UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

PAULO DE MELLO TAVARES LIMA

Aspectos produtivos e emissão de metano em ovinos Santa Inês suplementados com a leguminosa *Macrotyloma axillare*

Piracicaba
2016

PAULO DE MELLO TAVARES LIMA

Aspectos produtivos e emissão de metano em ovinos Santa Inês suplementados com a leguminosa *Macrotyloma axillare*

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: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Helder Louvandini

Coorientadora: Dra. Luciana Gerdes

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

Lima, Paulo de Mello Tavares

Aspectos produtivos e emissão de metano em ovinos Santa Inês suplementados com a leguminosa *Macrotyloma axillare*/ Paulo de Mello Tavares Lima; orientador Helder Louvandini; coorientadora Luciana Gerdes. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.

93 p.: il.

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

1. Ácidos graxos 2. Análise de alimentos para animal 3. Cordeiros 4. Efeito estufa 5. Fermentação 6. Forragem 7. Gases I. Título

CDU (636.085 + 504.7) : 636.38

Aos meus pais, José Carlos e Jussara; à minha noiva, Ana Maria; ao meu irmão, Bruno; e à minha avó, Carmen (*in memoriam*),

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida, por minha saúde e por todos os objetivos que tenho conseguido alcançar até aqui.

Agradeço a meus pais, José Carlos e Jussara, pela educação e transmissão de valores, e por todo o amor e suporte dedicado a mim. Vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho. Muito obrigado, amo vocês!

Agradeço à minha noiva, Ana Maria, por toda a paciência, compreensão, carinho e paz que me proporcionou durante esta caminhada. Sem você, o trabalho teria sido muito mais árduo. Muito obrigado, te amo muito!

Ao meu irmão Bruno, pelo companheirismo, amizade e parceria durante toda a vida e à minha avó Carmen (*in memoriam*), pelo amor incondicional que sempre dedicou a mim e que com certeza, olha por mim onde quer que esteja agora. Muito obrigado, amo vocês!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de Doutorado e pela reserva técnica (Processo 2013/02814-5) que foi fundamental para o desenvolvimento deste projeto.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro no início do trabalho.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, ao Instituto de Zootecnia e à Universidade de São Paulo, por toda a estrutura física e pedagógica disponibilizada para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Helder Louvandini, pela confiança e pelos ensinamentos estabelecidos ao longo desta parceria de trabalho. Sua contribuição tem sido fundamental para a minha formação pessoal e profissional. Muito obrigado!

À minha coorientadora, Dra. Luciana Gerdes, por todo o suporte para a realização deste trabalho e por todos os ensinamentos. Espero que a nossa parceria ainda possa durar bastante. Muito obrigado!

Ao Prof. Adibe Luiz Abdalla, por todos os ensinamentos, pelos incentivos e por contribuir fundamentalmente para a qualidade deste trabalho. Muito obrigado!

À Profa. Concepta McManus, por todo o suporte que tem me dado desde o início da minha vida acadêmica. Muito obrigado!

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

Agradeço aos funcionários do Laboratório de Nutrição Animal (LANA), Maria Regina S. R. Peçanha, Lécio Aparecido Castilho, Aparecido Elpídio, Karinna Scotton e Joaquim Everaldo M. Santos, assim como a toda a equipe de colegas de laboratório, Adibe Luiz Abdalla Filho, Alessandra Romero, Aline Schumann, Ana Claudia Koki Sampaio Issakowicz, Andressa Santanna, Bernardo Berenchtein, Carina Nazato, Carolina Jimenez, Dinesh Kumar Dhanasekaran, Egon Ieda, Érika Breda Canova, Fernanda Campos, Gabriel Sakita, Guilherme Moreira, Juliano Issakowicz, Linander Campos, Letícia de Abreu Faria, Patricia Righetto, André Joaquim, Samy Emanuelle, Tairon Pannunzio, Tiago Paim, Thiago Bompadre, Ronaldo Lucas, Pierre Crouzoulon, Tamires Pinheiro, Wilian Costa e a todos os demais colegas que por ventura eu possa ter esquecido, muito obrigado!

Ao Programa de Pós-Graduação e seus funcionários (Alzira, Cleide, Daiane, Daniel, Fábio, Gilson, Magali, Marcos, Neuda, Raquel, Sônia), por toda a contribuição durante o doutorado.

A equipe de funcionários e alunos do Instituto de Zootecnia que junto à Dra. Luciana Gerdes deram suporte fundamental à execução deste projeto.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho, muito obrigado!

RESUMO

LIMA, P. M. T. **Aspectos produtivos e emissão de metano em ovinos Santa Inês suplementados com a leguminosa *Macrotyloma axillare***. 2016. 93 p. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

A utilização de leguminosas na produção de ruminantes pode propiciar benefícios como a melhora no desempenho animal; redução das emissões de metano (CH_4), principalmente em razão da presença de taninos; e o aumento na disponibilidade de nitrogênio no solo, devido à fixação deste elemento realizada por estas plantas. A macrotiloma (*Macrotyloma axillare* - NO 279) é uma leguminosa de clima tropical que se caracteriza por apresentar baixos teores de taninos, com risco reduzido de causar efeitos antinutricionais, mas que ainda carece de estudos a respeito de seus efeitos em ruminantes. Objetivando-se determinar os efeitos dos taninos da macrotiloma sobre a fermentação ruminal *in vitro* e avaliar a digestibilidade aparente, desempenho produtivo, emissão de CH_4, fermentação ruminal, características de carcaça e perfil de ácidos graxos da carne em ovinos alimentados com esta leguminosa, foram realizados os estudos aqui descritos. No primeiro estudo, realizou-se um bioensaio *in vitro* para se verificar os efeitos dos taninos sobre a fermentação ruminal e produção de gases; e um ensaio *in vivo* de digestiblidade aparente dos nutrientes, com 12 cordeiras, divididas em 2 tratamentos: dieta exclusiva de feno de gramínea tropical (CON); e dieta de feno de gramínea suplementada com feno de macrotiloma (MAC) (gramínea:leguminosa, 75:25). *In vitro*, verificou-se menor ($p < 0,05$) produção total de gases (PTG) e CH_4 nas amostras incubadas sem polietilenoglicol (PEG), ou seja, as que estavam sujeitas aos efeitos dos taninos, e no ensaio *in vivo*, maior digestibilidade da proteína bruta (PB), maior produção de nitrogênio amoniacal ($N\text{-}NH_3$) na fermentação ruminal e menor contagem de protozoários ruminais nas cordeiras MAC ($p < 0,05$) foram observadas. Já no segundo estudo, foi realizado um ensaio de desempenho animal de 90 dias, com 14 cordeiros Santa Inês, divididos em 2 tratamentos, CON e MAC, conforme descrito anteriormente. Neste caso, além do desempenho, também foram avaliados a emissão de CH_4 pela técnica do gás traçador hexafluoreto de enxofre (SF_6), parâmetros de fermentação ruminal, características de carcaça e perfil de ácidos graxos da carne. Não se observou efeito da macrotiloma ($p > 0,05$) sobre o consumo de matéria seca (CMS), ganho em peso médio diário (GMD), emissão de CH_4, produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), características de carcaça e perfil de ácidos graxos. Na avaliação dos parâmetros ruminais, observou-se maior ($p < 0,05$) concentração de $N\text{-}NH_3$ para os animais MAC; maior ($p < 0,05$) contagem de protozoários nos animais CON; e menor abundância relativa de metanogênicas nos animais MAC ($p < 0,05$). Mesmo não tendo influenciado o desempenho produtivo e emissão de CH_4, as menores produção de CH_4 *in vitro* e contagens de protozoários, a maior produção de $N\text{-}NH_3$ e a diminuição das metanogênicas denotaram à macrotiloma potencial como alimento para ruminantes e como alternativa a ser avaliada em novos estudos relacionados à mitigação de CH_4 no sistema de produção.

Palavras-chave: Ácidos graxos. Cordeiros. Efeito estufa. Fermentação. Forragens. Gases. Taninos.

ABSTRACT

LIMA, P. M. T. **Productive aspects and methane emission in Santa Inês sheep supplemented with the legume *Macrotyloma axillare*** 2016. 93 p. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

Using legumes in ruminant production system may provide benefits such as improvement in animal performance; decrease in methane (CH_4) emissions, mainly due to the presence of tannins; and increase in nitrogen soil availability, due to the fixation of this element carried out by these plants. Macrotiloma (*Macrotyloma axillare* - NO 279) is a tropical legume which is characterized for presenting low concentrations of tannins, providing reduced risks of antinutritional effects, but still has few studies regarding its effects on ruminants. The studies described here aimed to determine the effects of macrotiloma tannins on the *in vitro* ruminal fermentation, and to evaluate apparent digestibility, productive performance, CH_4 emission, ruminal fermentative parameters, carcass characteristics and fatty acids profile of the meat in sheep fed this legume. At the first study, an *in vitro* bioassay was performed to evaluate gas production and ruminal fermentation, while an *in vivo* trial was carried out to determine apparent digestibility of nutrients using 12 ewes, divided into 2 treatments: exclusive tropical grass hay diet (control - CON); and tropical grass hay diet supplemented with macrotiloma hay (macrotiloma - MAC) (grass:legume, 75-25). In the *in vitro* assay, reduced total gases (TGP) and CH_4 production were observed in the samples incubated without polyethylene glycol (PEG), that is, those which were subject to effects of tannins ($p < 0.05$) and in the digestibility trial, increased crude protein (CP) digestibility and ruminal ammoniacal nitrogen (NH_3-N), as well as reduced protozoa count were observed for the ewes fed MAC ($p < 0.05$). In the second study, a 90 days growth performance assay was performed, with 14 Santa Inês lambs divided into 2 treatment groups, CON and MAC, as previously described. In addition to growth performance, CH_4 emission by using the sulphur hexafluoride (SF_6) tracer technique, ruminal fermentative parameters, carcass characteristics and fatty acids profile of meat were evaluated. No difference ($p > 0.05$) was observed between the lambs of the groups CON and MAC for dry matter intake (DMI), average daily gain (ADG), CH_4 emission, short chain fatty acids production, carcass characteristics as well as for fatty acids profile of meat. Evaluating ruminal fermentative parameters, increased concentration of NH_3-N in the rumen fluid and reduction of both, protozoa count and relative abundance of methanogens were observed for the animals fed MAC ($p < 0.05$) when compared to those fed CON. Even though macrotiloma has not influenced productive performance and CH_4 emission, the decrease observed for *in vitro* CH_4 production and *in vivo* protozoa count, as well as the increased NH_3-N production and the reduction in methanogens have denoted potential to macrotiloma as a ruminant feed and as an option for being evaluated in further studies regarding CH_4 mitigation in the production system.

Key words: Fatty acids. Fermentation. Forages. Gases. Greenhouse effect. Lambs. Tannins.

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Produção de AGCC em ruminantes alimentados com diferentes dietas.....37

Tabela 3.1 - Composição bromatológica das forragens utilizadas nos ensaios.....55

Tabela 3.2 - Efeito da ausência (-) ou presença (+) de PEG em substratos de feno de macrotiloma sobre parâmetros de produção de gases e fermentação ruminal *in vitro*.....57

Tabela 3.3 - Consumo médio diário de matéria seca e demais nutrientes em cordeiras alimentadas com dietas CON e MAC.....58

Tabela 3.4 - Percentagem da digestibilidade aparente de nutrientes e parâmetros ruminais em cordeiras alimentadas com dietas CON e MAC.....58

Tabela 4.1 - Primers específicos utilizados na análise de RT-qPCR.....74

Tabela 4.2 - Perfil de ácidos graxos dos fenos de capim-aruana (ARU) e de macrotiloma (MAC) 77

Tabela 4.3 - Peso inicial, final e parâmetros de desempenho produtivo de cordeiros alimentados com dietas CON e MAC 78

Tabela 4.4 - Emissão de CH_4 de cordeiros alimentados com dietas controle (CON) e macrotiloma (MAC) durante os 3 períodos de coleta do experimento.....78

Tabela 4.5 - Parâmetros de fermentação e composição da microbiota ruminal de cordeiros alimentados com dietas controle (CON) e macrotiloma (MAC).....79

Tabela 4.6 - Peso ao abate e características de carcaça de cordeiros alimentados com dietas controle (CON) e macrotiloma (MAC).....80

Tabela 4.7 - Perfil de ácidos graxos da carne de cordeiros alimentados com dietas controle (CON) e macrotiloma (MAC) 81

Tabela 4.8 - Grupos de ácidos graxos e índices calculados da carne de cordeiros alimentados com dietas controle (CON) e macrotiloma (MAC).....82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

16S rRNA	RNA ribossomal 16S
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
ATHERO	Índice de aterogenicidade
BACT	Bactérias totais
C12:0	Ácido láurico
C14:0	Ácido mirístico
C16:0	Ácido palmítico
C18:0	Ácido esteárico
C18:1c-9	Ácido oleico
C18:2 c-9 t-11	Ácido rumênico
C18:2 c-9 c-12	Ácido linoleico
C20:4 n-6	Ácido araquidônico
C22:5	Ácido docosapentanóico
C2	Acetato
C3	Propionato
C4	Butirato
CA	Índice de conversão alimentar
CFDN	Consumo de fibra em detergente neutro
CFDA	Consumo de fibra em detergente ácido
CH_4	Metano
CH_4/dia	Emissão de metano em 24 horas
CH_4/FDND degradada	Produção de metano em relação à fibra em detergente neutro
CH_4/GMD	Emissão de metano em relação ao ganho em peso médio diário
CH_4/MOD	Produção de metano em relação à matéria orgânica degradada
CH_4/MS	Emissão de metano em relação ao consumo de matéria seca
CLA	Ácido linoleico conjugado
CMO	Consumo de matéria orgânica
CMS	Consumo médio de matéria seca
CNTP	Condições normais de temperatura e pressão
CO_2	Dióxido de carbono
CON	Tratamento controle
Cor A	Valores colorimétricos de vermelho da carne
Cor B	Valores colorimétricos de amarelo da carne
Cor L	Valores colorimétricos de luminosidade da carne
CPB	Consumo de proteína bruta
DFA	Ácidos graxos desejáveis
DFDN	Digestibilidade aparente da fibra em detergente neutro
DFDA	Digestibilidade aparente da fibra em detergente ácido
DMO	Digestibilidade aparente da matéria orgânica
DMS	Digestibilidade aparente da matéria seca
DPB	Digestibilidade da proteína bruta
DVMO	Degradabilidade verdadeira da matéria orgânica
ECD	Detector de captura de elétrons
EE	Extrato etéreo
EPM	Erro padrão da média
FDA	Fibra em detergente ácido

FDN	Fibra em detergente neutro
FDND	Degradabilidade da fibra em detergente neutro
FID	Detector de ionização de chama
FIBRO	*Fibrobacter succinogenes*
FP	Fator de partição
FUNG	Fungos totais anaeróbios
GEE	Gases de efeito estufa
G/FDND	Produção de gases em relação à fibra em detergente neutro degradada
GMD	Ganho médio diário em peso
G/MOD	Produção de gases em relação à matéria orgânica degradada
GOGAT	Glutamina sintetase / glutamato sintase
H_2	Íon de hidrogênio
MAC	Tratamento macrotiloma
METH	*Archaea* metanogênicas
M.F.S.	Solução a base de verde de metila e formol salino
MS	Matéria seca
MM	Matéria mineral
MOD	Matéria orgânica degradada
MUFA	Ácidos graxos monoinsaturados
$N\text{-}NH_3$	Nitrogênio amoniacal
n.s.	Não significativo
n-3	Ácidos graxos ômega 3
n-6	Ácidos graxos ômega 6
OPG	Ovos por grama de fezes
P	Pressão
PA	Peso ao abate
PB	Proteína bruta
PCF	Peso de carcaça fria
PCQ	Peso de carcaça quente
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Polietilenoglicol
PR	Perda por resfriamento
PTG	Produção total de gases
PUFA	Ácidos graxos poli-insturados
RCF	Rendimento de carcaça fria
RCQ	Rendimento de carcaça quente
RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
RUMI	*Ruminococcus flavefaciens*
SCFA	Short chain fatty acids
SF_6	Hexafluoreto de enxofre
SFA	Ácidos graxos saturados
TC	Taninos condensados
TT	Taninos totais
UFA	Ácidos graxos insaturados
V	Volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 17
1.1. Hipóteses 18
1.2. Objetivos 18

2. REVISÃO DE LITERATURA 20
2.1. Pastagens e plantas forrageiras na alimentação de ruminantes 20
2.1.1. Vantagens do uso de leguminosas nos sistemas de pastagens 21
2.1.2. *Macrotyloma axillare* 23
2.2. Taninos na nutrição de ruminantes 24
2.2.1. Taninos e o metabolismo de ruminantes 26
2.2.2. Taninos e o controle de verminoses 28
2.3. Produção de metano em ruminantes 29
2.3.1. Estratégias de mitigação 30
2.3.2. Taninos e a emissão de metano 31
2.3.3. Técnicas de mensuração de CH_4 32
2.4. Parâmetros fermentativos e microbiota ruminal 34
2.4.1. Mensuração do pH ruminal 34
2.4.2. Concentração de nitrogênio amoniacal no rúmen 35
2.4.3. Produção de ácidos graxos de cadeia curta 36
2.4.4. Contagem de protozoários ruminais 38
2.4.5. Determinação da composição microbiana ruminal por PCR 38
Referências 40

3. AVALIAÇÃO NUTRICIONAL DA LEGUMINOSA *MACROTYLOMA AXILLARE* EM BIOENSAIOS *IN VITRO* E *IN VIVO* COM OVINOS 48
3.1. Introdução 50
3.2. Material e métodos 51
3.2.1. Local 51
3.2.2. Bioensaio *in vitro* 52
3.2.3. Ensaio de digestibilidade aparente dos nutrientes 54
3.2.4. Análise estatística 56
3.3. Resultados 56
3.3.1. Bioensaio *in vitro* 56

3.3.2. Ensaio de digestibilidade aparente dos nutrientes 57
3.4. Discussão 59
3.4.1. Bioensaio *in vitro* 59
3.4.2. Digestibilidade aparente dos nutrientes 61
3.5. Conclusão 63
Referências 63

4. EMISSÃO DE METANO, MICROBIOTA RUMINAL E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS EM OVINOS SANTA INÊS SUPLEMENTADOS COM A LEGUMINOSA *MACROTYLOMA AXILLARE* 68
4.1. Introdução 70
4.2. Material e métodos 71
4.2.1. Local 71
4.2.2. Animais, tratamentos e manejo 71
4.2.3. Emissão de CH_4 72
4.2.4. Parâmetros de fermentação ruminal 73
4.2.5. Características de carcaça e perfil de ácidos graxos 74
4.2.6. Análise estatística 76
4.3. Resultados 78
4.4. Discussão 82
4.5. Conclusão 88
Referências 88

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS 93

1. INTRODUÇÃO

O constante aumento da população mundial, sobre a qual se prevê que atinja o patamar de 9,6 bilhões de pessoas no ano de 2050, deve trazer consigo maior demanda por alimentos de origem animal, superando em mais de 70 % a demanda observada no ano de 2010. Tal cenário constitui-se um desafio sem precedentes para a produção de alimentos e agricultura mundial, uma vez que a disponibilidade de recursos naturais necessários para se alcançar o suprimento desta demanda não deve acompanhar este aumento (GERBER et al., 2013; CERRI et al., 2016).

