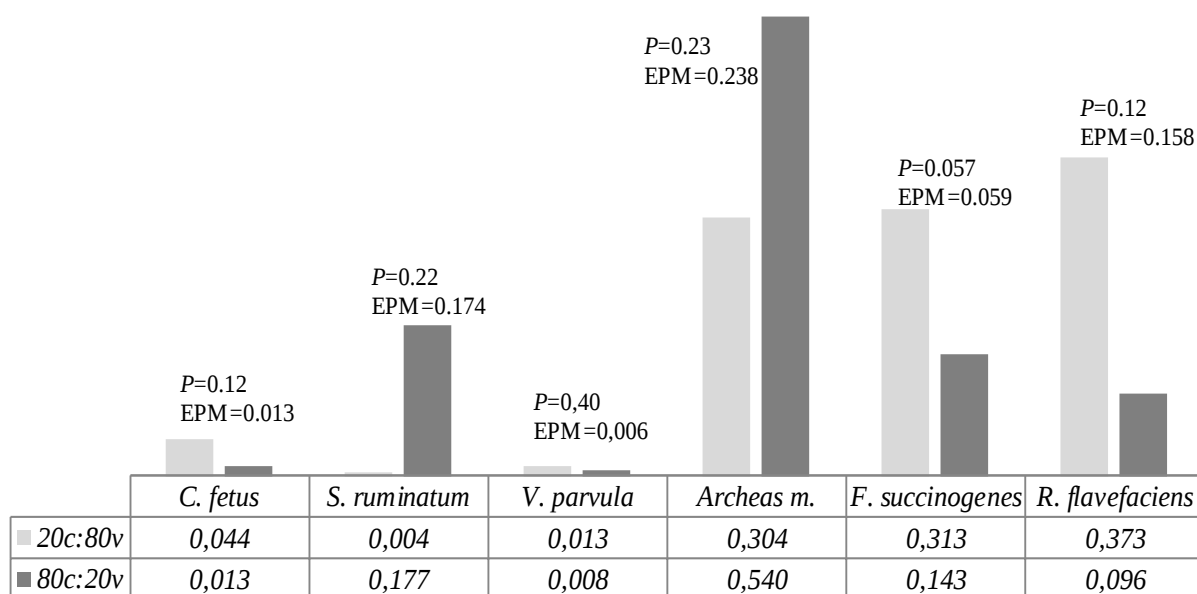


Figura 5 - Efeito da relação concentrado:volumoso (20c:80v e 80c:20v) sobre a proporção relativa de bactérias ruminais de ovinos (% do total de bactérias quantitativas em 16S rRNA genes, $(100 \cdot (2^{\Delta C_t}) - 1)$)

Foi observada correlação positiva entre dose de PNE e expressão relativa de alguns microrganismos. Assim, com o aumento da dose de PNE nas dietas foi observado elevação na expressão relativa de Arqueas metanogênicas ($r = 0,384$, $P = 0,02$) e bactérias *C. fetus* ($r = 0,479$, $P = 0,004$). Também foi observada correlação positiva entre bactéria fibrolítica *R. flavefaciens* e Arqueas metanogênicas ($r = 0,379$, $P = 0,03$) e entre essas bactérias e *C. fetus* ($r = 0,394$, $P = 0,02$). Correlação negativa entre o pH ruminal, coletado 4 horas após a alimentação, e bactérias *F. succinogenes* ($r = 0,497$, $P = 0,01$) que aumentaram sua expressão relativa com a queda do pH. Essas correlações podem ser observadas na análise de componentes principais (Figura 6) que explica 48% da variância entre as características.

Tabela 6 – Efeito das dietas com relação concentrado:volumoso de 20:80 e 80:20 e inclusão de produto nitrato encapsulado (PNE) sobre o número de protozoários médio e a expressão relativa da população microbiana (BACT 16S rDNA, $2^{-\Delta\Delta C_t}$) ruminal 4 h após alimentação

Item	Tratamento ¹						EPM ²	Valor -P ³				
	20:80			80: 20				Diet	PNE	Diet* PNE	L	Q
	0%	1.5%	3%	0%	1.5%	3%						
pH (4 h após a alimentação)	6,54 ^{ad}	6,53 ^{ad}	6,68 ^a	5,61 ^b	5,84 ^{bc}	6,13 ^{cd}	0,098	0,01	0,02	0,27	<0,04	0,71
Protozoarios x 10 ⁻⁵ cel/ mL, média dia	9,87 ^a	10,05 ^a	10,53 ^a	36,63 ^b	27,18 ^b	30,50 ^b	4,533	0,01	0,44	0,41	0,92	0,23
<i>A. metanogênicas</i>	1 ^a	2,78 ^a	4,57 ^a	1 ^a	1,26 ^a	5,30 ^a	1,284	0,80	0,02	0,67	0,04	0,53
<i>C. fetus</i>	1 ^a	5,51 ^a	57,04 ^b	1 ^a	10,40 ^a	8,22 ^a	7,940	0,04	0,02	0,01	0,02	0,29
<i>V. parvula</i>	1 ^a	3,73 ^a	11,54 ^a	1 ^a	1,11 ^a	1,47 ^a	3,946	0,20	0,37	0,43	0,20	0,71
<i>S. ruminantium</i>	1 ^a	2,45 ^a	1,15 ^a	1 ^a	8,56 ^a	7,83 ^a	3,521	0,15	0,41	0,57	0,48	0,31
<i>R. flavefaciens</i>	1 ^a	7,98 ^a	55,13 ^a	1 ^a	76,15 ^a	44,44 ^a	31,301	0,47	0,26	0,40	0,39	0,38
<i>F. succinogenes</i>	1 ^a	0,80 ^a	1,42 ^a	1 ^a	38,38 ^b	31,50 ^b	8,499	0,01	0,09	0,09	0,15	0,23

¹Tratamentos experimentais: relação concentrado:volumoso 20:80 e 80:20, com adição de produto nitrato encapsulado (PNE) à 0; 1,5; 3,0 e 4,5% (matéria seca)

²EPM = erro padrão da média

³Ctl vs PNE = Dietas sem PNE (0%) vs Dietas com PNE (1,5 + 3 %); Dieta = efeito fixo da dieta (20: 80 e 80: 20 concentrado: volumoso); PNE = efeito fixo do Produto nitrato encapsulado (0, 1,5 e 3,0% PNE em base da MS); Dieta* PNE = interação entre dieta e PNE, Efeito da adição de PNE: L = Efeito linear; Q = efeito quadrático

^{a, b, c} Médias com diferentes letras na mesma linha indica efeito significativo do tratamento (Teste Tukey, $P < 0,05$).