A pecuária de ruminantes é uma atividade que se destaca na produção de alimentos, uma vez que gera produtos de grande valor para o consumo humano, como a carne e o leite, à custa de alimentos fibrosos, de baixo valor nutritivo. No entanto, esta atividade representa uma questão de grande importância em relação ao meio ambiente no mundo todo, uma vez que os ruminantes, por meio de seus processos digestivos, produzem importantes quantidades de metano (CH_4), gás de efeito estufa com potencial de aquecimento global superior ao do gás carbônico (CO_2), e que ainda representa perda do potencial energético do alimento consumido por estes animais, podendo limitar a produtividade (MORGAVI et al., 2010; USEPA, 2014).

Na maior parte do Brasil, a produção de ruminantes baseia-se no uso de pastagens de gramíneas tropicais, as quais podem apresentar oscilações ao longo do ano no que diz respeito à quantidade e qualidade da forragem produzida, especialmente durante as estações de seca, podendo este fator ser considerado um limitante ao desempenho produtivo do rebanho, e que também leva ao aumento das emissões de CH_4 em relação ao alimento de origem animal produzido, seja ele carne ou leite (BERTELLI; FRANZOLIN, 2013; DEMARCHI et al., 2016).

Diante deste quadro, a utilização de leguminosas nos sistemas de produção representa importante alternativa de alimentação, uma vez que, de forma geral, estas se caracterizam por possuírem maiores teores de nutrientes e digestibilidade que as gramíneas, o que pode trazer benefícios ao desempenho animal. Somando-se a isto, estas plantas também são fixadoras de nitrogênio, podendo aumentar o aporte deste elemento aos solos, favorecendo a fertilidade dos mesmos e ocasionando até mesmo o melhor desenvolvimento de outras forrageiras ao redor (PAULINO et al., 2008; HAMMOND et al., 2011; SCHIPANKSI; DRINKWATER, 2012).

Uma característica das leguminosas que muitas vezes pode ser limitante à sua utilização na dieta de ruminantes é a presença de compostos secundários como os taninos, que podem prejudicar a degradabilidade e a utilização dos nutrientes da dieta. No entanto, sabe-se

que, desde que presentes em quantidades moderadas na alimentação dos animais, e de acordo com a sua origem, os taninos podem propiciar efeitos positivos, como a redução da emissão de CH_4, o auxílio no controle da infecção endoparasitária e até alterações benéficas na qualidade da carne e leite produzidos (VASTA et al., 2009; JAYANEGARA; LEIBER; KREUZER, 2012; HOSTE et al., 2012).

A *Macrotyloma axillare* (macrotiloma), espécie de leguminosa de clima tropical, apresenta baixos teores de taninos na sua composição (VALARINI; POSSENTI, 2006; RUFINO et al., 2006), o que contribui para a não ocorrência de efeitos antinutricionais devido ao seu consumo, e que, mesmo já tendo apresentado bom potencial para o uso na alimentação de ruminantes (GETACHEW; SAID; SUNDSTOL, 1994; GERDES et al., 2009), ainda são escassos os estudos relatando os efeitos da utilização desta leguminosa sobre parâmetros de desempenho e metabolismo destes animais.

1.1. Hipóteses

As seguintes hipóteses serviram de base ao presente estudo:

- A suplementação de macrotiloma na dieta de ovinos pode reduzir a produção de CH_4 entérico destes animais devido às suas características nutricionais e pela presença de taninos.
- A suplementação da leguminosa macrotiloma também pode gerar melhor desempenho produtivo dos animais, reduzindo assim, a quantidade de CH_4 produzido em relação ao produto (carne) gerado.
- Mesmo presentes em baixos teores, os taninos da macrotiloma podem exercer efeitos sobre o metabolismo e desempenho animal, a microbiota ruminal, e características da carcaça e carne produzidas pelos animais.

1.2. Objetivos

O presente estudo foi realizado objetivando-se:

- Determinar os efeitos dos taninos da macrotiloma sobre a produção de gases e parâmetros de fermentação ruminal *in vitro*;

- Avaliar a digestibilidade aparente dos nutrientes da dieta e parâmetros de fermentação ruminal em ovinos alimentados com feno de gramínea tropical e suplementados com feno da leguminosa macrotiloma;
- Mensurar a emissão de CH_4 *in vivo* e ao mesmo tempo avaliar parâmetros de desempenho produtivo, fermentação ruminal, composição da microbiota ruminal, características de carcaça e perfil de ácidos graxos da carne de ovinos alimentados com feno de gramínea tropical e suplementados com feno da leguminosa macrotiloma.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Pastagens e plantas forrageiras na alimentação de ruminantes

Por milhares de anos, áreas de pastagem têm representado um dos principais alicerces da civilização humana e suas atividades econômicas, devido a sua importância para a produção de alimentos para consumo humano (leite e carne) por meio da pecuária. Em países em desenvolvimento, que concentram 68 % das áreas de pastagem do mundo, esta situação é bastante evidente (BOVAL; DIXON, 2012).

Em vários destes países, as pastagens constituem o principal recurso alimentar para ruminantes. A disponibilidade e qualidade dos pastos dependem de fatores como o regime de chuvas, estágio de maturidade, qualidade nutricional do solo e composição botânica das espécies forrageiras (BEZABIH et al., 2014). Em países tropicais, como é o caso do Brasil, observa-se irregular taxa de crescimento das plantas forrageiras ao longo do ano, com produtividade mais reduzida nos períodos de escassez de chuvas e temperaturas mais amenas (BERTELLI; FRANZOLIN, 2013).

Gramíneas tropicais, forrageiras predominantes em regiões de clima tropical, apresentam elevadas taxas de crescimento durante os períodos de chuva, no entanto, em períodos de seca, além de se reduzir a taxa de crescimento, reduz-se também a qualidade nutricional das mesmas, com o aumento do teor de parede celular e diminuição dos teores de proteína bruta (PB) destas plantas. Nestas situações, muitas vezes as gramíneas podem apresentar teores de PB inferiores a 7 %, valor considerado como o mínimo necessário para o adequado funcionamento da microbiota ruminal, prejudicando, portanto, o desempenho produtivo dos ruminantes mantidos em sistema de pastejo durante este período (SAMPAIO et al., 2010).

Levando-se em consideração a oscilação da produtividade frequentemente observada na criação de ruminantes a pasto em regiões tropicais, diversas estratégias foram traçadas com o intuito de amenizar os efeitos negativos da estacionalidade das pastagens sobre o desempenho animal, minimizando dessa forma a queda da produção de carne ou leite por estes animais em determinada época do ano. Dentre essas estratégias, pode-se destacar: a utilização de fertilizantes na pastagem; manejo da duração e frequência de pastejo; emprego de coprodutos da agroindústria na alimentação dos animais; e utilização de leguminosas na dieta (BOVAL; DIXON, 2012).

Dentre os principais motivos que levam à queda de produtividade das forrageiras, o nitrogênio se destaca como principal nutriente limitante para o desempenho produtivo destas. Sendo assim, a suplementação deste elemento às pastagens constitui um dos principais meios de se manter a produtividade do sistema frente à oscilação de qualidade das forrageiras durante o ano (PIRHOFER-WALZL et al., 2012).

2.1.1. Vantagens do uso de leguminosas nos sistemas de pastagens

Em sistemas de produção de ruminantes a pasto nos trópicos, muitas vezes a baixa fertilidade do solo é um entrave para a expressão do potencial de produtividade das pastagens e por consequência, do sistema como um todo. O uso de fertilizantes nitrogenados em pastagens é uma alternativa que proporciona o aumento da densidade de forragem no pasto e a disponibilidade de folhas, gerando incremento na produção de massa seca e possibilitando o aumento da produção animal por área (PARIS et al., 2009).

Segundo Vitor et al. (2009), a maior disponibilidade de nitrogênio no solo causa aumento nas taxas de atividades enzimáticas e do metabolismo das plantas e também propicia maior assimilação de deste elemento aos esqueletos carbônicos por via do sistema glutamina sintetase (GS) / glutamato sintase (GOGAT). Tais processos levam à maior disponibilidade de forragem e aumento no teor de PB da mesma, respectivamente. Testando quatro diferentes níveis (100 a 700 kg/ha) de adubação nitrogenada em área de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum. cv. Napier), estes autores observaram aumento linear na produção de matéria seca (MS) acumulada da pastagem e teor de PB da forragem, chegando à produção acumulada de 29000 kg MS/ha e teor de PB de 10,65 % em 14 meses de período experimental no caso da maior dose de adubo nitrogenado testada.

Apesar dos benefícios à produtividade pelo uso de fertilizantes nitrogenados no sistema, constituem-se fatores limitantes para a utilização destes nas pastagens, o alto custo e o potencial em causar poluição das águas por meio da lixiviação (BOVAL; DIXON, 2012). Neste sentido, uma alternativa que se apresenta é a introdução de leguminosas nos sistemas de pastagens.

As leguminosas compreendem um grupo de plantas que possuem a capacidade de fixar o nitrogênio oriundo da atmosfera, disponibilizando este elemento no solo, aumentando fertilidade do mesmo. Algumas espécies de leguminosas, como o *Calopogonium mucunoides* e a *Leucaena leucocephala* podem fixar de 90 até 400 kg de nitrogênio por hectare anualmente. A fixação de nitrogênio pelas leguminosas se dá por meio de bactérias do gênero

Rhizobium e representa uma fonte mais barata deste elemento quando comparada aos fertilizantes nitrogenados (CARVALHO, 1985; PAULINO et al., 2008).

Em casos em que há limitada disponibilidade de nitrogênio no solo, a presença de leguminosas pode beneficiar inclusive, o crescimento de outras espécies de plantas, como as gramíneas, transferindo nitrogênio para estas e constituindo assim, um dos principais benefícios a respeito do uso de pastagens consorciadas (PIRHOFER-WALZL et al., 2012; SCHIPANKSI; DRINKWATER, 2012).

Longos períodos de seca e baixa fertilidade dos solos são fatores frequentemente observados nos trópicos e são entraves para o desenvolvimento das plantas forrageiras nestas regiões. As leguminosas tropicais, adaptadas às condições ambientais destas regiões, além de beneficiarem o sistema por meio da fixação biológica de nitrogênio, se caracterizam por apresentarem maiores teores de PB e menores teores de fibra que as gramíneas, representando assim, boa fonte de nutrientes para ruminantes, podendo ser empregadas com sucesso na dieta destes animais, seja por meio de pastejo ou suplementação no cocho (VALARINI; POSSENTI, 2006; TIEMANN et al., 2009).

Outra característica frequentemente observada nas leguminosas é a presença de quantidades significativas de compostos secundários, como saponinas e taninos, sendo estes últimos, alvos de grande interesse da pesquisa em nutrição de ruminantes. Estas moléculas são apontadas como capazes de influenciar significativamente o metabolismo animal, reduzindo degradabilidade e palatabilidade dos alimentos, ou podendo até mesmo reduzir produção de metano (CH_4) por parte destes animais, dependendo de fatores como características específicas de cada tipo de tanino e também de acordo com o teor destes nas leguminosas e dietas (FRUTOS et al., 2002; JAYANEGARA; LEIBER; KREUZER, 2012; MOREIRA et al., 2013, RODRÍGUEZ et al., 2014).

Existem várias espécies de leguminosas cultivadas no Brasil, como as dos gêneros *Stylosanthes*, *Arachis*, *Calopogonium*, *Macrotyloma*, *Centrosema*, *Neonotonia* e *Mimosa*. Para o sucesso da adoção do uso de leguminosas em sistemas de pastagens, é necessário estar atento a suas particularidades no que se refere à exigência de nutrientes e características morfo-fisiológicas. Em linhas gerais, gramíneas apresentam vantagem na competição por nutrientes em relação às leguminosas, tendendo a dominar os pastos em situação de consórcio. Fatores como características climáticas da região a ser trabalhada, a compatibilidade das espécies a serem plantadas e principalmente a disponibilidade adequada de nutrientes, constituem-se pontos fundamentais para que se obtenha a persistência das leguminosas nas

pastagens e que os benefícios decorrentes desta prática possam ser observados (PAULINO et al., 2008).

2.1.2. *Macrotyloma axillare*

Espécie de hábito de crescimento volúvel e adaptada aos climas tropical e subtropical, a leguminosa macrotiloma (*Macrotyloma axillare*) se apresenta como alternativa para uso em sistemas de produção de ruminantes. Apresentando bom desenvolvimento em diversos tipos de solo, esta planta tem boa resistência à seca, não tolera alagamento ou geadas e exige temperatura ambiente média anual de 18 a 27 ºC, sendo recomendado pastejo moderado durante o período de estabelecimento em consórcio (BLUMENTHAL; STAPLES, 1993; MORRIS, 2008).

Alvo de pesquisas científicas do Instituto de Zootecnia/APTA/SAA - SP ao longo dos últimos 20 anos, esta leguminosa já apresenta alguns resultados que a colocam dentre as espécies com potencial para serem trabalhadas pela nutrição de ruminantes no Brasil (VEASEY et al., 1999; VALARINI; POSSENTI, 2006; GERDES et al., 2009).

No final da década de 90, Veasey et al. (1999) realizaram estudo em que foram avaliados 96 acessos de diferentes gêneros de leguminosas forrageiras tropicais quanto a características como florescimento precoce, produção de sementes, produção de biomassa e tolerância a pragas. Neste estudo, o acesso NO 279 da leguminosa macrotiloma, do banco ativo de germoplasma do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa - SP, apresentou resultados de destaque e continuou então a ser trabalhado em novas pesquisas.

Valarini e Possenti (2006) verificaram degradabilidade *in situ* de 64 % da MS desta leguminosa, e posteriormente, trabalhando com o acesso NO 279, Gerdes et al. (2009) observaram que esta leguminosa foi capaz de proporcionar maior aumento do teor de PB ao capim-aruana (*Panicum maximum* Jaqc. cv. Aruana) quando comparada a outras leguminosas em consórcio sob pastejo de ovinos.

Testando os efeitos da suplementação de leguminosas em dietas de ovinos machos castrados, Getachew, Said e Sundstol (1994) observaram maior ganho em peso para os animais que receberam dieta base de palha de milho suplementada com macrotiloma quando comparados a animais que receberam esta mesma dieta base, porém com suplementação das leguminosas *Stylosanthes guianensis* e *Desmodium intortum*.

No que diz respeito à qualidade nutricional, Valarini e Possenti (2006) observaram teores de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e PB de 463,

356 e 167 g/kg respectivamente para esta leguminosa, e somando-se a isso, estes autores verificaram também teores de taninos totais de 19 g/kg e taninos condensados de 0,5 g/kg. Rufino et al. (2006) consideraram os teores de taninos desta planta como baixos, o que pode contribuir para que não sejam observados efeitos antinutricionais causados por estas moléculas frente ao consumo desta planta.

A literatura científica ainda carece de estudos de maior robustez a respeito do uso dessa leguminosa na alimentação de ruminantes, no entanto, considerando os resultados obtidos até então e o cenário da produção de ruminantes no Brasil, é possível se inferir que a leguminosa macrotiloma é uma espécie que deva ser alvo de novos estudos, com a possibilidade de se alcançar a consolidação de uma nova alternativa de forrageira leguminosa.

2.2. Taninos na nutrição de ruminantes

Compostos polifenólicos com variáveis estruturas e pesos moleculares, os taninos fazem parte do metabolismo secundário das plantas, estando amplamente distribuídos na natureza e podem afetar de diversas maneiras o metabolismo animal. Frequentemente encontrados em leguminosas, a função dos taninos no metabolismo das plantas está relacionada à proteção contra prejuízos causados por bactérias, vírus, fungos, nematoides e pelo consumo por parte dos herbívoros (LOUVANDINI et al., 2011).

De acordo com sua estrutura química, os taninos são classificados em dois grupos, hidrolisáveis e condensados. Estruturalmente, taninos hidrolisáveis são formados por um grupo de açúcar central, esterificado a vários grupos de ácido gálico ou elágico, enquanto taninos condensados são polímeros de flavonoides, formados por ligações entre moléculas de carbono (MUETZEL; BECKER, 2006).

Taninos hidrolisáveis podem ser tóxicos para ruminantes, principalmente em situações em que grandes quantidades são ingeridas sem prévia adaptação da microbiota ao consumo destes. No entanto, os animais podem se adaptar à ingestão destas substâncias, degradando-as sem que estas prejudiquem o desempenho produtivo (WAGHORN, 2008).

Por outro lado, os taninos condensados apresentam afinidade por componentes da dieta como a proteína e a fibra, formando complexos com estes e limitando dessa forma, a degradabilidade destes nutrientes, podendo trazer prejuízos ao desempenho animal. Os efeitos dos taninos sobre o metabolismo dos ruminantes não variam somente de acordo

com a concentração destes na dieta, mas também de acordo com sua reatividade, que está associada à sua natureza química e origem (RODRÍGUEZ et al., 2014).

Apesar do fato mencionado anteriormente, assume-se de modo geral, que os efeitos antinutricionais dos taninos no metabolismo de ruminantes são observados em situações em que estes estão presentes em altas concentrações na dieta dos animais (60 a 120 g/kg da MS). Além de reduzirem a degradabilidade da proteína e fibra, os taninos também podem diminuir a aceitabilidade e nível de consumo da dieta, e podem interagir com enzimas do trato gastrintestinal, prejudicando o funcionamento das mesmas (SILANIKOVE; PEREVOLOTSKY; PROVENZA, 2001; FRUTOS et al., 2002; LOUVANDINI et al., 2011).

A presença dos taninos nas leguminosas, em decorrência de seus efeitos antinutricionais, por muitas vezes foi considerado um fator limitante do uso destas plantas na dieta de ruminantes (BOVAL; DIXON, 2012). No entanto, sabe-se que a presença moderada de taninos na dieta, variando na faixa de 20 a 40 g/kg da MS, pode proporcionar efeitos benéficos ao metabolismo animal (FRUTOS et al., 2002; LOUVANDINI et al., 2011). Dentre os principais efeitos positivos observados, destacam-se a redução da produção de CH_4, aumento da absorção intestinal de aminoácidos da dieta e a diminuição da infecção helmíntica (CENCI et al., 2007; WAGHORN, 2008; JAYANEGARA; LEIBER; KREUZER, 2012).

Uma vez que a ação dos taninos sobre o metabolismo de ruminantes também está relacionada à sua natureza química e origem, o estudo dos efeitos dos mesmos sobre os parâmetros de fermentação ruminal é de suma importância para o sucesso do emprego destes na nutrição de ruminantes. A fim de se observar de maneira mais precisa os efeitos dos taninos, uma alternativa prática é a utilização do polietilenoglicol (PEG), composto que se liga a estas moléculas, funcionando como um agente neutralizador dos seus efeitos, podendo ser utilizado tanto em ensaios *in vitro*, incluídos nos substratos incubados, como *in vivo*, sendo fornecidos aos animais a serem avaliados (WAGHORN, 2008; SOLTAN et al., 2013; RODRÍGUEZ et al., 2014).

Neste sentido, o PEG também tem sido recomendado para o uso em propriedades rurais, como uma medida para corrigir os altos teores de taninos das pastagens, podendo ser fornecido aos animais por diluição na água, misturado em pequenas quantidades no concentrado, borrifado nos alimentos ou até por meio de blocos para serem lambidos pelos animais (MAKKAR, 2003; KAWAS; ANDRADE-MONTEMAYOR; LU, 2010).

2.2.1. Taninos e o metabolismo de ruminantes

Uma vez consumido pelos ruminantes, ainda durante o processo de mastigação, os taninos formam complexos com as proteínas da saliva, que se mantém estáveis em pH variando entre 3,5 e 7,0, faixa de valores na qual se encontra o pH ruminal. Visto que este complexo permanece estável no ambiente ruminal, o mesmo se mantém protegido da desaminação e hidrólise microbiana, favorecendo o fluxo de proteínas e aminoácidos provenientes da dieta para abomaso e intestino de delgado (WAGHORN, 2008; LOUVANDINI et al., 2011).

A esta capacidade que os taninos possuem de se ligarem às proteínas da dieta, atribui-se ainda outros benefícios, como a prevenção de timpanismo espumoso, uma vez que estes se ligam às proteínas solúveis dos alimentos, as quais uma vez no rúmen podem ser responsáveis pela formação de espuma. Os taninos também são capazes de aumentar o fluxo de saliva, que auxilia no tamponamento do rúmen e estimula a reciclagem de nitrogênio via ureia salivar (LOUVANDINI et al., 2011; JAYANEGARA; LEIBER; KREUZER, 2012).

Outro benefício que se atribui à presença de taninos nos alimentos é o aumento da produção de lã. Wang et al. (1994) observaram que o fornecimento da leguminosa taninífera *Lotus corniculatus* aumentou a conversão de metionina em cistina, aminoácido essencial utilizado na síntese da fibra de lã. Min et al. (2003) relataram que a presença na taninos condensados de *L. corniculatus* na faixa de concentração de 22 a 38 g/kg MS é responsável por gerar efeitos positivos à produção de lã e a inclusão superior a 50 g/kg MS já pode gerar efeitos negativos.

Apesar dos taninos aumentarem o fluxo de proteínas e aminoácidos da dieta para o intestino delgado, isso não significa necessariamente que a absorção destes estará aumentada. Os complexos formados entre proteínas e taninos, apesar de se desfazerem no baixo pH do abomaso, podem se formar novamente no intestino delgado, e somando-se a isso, os taninos podem também se complexar às enzimas digestivas, fatores que prejudicam a digestão das proteínas e a absorção de aminoácidos (WAGHORN, 2008).

Corroborando essa linha de raciocínio, Robins e Brooker (2005) alimentaram ovelhas com dieta exclusiva de *Acacia aneura*, e observaram que os taninos condensados desta planta, presentes em concentração de 7,5 % da MS, foram capazes de reduzir em até 70% a atividade enzimática no trato gastrintestinal dos animais. Neste experimento ainda, os autores observaram outros efeitos dos taninos que foram prejudiciais aos animais, tais como danos

aos tecidos abomasal e intestinal, caracterizando um caso típico de efeito antinutricional dos taninos.

Por outro lado, Ramirez-Restrepo et al. (2005), trabalhando com ovelhas da raça Romney, avaliaram os efeitos do pastejo sobre a leguminosa taninífera *L. corniculatus*, antes e durante a estação de monta, sobre parâmetros de desempenho animal e eficiência reprodutiva. Estes autores observaram que ao longo dos nove meses de experimento, os animais que se alimentaram na pastagem desta leguminosa obtiveram ganho em peso diário, escore corporal, produção de lã e desempenho reprodutivo superiores aos de animais do grupo controle, que se alimentaram de pastagem de azevém e trevo branco (*Lolium perene* e *Trifolium repens*).

Os autores do trabalho acima ressaltaram que o superior ganho em peso dos animais em pastagem exclusiva de *L. corniculatus* deveu-se principalmente à melhor qualidade nutricional da dieta, entretanto, os melhores resultados obtidos em relação ao desempenho reprodutivo e também na produção de lã, são relacionados à presença de taninos condensados na dieta e à maior absorção de aminoácidos essenciais no intestino.

De modo semelhante, Woodward, Waghorn e Laboyrie (2004), trabalhando com vacas holandesas, verificaram aumento na produção de leite de vacas alimentadas com *L. corniculatus* em relação a animais alimentados em pastagem de azevém. Destaca-se neste trabalho, o fato de que os autores utilizaram o PEG em metade dos animais de ambos os tratamentos, como uma maneira de evidenciar os efeitos dos taninos condensados presentes na forragem. Observou-se superior produção de leite nas vacas consumindo *L. corniculatus* não apenas em relação às vacas consumindo azevém, mas também em relação às vacas consumindo *L. corniculatus* com PEG, evidenciando assim os efeitos dos taninos condensados. Neste último caso, a maior produção de leite dos animais alimentados com *L. corniculatus* em relação aos animais alimentados com *L. corniculatus* e PEG foi devido, provavelmente, à maior absorção intestinal de proteínas.

Outro aspecto que tem sido recente alvo de estudos são os efeitos dos taninos na dieta de ruminantes sobre o perfil de ácidos graxos dos produtos originados por estes animais. Vasta et al. (2009) observaram os efeitos dos taninos de quebracho (*Schinopsis lorentzii*) sobre a carne de cordeiros da raça Comisana, alimentados tanto com dieta a base de volumoso como em dieta a base de concentrado. Estes autores observaram que a carne dos cordeiros suplementados apresentaram maiores teores de ácidos graxos poli-insturados e menores teores de ácidos graxos saturados, o que é desejável para o consumo humano. Estes autores

atribuíram estes efeitos à capacidade dos taninos de afetarem diretamente os micro-organismos ruminais, diminuindo a bio-hidrogenação dos ácidos graxos na dieta.

Por outro lado, Benchaar e Chouinard (2009) também usaram a suplementação de taninos de quebracho, neste caso para vacas Holandesas, e não observaram efeitos destes taninos sobre o perfil de ácidos graxos do leite destes animais. De acordo com Morales e Ungerfeld (2015), estudos considerando os efeitos dos taninos sobre o perfil de ácidos graxos de produtos de origem animal ainda apresentam resultados bastante variáveis e imprevisíveis, permanecendo esta uma área a ser mais trabalhada para melhor elucidação dos efeitos destas moléculas sobre os micro-organismos ruminais envolvidos no processo de biohidrogenação e as consequências sobre o leite e a carne, uma vez que o tema é de grande importância para a saúde humana.

2.2.2. Taninos e o controle de verminoses

Os nematódeos do trato grastrintestinais são apontados como um dos principais problemas sanitários para a criação de ruminantes a pasto em todo o mundo. O uso de anti-helmínticos comerciais tradicionais foi, por muito tempo, a principal ferramenta encontrada para viabilizar a pecuária a pasto frente aos problemas causados por estes parasitas (MANOLARAKIS et al., 2010).

Entretanto, o uso de drogas anti-helmínticas tem esbarrado em alguns entraves como, principalmente, o surgimento de vermes resistentes a estes medicamentos, além de outros fatores como a crescente preocupação do mercado consumidor em relação à presença de resíduos químicos em produtos de origem animal, e muitas vezes, a restrição financeira enfrentada por muitos produtores para terem acesso estes medicamentos. Diante deste quadro, o uso de plantas com metabólitos secundários, como os taninos condensados, surge como uma alternativa promissora para o controle de verminoses em ruminantes (HOSTE et al., 2012).

Avaliação em ensaios *in vitro* é a primeira linha de ação na busca por plantas com potencial anti-helmíntico. Katiki et al. (2013) testaram extratos de diferentes plantas taniníferas da região dos Apalaches, na América do Norte, apresentando diferentes teores de taninos condensados, e observaram em ensaio *in vitro*, pronunciado efeito anti-helmíntico destes extratos sobre vermes adultos da espécie *Caenorhabditis elegans*, espécie de nematódeo de vida livre adotada como modelo para este tipo de ensaio.

Em trabalho com ovinos Santa Inês a pasto, apresentando infecção endoparasitária natural por várias espécies de helmintos, Cenci et al. (2007) observaram redução na

contagem de ovos por grama de fezes (OPG) e na contagem de vermes adultos de *Trichostrongylus columbriformis* e *Cooperia* sp. no conteúdo visceral dos animais que recebiam 18 g semanais de casca de Acácia negra (*Acacia mearnsii*) em pó, material contendo 18 % de taninos condensados.

Buscando explicar os efeitos dos taninos sobre os parasitas gastrintestinais, são propostas duas hipóteses, um mecanismo de ação direto, e outro indireto. O mecanismo direto se refere ao efeito que os taninos causam sobre o ciclo biológico dos parasitas, amenizando assim as infecções. Tal mecanismo é respaldado principalmente pelos experimentos *in vitro*, nos quais se observam efeitos diretos destas substâncias sobre os helmintos. Já o mecanismo indireto, se refere à capacidade dos taninos de se complexarem a proteínas da dieta, reduzindo a degradabilidade das mesmas no rúmen e permitindo que elas cheguem ao abomaso e posteriormente ao intestino delgado, aumentando assim o aporte de aminoácidos e peptídeos ao organismo do animal, e por consequência, melhorando a resposta imune do mesmo (HOSTE et al., 2012).

2.3. Produção de metano em ruminantes

Durante a fermentação entérica, principal processo digestivo dos ruminantes, além de serem gerados os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), mais importantes fontes de energia para o funcionamento do organismo destes animais, também são gerados outros produtos, tais como dióxido de carbono (CO_2) e o íons de hidrogênio (H_2), que por intermédio dos micro-organismos metanogênicos, irão formar o CH_4, gás que representa perda de 5 a 10 % do potencial energético dos alimentos consumidos (MADSEN et al., 2010).

A maior parte da metanogênese se dá no rúmen, câmara fermentativa anaeróbia que compõe o trato gastrintestinal dos ruminantes. Produzido por um grupo de micro-organismos denominados *Archaea* metanogênicas, este gás não é utilizado em nenhuma etapa do metabolismo dos animais, sendo então eliminado para o ambiente, sobretudo, pelo processo de eructação (MURRAY; BRYANT; LENG, 1976; MORGAVI et al., 2010; HAMMOND et al., 2016). A produção de CH_4 faz parte do metabolismo normal dos ruminantes, uma vez que esta ocorre para evitar o acúmulo de H_2 no rúmen, o qual poderia levar à inibição de processos como a degradação de forragens, crescimento microbiano e produção de AGCC (ECKARD; GRAINGER, De KLEIN, 2010).

Somando-se à perda de parte da energia da dieta, a produção de CH_4 pelos ruminantes está associada ao impacto da pecuária sobre o meio ambiente, uma vez que este é um componente do grupo denominado gases de efeito estufa (GEE). Os GEE são capazes de reter calor na atmosfera, aumentando assim a temperatura média do planeta. O CH_4 apresenta potencial de aquecimento global, métrica adotada pelo protocolo de Kyoto para se qualificar os gases emitidos, 21 vezes mais forte que o CO_2 (ECKARD; GRAINGER, De KLEIN, 2010; USEPA, 2014).

A pecuária contribui com até 18% das emissões antropogênicas de GEE no mundo, quando consideradas além das emissões diretas, aquelas oriundas da produção de rações, uso de combustíveis, transporte de produtos, dentre outros. Estima-se que a que o CH_4 contribua com cerca de 30% das emissões da pecuária, com a fermentação entérica sendo responsável por aproximadamente 80% das emissões de CH_4 deste setor (GILL; SMITH; WILKINSON, 2010; MORGAVI et al., 2010).

A tendência dos números apresentados é aumentar, uma vez que é estimado crescimento da população mundial do patamar atual de 7,2 bilhões para 9,6 bilhões de pessoas até o ano de 2050, podendo ocorrer aumento de até 70 % na demanda por produtos de origem animal (CERRI et al., 2016). Diante deste quadro, torna-se necessário aumentar a produtividade da pecuária, sendo este aumento, no entanto, associado ao menor impacto ambiental possível. A redução da produção de CH_4 por ruminantes está relacionada à maior eficiência de uso da energia dos alimentos por parte dos animais. Dessa forma, estratégias de mitigação da emissão de CH_4, muitas vezes, além de diminuir a produção deste gás, devem estar associadas ao melhor desempenho produtivo dos animais (SHIBATA; TERADA, 2010).

2.3.1. Estratégias de mitigação

Muitas estratégias têm sido desenvolvidas com o objetivo de se mitigar a produção de CH_4 nos sistemas de produção pecuária. Grande parte delas está relacionada ao manejo alimentar dos ruminantes, uma vez que a composição, qualidade e quantidade da dieta são fatores que afetam de maneira significativa a metanogênse. No entanto, fatores relacionados ao manejo no sistema e à microbiologia ruminal também podem afetar a produção de CH_4 (ECKARD; GRAINGER, De KLEIN, 2010; SHIBATA; TERADA, 2010).

As estratégias de mitigação geralmente se baseiam em um ou mais dos pontos a seguir: redução da produção de H_2 sem prejudicar a degradabilidade dos alimentos; o estímulo da utilização do H_2 em vias metabólicas alternativas, o desviando da formação de CH_4; e a

inibição direta dos micro-organismos metanogênicos, que deve ser acompanhada da geração de uma via alternativa de consumo do H_2, evitando o acúmulo desta molécula e seus consequentes efeitos negativos ao organismo (MARTIN; MORGAVI; DOREAU, 2010).

Aspecto importante a ser considerado é o custo benefício das estratégias. Estas devem levar em conta as características inerentes aos diferentes sistemas de produção, permitindo assim o aproveitamento máximo dos recursos disponíveis em cada região, sem gerar aumento significativo de gastos (COTTLE; NOLAN; WIEDEMANN, 2011). Além do uso de forragens com características diferenciadas, caso das que contém metabólitos secundários como os taninos, a suplementação com lipídios, fornecimento de concentrado, e até o uso de vacinas são estratégias de mitigação já trabalhadas na literatura (BEAUCHEMIN et al.; 2009; MARTIN; MORGAVI; DOREAU, 2010; EMBRAPA, 2011; WEDLOCK et al., 2013).

2.3.2. Taninos e a emissão de metano

Devido a seus efeitos sobre a produtividade animal e seus impactos ao meio ambiente, a produção de CH_4 e alternativas de mitigação deste processo têm sido importantes objetos de estudos nos últimos anos. Os taninos, muitas vezes tidos como agentes causadores de efeitos antinutricionais, são considerados um dos principais grupos de compostos capazes de reduzir a produção de CH_4 nos ruminantes (JAYANEGARA; LEIBER; KREUZER, 2012).

Os efeitos dos taninos sobre a produção de CH_4 podem ocorrer de maneira direta, por meio de efeito tóxico direto sobre os micro-organismos metanogênicos, ou indiretamente, tanto por reduzir a degradabilidade de nutrientes dos alimentos, como também por afetar a população de protozoários ruminais, os quais vivem em associação com algumas metanogênicas, além destes serem também importantes produtores de hidrogênio no rúmen (BHATTA et al., 2009; JAYANEGARA; LEIBER; KREUZER, 2012).

Em trabalho utilizando sistema semi-automático para determinação de produção de gases *in vitro*, Gemeda e Hassen (2015) avaliaram 19 diferentes plantas tropicais coletadas na África do Sul, todas apresentando diferentes teores de taninos condensados e verificaram que na presença de PEG, a produção de CH_4 foi maior para todas as plantas, durante todo o período de incubação, indicando claramente o efeito dos taninos sobre a produção deste gás.

Bhatta et al. (2013) avaliaram a produção de CH_4 em caprinos que receberam na dieta, dois níveis diferentes de um composto comercial contendo taninos de *Mimosa* spp. Estes autores observaram que os animais tratados com ambos os níveis de taninos apresentaram redução na produção de CH_4 em 9 e 11 % para o nível mais baixo e mais alto de inclusão respectivamente, quando comparados ao grupo controle, sem taninos. Salientou-se neste trabalho que o nível mais alto de taninos, além de reduzir a metanogênese, também reduziu a degradabilidade de vários constituintes da dieta em relação ao grupo controle, enquanto o mesmo não foi observado no caso do nível mais baixo de inclusão.

2.3.3. Técnicas de mensuração de CH_4

Uma vez que a pecuária é um dos setores que mais contribui com as emissões antropogênicas de CH_4 no planeta, e a busca por conhecimento a respeito de fatores que influenciam a emissão deste gás por ruminantes e possíveis estratégias de manejo buscando a mitigação deste processo têm sido destacados focos de atenção da comunidade científica, existe a necessidade de se trabalhar com técnicas de mensuração que se adequem à realidade de cada sistema, mantendo sempre o máximo de acurácia nas medições das emissões (MORGAVI et al., 2010; HAMMOND et al., 2016).

Dentre técnicas de mensuração da emissão individual dos animais, como o uso de detectores de CH_4 a laser ou sistemas de mensuração individual automática, como o GreenFeed (C-Lock Inc., Rapid City, Dakota do Sul, EUA), destacam-se como mais utilizadas, as câmaras respirométricas e a técnica do gás traçador hexafluoreto de enxofre (SF_6) (NEW ZEALAND, 2014a; RICCI et al., 2014; HAMMOND et al., 2015).

A mais popular dentre as técnicas utilizadas para medição de CH_4 por ruminantes, as câmaras respirométricas têm o seu uso já descrito há mais de 100 anos, (ARMSBY, 1903; HAMMOND et al., 2016). Diversos modelos de câmaras são utilizados, apresentando diversos graus de complexidade, que vão desde gaiolas metabólicas cobertas com cortinas de polietileno até modernos sistemas de calorimetria, de custos mais elevados (ABDALLA et al., 2008; NEW ZEALAND, 2014b).

As câmaras respirométricas para quantificação de CH_4 funcionam como um circuito aberto, no qual ar externo é ventilado para o interior da câmara, circulando por seu interior e se misturando aos gases emitidos pelo animal. Para as análises, são comparados os teores de CH_4 nos gases no ponto de entrada de ar das câmaras e no ponto de saída, e, a diferença entre

estes corresponde ao CH_4 produzido. É levada em consideração também a velocidade do fluxo de ar na câmara, a humidade do ambiente. Por fim, os dados coletados são corrigidos para condições normais de temperatura e pressão (CNTP) (HAMMOND et al., 2016).