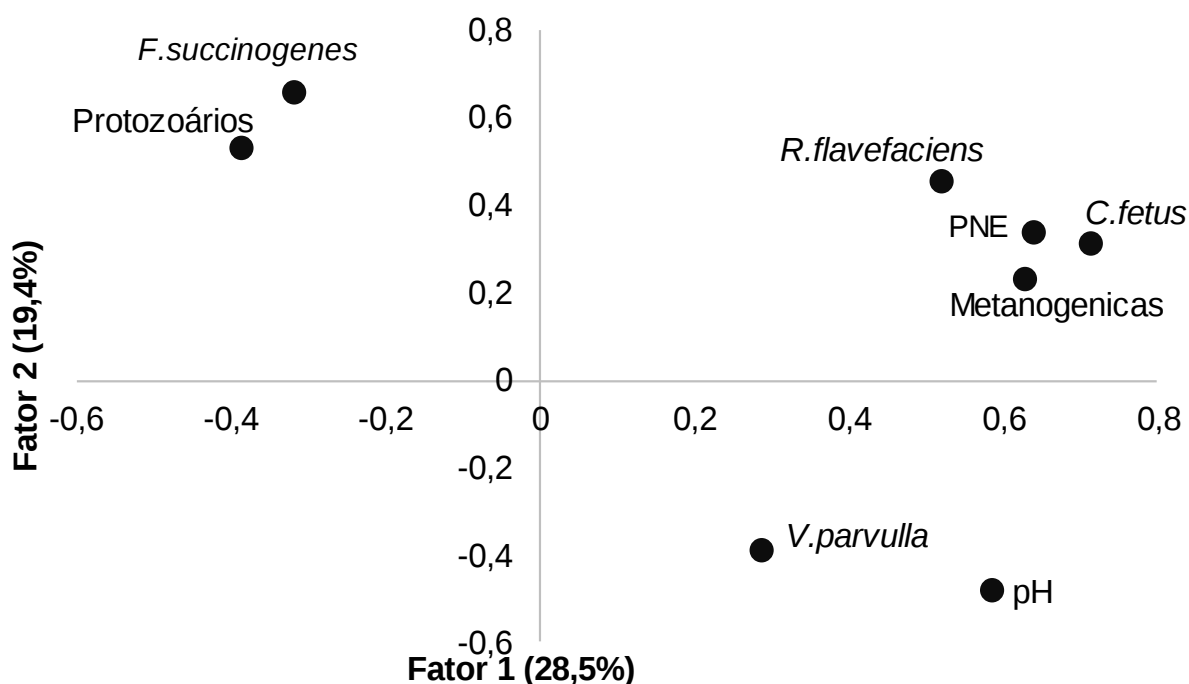


Figura 6 – Os dois principais fatores (1 e 2) mostram a correlação entre dose de produto nitrato encapsulado (PNE) e a proporção relativa de bactérias ruminais de ovinos (% do total de bactérias quantitativas em 16S rRNA genes) e pH 4 h após a alimentação

5.4. Discussão

O CMS, durante os dias que os animais permaneceram nas câmaras respirométrica para mensuração de metano, não foi alterado pelo ambiente (Tabela 2), diferente de alguns estudo (REYNOLDS et al., 2014; LEE et al., 2015a) que relatam a redução do consumo quando os animais permanecem nas câmaras respiratórias, denotando um efeito do ambiente.

Durante os dias de mensuração de gases, houve aumento na DMO de dietas com 80% de concentrado, consequentemente devido a elevada quantidade de carboidrato fermentescível presente nesta dieta, resultado da maior digestibilidade do amido frente a fibra. Também deve-se considerar que a relação concentrado:volumoso de 80:20 dessas dietas, propicia condição favorável aos microrganismos ruminais disponibilizando energia para degradação da porção fibrosa no rúmen (BERCHIELLI et al., 2003), o que resulta em elevação da DMO.

A relação concentrado:volumoso das dietas (80:20 ou 20:80) não ocasionou redução na produção de CH₄ (g/dia ou g/kg CMS). Berchielli et al. (2003) observaram uma redução na

produção de metano a partir da adição de 60% de concentrado na dieta e sugeriram que a maior quantidade de carboidratos rapidamente fermentáveis, provavelmente, direcionou a fermentação ruminal para produção de ácido propiônico, e alterou o pH ruminal de forma a tornar o ambiente prejudicial aos microrganismos responsáveis pela metanogênese. No presente experimento, em dietas com 80% de concentrado a mitigação de metano não foi observada, possivelmente devido ao uso de doses crescentes de PNE que auxiliaram na elevação do pH ruminal, provavelmente, a ponto de não tornar o meio ruminal prejudicial para o desenvolvimento de bactérias e protozoários. Essa hipótese pode ser comprovada pelo aumento do número de protozoários e Arqueas metanogênicas em dietas com 80% de concentrado suplementadas com NO_3^- .

A alimentação com NO_3^- é, possivelmente, uma estratégia útil para mitigação do CH_4 entérico em ruminantes (LEE et al., 2015a). O uso de NO_3^- pode reduzir de 16 a 50% a produção de metano, dependendo da taxa de inclusão de NO_3^- , tipo de dieta e animal usado no estudo (LENG, 2010).

Neste experimento, dieta com relação concentrado:volumoso de 80:20 suplementadas com 3% de PNE reduziu 13,3% a produção de CH_4 por CMS (g/kg) e 29,6% a produção diária de CH_4 (g/dia) em relação a dieta sem PNE (0%). Já em dieta com relação 20c:80v e 3% de PNE a redução foi de 10,9% e 11,1% para produção de CH_4 por CMS (g/kg CMS) e produção diária de CH_4 (g/dia), respectivamente. Os menores resultados observados para mitigação de CH_4 em dietas com 80% de volumoso pode ser devido a menor quantidade de carboidrato fermentescível nessas dietas. Li et al. (2013) confirmaram que dietas a base de concentrado são usadas para aumentar o potencial de atenuação de CH_4 entérico quando NO_3^- é adicionado por possibilitar maior fermentação e liberação de H no meio ruminal para redução de NO_3^- a NH_3 .

Estequiometricamente, 1 mol de NO_3^- (62 g) pode reduzir 1 mol de CH_4 (16 g) quando NO_3^- é completamente reduzido a NH_3 (LEE et al., 2015a). No presente estudo os animais consumiram diariamente por kg de MS 0; 11,15 e 22,35 g de NO_3^- , o que resultaria numa redução de 0; 2,88 e 5,77 g de CH_4 por dia, conforme as condições acima. Assim, o potencial de redução seria crescente conforme a dose de NO_3^- é aumentada. Porém, a eficácia de mitigação diária de metano (redução de metano observado / redução de metano teórico x 100, LEE et al., 2015a) observada com adição de 1,5 e 3% de PNE nas dietas com 80% de volumoso foi de 44,1% e 31,7%. Já em dietas com 80% de concentrado, as reduções foram de 76,4% e 90,3% em relação a dietas sem PNE (0% NO_3^-). Esses resultados indicam uma

redução na eficácia de mitigação de CH_4 para dietas com 80% de volumoso e aumento em dietas com 80% de concentrado, conforme aumento as doses de NO_3^- consumidos.

A hipótese para a real eficácia da mitigação de CH_4 ser menor na dieta com 80% de volumoso suplementadas com PNE pode ser devido uma redução na disponibilidade de H^+ em virtude da menor fermentação dos carboidratos fibrosos presentes nessa dieta que, consequentemente, pode ter causado acúmulo de NO_2^- , o qual pode ter exercido efeito indireto sobre os microrganismos ruminais. Segundo Iwamoto, Asanuma e Hino (1999) a redução de NO_3^- no rúmen frequentemente provoca acúmulo de NO_2^- , porque a redução de NO_3^- a NO_2^- é usualmente muito mais rápida do que a redução de NO_2^- a NH_3 .

Consequentemente, esse acúmulo afeta a população microbiana do rúmen, em especial Arqueas metanogênicas (KLUBER; CONRAD, 1998; VAN ZIJDERVELD et al., 2010; ZHOU; YU; MENG, 2012; ASANUMA; YOKOYAMA; HINO, 2014), celulolíticas (HALL; GADDY; HOBBS, 1960; ASANUMA; YOKOYAMA; HINO, 2014) e protozoários (IWAMOTO; ASANUMA; HINO, 2001; SAR et al., 2005; ASANUMA; YOKOYAMA; HINO, 2014), ocasionando redução de suas atividades. Embora as metanogênicas não tenham sido afetadas pelas dietas experimentais, o número de protozoários foi 67% menor nas dietas com 80% de volumoso. Sabe-se que uma parte de Arqueas metanogênicas são ligados a superfície de células de protozoários e utilizam o H_2 produzido pelos protozoários para a metanogênese (HILLMAN; LLOYD; WILLIAMS, 1988; USHIDA; JOUANY, 1996). Diminuir a população de metanogênicas e protozoários pode ter um efeito sinérgico sobre a supressão da metanogênese no rúmen. Assim, a redução na eficiência de mitigação de CH_4 em dietas com 80% de volumoso pode ter ocorrido em decorrência do acúmulo de NO_2^- no rúmen dos animais que consumiram essas dietas suplementadas com NO_3^- .