Inicialmente descrita na literatura científica por Johnson et al. (1994) e adaptada às condições brasileiras por Embrapa (2004), a técnica do gás traçador SF_6 pode ser utilizada tanto em animais confinados como em animais a pasto, o ambiente natural destes. A técnica se baseia na colocação de uma cápsula de permeação de SF_6 previamente calibrada no interior do rúmen dos animais a serem avaliados. O SF_6 funciona como um traçador da emissão de CH_4, e uma vez que se tem conhecimento a respeito da taxa de emissão de SF_6 da cápsula de permeação colocada em cada animal, pode estimar-se a taxa de emissão de CH_4.

Amostras do ar exalado pelos animais são coletadas em uma câmara coletora, a qual se denomina canga, previamente pressurizada com pressão negativa. Esta canga pode ser confeccionada com aço inoxidável ou plástico PVC e pode tanto ser carregada pelos animais em torno do pescoço destes ou no dorso, meio da utilização de arreios. A coleta das amostras se dá por meio de um tubo linear com reguladores de fluxo, que é conectado à canga e ao cabresto utilizado pelos animais em experimento. Uma vez que a canga está carregada com pressão negativa, a amostra do ar exalado pelos animais é coletada para o seu interior e terminado o período de coleta, normalmente de 24 horas, as amostras são diluídas com nitrogênio e analisadas em sistema de cromatografia gasosa para se determinar as concentrações de SF_6 e CH_4 em seu interior. É necessário utilizar uma canga para se coletar e analisar amostras do ar ambiente (EMBRAPA, 2004; NEW ZEALAND, 2014a; HAMMOND et al., 2016).

Ensaios em câmaras respirométricas geralmente são conduzidos por períodos de 24 horas, que variam de 1 a 7 dias consecutivos (Van ZIJDERVELD et al., 2010; El-ZAIAT et al., 2014; SCHWARM et al., 2015), enquanto para a técnica do gás traçador SF_6, o padrão adotado são 5 dias consecutivos, podendo este variar para períodos maiores ou menores, de acordo com particularidades e necessidades de cada experimento (MARTIN et al., 2012; NEW ZEALAND, 2014a).

Quando comparada às câmaras respirométricas, a técnica do SF_6 apresentou resultados que variaram em torno de 5 a 10 % para valores de emissão maiores ou menores em testes realizados com os mesmos animais em ambas as técnicas. No entanto, apesar de muitas vezes a emissão média não diferir entre as técnicas, a variação dos resultados para cada animal e entre animais é maior para a técnica do SF_6, fato que deve ser levado em conta no momento de se planejar experimentos (GRAINGER et al., 2007; HAMMOND et al., 2016).

Tanto o uso de câmaras, quanto a técnica do gás traçador SF_6 apresentam a necessidade de se treinar os animais para o seu uso. Testes de calibração, e monitoramento da presença de gases no ambiente se fazem importantes em ambos os casos, a fim de que os dados coletados reflitam a real emissão dos animais, garantindo a acurácia dos sistemas. Sendo assim, os objetivos propostos em cada experimento, assim como as condições de trabalho em cada situação, constituem-se os pontos mais importantes no momento da escolha da técnica a ser utilizada. Ambas as abordagens já se mostraram eficientes na mensuração da emissão e na utilização para avaliações de estratégias de mitigação (PINARES-PATIÑO et al., 2008; GRAINGER et al., 2010; MOREIRA et al., 2013; ZHANG et al., 2015).

2.4. Parâmetros fermentativos e microbiota ruminal

O rúmen consiste em um ecossistema anaeróbico de pronunciada complexidade e abriga uma comunidade microbiana bastante diversa. Apesar da grande maioria destes micro-organismos ainda não ter sido cultivada, com o advento de técnicas de biologia molecular, estima-se que somente de bactérias, existam entre 300 a 400 filotipos diferentes no ambiente ruminal. Somando-se a estas bactérias, fungos, protozoários, *Archaea* metanogênicas e até vírus bacteriófagos, por milhões de anos, evoluíram com seus hospedeiros e desenvolveram simbiose que é essencial para a saúde, crescimento e nutrição dos ruminantes (MORGAVI et al., 2010).

Uma vez que o rúmen pode ser descrito como uma câmara fermentativa onde é degradada a maior parte dos nutrientes da dieta consumida pelos animais, é possível concluir que o estudo de parâmetros fermentativos, assim como o estudo da composição da microbiota ruminal, podem dar informações valiosas a respeito do efeito de diferentes tipos de dietas sobre o metabolismo dos ruminantes.

2.4.1. Mensuração do pH ruminal

Em situações normais, o pH ruminal encontra-se na faixa de 5,5 a 7, variando de acordo com o tipo de dieta fornecida aos animais (FEITOSA, 2008). Em sistemas de criação com elevados índices de produtividade, a fim de que se supram as exigências em energia do rebanho, grandes quantidades de concentrados com altos teores de carboidratos solúveis são fornecidas na dieta, fazendo com que os cuidados com o pH do rúmen sejam de extrema

importância, uma vez que casos de acidose ruminal (pH abaixo do fisiológico) podem ser verificados frequentemente (MORGANTE et al., 2007).

Nos casos como o descrito acima, altos teores de concentrado sem prévia adaptação dos animais e quantidades insuficientes de fibras longas na dieta levam à maior produção de AGCC curta no rúmen, que somada à elevada concentração de ácido lático, provocam a queda do pH. Uma vez o pH abaixo de 5,5 (5,6 e 5,7 já são considerados valores críticos), tem-se um quadro de acidose subclínica. Tal quadro afeta fisiologia normal do animal e pode trazer consequências como perda de condição corporal, diminuição do consumo de matéria seca, queda na produtividade e até mesmo problemas de casco (KLEEN et al., 2009).

Por outro lado, em sistemas de produção exclusiva a pasto, como é frequente no Brasil, o pH ruminal não representa questão de grande preocupação clínica. No entanto, o pH está associado também a outros fatores, como a produção de AGCC no rúmen, podendo ser usado, portanto, como uma forma de se obter informações a respeito da degradabilidade da dieta (MORGANTE et al., 2007).

Em ensaio *in vitro*, Bhatta et al. (2009) observaram que a presença de taninos nos substratos incubados levou a aumento de pH e queda na produção de AGCC, caracterizando um potencial efeito anti-nutricional destas moléculas e evidenciando importância da avaliação de pH mesmo em situação onde não há presença de concentrados na dieta. Ao baixo pH ruminal também estão associadas alterações fisiológicas como a redução na degradabilidade da celulose, diminuição na contagem de protozoários ruminais e redução na produção de CH_4 (FRANZOLIN; DEHORITY, 2010; SEJIAN et al., 2011; GUO et al., 2013). No entanto, no que diz respeito à metanogênese, Hünerberg et al. (2015) observaram em experimento *in vivo* que o pH reduzido, por si só, não foi capaz de reduzir a emissão de CH_4 em novilhas.

2.4.2. Concentração de nitrogênio amoniacal no rúmen

A produção e a mensuração do nitrogênio amoniacal ($N\text{-}NH_3$) ruminal são bons indicadores da degradabilidade ruminal da proteína dietética (WANG et al., 2006; PIMENTEL et al., 2012; BHATTA et al., 2013). Uma vez no rúmen, as proteínas da dieta são hidrolisadas a peptídeos e aminoácidos pela microbiota ruminal, podendo estes últimos ser incorporados pela microbiota para síntese de proteína microbiana, ou então desaminados, dando origem à amônia (McDONALD et al., 2011).

A amônia oriunda da hidrólise de proteínas poderá ser então, utilizada pelos micro-organismos ruminais para síntese de proteína microbiana, ou então ser absorvida na corrente sanguínea e transformada em ureia no fígado, sendo esta ureia excretada em maior parte na urina, ou então pode retornar ao rúmen pela reciclagem na saliva ou até mesmo pela corrente sanguínea (McDONALD et al., 2011). A presença de amônia no rúmen é importante para o adequado funcionamento deste ecossistema, verificando-se na literatura, a concentração mínima ideal variando de 5 a 20 mg/dL (LENG, 1990; PIMENTEL et al., 2012).

Devido à presença de taninos na composição de várias leguminosas, em estudos em que se utilizam estas plantas, a avaliação da produção de N-NH_3 se faz de suma importância. Os taninos, bastante conhecidos pela capacidade de se ligarem às proteínas da dieta, formando complexos que resistem à hidrólise microbiana ruminal, podem ser responsáveis por ocasionarem reduzida concentração de N-NH_3 no rúmen (GOEL; MAKKAR, 2012; AUFRÈRE et al., 2013).

2.4.3. Produção de ácidos graxos de cadeia curta

A degradação dos carboidratos no rúmen pode ser divida em duas fases, uma primeira, na qual moléculas de maior complexidade como celulose, hemicelulose e amido são metabolizadas a açúcares mais simples por meio de digestão microbiana enzimática extracelular e, na segunda fase, que se dá intracelularmente, há a síntese dos AGCC, principais fontes de energia no metabolismo dos ruminantes, que são constituídos principalmente por: acetato, propionato e butirato (produzidos em maiores proporções); e o isobutirato, valerato e isovalerato, produzidos em menores quantidades (McDONALD et al., 2011).

A quantidade e a proporção dos AGCC presentes no rúmen são fatores dependentes da dieta consumida pelos animais, assumindo-se de forma geral, os valores variando em torno de 65, 20 e 15 % para acetato, propionato e butirato respectivamente, com oscilações sendo observadas de acordo com diferenças na dieta (Tabela 2.1). Animais alimentados com maiores proporções de concentrados ou com forragem mais jovem, de maior degradabilidade, tendem a aumentar a proporção de propionato em relação aos outros AGCC (JANSSEN, 2010).

A relação entre a proporção dos AGCC acetato e propionato é um ponto de destacada importância em estudos que abordam a emissão de CH_4 na produção de ruminantes. O processo de síntese de propionato pela microbiota ruminal emprega íons de hidrogênio (H_2),

enquanto que a síntese de acetato libera estes íons no meio. Tendo em vista que as metanogênicas fazem uso deste H_2 para produzirem CH_4, menores valores para a relação acetato:propionato estão associados à menor produção de CH_4 (COTTLE; NOLAN; WIEDEMANN, 2011).

Tabela 2.1 - Produção de AGCC em ruminantes alimentados com diferentes dietas. (McDonald et al., 2011 - Adaptado)

Animal	Dieta	AGCC[1] total (mmol/L)	AGCC individuais - (%)			
			C2	C3	C4	Outros
Ovinos	Azevém (jovem)	107	60	24	12	4
Bovinos	Azevém (ponto de pastejo)	137	64	22	11	3
Bovinos	Silagem de gramínea	108	74	17	7	3
Ovinos	Feno de alfafa picado	113	63	23	10	4
Ovinos	Feno de gramínea:concentrado					
	100:0	97	66	22	9	3
	80:20	80	61	25	11	3
	60:40	87	61	23	13	2
	40:60	76	52	34	12	3
	20:80	70	40	40	15	5

[1] - AGCC - Ácidos graxos de cadeia curta; C2 - Acetato; C3 - Propionato; C4 - Butirato.

Além de poder ser utilizada em estudos relacionados à produção de CH_4, a avaliação das concentrações de AGCC no rúmen pode dar indícios de outros aspectos a respeito do metabolismo animal, ressaltando o potencial e a importância deste parâmetro. O acetato está diretamente relacionado aos níveis de gordura no leite; o propionato é o principal precursor da síntese hepática de glicose, molécula utilizada pelo metabolismo energético do sistema nervoso dos ruminantes; os AGCC ramificada, caso do isobutirato, valerato e isovalerato, são oriundos especificamente da desaminação ruminal dos aminoácidos valina, prolina e isoleucina respectivamente, caracterizando assim, o estudo das concentrações destes AGCC, como um meio de se obter informações a respeito da degradabilidade ruminal das proteínas de uma determinada dieta (McDONALD et al., 2011; BHATTA et al., 2013; OH et al., 2015; CASTRO et al., 2016).

2.4.4. Contagem de protozoários ruminais

Apesar de se fazerem presentes no rúmen em número bem inferior às bactérias (10^6 protozoários x 10^{10} bactérias), o maior tamanho dos protozoários faz com que estes se igualem a estas últimas no que diz respeito à biomassa presente no rúmen (JOUANY; USHIDA, 1999; NEWBOLD et al., 2015). Mesmo possuindo grande representatividade dentro da microbiota, a função dos protozoários ainda é controversa e sabe-se que a existência deles não é essencial para o ecossistema ruminal e bem-estar dos animais que os hospedam (NGUYEN et al., 2016).

O uso de animais defaunados, ou seja, animais que tiveram suas populações de protozoários eliminadas por métodos químicos ou físicos permite melhor elucidação a respeito das funções dos protozoários no rúmen. Newbold et al. (2015) fizeram uma meta-análise de diversos estudos utilizando ruminantes defaunados, e os principais achados foram: 1 - A redução da degradabilidade da matéria orgânica na ausência de protozoários, especialmente, fibras; 2 - Diminuição da concentração de $N\text{-}NH_3$ no rúmen devido à diminuição da quebra de proteína microbiana e dietética na ausência de protozoários, fato que pode levar a aumento do fluxo de proteínas para o intestino delgado; 3 - Diminuição na concentração de AGCC, evidenciando a importância dos protozoários na síntese dessas moléculas e na degradação dos alimentos; 4 - Redução em até 11 % na produção de CH_4.

Grande parte das metanogênicas vive em simbiose com os protozoários ruminais, usufruindo a destacada habilidade destes em produzirem hidrogênio (JAYANEGARA; LEIBER; KREUZER, 2012). Devido a esta relação entre metanogênicas e protozoários é que frequentemente se observa a contagem destes micro-organismos em estudos relativos à emissão de CH_4 (BHATTA et al., 2009; HRISTOV et al., 2011; NGUYEN et al., 2016). Protozoários ruminais, como são sensíveis a grandes variações no pH ruminal, não resistindo em ambientes com pH maior que 7,8 ou inferior a 5,0, também podem servir como um bom indicativo de acidose ruminal (NAGARAJA; TITGEMEYER, 2007; FRANZOLIN; DEHORITY, 2010).

2.4.5. Determinação da composição microbiana ruminal por PCR

Como mencionado anteriormente, a digestão da dieta, o correto funcionamento do metabolismo e a produtividade dos animais ruminantes é fruto direto de uma complexa relação simbiótica entre micro-organismos que habitam o rúmen destas espécies

(MORGAVI et al., 2010). A associação de técnicas de cultivo microbiano a modernas técnicas de biologia molecular têm permitido rápido avanço neste campo de pesquisa (METZLER-ZEBELI et al., 2015).

A população microbiana do rúmen é composta, sobretudo por bactérias, fungos, protozoários e *Archaea* metanogênicas, estando estes micro-organismos, sujeitos a fatores externos, tais como mudanças na dieta, frequência de alimentação, idade dos animais, interações específicas com os hospedeiros e até estações do ano e localização geográfica dos animais (KIM; MORRISON; YU, 2011).

O uso do PCR (reação em cadeia da polimerase) quantitativo em tempo real caracteriza-se como ferramenta de biologia molecular com destacada eficiência para se quantificar populações microbianas em amostras de conteúdo ou até mesmo epitélio ruminal, por meio do emprego de diferentes *primers* específicos (MOSONI et al., 2007; WILLIAMS et al., 2009; PETRI et al., 2013; WEIMER, 2015).

Os estudos que se utilizam desta ferramenta têm sido direcionados principalmente a bactérias dos gêneros *Fibrobacter* e *Ruminococcus*, os principais fibrolíticos do rúmen; ao estudo das populações de fungos anaeróbios, que também apresentam atividade fibrolítica; e às metanogênicas, que são foco de atenção principalmente devido à importância do CH_4 nas questões relacionadas à produção sustentável e seguridade alimentar (DENMAN; McSWEENEY, 2006; DENMAN; TOMKINS; McSWEENEY, 2007; MORGAVI et al., 2010).

Avaliando os efeitos de grãos de cevada submetidos a tratamento com ácido lático ou ácido lático e tratamento térmico, sobre as populações microbianas e parâmetros ruminais de vacas holandesas, Metzler-Zebeli et al. (2015) observaram que ambos os tipos de tratamentos sobre os grãos afetaram as populações de fibrolíticas em relação ao grupo controle (grãos de cevada sem nenhum tipo de tratamento), além de aumentarem também a produção de propionato, novamente em relação ao controle.

A respeito dos estudos relacionados à emissão de CH_4, Shi et al. (2014) avaliaram a microbiota de ovinos produtores de altas e baixas concentrações de CH_4. Neste estudo, os autores observaram que apesar das diferenças na produção de CH_4, a abundância e a estrutura das populações de metanogênicas eram semelhantes entre si, estando a diferença na metanogênese atribuída às diferenças na expressão gênica da microbiota dos dois grupos de animais. Resultados como este último mencionado, destacam a complexidade do ecossistema ruminal, sendo indicativo da série de lacunas ainda por serem preenchidas no que diz respeito a esta área do conhecimento.

Referências

ABDALLA, A.L. et al. *In vivo* methane determination in a small chamber system. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, East Melbourne, v. 48, 2008. Presented at 3rd Greenhouse Gases and Animal Agriculture Conference, Christchurch, 2008.

ARMSBY, H. P. Methods of investigation. In: _____. **Principles of animal nutrition**. 3. ed. New York: John Willey and Sons, 1903. cap. 3, p. 59-79.

AUFRÈRE, J. et al. Mixing sainfoin and lucerne to improve the feed value of legumes fed to sheep by the effect of condensed tannins. **Animal**, Cambridge, v. 7, n. 1, p. 82-92, 2013.

BEAUCHEMIN, K. A. et al. Crushed sunflower, flax, or canola seeds in lactating dairy cow diets: Effects of methane production, rumen fermentation, and milk production. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 5, p. 2118-2127, 2009.

BENCHAAR, C.; CHOUINARD, P. Y. Assessment of the potential of cinnamaldehyde, condensed tannins, and saponins to modify milk fatty acid composition of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 7, p. 3392-3396, 2009.

BERTELLI, L. F.; FRANZOLIN, R. Suplementação mineral-proteica com e sem uso de aditivo para bovinos de corte em pastagem tropical. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, Mayaguez, v. 21, n. 4, p. 207-213, 2013.

BEZABIH, M. et al. Chemical composition and in vitro total gas and methane production of forage species from the Mid Rift Valley grasslands of Ethiopia. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 69, n. 4, p. 635-643, 2014.

BHATTA, R. et al. Difference in the nature of tannins on in vitro ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 11, p. 5512-5522, 2009.

BHATTA, R. et al. Methane reduction and energy partitioning in goats fed two concentrations of tannin from *Mimosa* spp. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 151, n. 1, p. 119-128, 2013.

BLUMENTHAL, M. J.; STAPLES, I. B. Origin, evaluation and use of *Macrotyloma* as forage – a review. **Tropical Grasslands**, Brisbane, v. 27, n. 1, p. 16-29, 1993.

BOVAL, M.; DIXON R. M. The importance of grasslands for animal production and other functions: a review on management and methodological progress in the tropics. **Animal**, Cambridge, v. 6, n. 5, p. 748-762, 2012.

CARVALHO, M. M. Fixação biológica como fonte de nitrogênio para pastagens. In: SIMPÓSIO SOBRE CALAGEM E ADUBAÇÃO DE PASTAGENS, 1., 1985, Nova Odessa. **Anais**... Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1986. p. 125-144.

CASTRO, R. D. et al. Lactic acid microbiota identification in water, raw milk, endogenous starter culture, and fresh Minas artisanal cheese from the Campo das Vertentes region of Brazil during the dry and rainy seasons. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 99, n. 8, p. 6086-6096, 2016.

CENCI, F. B. et al. Effects of condensed tannin from *Acacia mearnsii* on sheep infected naturally with gastrointestinal helminthes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 144, n. 1-2, p. 132-137, 2007.

CERRI, C. C. et al. Assessing the carbon footprint of beef cattle in Brazil: a case study with 22 farms in the State of Mato Grosso. **Journal of Cleaner Production**, Oxford, v. 112, n. 4, p. 2593-2600, 2016.

COTTLE, D. J.; NOLAN, J. V.; WIEDEMANN, S. G. Ruminant enteric methane mitigation: a review. **Animal Production Science**, Victoria, v. 51, n. 6, p. 491-514, 2011.

DEMARCHI, J. J. A. A. et al. Effect of seasons on enteric methane emissions from cattle grazing *Urochloa brizantha*. **Journal of Agricultural Science**, Toronto, v. 8, n. 4, p. 1-10, 2016.

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, n. 3, 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, n. 3, p. 313-322, 2007.

ECKARD, R. J.; GRAINGER, C.; DE KLEIN, C. A. M. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: A review. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 130, n. 1-3, p. 47-56, 2010.

EL-ZAIAT, H. M. et al. 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, n. 5, p. 2214-2224, 2014.

EMBRAPA. **Técnica do gás traçador SF_6 para medição de campo do metano ruminal em bovinos**: adaptações para o Brasil. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2004.

EMBRAPA. **Emissões de metano na pecuária**: conceitos, métodos de avaliação e estratégias de mitigação. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2011.

FEITOSA, F. L. F. Semiologia do sistema digestório de ruminantes. In: _____. **Semiologia veterinária**: A arte do diagnóstico. 2. ed. São Paulo, 2008. cap. 5, p. 108-138.

FRANZOLIN, R.; DEHORITY, B. A. The role of pH on the survival of rumen protozoa in steers. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 10, p. 2262-2267, 2010.

FRUTOS, P. et al. Condensed tannin content of several shrub species from a mountain area in northern Spain, and its relationship to various indicators of nutritive value. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 95, n. 3-4, p. 215-226, 2002.

GEMEDA, B. S.; HASSEN, A. Effect of tannin and species variation on *in vitro* digestibility, gas, and methane production of tropical browse plants. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Seoul, v. 28, n. 2, p. 188-199, 2015.

GERBER, P. J. et al. **Tackling climate change through livestock -** A global assessment of emissions and mitigation opportunities. Rome: FAO, 2013. 115 p.

GERDES, L. et al. Introdução de leguminosas em pastagem já estabelecida de capim Aruana em pastejo com ovinos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 46., 2009, Maringá. **Anais**... Maringá: UEM, 2009. p. 1-3.

GETACHEW, G.; SAID, A. N.; SUNDSTOL, F. The effect of forage legume supplementation on digestibility and body weight gain by sheep fed a basal diet of maize stover. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 46, n. 1-2, p. 97-108, 1994.

GILL, M.; SMITH, P.; WILKINSON, J. M. Mitigating climate change: the role of domestic livestock. **Animal**, Cambridge, v. 4, n. 3, p. 323-333, 2010.

GRAINGER, C. et al. Methane emissions from dairy cows measured using the sulfur Hexafluoride (SF_6) tracer and chamber techniques. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 6, p. 2755-2766, 2007.

GRAINGER, C. et al. Supplementation with whole cottonseed causes long-term reduction of methane emissions from lactating dairy cows offered a forage and cereal grain diet. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, n. 6, p. 2612-2619, 2010.

GOEL, G.; MAKKAR, H. P. Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburg, v. 44, n. 4, p. 729-739, 2012.

GUO, Y. et al. Changes in feed intake, nutrient digestion, plasma metabolites, and oxidative stress parameters in dairy cows with subacute ruminal acidosis and its regulation with pelleted beet pulp. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, London, v. 4, n. 1, p. 31-41, 2013.

HAMMOND, K. J. et al. Effects of feeding fresh white clover (*Trifolium repens*) or perennial ryegrass (*Lolium perenne*) on enteric methane emissions from sheep. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam v. 166-167, p. 398-404, 2011.

HAMMOND, K. J. et al. Methane emissions from cattle: estimates from short-term measurements using a Green Feed system compared with measurements obtained using respiration chambers or sulphur hexafluoride tracer. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 203, p. 41-52, 2015.

HAMMOND, K. J. et al. Review of current in vivo measurement techniques for quantifying enteric methane emission from ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 219, p. 13-30, 2016.

HOSTE, H. et al. Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 186, n. 1-2, p. 18-27, 2012.

HRISTOV, A. N. et al. Effects of lauric and myristic acids on ruminal fermentation, production, and milk fatty acid composition in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, n. 1, p. 382-395, 2011.

HÜNERBERG, M. et al. Impact of ruminal pH on enteric methane emissions. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 93, n. 4, p. 1760-1766, 2015.

JAYANEGARA, A.; LEIBER, F.; KREUZER, M. Meta-analysis of the relationship between dietary tannin level and methane formation in ruminants from *in vivo* and *in vitro* experiments. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 96, n. 3, p. 365-375, 2012.

JANSSEN, P. H. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 160, n. 1-2, p. 1-22, 2010.

JOHNSON, K. et al. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a SF_6 tracer technique. **Environmental Science and Technology**, Washington, DC, v. 28, n. 2, p. 359-362, 1994.

JOUANY, J. P.; USHIDA, K. The role of protozoa in feed digestion. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Seoul, v. 12, n. 1, p. 113-128, 1999.

KATIKI, L. M. et al. Anthelmintic effect of plant extracts containing condensed and hydrolyzable tannins on *Caenorhabditis elegans*, and their antioxidant capacity. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 192, n. 1-3, p. 218-227, 2013.

KAWAS, J. R.; ANDRADE-MONTEMAYOR, H.; LU, C.D. Strategic nutrient supplementation of free-ranging goats. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 89, n. 2-3, p. 234-243, 2010.

KIM, M; MORRISON, M; YU, Z. Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 76, n. 1, p. 49-63, 2011.

KLEEN, J. L. et al. Subacute ruminal acidosis in Dutch dairy herds. **The Veterinary Record**, London, v. 164, n. 22, p. 681-684, 2009.

LENG, R. A. Factors affecting the utilization of ‘poor-quality’ forages by ruminants particularly under tropical conditions. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 3, n. 1, p. 277-303, 1990.

LOUVANDINI, H. et al. Plantas taniníferas na nutrição de ovinos. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 18, n. 4, p. 176-181, 2011. Supl. 4.

MADSEN, J. et al. Methane and carbon dioxide ration in excreted air for quantification of production from ruminants. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 129, n. 1-3, p. 223-227, 2010.

MAKKAR, H. P. S. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 49, n. 3, p. 241-256, 2003.

MANOLARAKIS, F. et al. Anthelmintic activity of some Mediterranean browse plants against parasitic nematodes. **Parasitology**, Cambridge, v. 137, n. 4, p. 685-696, 2010.

MARTIN, C.; MORGAVI, D. P.; DOREAU, M. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. **Animal**, Cambridge, v. 4, n.3, p. 351-365, 2010.

MARTIN, C. et al. Effect of release rate of the SF_6 tracer on methane emission estimates based on ruminal and breath gas samples. **Animal**, Cambridge, v. 6, n. 3, p. 518-525, 2012.

McDONALD, P. et al. **Animal nutrition**. Harlow: Pearson, 2011. 692 p.

METZLER-ZEBELI, B. U. et al. Microbial populations and fermentation profiles in rumen liquid and solids of Holstein cows respond differently to dietary barley processing. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 119, n. 6, p. 1502-1514, 2015.

MIN, B. R. et al. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 106, n. 1-4, p. 3-19, 2003.

MORALES, R; UNGERFELD, E. M. Use of tannins to improve fatty acids profile of meat and milk quality in ruminants: A review. **Chilean Journal of Agricultural Research**, Chillán, v. 75, n. 2, p. 239-248, 2015.

MOREIRA, G. D. et al. Tropical tanniniferous legumes used as an option to mitigate sheep enteric methane emission. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburg, v. 45, n. 3, p. 879-882, 2013.

MORGANTE, M. et al. Subacute rumen acidosis in lactating cows: an investigation in intensive Italian dairy herds. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 91, n. 5-6, p. 226-234, 2007.

MORGAVI, D. P. et al. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. **Animal**, Cambridge, v. 4, n. 7, p. 1024-1036, 2010.

MORRIS, J. B. *Macrotyloma axillare* and *M. uniflorum*: descriptor analysis, anthocyanin indexes, and potential uses. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Amsterdam, v. 55, n. 1, p. 5-8, 2008.

MOSONI, P. et al. Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: effect of a yeast additive. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 103, n. 6, p. 2676-2685, 2007.

MUETZEL, S.; BECKER, K. Extractability and biological activity of tannins from various tree leaves determined by chemical and biological assays as affected by drying procedure. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 125, n. 1-2, p. 139-149, 2006.

MURRAY, R. M.; BRYANT, A. M.; LENG, R. A. Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 36, n. 1, p. 1-14, 1976.

NAGARAJA, T. G.; TITGEMEYER, E. C. Ruminal Acidosis in Beef Cattle: The Current Microbiological and Nutritional Outlook. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, p. 17-38, 2010. Suppl.

NEWBOLD, C. J. et al. The role of ciliate protozoa in the rumen. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 6, p.1-10, 2015.

NGUYEN, S. H. et al. Methane emissions, ruminal characteristics and nitrogen utilization changes after refaunation of protozoa-free sheep. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 144, n. p. 48-55, 2016.

NEW ZEALAND. Ministry for Primary Industries. **Guidelines for use of sulphur hexafluoride (SF_6) tracer technique to measure enteric methane emissions from ruminants**. Wellington, 2014a. 166 p.

NEW ZEALAND. Ministry of Agriculture and Forestry. **Technical Manual on Respiration Chamber Designs**. Wellington, 2014b. 119 p.

OH, Y. K. et al. Responses of Blood Glucose, Insulin, Glucagon, and Fatty Acids to Intraruminal Infusion of Propionate in Hanwoo. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Seoul, v. 28, n. 2, p. 200-206, 2015.

PARIS, W. et al. Produção de novilhas de corte em pastagem de Coastcross-1 consorciada com *Arachis pintoi* com e sem adubação nitrogenada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, n. 1, p. 122-129, 2009.

PAULINO, V. T. et al. Retrospectiva do uso de leguminosas forrageiras. **PubVet**, Maringá, v. 2, n. 40, p. 1-37, 2008.

PETRI, R. M. et al. Changes in the rumen epimural bacterial diversity of beef cattle as affected by diet and induced ruminal acidosis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 79, n. 12, p. 3744-3755, 2013.

PINARES-PATIÑO, C. S. et al. Measurement of methane emission from sheep by the sulphur hexafluoride tracer technique and by the calorimetric chamber: failure and success. **Animal**, Cambridge, v. 2, n. 1, p. 141-148, 2008.

PIMENTEL, P. G. et al. Parâmetros da fermentação ruminal e concentração de derivados de purina de vacas em lactação alimentadas com castanha de caju. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 64, n. 4, p. 959-966, 2012.

PIRHOFER-WALZL, K. et al. Nitrogen transfer from forage legumes to nine neighbouring plants in a multi-species grassland. **Plant and Soil**, The Hague, v. 350, n. 1, p. 350-671, 2012.

RAMIREZ-RESTREPO, C. A. et al. Use of *Lotus corniculatus* containing condensed tannins to increase reproductive efficiency in ewes under commercial dryland farming conditions. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 121, n. 1-2, p. 23-43, 2005.

RICCI, P. et al. Evaluation of the laser methane detector to estimate methane emissions from ewes and steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 92, n. 11, p. 5239-5250, 2014.

ROBINS, C.; BROOKER, J. D. The effects of *Acacia aneura* feeding on abomasal and intestinal structure and function in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 121, n. 1-2, p. 205-215, 2005.

RODRÍGUEZ, R. et al. Biological effect of tannins from different vegetal origin on microbial and fermentation traits in vitro. **Animal Production Science**, Victoria, v. 54, n. 8, p. 1039-1046, 2014.

RUFINO, M. C. et al. Nitrogen cycling efficiencies through resource-poor African crop–livestock systems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 112, n. 4, p. 261-282, 2006.

SAMPAIO, C. B. et al. Intake and digestibility in cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogenous compounds. **Topical Animal Health and Production**, Edinburg, v. 42, n. 10, p. 1471-1479, 2010.

SCHIPANSKI, M. E.; DRINKWATER, L. E. Nitrogen fixation in annual and perennial legume-grass mixtures across a fertility gradient. **Plant and Soil**, Haia, v. 357, n. 1, p.147-159, 2012.

SCHWARM, A. et al. Methane emission, digestive characteristics and faecal archaeol in heifers fed diets based on silage from brown midrib maize as compared to conventional maize. **Archives of Animal Nutrition**, Abingdon, v. 69, n. 3, p. 159-176, 2015.

SEJIAN, V. et al. Measurement and prediction of enteric methane emission. **International Journal of Biometeorology**, New York, v. 55, n. 1, p. 1-16, 2011.

SHI, W. et al. Methane yield phenotypes linked to differential gene expression in the sheep rumen microbiome. **Genome Research**, New York, v. 24, n. 9, p. 1517-1525, 2014.

SHIBATA, M.; TERADA, F. Factors affecting methane production and mitigation in ruminants. **Animal Science Journal**, Tokyo, v. 81, n. 1, p. 2-10, 2010.

SILANIKOVE, N.; PEREVOLOTSKY, A.; PROVENZA, F. D. Use of tannin-binding chamicals to assay for tannins and their negative postingestive effects in ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 91, n. 1-2, p. 69-81, 2001.

SOLTAN, Y. A. et al. Contribution of condensed tannins and mimosine to the methane mitigation caused by feeding *Leucaena leucocephala*. **Archives of Animal Nutrition**, Abingdon, v. 67, n. 3, p. 169-184, 2013.

TIEMANN, T. et al. Effect of season, soil type and fertilizer on the biomass production and chemical composition of five tropical shrub legumes with forage potential. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 64, n. 3, p. 255-264, 2009.

USEPA. **Inventory of U.S. Greenhouse Gas Emissions and Sinks**: 1990 - 2012. Washington, DC, 2014.

VALARINI, M. J.; POSSENTI, R. A. Nutritive value of a range of tropical forage legumes. **Tropical Grasslands**, Brisbane, v. 40, n. 3, p.183-187, 2006.

VAN ZIJDERVELD, S. M. et al. Nitrate and sulfate: Effective alternative hydrogen sinks for mitigation of ruminal methane production in sheep. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, n. 12, p. 5856-5866, 2010.

VASTA, V. et al. Metabolic fate of fatty acids involved in ruminal biohydrogenation in sheep fed concentrate or herbage with or without tannins. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 8, p. 2674-2684, 2009.

VEASEY, E. A. et al. Avaliação de caracteres morfológicos, fenológicos e agronômicos em leguminosas forrageiras tropicais visando a produção de sementes. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 56, n. 2, p. 109-125, 1999.

VITOR, C. et al. Produção de matéria seca e valor nutritivo de pastagem de capim-elefante sob irrigação e adubação nitrogenada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, n. 3, p. 435-442, 2009.

WAGHORN, G. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production - Progress and challenges. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 147, n. 1-3, p. 116-139, 2008.

WANG, Y. et al. The effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* on plasma metabolism of methionine, cystine and inorganic sulphate by sheep. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 72, n. 6, p. 923-935, 1994.

WANG, Y. et al. Comparison of alfalfa and mixed alfalfa-sainfoinpastures for grazing cattle: Effects on incidence of bloat, ruminal fermentation, and feed intake. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 86, n. 3, p. 383-392, 2006.

WEDLOCK, D. N. et al. Progress in the development of vaccines against rumen methanogens. **Animal**, Cambridge, v. 7, p. 244-252, 2013. Suppl. 2.

WEIMER, P. J. Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: implications for engineering improved ruminal fermentations. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 6, p. 1-16, 2015.

WILLIAMS, Y. J. et al. A vaccine against rumen methanogens can alter the composition of archaeal populations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 75, n. 7, p. 1860-1866, 2009.

WOODWARD, S. L.; WAGHORN, G. C.; LABOYRIE, P. G. Condensed tannins in birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) reduce methane emissions from dairy cows. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, Hamilton, v. 64, p. 160-164, 2004.

ZHANG, L. et al. Immunization against rumen methanogenesis by vaccination with a new recombinant protein. **PloS One**, San Francisco, v. 10, n. 10, p. 1-13, 2015.