Já a mitigação da metanogênese abaixo dos níveis estequiométricos previstos poderia ser resultado do efeito do NO_3^- sobre a proporção de AGCC (NOLAN et al., 2010), fato observado no presente estudo, uma vez que a inclusão de PNE (0; 1,5 e 3%) resultou em aumento linear da relação acetato:propionato e maior liberação de H_2 no meio, em ambas as dietas, o que garantiu tanto a redução do NO_3^- como a redução de CO_2 à CH_4 . Estudos anteriores (VAN ZIJDERVELD et al., 2011; LUND et al., 2014) mostraram um aumento da concentração de hidrogênio nos gases respiratórios de ruminantes quando o NO_3^- estava presente na dieta, significando que H_2 foi produzido com velocidade maior do que estava sendo utilizado para a conversão de NO_3^- a amônia, possibilitando a metanogênese (GUYADER et al., 2015).

A redução de CH_4 entérico pelo uso de NO_3^- pode ocorrer pela captação de H^+ do meio, ou pela diminuição no número de metanogênicas no rúmen devido intoxicação pelos produtos intermediários da redução do NO_3^- (nitrito, óxido nítrico ou óxido nitroso), ou pela redução das bactérias produtoras de H^+ (VAN ZIJDERVELD et al., 2010; ZHOU et al., 2011; 2012). No entanto, não é possível afirmar que houve redução H^+ no meio ruminal porque isso não foi mensurado neste estudo. O que foi observado foi uma redução do pH ruminal conforme foi incluído PNE na dieta, indicando uma possível captação de H^+ no rúmen. Foi observado um aumento linear no número de metanogênicas com a inclusão do PNE em ambas as dietas, o que evidencia que o NO_3^- ou NO_2^- não teve efeito tóxico sobre as bactérias do rúmen, nem exauriu todo o H_2 do meio, já que houve um aumento na relação acetato:propionato. Estes resultados nos levaram a inferir que a redução de CH_4 se deu pela captação de H^+ do meio ruminal na presença de NO_3^- .

A falta de interação entre tipo de dieta e dose de PNE para a mitigação de CH_4 evidencia que não houve um efeito acumulativo entre as estratégias de mitigação de CH_4 testadas, (alto) concentrado e NO_3^- , quando se levou em conta a produção diária (g/dia) e por CMS (g/kg CMS).

As taxas de metahemoglobina (Figura 2) também evidenciam que a adição de NO_3^- não teve efeito tóxico sobre os animais. Apenas o animal 6, alimentado com a dieta com 80% de concentrado suplementado com 3% de PNE apresentou taxa de Met-Hb mais elevada, 17%, durante o período experimental, mas abaixo da taxa de Met-Hb de 20%, que é geralmente considerado para leve envenenamento (COCKRUM et al., 2010).

Níveis elevados de NO_2^- no sangue causam metemoglobinemia, pois convertem o ferro ferroso para ferro férrico interrompendo o fornecimento de oxigênio do sangue para os tecidos (OZMEN et al., 2005). Quando grandes quantidades de NO_3^- são adicionadas a alimentação de ruminantes, a capacidade dos microrganismos ruminais para reduzir NO_2^- , produto intermediário da redução de NO_3^- a NH_3 , pode ser sobrecarregada, resultando em acúmulo de NO_2^- no rúmen e aumento de absorção de NO_2^- no sangue a partir do rúmen.

As baixas taxas de Met-Hb observadas neste estudo podem ser devidas à adaptação dos animais ao consumo de NO_3^- , considerando que a quantidade fornecida foi aumentada gradualmente de 0,5% de PNE adicionado à dieta a cada três dias até chegar as doses pretendidas (1,5 e 3% de PNE). Essa prática de adaptação para reduzir o efeito tóxico do NO_2^- já foi comprovada por outros autores (VAN ZIJDERVELD et al., 2010; HULSHOL et al., 2012, EL-ZAIAT et al., 2014). A adaptação gradual ao nitrato dietético permite o aumento de

bactérias NO_3^- e NO_2^- redutoras (LIN et al., 2011) que possibilitam aos animais a ingestão do NO_3^- com menor risco de intoxicação por NO_2^- .

Outro fator que auxiliou esses resultados foi o fato do NO_3^- utilizado neste experimento ser encapsulado o que promoveu uma taxa de liberação lenta. O encapsulamento de complexos a base de NNP proporciona segurança quanto a toxicidade (TAYLOR-EDWARDS et al., 2009). De acordo com Lee et al. (2015b) o uso de NO_3^- encapsulado poderia diminuir a toxicidade do NO_3^- (ou seja, menos acumulação de NO_2^- no rúmen e no sangue e, conseqüentemente, menor formação de Met-Hb no sangue).

A relação concentrado:volumoso da dieta afetou diretamente o consumo de nutrientes dos animais. As dietas com 80% de concentrado resultaram em maior consumo de MS, MO, CNF, EM e menor consumo de FDA (Tabela 3) quando comparadas a dietas com 80% de volumoso. Dietas com altos teores de concentrado (alta densidade energética) têm consumo controlado pela demanda energética e por fatores metabólicos (NRC, 1996). Assim em dietas com relação concentrado:volumoso de 80:20 (maior energia digestível) o consumo de MS tende a aumentar à medida que a taxa e a extensão da digestão aumentam, liberando capacidade no rúmen mais rapidamente pelo aumento na taxa de passagem, criando espaço para outra refeição (FORBES, 2003).

Ao passo que dietas com relação concentrado:volumos de 20:80, a elevada relação de fibra resulta em consumo da MS limitado por fatores físicos, uma vez que a taxa de esvaziamento ruminal é dependente da digestão da fração fibrosa do alimento, essas estruturas são menos solúveis e ocupam mais espaço no rúmen (NUSSIO; CAMPOS; LIMA, 2006).

Assim como neste experimento, Medeiros et al. (2007), que estudaram o efeito de inclusão de concentrado (20, 40, 60 e 80%) em ração de ovinos Morada Nova, observaram aumento no consumo e na digestibilidade da MS e dos carboidratos totais com o aumento dos níveis de energia nas rações.

Há um aumento na digestibilidade à medida que a fração de volumoso é reduzida (WEAKLEY; SATTER, 1985) em função ao tipo de carboidrato na dieta. Desta forma, o maior teor de carboidrato não fibrosos em dietas com 80% de concentrado é uma possível causa para o aumento da digestibilidade aparente da MS, MO e FDN, em contraste a dietas com 80% de volumoso, que apresentavam elevada relação de carboidratos fibroso de baixa digestíveis.

Os teores de NO_3^- nas dietas não influenciaram o consumo e digestibilidade aparente dos nutrientes, confirmando experimentos anteriores utilizando ovinos alimentados com feno e 4% de nitrato de potássio (NOLAN et al., 2010), vacas alimentadas com dieta com relação

concentrado:volumoso 50:50 suplementadas com 3% de nitrato de cálcio (GUYADER et al., 2015) e ovinos Santa Inês alimentados com 4,51% de nitrato encapsulado (EL-ZAIAT, 2014).

No experimento de Lee et al. (2015a) também não houve diferença no consumo de bovinos alimentados com doses crescentes de NO_3^- encapsulado (0, 1, 2 e 3%), mas foi observado aumento linear ($P = 0,03$) na digestibilidade da MS e tendência ($P = 0,06$) a aumento da digestibilidade da MO. Os autores relataram que uma possível explicação para esse aumento seria que as bactérias *S. ruminantium*, que são capazes de degradar o amido, aumentam com a inclusão de NO_3^- (ASANUMA; YOKOYAMA; HINO, 2014). No presente estudo não foi observada diferença significativa para essas bactérias com o aumento da dose de NO_3^- nas dietas.

De acordo com alguns autores (FARRA; SATTER, 1971; LICHTENWALNER; FONTENOT; TUCKER, 1973) o NO_3^- tem um sabor amargo e pode reduzir a palatabilidade de dietas em altas taxas de inclusão, reduzindo o CMS. Os valores de CMS observados neste experimento com a inclusão de 1,5 e 3 % de PNE na dieta foram de 1,075 a 1,384 kg / dia, superiores aos valores encontrados na tabela de exigências do NRC (2007), que aponta para ovinos adultos em manutenção, com peso médio de 60 kg, o CMS de aproximadamente 1,05 kg/dia. Isso denota que a palatabilidade das dietas não reduziu o consumo, talvez pelo produto utilizado ser uma forma encapsulada de NO_3^- .