3. AVALIAÇÃO NUTRICIONAL DA LEGUMINOSA *MACROTYLOMA AXILLARE* EM BIOENSAIOS *IN VITRO* E *IN VIVO* COM OVINOS

Resumo:
Objetivou-se com o presente estudo avaliar os efeitos dos taninos da leguminosa tropical macrotiloma (*Macrotyloma axillare* - NO 279) sobre a produção de gases e demais parâmetros de fermentação ruminal *in vitro*, por meio de bioensaio com substratos incubados com e sem polietilenoglicol (PEG), e, em experimento *in vivo*, objetivou-se avaliar a digestibilidade aparente de nutrientes da dieta e parâmetros ruminais de cordeiras Santa Inês alimentadas com feno de gramínea tropical e suplementadas com feno da leguminosa macrotiloma. Para o experimento *in vitro*, amostras de 0,5 g de feno de macrotiloma moídas a 1 mm foram colocadas em garrafas de 160 mL e incubadas em sistema semi-automático por 24 horas, a 39 ºC, com líquido ruminal coletado a partir de ovinos doadores de inóculos. As amostras foram incubadas tanto na presença como na ausência de PEG. Nos tempos de 4, 8, 12 e 24 horas após o início da incubação, mediu-se a pressão interna de cada garrafa para se calcular o volume de gás produzido; durante estas medições, foram amostrados 2 mL de cada garrafa para mensuração do metano (CH_4) produzido. Ao final da fermentação foram mensurados no conteúdo de todas as garrafas, os teores de nitrogênio amoniacal ($N\text{-}NH_3$) e de ácidos graxos de cadeia curta. Já *in vivo*, por período experimental de 17 dias (12 de adaptação; 5 de coletas), foram utilizadas 12 cordeiras Santa Inês, não castradas, com 8 a 9 meses de idade e peso corporal médio de 24,95 $\pm$ 1,8 kg. Foram formados 2 grupos de tratamentos: dieta exclusiva de feno picado de capim-aruana (*Panicum maximum* cv. Aruana) (controle - CON); e feno de capim-aruana suplementado com feno picado da leguminosa macrotiloma (macrotiloma - MAC). Os animais permaneceram durante 5 dias em gaiolas metabólicas para ensaio de digestibilidade e ao final foram coletadas amostras de líquido ruminal dos animais para determinação dos teores de $N\text{-}NH_3$ e contagem de protozoários ruminais. Trabalhando *in vitro*, observou-se maior produção total de gases e de CH_4 nas amostras com PEG ($p < 0,05$). Não se observou diferença para os demais parâmetros ($p > 0,05$). Já *in vivo*, verificou-se maior consumo e digestibilidade aparente ($p < 0,05$) apenas para proteína bruta da dieta dos animais alimentados com MAC em relação ao CON. Não foram verificados efeitos sobre os demais parâmetros de consumo e digestibilidade avaliados ($p > 0,05$). Para os parâmetros ruminais, observaram-se maior produção de $N\text{-}NH_3$ e menor contagem de protozoários nos animais do grupo MAC quando comparado aos animais do grupo CON ($p < 0,05$). Os resultados observados em ambos os ensaios ressaltaram o potencial da macrotiloma como opção de forragem a ser utilizada na alimentação de ruminantes.

Palavras-chave: digestibilidade, fermentação, metano, protozoários, taninos.

Nutritional evaluation of the legume *Macrotyloma axillare* by using *in vitro* and *in vivo* bioassays with sheep

Abstract:
The aim of the present study was to evaluate the effects of tannins from the tropical legume macrotiloma (*Macrotyloma axillare* - NO 279) on the gas production and ruminal fermentation parameters by performing an *in vitro* bioassay, with samples incubated with and without polyethylene glycol (PEG) and in an *in vivo* experiment, the objective was to determine apparent digestibility of dietary nutrients and ruminal fermentation parameters of Santa Inês ewes fed tropical grass hay supplemented with macrotiloma hay. For the *in vitro* assay, 0.5 g samples of macrotiloma hay ground at 1 mm were placed in 160 mL glass bottles and incubated for 24 hours at 39 ºC in a semi-automatic system with rumen fluid collected from Santa Inês rams used as inoculum donnors. Samples were incubated both with and without PEG. At the times of 4, 8, 12 and 24 hours after incubation started, internal pressure of each bottle was measured for calculating the volume of gases produced; during these measurements, 2 mL gases samples were collected from each bottle in order to measure the methane (CH_4) production. At the end of the incubation, ammoniacal nitrogen (NH_3-N) and short chain fatty acids (SCFA) concentrations were measured in the content of the bottles. For the *in vivo* assay, in 17 days experimental period (12 for adaption and 5 for collection), 12 intact 8-9 months old Santa Inês ewes, with average body weight of 24.95 $\pm$ 1.8 kg were used. The ewes were divided into 2 treatment groups: exclusive chopped aruana grass hay diet (control - CON); and aruana grass hay supplemented with chopped macrotiloma hay (macrotiloma - MAC). The animals were kept for 5 consecutive days in metabolic cages for the digestibility assay and at the end of this period, samples of rumen fluid were collected from each ewe for determining NH_3-N concentration and performing protozoa counting. At the *in vitro* assay, increased total gas and CH_4 production were observed in the samples incubated with PEG ($p < 0.05$). No differences were observed for the other parameters ($p > 0.05$). At the *in vivo* experiment, it was observed increased intake and apparent digestibility for the crude protein of the animals fed MAC, when compared with CON. No further effects were observed for parameters regarding intake and digestibility of other dietary nutrients ($p > 0.05$). For the ruminal parameters, increased NH_3-N production and reduced protozoa counting were observed in the animals fed MAC when compared with those fed CON ($p < 0.05$). The results observed highlighted the potential of macrotiloma for being used as a ruminant feed.

Keywords: digestibility, fermentation, methane, polyethylene glycol, protozoa, tannins

3.1. Introdução

As plantas forrageiras constituem o principal alimento para ruminantes em diversos locais do mundo. Em países tropicais, como é o caso do Brasil, observa-se oscilação da disponibilidade e qualidade das forrageiras em função de, principalmente, fatores como a disponibilidade de nutrientes no solo e regime de chuvas, verificando-se redução da produção e qualidade das pastagens em períodos de estiagem, prejudicando a produtividade do sistema (BERTELLI; FRANZOLIN, 2013; BEZABIH et al., 2014)

Predominam nas pastagens tropicais, gramíneas de metabolismo fotossintético C4, as quais durante os períodos de seca apresentam em sua composição maiores teores de parede celular e diminuição na proteína bruta (PB), podendo muitas vezes apresentar valores inferiores a 70 g/kg, considerado como teor de PB mínimo para o funcionamento adequado do rúmen. Nestes casos, observa-se também a queda do consumo voluntário e digestibilidade destas plantas (SAMPAIO et al., 2010; ARCHIMÈDE et al., 2011).

Neste cenário de oscilação da produtividade das gramíneas, as leguminosas tropicais se destacam como uma importante fonte de nutrientes para ruminantes, podendo ser pastejadas ou oferecidas no cocho. Adaptadas a uma ampla diversidade de climas e regiões, estas plantas podem ainda aumentar a fertilidade dos solos, devido à capacidade das mesmas em fixarem nitrogênio, disponibilizando este elemento no solo não só para si mesmas, mas como também para outras plantas a seu redor (VALARINI; POSSENTI, 2006; TIEMANN et al., 2009; PIRHOFER-WALZL et al., 2012).

Frequentemente encontrados nas leguminosas, os taninos são metabólitos secundários destas plantas e quimicamente, constituem-se em compostos polifenólicos de variáveis estruturas e pesos moleculares, caracterizando-se pela capacidade de se ligarem a polímeros como proteínas e carboidratos (JAYANEGARA; LEIBER; KREUZER, 2012). Com base na estrutura molecular destes compostos, os taninos são definidos em duas classes, hidrolisáveis e condensados. Seus efeitos no metabolismo de ruminantes variam de acordo não somente com a concentração dos mesmos na dieta, mas também de acordo com a origem e natureza química destas moléculas (RODRÍGUEZ et al., 2014).

Para a nutrição de ruminantes, os taninos são considerados como capazes de gerarem efeitos negativos, como a redução da palatabilidade e digestibilidade da dieta assim como efeitos positivos, uma vez que estando presentes na dieta em concentrações em torno de 20 a 40 g/kg da matéria seca (MS), podem ocasionar a melhor absorção de aminoácidos provenientes dos alimentos consumidos ou até mesmo redução da produção de metano (CH_4)

durante a fermentação ruminal (LOUVANDINI et al., 2011; JAYANEGARA; LEIBER; KREUZER, 2012).

A espécie *Macrotyloma axillare*, é uma leguminosa tropical com potencial para uso na nutrição de ruminantes, tendo se destacado como suplementação à dieta de ovinos e em consórcio com capim-aruana, apresentando nesta última situação, maior produção de sua massa de forragem e maior aumento na PB da gramínea quando comparada a outras leguminosas (GETACHEW; SAID; SUNDSTOL, 1994; GERDES et al., 2009). De acordo com Rufino et al. (2006), os baixos teores de taninos desta planta constituem um fator que pode contribuir para que não sejam observados efeitos antinutricionais destas molécula.

Bioensaios *in vitro* utilizando agentes que se ligam aos taninos, como o polietilenoglicol (PEG), anulando a atividade biológica destas moléculas, representam valiosa ferramenta para o estudo dos efeitos dos taninos sobre diversos parâmetros de fermentação ruminal (MAKKAR; BLÜMMEL; BECKER, 1995; GOEL; MAKKAR, 2012; RODRÍGUEZ et al., 2014).

Neste sentido, foram avaliados no presente estudo os efeitos dos taninos da leguminosa macrotiloma (*Macrotyloma axillare* - NO 279 - banco ativo de germoplasma do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa - SP) sobre a produção de gases e demais parâmetros de fermentação ruminal *in vitro*, por meio de bioensaio com substratos incubados com e sem PEG. Realizou-se também experimento *in vivo* com objetivo de avaliar a digestibilidade aparente de nutrientes da dieta e parâmetros de fermentação ruminal em cordeiras Santa Inês alimentadas com feno de gramínea tropical e suplementadas com feno de macrotiloma.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Local

Todas as atividades descritas no presente estudo foram realizadas nas dependências do Laboratório de Nutrição Animal do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, da Universidade de São Paulo, localizado no município de Piracicaba, São Paulo (LANA-CENA/USP). Os procedimentos realizados envolvendo o uso de animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – CEUA-ESALQ/USP (Protocolo n. 005061).

3.2.2. Bioensaio *in vitro*

3.2.2.1. Planta utilizada

O substrato utilizado neste ensaio foi feno da leguminosa macrotiloma, plantada, coletada e enfenada no Instituto de Zootecnia (IZ), da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento (SAA), localizado na cidade de Nova Odessa-SP. A produção do feno da macrotiloma foi realizada à sombra, empregando-se período de secagem de 10 dias, com o material sendo revirado três vezes/dia, diariamente, durante os meses de junho e julho de 2014.

Logo após o feno estar pronto, parte do material foi amostrada e triturada a 1 mm em moinho tipo Willey, para se determinar os teores de matéria seca (MS), PB, extrato etéreo (EE), fibras em detergente neutro (FDN), fibras em detergente ácido (FDA) e matéria mineral (MM), de acordo com procedimentos da AOAC (2011). Também foram determinados os teores de compostos fenólicos totais, taninos totais e taninos condensados, de acordo com Makkar (2000) (Tabela 3.1).

3.2.2.2. Incubação *in vitro*

Para esta etapa do ensaio, foi coletado líquido ruminal de três ovinos Santa Inês, machos, castrados, com cânula ruminal e peso corporal médio de 65,0 $\pm$ 2,3 kg. Os animais foram alimentados com dieta exclusiva de feno de gramínea tropical e receberam água e sal mineral, todos disponibilizados *ad libitum*.

O ensaio de produção de gases *in vitro* foi conduzido de acordo com técnica descrita por Theodorou et al. (1994) e Mauricio et al. (1999), com adaptações de Bueno et al. (2005) e Longo et al. (2006). Para o preparo dos substratos, o feno de macrotiloma foi moído a 1 mm em moinho tipo Willey e então amostras de 0,5 g deste material foram transferidas para garrafas de vidro de 160 mL, juntamente com 50 mL de meio de incubação (meio tampão de Menke) e 25 mL de inóculo.

As amostras de feno de macrotiloma foram incubadas com e sem PEG (0,5 g), com o intuito de se observar os efeitos dos taninos sobre os parâmetros de fermentação ruminal avaliados (MAKKAR; BLÜMMEL; BECKER, 1995). Para a incubação, foram utilizadas tanto a fração líquida, como a fração sólida do conteúdo ruminal dos animais no momento do preparo dos inóculos, na proporção de 50:50. Utilizou-se o conteúdo ruminal oriundo de 2 animais para o preparo de cada um dos inóculos, totalizando 3 diferentes

combinações de animais, que formaram 3 diferentes inóculos. Para cada inóculo, foram incubadas duas garrafas por tratamento (2 com PEG; 2 sem PEG), além de garrafas branco, sem substrato e garrafas com amostra padrão, para controle interno do laboratório.

As garrafas foram colocadas em estufa de ventilação forçada por 24 horas, em temperatura de 39 ºC, e nos tempos de 4, 8, 12 e 24 horas após o início da incubação, foi medida a pressão interna de cada garrafa utilizando-se um transdutor de pressão e um data logger (Pressure Press 800, LANA , CENA /USP, Piracicaba, SP , Brasil). O volume total de gás produzido em cada garrafa foi determinado de acordo com a equação: V = (7,365 * P) onde: V= volume de gás (mL) e P = pressão mensurada (psi) (ARAUJO et al., 2011). A produção total de gases após 24 horas de fermentação foi determinada somando-se os volumes produzidos em cada mensuração de pressão das garrafas.

Durante os momentos de mensuração da pressão, foram coletadas amostras de 2,5 mL dos gases produzido em tubos Vacuntainer ®, para posterior medição do teor de metano (CH_4). A concentração de CH_4 nas amostras coletadas foi determinada em cromatógrafo a gás Shimadzu ® GC-2010. Após as coletas, a pressão interna de cada garrafa era aliviada, o conteúdo homogeneizado manualmente e estas retornavam para a estufa. A produção total de CH_4 após 24 horas de fermentação tabém foi determinada somando-se os volumes produzidos nos intervalos entre cada período de mensuração de pressão das garrafas

Após o fim da incubação, as garrafas foram colocadas em água em temperatura de - 4 ºC para interrupção da fermentação e as amostras sem adição de PEG foram tratadas com 70 mL de solução de FDN, por período de quatro horas, em temperatura de 105 ºC e depois transferidas e filtradas em cadinhos sinterizados, previamente pesados e lavados com água destilada quente. Para se determinar a degradabilidade verdadeira da matéria orgânica (DVMO), os resíduos retidos nos cadinhos foram queimados em mufla a 600°C.

A determinação da DVMO restringiu-se somente às amostras que foram incubadas sem a presença de PEG, uma vez que este último, em contato com os taninos, formam complexos que podem ser recuperados no material não degradado após tratamento com solução de FDN e filtragem nos cadinhos sinterizados, subestimando assim a degradabilidade do substrato (MAKKAR; BLÜMMEL; BECKER, 1995; RODRÍGUEZ et al., 2014).

A relação entre a matéria orgânica degradada (g) 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).

Mensuraram-se no conteúdo de todas as garrafas, independentemente da presença de PEG, os valores de nitrogênio amoniacal ($N\text{-}NH_3$) de acordo com Preston (1995); o pH, em

um phmetro modelo Tecnal® TEC-2; e o teor de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), empregando-se metodologia de Palmquist e Conrad (1971) (adaptado) e Nocek, Hart e Polan (1987).

3.2.3. Ensaio de digestibilidade aparente dos nutrientes

3.2.3.1. Animais, tratamentos e manejo

Durante período experimental de 17 dias, 12 dias de adaptação e 5 dias de coletas, foram utilizadas 12 cordeiras Santa Inês, não castradas, com peso corporal médio de 24,95 $\pm$ 1,8 kg com oito a nove meses de idade. Os animais foram inicialmente alocados em baias coletivas para o início do período de adaptação às dietas e, após 10 dias, foram colocados em gaiolas para estudo de metabolismo, sendo respeitados 2 dias de adaptação às gaiolas antes de serem iniciadas as coletas. Foram formados dois grupos de tratamento (seis animais/tratamento) de acordo com a dieta fornecida:

- Controle (CON) - feno picado de capim-aruana (*Panicum maximum* cv. Aruana) *ad libitum*;
- Macrotiloma (MAC) - feno picado de capim-aruana *ad libitum* e suplementação com feno picado de macrotiloma.

A dieta foi fornecida duas vezes ao dia, período da manhã e período da tarde, com o intuito de se obter consumo médio de matéria seca (CMS) de 3 % em relação ao peso corporal dos animais e 10 % de sobras em relação ao oferecido. No caso do tratamento MAC, a proporção em que os fenos de capim-aruana e macrotiloma foram oferecidos foi de 75:25. No período de adaptação, assim como no período de coletas, água e sal mineral foram disponibilizados *ad libitum*.

3.2.3.2. Digestibilidade aparente

As sobras e as fezes excretadas foram recolhidas e pesadas diariamente durante o período de coletas e uma amostra representativa de 10 % de cada um destes materiais foi armazenada em refrigeração (-20 ºC). As amostras de sobras e fezes foram descongeladas, secas em estufa de ventilação forçada a 60 ºC por período de cinco dias, moídas a 1,0 mm em

moinho tipo Willey e encaminhadas para análise bromatológica a fim de se determinar os teores MS, PB, FDN, FDA e matéria mineral MM de acordo com procedimentos da AOAC (2011). A análise bromatológica dos alimentos ofertados foi realizada antes do início deste experimento (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Composição bromatológica das forragens utilizadas nos ensaios (valores expressos com base na matéria seca). No bioensaio *in vitro*, utilizou-se somente o feno de macrotiloma

Parâmetro avaliado	Feno de capim-aruana	Feno de macrotiloma
Matéria seca (g/kg)[1]	953,85	873,87
Proteína bruta (g/kg)	91,10	154,02
Extrato etéreo (g/kg)	24,15	30,18
Fibra em detergente neutro (g/kg)	731,06	626,58
Fibra em detergente ácido (g/kg)	456,10	446,36
Matéria mineral (g/kg)	61,75	77,65
Fenóis totais [2,3]	-	29,64
Taninos totais [2,3]	-	23,23
Taninos condensados [2,4]	-	2,14

[1] - Análises realizadas de acordo com AOAC, 2011.
[2] - Análises realizadas de acordo com Makkar, 2000.
[3] - Valores expressos em equivalente grama de ácido tânico / kg de matéria seca.
[4] - Valores expressos em equivalente grama de leucocianidina / kg de matéria seca.

A digestibilidade aparente dos nutrientes das dietas foi calculada de acordo com a equação:

Digestibilidade aparente de X (%) = (X consumido – X excretado) / X consumido *100. Onde X = nutriente avaliado.

3.2.3.3. Parâmetros de fermentação ruminal

Ao fim do último dia de coletas, usando-se uma sonda esofágica, foram coletadas amostras de líquido ruminal das cordeiras respeitando-se intervalo de três a quatro horas após o fornecimento das dietas às mesmas. As amostras de líquido ruminal foram utilizadas para determinação da concentração N-NH_3 e contagem de protozoários seguindo metodologias descritas por Preston (1995) e Dehority; Damron e McLaren (1983) respectivamente. Para as análises de N-NH_3, as amostras foram armazenadas em refrigerador, em temperatura de -20 ºC, e para a contagem de protozoários, 2 mL das amostras de líquido ruminal foram

diluídos em 4 mL de solução a base de verde de metila e formol salino (M.F.S.) e mantidas em temperatura ambiente, ao abrigo da luz.

3.2.4. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o programa SAS ® v. 9.4 (Analysis System Institute, Cary NC, USA). Os dados coletados no bioensaio *in vitro* foram submetidos à análise de variância por meio do proc MIXED, considerando a adição de PEG como efeito fixo e os inóculos como efeito aleatório. Foi testada a interação entre os inóculos e tratamentos (presença ou ausência de PEG). Já no caso do ensaio de digestibilidade, os dados foram analisados por meio de análise de variância utilizando-se o proc GLM e as médias obtidas foram comparadas por meio do teste de Tukey. O nível de significância adotado para todas as análises foi de 5 %.

3.3. Resultados

3.3.1. Bioensaio *in vitro*

A adição de PEG aos substratos utilizados na incubação *in vitro* exerceu efeito sobre a produção total de gases (PTG) e a produção de CH_4 em relação à matéria seca incubada (CH_4 mL/g MS) (Tabela 3.2). Em ambos os casos, as amostras sem PEG apresentaram menores ($p < 0,05$) valores de PTG e CH_4 (117,73 e 5,55 mL/g MS respectivamente), quando comparadas às amostras com PEG (125,57 e 7,82 mL g MS para PTG e CH_4 respectivamente). A adição de PEG não exerceu efeito sobre a eficiência da fermentação ($p > 0,05$), parâmetro que se refere à proporção de CH_4 produzido em relação à PTG, no entanto, verificou-se tendência ($p < 0,10$) das amostras com PEG apresentarem maior produção de CH_4 em relação à PTG quando comparadas às amostras sem PEG.

Para a DVMO e parâmetros relacionados verificados nas amostras sem adição de PEG, observaram-se os seguintes resultados: DVMO: 474,25±149,46 g/kg; G/MOD (Produção de gases em relação à matéria orgânica degradada): 55,45±16,01 mL/g; CH_4/MOD (Produção de metano em relação à matéria orgânica degradada): 2,44±0,82 mL/g; FDND (Degradabilidade da fibra em detergente neutro): 248,64±88,23 g/kg; G/FDND (Produção de gases em relação à fibra em detergente neutro degradada): 28,72±23,85 mL/g; CH_4/FDND

(Produção de metano em relação à fibra em detergente neutro degradada): 0,94±0,51 mL/g; e FP (Fator de partição): 1,74±0,61.

Observando-se os resultados referentes às determinações de $N\text{-}NH_3$, pH e AGCC, também não se observou efeito da adição de PEG nos substratos ($p > 0,05$) (Tabela 3.2). Em nenhum dos dados avaliados neste ensaio observou-se interação entre tratamento (presença ou ausência de PEG) e inóculos ($p > 0,05$).

Tabela 3.2 - Efeito da ausência (-) ou presença (+) de PEG em substratos de feno de macrotiloma sobre parâmetros de produção de gases e fermentação ruminal *in vitro*

Parâmetro	PEG		Incremento (%) [2]	EPM	Valor de "p"
	(-)	(+)			
PTG (mL/g MS) [1]	117,73	125,57	6,65	3,00	0,04
CH_4 (mL/g MS)	5,55	7,82	41,02	0,90	0,04
Eficiência (%)	4,72	6,22	-	0,53	0,09
$N\text{-}NH_3$ (mg/dL)	12,75	11,61	-	1,79	n.s. [3]
pH	6,85	6,89	-	0,03	n.s.
AGCC					
Total (mmol/L)	47,16	48,11	-	0,55	n.s.
Acetato (%)	75,56	75,77	-	0,21	n.s.
Propionato (%)	15,56	15,48	-	0,10	n.s.
Butirato (%)	5,97	5,84	-	0,09	n.s.
Valerato (%)	1,00	1,02	-	0,02	n.s.
Isobutirato (%)	0,44	0,42	-	0,01	n.s.
Isovalerato (%)	1,48	1,47	-	0,02	n.s.
Acetato/Propionato	4,86	4,90	-	0,04	n.s.

[1] - PTG - Produção total de gases em relação à matéria seca incubada; CH_4/MS - Produção de metano em relação à matéria seca incubada; Eficiência - Percentagem (%) de CH_4 produzido em relação à PTG; $N\text{-}NH_3$ - Nitrogênio amoniacal; AGCC - Ácidos graxos de cadeia curta.
[2] - Incremento - Aumento (%) na produção de gás decorrente do acréscimo de PEG ao substrato; EPM - Erro padrão da média.
[3] - n.s. - Não significativo ($p > 0,05$).

3.3.2. Ensaio de digestibilidade aparente dos nutrientes

Avaliando o consumo de nutrientes pelos animais (Tabela 3.3), observou-se diferença ($p < 0,05$) no consumo de PB, com os animais suplementados com macrotiloma consumindo 86,88 g/dia, enquanto os animais sem suplementação consumiram 74,92 g/dia. Não se observou diferença entre os tratamentos no CMS e demais nutrientes avaliados ($p > 0,05$).

Foi verificada influência dos tratamentos utilizados somente sobre a digestibilidade aparente da PB, com as cordeiras alimentadas com MAC apresentando maior digestibilidade

deste nutriente quando comparadas às cordeiras do tratamento CON ($p < 0,05$) (Tabela 3.4). Para o restante dos nutrientes, não se observou efeito sobre a digestibilidade ($p > 0,05$).

Já para os parâmetros de fermentação ruminal *in vivo* (Tabela 3.4), foi observada maior ($p < 0,05$) produção de $N\text{-}NH_3$ para os animais do MAC em relação aos animais do CON e, no caso da contagem de protozoários, foi observado o inverso, com maior presença destes micro-organismos nos animais do grupo CON ($p < 0,05$).

Tabela 3.3 - Consumo médio diário de matéria seca e demais nutrientes em cordeiras alimentadas com dietas controle (CON) e macrotiloma (MAC).

	CON	MAC	EPM [2]	Valor de "p"
CMS g/ (animal dia^{-1})[1]	822,38	815,88	19,86	n.s. [3]
CMO g/ (animal dia^{-1})	771,60	762,33	18,60	n.s.
CFDN g/(animal dia^{-1})	601,21	575,61	14,33	n.s.
CFDA g/ (animal dia^{-1})	375,09	370,18	9,04	n.s.
CPB g/ (animal dia^{-1})	74,92	86,88	1,92	0,0014

[1] - C - Consumo, MS - matéria seca; MO - matéria orgânica; FDN - fibra em detergente neutro; FDA - fibra em detergente ácido; PB - proteína bruta.
[2] - EPM - Erro padrão da média.
[3] - n.s. - Não significativo ($p > 0,05$).

Tabela 3.4 - Percentagem da digestibilidade aparente de nutrientes e parâmetros ruminais em cordeiras alimentadas com dietas controle (CON) e macrotiloma (MAC).

	CON	MAC	EPM [3]	Valor de "p"
DMS [1] (%)	54,62	55,62	10,87	n.s.
DMO (%)	57,56	58,61	9,64	n.s.
DFDN (%)	56,62	56,46	11,59	n.s.
DFDA (%)	53,58	53,34	14,31	n.s.
DPB (%)	58,27	64,74	10,63	0,0016
Parâmetros ruminais				
$N\text{-}NH_3$ [2] (mg/dL)	9,06	11,61	0,78	0,04
Protozoários (x10^5/mL)	6,05	4,13	0,58	0,04

[1] - D - Digestibilidade aparente, MS - Matéria seca; MO - Matéria orgânica; FDN - Fibra em detergente neutro; FDA - Fibra em detergente ácido; PB - Proteína bruta.
[2] - Nitrogênio amoniacal.
[3] - EPM - Erro padrão da média.
[4] - n.s. - Não significativo ($p > 0,05$).

3.4. Discussão

3.4.1 - Bioensaio *in vitro*

Observou-se no presente estudo, influência dos taninos da macrotiloma sobre a PTG e a produção de CH_4 em condições de fermentação *in vitro*. Taninos são moléculas capazes de limitar a degradabilidade de nutrientes das dietas de ruminantes, tais como fibras e proteínas (TIEMANN et al., 2009; GOEL; MAKKAR, 2012). A PTG pode ser utilizada como um parâmetro indicativo da degradabilidade dos substratos durante o período de incubação (SALLAM et al., 2010), e assim sendo, a menor PTG observada nas amostras incubadas sem PEG, pode estar relacionada à redução na degradabilidade das mesmas, uma vez que estavam suscetíveis aos efeitos dos taninos da macrotiloma.

O aumento na PTG ocasionado pela presença do PEG corrobora o fato de que os efeitos dos taninos na fermentação ruminal dependem da origem e natureza química destes e não somente de suas concentrações (GOEL; MAKKAR, 2012; RODRÍGUEZ et al., 2014). A leguminosa aqui utilizada apresentou teores de taninos totais (TT) e taninos condensados (TC) de 23,23 e 2,14 g/kg MS respectivamente, valores inferiores aos da leucena (*Leucaena leucocephala*) utilizada por Soltan et al. (2013) em ensaio *in vitro* de produção de gases, que apresentou valores 34,8 e 23,3 g/kg MS para TT e TC respectivamente, e ainda assim, neste caso, a presença de PEG não foi capaz de proporcionar aumento na PTG, evidenciando que os taninos da leucena, embora presentes em maior concentração que os da macrotiloma, não foram capazes de afetar a produção de gases.

Durante a fermentação ruminal, o modo pelo qual os taninos são capazes de afetar a metanogênese pode se dar tanto por mecanismos diretos como por mecanismos indiretos. O mecanismo direto é atribuído ao efeito tóxico que os taninos podem exercer sobre as *Archaea* metanogênicas, grupo de micro-organismos anaeróbios estritos, pertencentes ao domínio *Archaea*, filo *Euryarchaeota*, responsáveis por produzir CH_4 no rúmen, enquanto o mecanismo indireto se dá tanto pela redução da degradabilidade de nutrientes da dieta, como também pela redução no número de protozoários ruminais, os quais podem viver em associação às metanogênicas, contribuindo também para a produção de CH_4 (THAUER et al., 2008; BHATTA et al., 2009; HOOK; WRIGHT; MCBRIDE, 2010; JAYANEGARA; LEIBER; KREUZER, 2012).

Observando-se que os taninos da macrotiloma foram capazes de reduzir, além da PTG, também a produção de CH_4 durante o período de incubação, sem afetar, no entanto, a

eficiência da fermentação, sugere-se que esta redução na metanogênese tenha se dado em razão da queda na degradabilidade do substrato incubado na ausência de PEG. Caso os taninos da macrotiloma tivessem reduzido a produção de CH_4 de modo direto, afetando as metanogênicas, seria esperada alteração na proporção de CH_4 produzido em relação à PTG, o que se refletiria em diferença significativa para a eficiência entre as amostras incubadas com e sem PEG (BHATTA et al., 2015).

Apesar de não ter sido observado efeito dos taninos na eficiência de fermentação, observou-se tendência ($p < 0,10$) das amostras com PEG apresentarem maior valor para este parâmetro quando comparadas às amostras sem PEG. Este fato sugere que além da diminuição da degradabilidade da matéria seca incubada, possa ter havido algum outro mecanismo pelo qual, embora de maneira menos intensa, os taninos da macrotiloma tenham afetado a produção de CH_4 durante a fermentação *in vitro*. Tal questão será abordada novamente no tópico subsequente deste estudo.

Taninos são conhecidos por possuírem notada capacidade de se ligar às proteínas, diminuindo a degradabilidade destas no ambiente ruminal, e, por consequência, estão associados a menores valores de produção de $N\text{-}NH_3$ no rúmen (BHATTA et al., 2015). A presença de PEG nas amostras incubadas, mesmo anulando os efeitos dos taninos, não foi responsável por aumentar a produção de $N\text{-}NH_3$, indicando que os taninos da macrotiloma não reduziram a degradabilidade de suas proteínas ao ponto desta redução se refletir em menor produção de $N\text{-}NH_3$.

De modo semelhante, apesar de os dados referentes à produção de gases sugerirem redução da degradabilidade do material incubado na ausência de PEG, os resultados referentes à produção de AGCC sugeriram o oposto. A redução nos níveis totais de AGCC é esperada quando se diminui a degradabilidade dos nutrientes, e, em casos em que há reduzida degradabilidade da fibra, espera-se também que a produção de acetato esteja reduzida (TIEMANN et al., 2008a; JAYANEGARA et al., 2009; BHATTA et al., 2015). No entanto, não se observou diminuição na produção total de AGCC e também não foi verificado deslocamento na produção de acetato devido à presença ou ausência de PEG nos substratos, indicando que os taninos da macrotiloma também não afetaram a produção de AGCC.

Assim sendo, mesmo com os dados de PTG e produção de CH_4 indicando redução da degradabilidade de nutrientes, observando-se a produção de $N\text{-}NH_3$ e AGCC foi possível inferir que a macrotiloma apresentou bom potencial como forrageira, uma vez que seus taninos, moléculas muitas vezes apontadas como possível entrave para o uso de leguminosas na nutrição de ruminantes (TIEMANN et al., 2009; RODRÍGUEZ et al., 2014),

não demonstraram durante a incubação *in vitro*, comportamento que indicasse ser limitante ou nocivo ao processo fermentativo ruminal. Além disto, a macrotiloma demonstrou neste ensaio, sinais de ter potencial mitigador de CH_4, caracterizando-a como candidata a novos estudos em busca de estratégias nutricionais visando redução da produção deste gás.

3.4.2. Digestibilidade aparente de nutrientes

O consumo verificado para as cordeiras de ambos os tratamentos, em torno de 800 gramas por dia, foi o esperado de acordo com o NRC (2007), que descreve CMS variando na faixa de 600 a 1000 g/dia para animais com peso corporal de 20 a 30 kg. Os valores similares de CMS observados entre os animais deste experimento indicaram que a presença da macrotiloma nas dietas não exerceu nenhum efeito sobre a quantidade de alimentos consumidos.

No presente experimento não se observou redução na digestibilidade aparente de nenhum nutriente da dieta frente à suplementação de macrotiloma, verificando-se inclusive aumento na digestibilidade da PB, corroborando a maior digestibilidade em comparação às gramíneas que é atribuída às leguminosas (HAMMOND et al., 2011).

Apesar da qualidade nutricional superior das leguminosas em relação às gramíneas tropicais, o uso destas plantas na alimentação de ruminantes pode nem sempre levar à obtenção de melhoria no desempenho animal, pois se observa muitas vezes, a redução na digestibilidade de nutrientes da dieta devido à presença de compostos secundários como os taninos, podendo ocasionar redução do ganho médio em peso corporal ou produção de leite (TIEMANN et al., 2008b; ABDALLA et al., 2012; GOEL; MAKKAR, 2012). Os taninos da macrotiloma, presentes em baixas concentrações, não foram capazes de reduzir a digestibilidade de nutrientes dos animais alimentados com MAC, indicando potencial desta planta para o uso como suplemento para dieta de ovinos.

Tiemann et al. (2008b) avaliaram o efeito da inclusão de leguminosas taniníferas na dieta de cordeiros alimentados com diferentes proporções de misturas de gramínea e 2 leguminosas taniníferas (*Calliandra calothyrsus* e *Flemingia macrophylla*, contribuindo respectivamente com 18,8 e 8,6 g/kg MS de taninos condensados quando incluídas a 300 g/kg MS na dieta) e observaram redução da digestibilidade da matéria orgânica, fibras e PB, esta última, somente no caso da maior inclusão de taninos condensados.

Os resultados observados na determinação da concentração de N-NH_3 no conteúdo ruminal dos animais são um reflexo do maior consumo de proteínas verificado nos animais alimentados com MAC. Uma vez hidrolisadas pela microbiota ruminal, as proteínas dão origem a peptídeos e aminoácidos. Estes últimos, desaminados pela microbiota ruminal, dão origem à amônia, e, em situações em que ocorre o maior aporte de proteína degradável no rúmen, maiores concentrações de N-NH_3 são observadas. Muitas vezes, quando há presença de taninos na dieta, a degradabilidade ruminal da PB fica reduzida, devido à formação de complexos entre proteínas e taninos que são estáveis no pH ruminal, não sendo degradados pela microbiota. As concentrações de N-NH_3 observadas aqui sugerem que os taninos presentes na macrotiloma não prejudicaram a degradabilidade ruminal das proteínas da dieta (WANG et al., 2006; AUFRÈRE et al., 2013).

Verifica-se que para o adequado crescimento da microbiota ruminal, a concentração mínima de N-NH_3 deve estar entre 5 a 20 mg/dL (LENG, 1990; PIMENTEL et al., 2012). Em ambos os ensaios desenvolvidos neste estudo, as concentrações se mantiveram entre 11 e 12 mg/dL, o que indica que a macrotiloma foi capaz de manter o nível adequado de N-NH_3 no líquido ruminal.

Por outro lado, a menor contagem de protozoários ruminais verificada nos animais que receberam a macrotiloma é um indicativo de quê, embora a digestibilidade aparente não tenha sido afetada, os taninos presentes na macrotiloma podem ter agido sobre os protozoários ruminais. Taninos são tidos como sendo capazes de reduzir a contagem de protozoários no rúmen (BHATTA et al., 2009). Embora ainda que de maneira controversa, a redução da contagem de protozoários ruminais é apontada como uma estratégia de mitigação da produção de metano entérico, uma vez que parte das metanogênicas vive em associação a estes micro-organismos, caracterizando dessa forma, outro possível benefício do uso desta leguminosa na alimentação de ruminantes (HRISTOV et al., 2013; NGUYEN et al., 2016).

Na incubação *in vitro* descrita previamente, observou-se que os taninos da macrotiloma reduziram a PTG, a produção de CH_4 ($p < 0,05$) e que houve tendência ($p < 0,10$) para a proporção de CH_4 produzido em relação à PTG, ser menor para as amostras que estiveram sujeitas aos efeitos dos taninos da macrotiloma (amostras sem PEG) quando comparadas às amostras incubadas com PEG. Este fato deu indícios de que algum outro fator além da sugerida redução da degradabilidade da matéria seca incubada tenha afetado a produção de CH_4.

Considerando-se a reduzida contagem de protozoários observada nos animais alimentados com MAC no ensaio de digestibilidade *in vivo*, sugere-se que os taninos da

macrotiloma possam ter afetado este parâmetro também no bioensaio *in vitro*, caso das amostras sem PEG, contribuindo para a menor produção de CH_4 de maneira sinérgica à redução da degradabilidade dos substratos. A ideia de que houve outro fator além da redução da degradabilidade influenciando a produção de CH_4 *in vitro* é ainda reforçada quando se observa os valores de incremento deste ensaio, uma vez que a PTG aumentou cerca de 6 % na presença de PEG enquanto a produção de CH_4 aumentou aproximadamente 41 % nesta situação, sugerindo que esta variável possa ter sido mais intensa e diretamente afetada que a PTG.