O consumo e digestibilidade da PB não foram influenciados pela dieta nem pela adição de NO_3^- , possivelmente pelo fato das dietas serem formuladas com valores semelhantes de nitrogênio. O NO_3^- também não afetou o consumo, retenção ou excreção de N (pela urina e fezes), todos os animais tiveram resultado positivo para balanço de N (Tabela 4). Resultados semelhantes foram observados por Guyader et al. (2015) para vacas alimentadas com dietas isonitrogenadas com 3% de NO_3^- em substituição a ureia, mostrando que NO_3^- pode substituir outras fontes de NNP ou fonte de N vegetal, como o farelo de soja.

A substituição de farelo de soja por NO_3^- ocasionou interação entre dieta e adição de PNE para perda de N fecal. Foi observada maior perda de N fecal em animais alimentados com dieta com 80% de concentrado suplementada com 3% de PNE possivelmente pelo aumento da participação do milho em grão na formulação dessa dieta (70% da formulação, Tabela 1) devido à maior substituição do nitrogênio do farelo de soja pelo NNP do PNE. A maior proporção de milhos, carboidrato rapidamente fermentescível, proporcionou uma maior fermentação, conseqüentemente mais H no meio ruminal. Quando o PNE foi adicionado, o H do meio foi utilizado para converter NO_3^- a NH_3 . O aumento de NH_3

resultou em maior aporte de N microbiano e, consequentemente, elevação do N microbiano nas fezes. Colaborando com a afirmação de Zeoula et al. (2006) que dietas ricas em grão de cereais, como milho, suplementadas com NNP, ocasionam um aumento na quantidade de N fecal devido ao maior aporte de nitrogênio de origem microbiana nas fezes.

A relação concentrado:volumoso de 80:20 possibilitou maior consumo e retenção de N (g/dia) em animais alimentados com essas dietas. O maior consumo de N observado pode ser em decorrência da maior ingestão e digestibilidade destas dietas. Já a maior retenção de N em dietas com 80% de concentrado pode ser explicada pela afirmação de Moreno et al. (2010), que relataram que o uso de NNP, aliado a grande quantidade de carboidratos prontamente disponíveis no rúmen (amido), podem proporcionar melhor utilização das fontes de proteína o que reflete em maior retenção de N.

O conteúdo de N rapidamente degradado em dietas com 80% de concentrado resultou em aumento numérico na concentração de N-NH₃ (18,7 mg/dL) em comparação as dietas com 80% de volumoso (15,7 mg/dL). Contudo, ambas as concentrações de N-NH₃ estão dentro do valor indicado por Van Soest (1994), 13 mg/dL, como suficientes para suportar o crescimento bacteriano, sem afetar a disponibilidade de nitrogênio para os microrganismos, não interferindo na ingestão e digestibilidade da fibra. As maiores concentrações de N-NH₃ ocorreram 2 a 4 horas após a alimentação, evidenciando associação a fontes proteicas de rápida degradação, provenientes do concentrado.

O pH ruminal é função da relação entre a taxa de produção de ácidos graxos voláteis pela microbiota ruminal e os mecanismos tamponantes (secreção salivar, absorção e passagem) (KOZLOSKI, 2009). Neste estudo, o pH ruminal médio, mínimo e máximo alcançaram maiores resultados em dietas com 80% de volumoso (Tabela 5) onde a quantidade de fibra estimulou a produção de saliva durante os processos de ingestão e regurgitação da dieta. Mas, mesmo nas dietas com 80% de concentrado o pH médio se manteve próximo a 6,0, considerado adequado para a atuação dos microrganismos ruminais.

Como em outros estudos (VAN ZIJDERVELD et al., 2010; RAPHÉLIS-SOISSAN et al., 2014; GUYADER et al., 2015; LEE et al., 2015a) a inclusão de NO₃⁻ alterou o pH ruminal. Neste estudo, o pH médio e mínimo aumentaram linearmente em ambas as dietas conforme foi adicionado PNE (0; 1,5 e 3% MS). Nas dietas com 80% de concentrado suplementadas com PNE (1,5 e 3% MS) os valores de pH médio aumentaram 2h após alimentação o que não ocorreu com a dieta sem nitrato (0% de PNE), evidenciando a atuação da inclusão do NO₃⁻ sobre o pH logo após a alimentação (Figura 4).

O aumento do pH ruminal pode ser causado pelo aumento da produção de NH_3 a partir da amonificação respiratória do NO_3^- (ZHOU; YU; MENG, 2012), mas no presente estudo as concentrações de N-NH_3 não foram significativamente aumentadas com adição de NO_3^- .

Outra hipótese para esse aumento no pH ruminal pode estar relacionada ao fato de que os íons de H^+ podem ser removidos mais eficazmente do rúmen durante a redução de NO_3^- a NH_3 , à custa da mitigação de CH_4 em dose resposta (LEE et al., 2015b), consumindo H^+ do meio. Outro fato a ser considerado é que quando NO_3^- é reduzido à NH_4 o produto da redução do NO_3^- é: amônia, água e uma base ($\text{KNO}_3 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{NH}_3 + 2\text{H}_2\text{O} + \text{KOH}$) (LEWIS, 1951), a qual possivelmente auxilia no aumento do pH ruminal. Contudo, a inconsistência de resultados na literatura sobre o fato de NO_3^- aumentar o pH ruminal sugerem mais estudos para se saber a real razão para esse aumento do pH com uso de NO_3^- observado em alguns experimentos.

A relação concentrado:volumoso da dieta alterou a direção da produção de AGCC, resultando em proporção de acetato (C_2): propionato (C_3): butirato (C_4) diferenciada para cada dieta. Dietas com 80% de concentrado resultaram em proporção de $\text{C}_2:\text{C}_3:\text{C}_4$ de 61:24:10, com relação $\text{C}_2:\text{C}_3$ igual a 2,92. Já dietas com 80% de volumoso a proporção foi 74:16:7 ($\text{C}_2:\text{C}_3:\text{C}_4$, respectivamente) com aumento na relação $\text{C}_2:\text{C}_3$, 4,62.

Esses resultados são superiores aos encontrados por Annison e Armstrong (1970, adaptados por Antunes, Rodrigues e Saliba (2011) para vacas leiteiras alimentadas com diferentes relações de concentrado:volumoso (c:v), onde para relações de 80c:20v, os resultados observados para proporção $\text{C}_2:\text{C}_3:\text{C}_4$ foram de 53,6:30,6:10,7 e relação $\text{C}_2:\text{C}_3$ de 1,75, e relação 25c:75v, foram de 68,2:18,1:8, relação $\text{C}_2:\text{C}_3$ de 3,77. Essa discrepância entre os resultados pode ser resultado da inclusão de NO_3^- nas dietas, pois, NO_3^- aumenta a produção de acetato (EL-ZAIAT et al., 2014; GUYADER et al., 2015; LEE et al., 2015b), diminui propionato (RAPHÉLIS-SOISSAN et al., 2014) e tende a reduzir butirato (LI et al., 2012).

Nesse experimento a inclusão de NO_3^- afetou a produção dos AGCC de forma quadrática, modificou a proporção de butirato, mas não de propiônico, e aumentou a relação acetato:propionato em ambas as dietas.

Alterações na produção de AGCC com a inclusão de NO_3^- encapsulado também foram reportadas por El-Zaiat et al. (2014). Esses autores relataram que a inclusão de NO_3^- pode ter proporcionado uma melhora na fermentação ruminal, o que resultou em maior produção de AGCC total. No presente estudo essa produção também pode ter sofrido influência da alteração no pH ruminal com inclusão de NO_3^- nas dietas.

A adição de NO_3^- compete pelo uso de H_2 com a produção de propionato (VAN ZIJDERVELD et al., 2010) e de butirato (UNGERFELD; KOHN, 2006), reduzindo por sua vez a produção destes, e convertendo a MO fermentável para a produção de acetato (FARRA; SATTER, 1971), o que resulta em aumento na relação acetato:propionato conforme aumentam os teores de NO_3^- na dieta, fato observado neste experimento.

Butirato reduziu a medida que foi observado aumento de acetato. O butirato é formado a partir da condensação inicial de duas moléculas de acetil-CoA (KOZLOSKI, 2009), porém, com a adição de NO_3^- , os elétrons utilizados para a redução de Acetil-CoA a butirato são desviados para a redução de NO_3^- a NH_3 , diminuindo a síntese de butirato e aumentando acetato (FARRA, SATTER, 1971).

Para produção de acetato foi observada interação entre dieta e NO_3^- , o que resultou em aumento linear na proporção deste ácido. Essa resposta pode estar relacionada à tendência ($P = 0,09$) ao aumento do número de bactérias celulolíticas, *F. succinogenes*, conforme NO_3^- foi incluindo nas dietas. Por outro lado, a quantidade de substrato fornecido por cada dieta foi suficiente para crescimento destas bactérias. Uma vez que acetato é produzido no rúmen, principalmente pela atividade das bactérias que degradam celulose e hemicelulose (BALLARD, 1973), a geração de hidrogênio que acompanha este procedimento proporciona elétrons para a redução de NO_3^- no rúmen. A transferência de hidrogênio liberta o efeito inibidor de hidrogênio sobre a fermentação de fibra e aumenta a degradação da celulose (VAN ZIJDERVELD et al., 2010) e de produção de acetato (ZHAO et al., 2015).

Outra hipótese é que embora qualquer fator que inibe a metanogênese, como o uso de NO_3^- , modula a fermentação ruminal no sentido do aumento da síntese de propionato devido ao acúmulo de NADH nas bactérias (KOZLOSKI, 2009). Porém, quando NO_3^- está presente, termodinamicamente a afinidade de H_2 é maior pela redução de NO_3^- do que para a produção de propionato (UNGERFELD; KOHN, 2006). Assim, quando hidrogênio é removido pelo NO_3^- , as concentrações celulares de NADH são reduzidas e NAD^+ aumenta, suprimindo a produção de propionato e favorecendo a formação de acetato (SUTHERLAND, 1977). Contudo, no presente estudo, a proporção de propionato não foi influenciada pela adição de NO_3^- .

Isobutirato, valerato e isovalerato também sofreram influência da interação entre dieta e adição de PNE. Isovalerato resultou em regressão linear negativa com a suplementação de PNE em ambas as dietas, já isobutirato e valerato regressão quadrática com a adição de NO_3^- .

Uma vez que valerato é utilizador de H_2 , em níveis intermediários de adição de NO_3^- , (1,5%) as dietas com 80% de concentrado proporcionaram fermentação suficiente para a

produção de H_2 tanto para a redução de NO_3^- a NH_3 como para síntese de valerato. Contudo em teores elevados de inclusão de NO_3^- (3% de PNE) o H_2 produzido foi revertido para a redução de NO_3^- reduzindo valerato.

A síntese de isoácidos, isobutírico e isovalérico, sofreu alteração em dietas suplementadas com fonte de NNP de liberação lenta em substituição ao farelo de soja. Embora não houve limitação de N ruminal em nenhum tratamento (sem balanço negativo de N ruminal), pode ter ocorrido uma limitação na disponibilidade de proteína verdadeira com a substituição da soja pelo NNP, consequentemente, menos aminoácidos estiveram presentes no rúmen para a síntese destes isoácidos.

O tempo de amostragem do líquido ruminal resultou em interação entre tratamentos e hora de coleta para alguns AGCC, como acetato. De acordo com Kozloski (2009) as taxas de produção de AGCC variam com o tempo após a ingestão e com o tipo de alimento, para alimentos concentrados o pico de produção é 2 a 3 horas após a ingestão e para alimentos volumoso 4 a 5 horas. Contudo, neste experimento a menor proporção de acetato (mol %), em ambas as dietas foi observada 4 horas após a alimentação coincidindo, com a redução no pH ruminal (Figura 5).

A fibra é uma fonte de nutriente importante para o crescimento de ruminantes e, consequentemente, de algumas bactérias ruminais (MERTENS, 1996). Neste experimento *F. succinogenes*, bactéria fibrolítica, teve um redução em proporção no fluido ruminal coletado 4 h após a alimentação em dietas com 80% de concentrado. Uma possível explicação pode estar relacionada ao pH ruminal, já que os microrganismos ruminais tem sua atividade metabólica paralisada quando há diferença entre pH do meio e pH citoplasmático (RUSSELL, 1998). Este é o caso de células de *F. succinogenes* em pH abaixo de 5,8 (RUSSELL; DOMBROWSKI, 1980). Quatro horas após a alimentação o pH ruminal nas dietas com 80% de concentrado era de 5,8 enquanto nas dietas com 80% de volumoso era de 6,5, condição ambiental que, possivelmente, propiciou seu crescimento, além do fato de dieta com alta fibra proporcionarem mais substrato para o desenvolvimento de bactérias fibrolíticas.

De acordo com Franzolin e Dehority (1996) a elevada participação de concentrado na dieta reduz o número de protozoários, pois leva à redução do pH ruminal ocasionando restrição do ambiente ruminal para o desenvolvimento de alguns microrganismos, incluindo protozoários. Contradizendo essa afirmação, as dietas com 80% de concentrado apresentaram um número 67,7% maior de protozoários que dietas com 80% de volumoso.

Uma possível explicação está atrelada ao maior número de protozoários estar relacionado com dietas mais digestíveis (BORGES et al., 2002) e a concentração de

protozoários totais ser reduzida em pH abaixo de 6,0 (JESUS et al., 2012). Neste estudo, os resultados mostram que a inclusão de NO_3^- possibilitou aumento no pH médio diário em ambas as dietas. Sendo que em dietas com 80% concentrado foi observado pH médio de 5,96, próximo a 6,0; e maior digestibilidade dos nutrientes. Desta forma, o ambiente ruminal foi propício para o crescimento da população de protozoários, além de proporcionar substrato de alta degradação para esses microrganismos. Contudo, nenhuma correlação foi observada entre pH ruminal e número de protozoários.

Também seria possível que o fato das dietas com 80% de volumoso, elevada relação de carboidrato fibroso, resultarem em menor fermentação e, conseqüentemente, em menor produção de H_2 , pode ter ocasionado acúmulo de NO_2^- ou outro produto da desnitrificação do NO_3^- (NO e N_2O) que intoxicou os protozoários, reduzindo-os nestas dietas.

Embora NO_3^- não alterou o número de protozoários no rúmen, a adição de nitrato possibilitou um aumento linear no pH ruminal que pode ter contribuído para manter as condições ambientais para aumento linear na proporção de Arqueas metanogênicas conforme PNE foi incluído na dieta (0; 1,5 e 3%), uma vez que, foi observada correlação positiva entre adição de PNE e Arqueas metanogênicas ($P = 0,02$). Outro fato possível é que NO_3^- pode servir como fonte de N para o crescimento de algumas metanogênicas (BELAY et al., 1990), embora possa causar inibição de outras metanogênicas mais sensíveis, como *Ms. barkeri* e *Mb. bryantii* (KLÜBER; CONRAD, 1997). Desta forma, sugere-se que metanogênicas menos sensíveis aumentaram na presença de NO_3^- , já que no presente estudo não foi avaliada a espécie de metanogênica que aumentou.

A redução de NO_3^- a NH_3 é uma etapa crítica do metabolismo de NO_3^- no rúmen, e ocorre pela rota assimilatória ou dissimilatória envolvendo as seguintes bactérias: *S. ruminantium*, *C. fetus*, *M. succiniciproduces*, *W. succinogenes*, e *V. parvula* (LIN et al., 2011). Destas, apenas *C. fetus* foi significativamente influenciada pelos tratamentos, resultando em interação linear positiva ($P = 0,02$) entre dieta e inclusão de PNE.

C. fetus pertence ao gênero *Campylobacter*, bactérias Gram-negativas (SMIBERT, 1978) que reduzem fumarato e succinato e cresce a temperatura de 30 a 42 °C. Todas as *Campylobacters* reduzem NO_3^- , sendo que *C. fetus* não reduz NO_2^- (WASSENAAR; NEWELL 2006).

Zhao et al. (2015) também observaram aumento para *Campylobacter* com a suplementação de NO_3^- (0, 1 e 2 %), sendo que *C. fetus* representou 0,10% do gênero *Campylobacter*, o que levou os pesquisadores a inferir que outras bactérias deste gênero tem um potencial NO_3^- redutor.

F. succinogenes também apresentou tendência ($P = 0,09$) a interação entre dieta e inclusão de PNE para a expressão de bactérias no fluido ruminal coletado. Possivelmente porque ambas as dietas possuíam quantidade de fibra suficiente para possibilitar substrato para o crescimento destas bactérias, aliado ao fato da inclusão de 0; 1,5 e 3% de PNE possibilitar maior produção dos isoácidos como: isobutírico (0,608; 0,654 e 0,600 mmol/L), isovalérico (1,943; 2,592 e 1,940 mmol/L) e valérico (0,971; 1,336 e 1,026 mmol/L); isoácidos essenciais e necessários para o crescimento de bactérias fibrolíticas (*R. ablus*, *R. flavefaciens*, e *F. succinogenes*) (ANDRIES et al., 1987).

5.5. Conclusão

O presente estudo evidenciou que nitrato, fornecido de forma segura, representa uma estratégia útil para mitigação do metano entérico em ruminantes alimentados com dietas com 80% de grão ou 80% de volumoso, além de representar uma fonte de N degradável no rúmen sem ser tóxico a microbiota ruminal.

Aliar duas estratégias de mitigação, concentrado e nitrato, não resultou em efeito cumulativo para redução diária de metano, mas tem que se levar em consideração que o nitrato em dietas com elevada relação de concentrado além de possibilitar uma maior eficiência de mitigação de metano entérico, chegando a 90% em dieta com 2% de nitrato, resultou em aumento no pH ruminal, o que possibilita um ambiente ruminal mais saudável aos microrganismos ruminais, embora, nesta dose, reduziu a produção de ácidos graxos de cadeia curta.

Referências

ABDALLA, A. L.; BUENO, I. C. S.; PEÇANHA, M. R. S. R.; LONGO, C.; GODOY, P. B.; SALLAM, S. M. A.; CASTILHO, L. A.; SANTOS, J. E. M.; CAMPOS, F. C.; MECI, J. *In vivo* methane determination in a small chamber system. In: GREENHOUSE GASES AND ANIMAL AGRICULTURE CONFERENCE, 3., 2008, Christchurch. **Proceedings...** East Melbourne: CSIRO, 2008.

ABDALLA, A. L.; LOUVANDINI, H.; SALLAM, S. M. A.; BUENO, I. C. S.; TSAI, S. M.; FIGUEIRA, A. V. O. *In vitro* evaluation, *in vivo* quantification and microbial diversity studies of nutritional strategies for reducing enteric methane production. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 44, p. 953-964, 2012.

ANDERSON, R. C.; HUWE, J. K.; SMITH, D. J.; STANTON, T. B.; KRUEGER, N. A.; CALLAWAY, T. R.; EDRINGTON, T. S.; HARVEY, R. B.; NISBET, D. J. Effect of nitroethane, dimethyl-2-nitroglutarate and 2-nitro-methyl-propionate on ruminal methane production and hydrogen balance in vitro. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, p. 5345-5349, 2010.

ANDRIES, J. I.; BUYASSE, F. X.; DEBRABANDER, D. L.; COTTYN, B. G. Isoacids in ruminant nutrition: Their role in ruminal and intermediary metabolism and possible influences on performances — A review. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 18, p. 169-180, 1987.

ANNISON, E. F.; ARMSTRONG, D. G. Volatile fatty acid metabolism and energy supply. In: PHILLIPSON, A. T. (Ed.). **Physiology of digestion and metabolism in the ruminant**. Cambridge: Oriel Press, 1970, p. 422-437.

ANTUNES, R. C.; RODRIGUEZ, N. M.; SALIBA, E. O. S. Metabolismo dos carboidratos não estruturais. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2011. cap. 8.

ASANUMA, N.; YOKOYAMA, S.; HINO, T. Effects of nitrate addition to a diet on fermentation and microbial population in the rumen of goats, with special reference to *Selenomonas ruminantium* having the ability to reduce nitrate and nitrite. **Animal Science Journal**, Tokyo, v. 86, p. 378-384, 2014. doi: 10.1111/asj.12307.

ASANUMA, N.; IWAMOTO, M.; KAWATO, M.; HINO, T. Numbers of nitrate-reducing bacteria in the rumen as estimated by competitive polymerase chain reaction. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, p. 199–205, 2002.

BELAY, N.; JUNG, K. Y.; RAJOGOPAL, B. S.; KREMER, J. D.; DANIELS, L. Nitrate as a sole nitrogen source for *Methanococcus thermolithotrophicus* and its effect on growth of several methanogenic bacteria. **Current Microbiology**, New York, v. 21, p. 193-198, 1990.

BALLARD, L. A. Physical barriers to germination. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 1, p. 285-303, 1973.

BERCHIELLI, T. T.; PEDREIRA, M. S.; OLIVEIRA, S. G.; PRIMAVESI, O.; LIMA, M.; FRIGUETO, R. T. S. Determinação da produção de metano e pH ruminal em bovinos de corte alimentados com diferentes relações volumoso: concentrado. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., 2003, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: SBZ, 2003. 1 CD-ROM.

BORGES, N. C.; SILVA, L. A. F.; FIORAVANTE, M. C. S.; CUNHA, P. H. J.; MORAES, R. R.; GUIMARÃES, P. L.; MARTINS, M. E. P. Avaliação de suco ruminal de bovinos “a fresco” e após 12 horas. **Ciência Animal Brasileira**, Goiania, v. 3, p. 57-63, 2002.

BROWN, M. S.; PONCE, C. H.; PULIKANI, R. Adaptation of beef cattle to highconcentrate diets: Performance and ruminal metabolism. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, p. 25-33, 2006. Supplement.

COCKRUM, R. R.; AUSTIN, K.; KIM, J. W.; GARBE, J. R.; FAHRENKRUG, S. C.; TAYLOR, J. F.; CAMMACK, K. M. Differential gene expression of ewes varying in tolerance to dietary nitrate. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 88, p. 3187–3197, 2010. doi:10.2527/jas.2009-2709.

DEHORITY, B. A.; DAMRON, W. S.; MCLAREN, J. B. Occurrence of the rumen ciliate *Oligoisotricha bubali* in domestic cattle (*Bos taurus*). **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 45, p. 1394–1397, 1983.

DENMAN, S. E.; MCSWEENEY, C. S. Development of a realtime PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen, **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 58, p. 572–582, 2006.

DENMAN, S. E.; TOMKINS, N. W.; MCSWEENEY, C. S. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane, **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 62, p. 313-322, 2007.

EL-ZAIAT, H. M.; ARAUJO, R. C.; SOLTAN, Y. A.; MORSY, A. S.; LOUVANDINI, H.; PIRES, A. V.; PATINO, H. O.; CORREA, P. S.; ABDALLA, A. L. Encapsulated nitrate and cashew nut shell liquid on blood and rumen constituents, methane emission, and growth performance of lambs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.92, p.2214-2224, 2014.

FARRA, P. A.; SATTER, L. D. Manipulation of the ruminal fermentation. III. Effect of nitrate on ruminal volatile fatty acid production and milk composition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 54, p. 1018–1024, 1971.

FORBES, J. M. The multifactorial nature of food intake control. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, p. 139-144, 2003. Supplement.

FRANZOLIN, R.; DEHORITY, B. A. Effect of prolonged high-concentrate feeding on ruminal protozoa concentrations. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, p. 2803-2809, 1996.

GUYADER, J.; EUGÈNE, M.; MEUNIER, B.; DOREAU, M.; MORGAVI, D. P.; SILBERBERG, M.; ROCHETTE, Y.; GERARD, C.; LONCKE, C.; MARTIN, C. Additive methane-mitigating effect between linseed oil and nitrate fed to cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 93, p. 3564-3577, 2015. doi: 10.2527/jas2014-8196.

HALL, O. G.; GADDY, C. D.; HOBBS, C. S. Effect of nitrates and nitrites upon forage utilization by the rumen microorganisms *in vitro* and upon ration digestibility by lambs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 19, p. 1305, 1960.

HEGARTY, R. S. Reducing rumen methane emissions through elimination of rumen protozoa. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 50, p. 1321-1327, 1999.

HILLMAN, K.; LLOYD, D.; WILLIAMS, A. G. Interactions between the methanogen *Methanosarcina barkeri* and rumen holotrich ciliate protozoa. **Letters in Applied Microbiology**, Hoboken, v. 7, p. 49-53, 1988.

HULSHOF, R. B. A.; BERNDT, A.; GERRITS, W. J. J.; DIJKSTRA, J.; VAN ZIJDERVELD, S. M.; NEWBOLD, J. N.; PERDOK, H. B. Dietary nitrate supplementation reduces methane emission in beef cattle fed sugarcane-based diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 10, p. 2527-4209, 2012.

IWAMOTO, M.; ASANUMA, N.; HINO, T. Effect of protozoa on nitrate and nitrite reduction in ruminal microbiota. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 51, p. 9-15, 2001.

IWAMOTO, M.; ASANUMA, N.; HINO, T. Effect of nitrate combined with fumarate on methanogenesis, fermentation, and cellulose digestion by mixed ruminal microbes *in vitro*. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, p. 471-478, 1999.

JESUS, L. P.; CABRAL, L. S.; ESPINOSA, M. M.; ABREU, J. G.; ZERVOUDAKIS, J. T.; MORENZ, M. J. F. Modelagem estatística para estimação da população de protozoários ruminais em função da relação volumoso: concentrado na dieta e da presença de aditivos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 13, n. 1, p. 97-109, 2012.

KLUBER, D. H.; CONRAD, R. Effects of nitrate, nitrite, NO, and N₂O on methanogenesis and other redox processes in anoxic rice field soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 25, p. 301-318, 1998.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos ruminantes**. Santa Maria: UFSM, 2009. 140 p.

LEE, C.; BEAUCHEMIN, K. A. A review of feeding supplementary nitrate to ruminant animals: Nitrate toxicity, methane emissions, and production performance. **Canada Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 94, p. 557-570, 2014.

LEE, C.; ARAUJO, R. C.; KOENIG, K. M.; BEAUCHEMIN, K. A. Effects of encapsulated nitrate on enteric methane production, and nitrogen and energy utilization in beef heifers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 93, p. 2391-2404, 2015a. doi: 10.2527/jas2014-8845.

LEE, C.; ARAUJO, R. C.; KOENIG, K. M.; BEAUCHEMIN, K. A. Effects of encapsulated nitrate on eating behavior, rumen fermentation, and blood profile of beef heifers fed restrictively or ad libitum. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 93, p. 2405-2418, 2015b. doi: 10.2527/jas2014-8851.

LENG, R. A.; PRESTON, T. R. Further considerations of the potential of nitrate as a high affinity electron acceptor to lower enteric methane production in ruminants. **Livestock Research for Rural Development**, Cali, v. 22, p. 12, 2010. Disponível em: <http://www.lrrd.org/lrrd22/12/leng22221.htm>.

LENG, R. A. Further considerations of the potential of nitrate as a high affinity electron acceptor to lower enteric methane production in ruminants. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON LIVESTOCK, CLIMATE CHANGE AND RESOURCE DEPLETION, 2010, Pakse, Laos. **Proceedings...** Pakse, Laos: Champasack University, 2010. p. 9-11.

LENG, R. A. Decline in available world resources; implications for livestock production systems in Asia. **Livestock Research for Rural Development**, Cali, v. 20, p. 8, 2008. Disponível em: <http://www.lrrd.org/lrrd20/1/leng20008.htm>.

LEWIS, D. The metabolism of nitrate and nitrite in the sheep. 2. Hydrogen donors in nitrate reduction by rumen micro-organisms *in vitro*. **The Biochemical Journal**, London, v. 49, p. 149-153, 1951.

LI, L.; DAVIS, J.; NOLAN, J.; HEGARTY, R. An initial investigation on rumen fermentation pattern and methane emission of sheep offered diets containing urea or nitrate as the nitrogen source. **Animal Production Science**, Victoria, v. 52, p. 653-659, 2012.

LI, L.; SILVEIRA, C. I.; NOLAN, J. V.; GODWIN, I. R.; LENG, R. A.; HEGARTY, R. S. Effect of added dietary nitrate and elemental sulfur on wool growth and methane emission of Merino lambs. **Animal Production Science**, Victoria, v. 53, p. 1195-1201, 2013.

LICHTENWALNER, R. E.; FONTENOT, J. P.; TUCKER, R. E. Effect of source of supplemental nitrogen and level of nitrate on feedlot performance and vitamin A metabolism of fattening beef calves. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 37, p. 837-847, 1973

LIN, M.; SCHAEFER, D. M.; GUO, W. S.; REN, L. P.; MENG, Q. X. Comparisons of *in vitro* nitrate reduction, methanogenesis, and fermentation acid profile among rumen bacterial, protozoal and fungal fractions. **Asian-Australasian Journal Animal Science**, Seoul, Korea, v. 24, p. 471-478, 2011.

LUND, P.; DAHL, R.; YANG, H. J.; HELLWING, A. L. F.; CAO, B. B.; WEISBJERG, M. R. The acute effect of addition of nitrate on *in vitro* and *in vivo* methane emission in dairy cows. **Animal Production Science**, Victoria, v. 54, p. 1432-1435, 2014.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, Orlando, v. 25, p. 402-408, 2001.

MEDEIROS, G. R.; CARVALHO, F. F. R.; FERREIRA, M. A.; BATISTA, A. M. V.; ALVES, K. S.; MAIOR JÚNIOR, R. J. S.; ALMEIDA, S. C. Efeito dos níveis de concentrado sobre o desempenho de ovinos Morada Nova em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 4, p. 1162-1171, 2007. Suplemento.

MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in breakers or cribles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 85, p. 1217, 2002.

MERTENS, D. R. Using fiber and carbohydrate analysis to formulate dairy rations. In: INFORMATIONAL CONFERENCE WITH DAIRY AND FORAGE INDUSTRIES, 1996, Madison. Madison: US Dairy Forage Research Center, 1996. p. 81-92.

MORENO, G. M. B.; SILVA SOBRINHO, A. G.; LEÃO, A. G.; LOUREIRO, C. M. B.; PEREZ, H. L.; ROSSI, R. C. Desempenho, digestibilidade e balanço de nitrogênio em cordeiros alimentados com silagem de milho ou cana-de-açúcar e dois níveis de concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 4, p. 853-860, 2010.

MOSS, A. R.; JOUANY, J.; NEWBOLD, J. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. **Annales de Zootechnie**, Paris, v. 49, p. 231–253, 2000.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of beef cattle**. 7. ed. Washington, DC: National Academic Press, 1996. 242 p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of small ruminants: Sheep, goats, cervids, and New World camelids**. Washington, DC: National Academic Press, 2007. 292 p.

NOCEK, J. E.; HART, S. P.; POLAN, C. E. Rumen ammonia concentrations as influenced by storage time, freezing and thawing, acid preservative, and method of ammonia determination. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 70, p. 601-607, 1987.

NOLAN, J. V.; HEGARTY, R. S.; HEGARTY, J.; GODWIN, I. R., WOODGATE, R. Effects of dietary nitrate on fermentation, methane production and digesta kinetics in sheep. **Animal Production Science**, Victoria, v. 50, p. 801–806, 2010.

NUSSIO, L. G.; CAMPOS, F. P.; LIMA, M. L. M. Metabolismos de carboidratos estruturais. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Ed.). **Nutrição de ruminantes**. 1. ed. Jaboticabal: Funep, 2006. p.1 83-223.

OBISPO, N. E.; DEHORITY, B. A. A most probable number method for enumeration of rumen fungi with studies on factors affecting their concentration in the rumen. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 16, p. 259-270, 1992

OZMEN, O.; MOR, F.; SAHINDURAN, S.; UNSAL, A. Pathological and toxicological investigations of chronic nitrate poisoning in cattle. **Toxicological & Environmental Chemistry**, New York, v. 87, p. 99–106, 2005.

PAIXÃO, M. L.; VALADARES FILHO, S. C.; LEÃO, M. I.; VALADARES, R. F. D.; PAULINO, M. F.; MARCONDES, M. I.; FONSECA, M. A.; SILVA, P. A.; PINA, D. S. Ureia em dietas para bovinos: consumo, digestibilidade aparente, ganho de peso, característica de carcaça e produção microbiana. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, p. 2451-2460, 2006. doi: 10.1590/ S1516-35982006000800035.

PALMQUIST, D.; CONRAD, H. Origin of Plasma Fatty Acids in Lactating Cows Fed High Grain or High Fat Diets. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 54, p. 1025-1031, 1971.

PEDREIRA, S. M.; PRIMAVESI, O. Impacto da produção animal sobre o ambiente. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. (Ed.) **Nutrição de ruminantes**. 1.e d. Jaboticabal: Funep, 2006. p. 497-511.

RAPHÉLIS-SOISSAN, V.; LI, L.; GODWIN, I. R.; BARNETT, M. C.; PERDOK, H. B.; HEGARTY, R. S. Use of nitrate and *Propionibacterium acidipropionici* to reduce methane emissions and increase wool growth of Merino sheep. **Animal Production Science**, Victoria, v. 54, p. 1860–1866, 2014.

REYNOLDS, C. K.; HUMPHRIES, D. J.; KIRTON, P.; KINDERMANN, M.; DUVAL, S.; STEINBERG, W. Effects of 3-nitrooxypropanol on methane emission, digestion, and energy and nitrogen balance of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, p. 3777–3789, 2014.

RODRIGUES N. M.; CAMPOS, W. E. Manipulação ruminal para redução da emissão de metano. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE PRODUÇÃO ANIMAL E AMBIENTE, 1., 2007, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: UFMG, 2007. p. 1-28.

RUSSELL, J. B.; DOMBROWSKI, D. B. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 39, p. 604-610, 1980.

RUSSELL, J. B. Strategies that ruminal bacteria use to handle excess carbohydrate. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, p. 1995-1963, 1998.

SANTOS, G. T.; CAVALIERI, F. L. B.; MODESTO, E. C. Recentes avanços em nitrogênio não proteico na nutrição de vacas leiteiras. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL EM BOVINOCULTURA DE LEITE: NOVOS CONCEITOS EM NUTRIÇÃO, 2., Lavras, 2001. **Anais...** Lavras: UFLA, 2001. p. 199-228. Disponível em: <http://www.nupel.uem.br/recentes.pdf>. Acesso em: 14 dez. 2015.

SAR, C.; MWENYA, B.; SANTOSO, B.; TAKAURA, K.; MORIKAWA, R.; ISOGAI, N.; ASAKURA, Y.; TORIDE, Y.; TAKAHASHI, J. Effect of *Escherichia coli* wild type or its derivative with high nitrite reductase activity on *in vitro* ruminal methanogenesis and nitrate/nitrite reduction. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, p. 644-652, 2005.

SATO, K. Methemoglobin. In: SUZUKI, O.; WATANABE, K. **Drugs and poisons in humans: a handbook of practical analysis**. Tokyo: Japan Springer, 2005. p. 655-657.

SILIVONG, P.; PRESTON, T. R.; LENG, R. A. Effect of sulphur and calcium nitrate on methane production by goats fed a basal diet of molasses supplemented with *Mimosa* (*Mimosa pigra*) foliage. **Livestock Research for Rural Development**, Cali, v. 23, p. 58, 2011. Disponível em: <http://www.lrrd.org/lrrd23/3/sili23058.htm>.

SMIBERT, R. M. The genus *Campylobacter*. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 32, p. 673-709, 1978.

SNIFFEN, C. J.; O'CONNOR, J. D.; VAN SOEST, P. J. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, p. 3562-3577, 1992.

SUTHERLAND, T. M. **The control and manipulation of rumen fermentation**. Armidale, NSW: University of New England, 1977. 1029 p. (Recent Advances in Animal Nutrition in Australia).

TAYLOR-EDWARDS, C. C.; ELAM, N. A.; KITTS, S. E.; McLEOD, K. R.; AXE, D. E.; VANZANT, E. S.; KRISTENSEN, N. B.; HARMON, D. L. Influence of slow-release urea in nitrogen balance and portal-drained visceral nutrient flux in beef steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, p. 209-221, 2009.

UNGERFELD, E. M.; KOHN, R. A. The role of thermodynamics in the control of ruminal fermentation. In: SEJRSEN, T.; PLUND, H.; NIELSEN, D. M. O. (Ed). **Ruminant physiology: digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress**. Wageningen: Wageningen Academic Published, 2006. p. 55-85.

USHIDA, K.; JOUANY, J. Methane production associated with rumen-ciliated protozoa and its effect on protozoan activity. **Letters in Applied Microbiology**, Hoboken, v. 23, p. 129-132, 1996.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476 p.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, p. 3583-3597, 1991.

VAN ZIJDERVELD, S. M.; FONKEN, B.; DIJKSTRA, J.; GERRITS, W. J. J.; PERDOK, H. B.; FOKKINK, W.; NEWBOLD, J. R. Effects of a combination of feed additives on methane production, diet digestibility, and animal performance in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaing, v. 94, p. 1445-1454, 2011.

VAN ZIJDERVELD, S. M.; GERRITS, W. J. J.; APAJALAHTI, J. A.; NEWBOLD, J. R.; DIJKSTRA, J.; LENG, R. A.; PERDOK, H. B. Nitrate and sulfate: effective alternative hydrogen sinks for mitigation of ruminal methane production in sheep. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, p. 5856–5866, 2010.

WASSENAAR, T. M.; NEWELL, D. G. The genus *Campylobacter*. **The Prokaryotes**, Heidelberg, v. 7, p. 119-138, 2006.

ZEOULA, L. M.; FERELI, F.; PRADO, I. N.; GERON, L. J. V.; CALDAS NETO, S. F.; PRADO, O. P. P.; MAEDA, E. M. Digestibilidade e balanço de nitrogênio com diferentes teores de proteína degradável no rúmen e milho como fonte de amido em ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 5, p. 2179-2186, 2006.

ZHAO, L.; MENG, Q.; REN, L.; ZHANG, X.; HUO, Y.; ZHOU, Z. Effects of nitrate addition on rumen fermentation, bacterial biodiversity and abundance. **Asian-Australasian Journal Animal Science**, Seoul, Korea, v. 28, p. 1433-1441, 2015.

ZHOU, Z.; MENG, Q.; YU, Z. Effects of methanogenic inhibitors on methane production and abundances of methanogens and cellulolytic bacteria in *in vitro* ruminal cultures. **Applied and Environment Microbiology**, Baltimore, v. 77, p. 2634–2639, 2011.

ZHOU, Z.; YU, Z.; MENG, Q. Effects of nitrate on methane production, fermentation, and microbial populations in *in vitro* ruminal cultures. **Bioresource Technology**, Essex, v. 103, p. 173–179, 2012.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso do nitrato mostrou eficácia em redução na produção de metano entérico em ruminantes sem trazer problemas à saúde do animal e assegurando um benefício ao meio ambiente, mostra-se um produto com sustentabilidade.

Em termos gerais, um bovino produz em média 62 kg de metano por ano. Se reduzirmos 10% desta produção com o uso do suplemento nitrato, uma vez que o rebanho bovino nacional possui aproximadamente 200 milhões de cabeças, isso representaria significativa redução de gases de efeito estufa pela pecuária. Contudo, como no Brasil a política de crédito de carbono na pecuária de ruminantes não é solidificada, tornam-se necessários estudos econômicos sobre a aplicabilidade do produto para o pecuarista.

Desta forma, estudos complementares devem ser realizados frente à economia de energia líquida que os animais teriam e quanto isso reverteria ao acabamento do produto final para, além de um apelo ambiental, o produto apresentar um apelo nutricional atrativo, dando ao produtor maior rentabilidade ao seu investimento.