3.5. Conclusão

Os taninos da macrotiloma se mostraram capazes de reduzir tanto a produção total de gases como a produção de CH_4 durante a fermentação *in vitro*, sem afetar a produção de N-NH_3 e AGCC. Já no ensaio *in vivo* de digestibilidade, observou-se maior aporte e degradação ruminal das proteínas da dieta nos animais alimentados com esta leguminosa em comparação ao controle, ao mesmo tempo em que se verificou maior digestibilidade aparente deste nutriente.

Os resultados observados ressaltaram o potencial da macrotiloma como opção de forragem a ser utilizada na alimentação de ruminantes. Seus taninos não apresentaram sinais de efeitos antinutricionais e ainda verificou-se nestes, capacidade de mitigar a produção de CH_4 na fermentação ruminal. Sugere-se que mais estudos sejam realizados, a fim de se obter um esclarecimento mais preciso sobre os efeitos da macrotiloma e seus taninos sobre o metabolismo de ruminantes.

Referências

ABDALLA, A. L. et al. *In vitro* evaluation, *in vivo* quantification, and microbial diversity studies of nutritional strategies for reducing enteric methane production. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburg, v. 44, n. 5, p. 953-964, 2012.

ARAUJO, R. C. et al. Use of blanks to determine *in vitro* net gas and methane production when using rumen fermentation modifiers. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 166-167, p. 155-162, 2011.

ARCHIMÈDE, H. et al. Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and legumes. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 166-167, p. 59-64, 2011.

AUFRÈRE, J. et al. Mixing sainfoin and lucerne to improve the feed value of legumes fed to sheep by the effect of condensed tannins. **Animal**, Cambridge, v. 7, n. 1, p. 82-92, 2013.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis**. 18. ed. Arlington: AOAC International, 2011.

BERTELLI, F. L.; FRANZOLIN, R. Suplementação mineral-proteica com e sem uso de aditivo para bovinos de corte em pastagem tropical. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, Mayaguez, v. 21, n. 4, p. 207-213, 2013.

BEZABIH, M. et al. Chemical composition and in vitro total gas and methane production of forage species from the Mid Rift Valley grasslands of Ethiopia. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 69, n. 4, p. 635-643, 2014.

BHATTA, R. et al. Difference in the nature of tannins on *in vitro* ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 11, p. 5512-5522, 2009.

BHATTA, R. et al. Effects of graded levels of tannin-containing tropical tree leaves on in vitro rumen fermentation, total protozoa and methane production. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 118, n. 3, p. 557-564, 2015.

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, n. 1-5, p. 24-34, 1997.

BUENO, I. C. S. et al. Influence of inoculum source in a gas production method. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 123-124, p. 95-105, 2005.

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, n. 4, p. 1394-1397, 1983.

GERDES, L. et al. Introdução de leguminosas em pastagem já estabelecida de capim Aruana em pastejo com ovinos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 46., 2009, Maringá. **Anais**... Maringá: UEM, 2009. p. 1-3.

GETACHEW, G.; SAID, A.N.; SUNDSTOL, F. The effect of forage legume supplementation on digestibility and body weight gain by sheep fed a basal diet of maize stover. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 46, n. 1-2, p. 97-108, 1994.

GOEL, G.; MAKKAR, H. P. Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburg, v. 44, n. 4, p. 729-739, 2012.

HAMMOND, K. J. et al. Effects of feeding fresh white clover (*Trifolium repens*) or perennial ryegrass (*Lolium perenne*) on enteric methane emissions from sheep. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 166-167, p. 398-404, 2011.

HOOK, S. E.; WRIGHT, A. D. G.; MCBRIDE, B. W. Methanogens: Methane producers of the rumen and mitigation strategies. **Archaea**, Victoria, v. 2010, p. 1-11, 2010.

HRISTOV, A. N. et al. Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 91, n. 11, p. 5045-5069, 2013.

JAYANEGARA, A. et al. Tannins determined by various methods as predictors of methane production reduction potential of plants by an *in vitro rumen* fermentation system. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 150, n. 3-4, p. 230-237, 2009.

JAYANEGARA, A.; LEIBER, F.; KREUZER, M. Meta-analysis of the relationship between dietary tannin level and methane formation in ruminants from *in vivo* and *in vitro* experiments. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 96, n. 3, p. 365-375, 2012.

LENG, R. A. Factors affecting the utilization of 'poor-quality' forages by ruminants particularly under tropical conditions. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 3, n. 1, p. 277-303, 1990.

LONGO, C. et al. The influence of head-space and inoculum dilution on in vitro ruminal methane measurements. **International Congress Series**, Amsterdam, v. 1293, p. 62-65, 2006.

LOUVANDINI, H. et al. Plantas taniníferas na nutrição de ovinos. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 18, n. 4, p. 176-181, 2011. Supl. 4.

MAKKAR, H. P. S. **Quantification of tannins in tree foliage**. Vienna: FAO/IAEA, 2000.

MAKKAR, H. P. S.; BLÜMMEL, M.; BECKER, K. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in *in vitro* techniques. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 73, n. 6, p. 897-913, 1995.

MAURICIO, R. M. et al. A semiautomated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 79, n. 4, p. 321-330, 1999.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrition requirements of small ruminants:** sheep, goats, cervids and world camelids. Washington, DC, 2007.

NGUYEN, S. H. et al. Methane emissions, ruminal characteristics and nitrogen utilization changes after refaunation of protozoa-free sheep. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 144, p. 48-55, 2016.

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, n. 3, p. 601-607, 1987.

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, n. 7, p. 1025-1031, 1971.

PIMENTEL, P. G. et al. Parâmetros da fermentação ruminal e concentração de derivados de purina de vacas em lactação alimentadas com castanha de caju. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 64, n. 4, p. 959-966, 2012.

PIRHOFER-WALZL, K. et al. Nitrogen transfer from forage legumes to nine neighbouring plants in a multi-species grassland. **Plant and Soil**, The Hague, v. 350, n. 1, p. 350-671, 2012.

PRESTON, T. R. **Tropical animal feeding**: a manual for research workers. Rome: FAO, 1995. 126 p.

RODRÍGUEZ, R. et al. Biological effect of tannins from different vegetal origin on microbial and fermentation traits in vitro. **Animal Production Science**, Victoria, v. 54, n. 8, p. 1039-1046, 2014.

RUFINO, M. C. et al. Nitrogen cycling efficiencies through resource-poor African crop–livestock systems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 112, n. 4, p. 261-282, 2006.

SALLAM, S. M. A. H. et al. Ruminal fermentation and tannins bioactivity of some browses using a semi-automated gas production technique. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, Mérida, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2010.

SAMPAIO, C. B. et al. Intake and digestibility in cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogenous compounds. **Topical Animal Health and Production**, Edinburg, v. 42, n. 10, p. 1471-1479, 2010.

SOLTAN, Y. A. et al. Contribution of condensed tannins and mimosine to the methane mitigation caused by feeding *Leucaena leucocephala*. **Archives of Animal Nutrition**, Abingdon, v. 67, n. 3, p. 169-184, 2013.

THAUER, R. K. et al. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. **Nature Reviews. Microbiology**, Londres, v. 6, n. 8, p. 579-591, 2008.

THEODOROU, M. K. et al. 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, n. 3-4, p. 185-197, 1994.

TIEMANN, T. T. et al. *In vitro* ruminal fermentation of tanniniferous tropical plants: Plant-specific tannin effects and counteracting efficiency of PEG. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 146, n. 3-4, p. 221-241, 2008a.

TIEMANN, T. T. et al. Effect of the tropical tannin-rich shrub legumes *Calliandra calothyrsus* and *Flemingia macrophylla* on methane emission and nitrogen and energy balance in growing lambs. **Animal**, Cambridge, v. 2, n. 5, p. 790-799, 2008b.

TIEMANN, T. T. et al. Effect of season, soil type and fertilizer on the biomass production and chemical composition of five tropical shrub legumes with forage potential. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 64, n. 3, p. 255-264, 2009.

VALARINI, M. J.; POSSENTI, R. A. Nutritive value of a range of tropical forage legumes. **Tropical Grasslands**, Brisbane, v. 40, n. 3, p.183-187, 2006.

WANG, Y. et al. Comparison of alfalfa and mixed alfalfa-sainfoinpastures for grazing cattle: Effects on incidence of bloat, ruminal fermentation, and feed intake. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 86, n. 3, p. 383-392, 2006.

4. EMISSÃO DE METANO, MICROBIOTA RUMINAL E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS EM OVINOS SANTA INÊS SUPLEMENTADOS COM A LEGUMINOSA *MACROTYLOMA AXILLARE*

Resumo:
Objetivou-se neste experimento avaliar o desempenho produtivo, emissão de metano (CH_4), parâmetros de fermentação ruminal, características de carcaça e perfil de ácidos graxos da carne em cordeiros alimentados com gramínea tropical e suplementados com leguminosa. Por um período experimental de 90 dias, foram utilizados 14 cordeiros Santa Inês machos, não castrados, com aproximadamente 100 dias de idade e peso corporal médio de 18,06 $\pm$ 3,26 kg. Os animais foram alocados em baias individuais e divididos em 2 grupos de tratamento (7 animais cada), que receberam dieta exclusiva de feno picado de capim-aruana (*Panicum maximum* cv. Aruana) (controle - CON) e feno de capim-aruana suplementado com feno picado da leguminosa macrotiloma (*Macrotyloma axillare* - NO 279) - (macrotiloma - MAC). Os animais suplementados com macrotiloma receberam gramínea e leguminosa na proporção de 75:25; água e sal mineral foram disponibilizados *ad libitum*. Os animais foram pesados quinzenalmente para cálculo do ganho médio em peso (GMD), e a emissão de CH_4 foi medida pela técnica do gás traçador hexfluoreto de enxofre (SF_6) nos dias 28 ao 32; 57 ao 61; e 85 ao 89. Encerrada a última coleta de CH_4, foi coletado líquido ruminal dos animais para determinação das concentrações de nitrogênio amoniacal ($N\text{-}NH_3$) e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), contagem de protozoários ruminais e determinação da abundância relativa de micro-organismos ruminais em análise por RT-qPCR (reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real). Ao final dos 90 dias, os animais foram abatidos, realizou-se avaliação das características de carcaça e foram coletadas amostras do músculo *Longissimus lumborum* para análise do perfil de ácidos graxos da carne. Não se observou diferença ($p > 0,05$) entre os animais dos grupos CON e MAC no consumo de matéria seca (CMS) e GMD, emissão de CH_4, produção de AGCC, características de carcaça e perfil de ácidos graxos. Na avaliação dos parâmetros ruminais, observou-se maior ($p < 0,05$) concentração de $N\text{-}NH_3$ no líquido ruminal dos animais MAC; maior ($p < 0,05$) contagem de protozoários ruminais nos animais CON; e menor abundância relativa de metanogênicas e maior de fungos totais anaeróbios nos animais alimentados com macrotiloma em relação aos animais CON ($p < 0,05$). Apesar de não ter influenciado o desempenho produtivo, emissão de CH_4, características de carcaça e perfil de ácidos graxos dos ovinos avaliados, as menores abundância relativa de metanogênicas e contagem de protozoários em relação ao controle indicam potencial antimetanogênico desta planta, devendo esta ser foco de novos estudos.

Palavras-chave: capim-aruana, cordeiros, forragens, metanogênese, taninos.

Methane emission, rumen microbes and fatty acids profile in Santa Inês lambs supplemented with the legume *Macrotyloma axillare*

Abstract:
The objective of this experiment was to evaluate productive performance, methane (CH_4) emission, ruminal fermentation parameters, carcass characteristics and fatty acids profile of the meat in lambs fed on tropical grass and supplemented with legume. For a 90 days experimental period, 14 intact Santa Inês male lambs, with approximate age of 100 days and 18.06 $\pm$ 3.26 kg of average body weight were used. Animals were allocated in individual pens and divided into 2 treatment groups (7 animals each) which received exclusive chopped aruana grass (*Panicum maximum* cv. Aruana) hay - (control - CON) diet and aruana grass hay supplemented with chopped macrotiloma (*Macrotyloma axillare* - NO 279) hay (macrotiloma - MAC). The animals had *ad libitum* access to water and mineral salt and those supplemented with macrotiloma received grass and legume following a 75:25 proportion. Lambs were fortnightly weighed for calculating average daily gain (ADG) and CH_4 emission was measured using the sulphur hexafluoride (SF_6) tracer technique in the days 28 - 32; 57 - 61; and 85 - 89. After the last CH_4 collection, rumen fluid samples were collected from the animals for the determination of ammoniacal nitrogen (NH_3-N), short chain fatty acids (SCFA) concentrations, and for performing the ruminal protozoa counting and determination of the relative abundance of rumen microbes by RT-qPCR (real-time quantitative polymerase chain reaction) analysis. At the end of the experimental period, the animals were slaughtered, carcass characteristics were evaluated and samples of *Longissimus lumborum* muscle were collected for evaluating the meat fatty acids profile. No difference ($p > 0.05$) was observed between the lambs of the groups CON and MAC for dry matter intake (DMI) and ADG, CH_4 emission, SCFA production, carcass characteristics as well as for fatty acids profile of meat. Evaluating ruminal fermentative parameters, increased concentration of NH_3-N ($p < 0.05$) in the rumen fluid, reduced relative abundance of methanogens, increased relative abundance of general anaerobic fungi and reduced protozoa counting were observed for the animals fed MAC ($p < 0.05$) when comparing to those fed CON. The inclusion of macrotiloma in the diet has not shown any effect on productive performance, CH_4 emission, carcass characteristics and fatty acids profile of the animals evaluated. However, the reduced relative abundance of methanogens and the protozoa counting when compared to the control have indicated the anti-methanogenic potential of this plant, suggesting that it should be focus of further studies.

Keywords: aruana grass, forages, lambs, methanogenesis, taninns.

4.1. Introdução

O sucesso da produção de ruminantes nos trópicos é frequentemente afetado pela limitada qualidade nutricional das gramíneas durante as estações de seca. Leguminosas tropicais constituem um grupo de plantas bem adaptadas às condições climáticas destas regiões e que normalmente apresentam maiores teores de proteína e menores teores de fibra que as gramíneas, podendo ser empregadas como suplementos na dieta de ruminantes, buscando dessa forma, a manutenção do desempenho produtivo durante períodos mais críticos do ano (TIEMANN et al., 2009).

Característica marcante das plantas deste grupo é a presença de compostos secundários como os taninos. Este grupo de moléculas pode exercer efeito sobre desempenho dos ruminantes de diversas maneiras, podendo prejudicar a palatabilidade do alimento e a degradabilidade de nutrientes, como também podem reduzir a produção de metano (CH_4) ou até mesmo alterar a qualidade da carne e leite produzidos (PATRA; SAXENA, 2011; JAYANEGARA; LEIBER; KREUZER, 2012; RODRÍGUEZ et al., 2014).

Uma espécie de leguminosa ainda pouco estudada e que apresenta potencial para utilização na nutrição de ruminantes é a *Macrotyloma axillare*. Leguminosa de clima tropical, com hábito de crescimento volúvel e boa resistência à seca, o acesso NO 279 desta planta, do banco ativo de germoplasma do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa - SP, mostrou bom desempenho quando comparado a outras leguminosas em situação de consórcio sob pastejo de ovinos, e, em ensaio de produção de gases *in vitro*, a presença desta planta nos substratos aumentou a degradabilidade dos mesmos e favoreceu a produção de propionato em relação ao acetato, demonstrando assim potencial para mitigação da emissão de CH_4 (BLUMENTHAL; STAPLES, 1993; GERDES et al., 2009; LIMA et al., 2016).

A produção de CH_4 pelos ruminantes é importante etapa do processo de fermentação ruminal destes animais, uma vez que visa evitar o acúmulo de hidrogênio (H_2) no rúmen, o que poderia causar efeitos negativos severos ao metabolismo do animal (ECKARD; GRAINGER; De KLEIN, 2010). No entanto, a metanogênese pode representar perda de 5 a 10% do potencial energético dos alimentos consumidos, e este gás é também, um dos mais importantes causadores de efeito estufa, com a fermentação entérica dos ruminantes sendo apontada como responsável por 80% do CH_4 produzido pela pecuária (MADSEN et al., 2010; MORGAVI et al., 2010).

Além de muitas vezes levarem à redução da degradabilidade ruminal da dieta, ocasionando consequentemente a redução na produção de CH_4, os taninos também podem exercer efeitos diretos sobre a microbiota ruminal, afetando a produção deste gás (BHATTA et al., 2009; JAYANEGARA; LEIBER; KREUZER, 2012). Outro benefício dos taninos que tem sido discutido é a interação destes com os micro-organismos ruminais responsáveis pela biohidrogenação de ácidos graxos no rúmen, que pode até mesmo culminar em aumento da concentração de ácido linoleico conjugado (CLA) em produtos como o leite e a carne, o que é de grande interesse para a saúde humana (VASTA et al., 2009; PATRA; SAXENA, 2011).

Diante disso, infere-se que a suplementação de leguminosas na dieta de ruminantes pode ser considerada uma estratégia nutricional com potencial para contribuir com a seguridade alimentar de forma sustentável, uma vez que dada a previsão de crescimento da população mundial dos atuais 7,2 bilhões para 9,6 bilhões de pessoas no ano de 2050, existe a necessidade de se aumentar a produção de alimentos de origem animal, aliando este aumento ao menor impacto ambiental possível (CERRI et al., 2016).

Assim sendo, objetivou-se com o presente experimento avaliar o desempenho produtivo, emissão de CH_4, parâmetros de fermentação e microbiota ruminal, características de carcaça e perfil de ácidos graxos da carne em ovinos Santa Inês alimentados com gramínea tropical e suplementados com a leguminosa macrotiloma (*Macrotyloma axillare* - NO 279).

4.2. Material e métodos

4.2.1. Local

O presente experimento foi conduzido nas instalações do Laboratório de Nutrição Animal do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, da Universidade de São Paulo, em Piracicaba, São Paulo (LANA-CENA/USP). Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – CEUA-ESALQ/USP (Protocolo n. 005061).

4.2.2. Animais, tratamentos e manejo

Por período experimental de 90 dias, precedidos por 14 dias de adaptação às dietas, foram utilizados 14 cordeiros Santa Inês, machos, não castrados, com peso corporal médio de 18,06 $\pm$ 3,26 kg e 100 dias de idade. Os animais foram divididos em dois grupos de

tratamento, empregando-se delineamento inteiramente casualizado e foram alocados em baias individuais com medidas de 1,60 x 1,15 m, com água e sal mineral disponibilizados *ad libitum*. De acordo com a dieta dos animais, formaram-se os seguintes tratamentos: Controle (CON), que recebeu feno picado de capim-aruana (*Panicum maximum* cv. Aruana) *ad libitum* e Macrotiloma (MAC), que recebeu feno picado de capim-aruana *ad libitum* e suplementação com feno picado de macrotiloma.

Os animais foram alimentados duas vezes ao dia (manhã e tarde), visando consumo médio de matéria seca (CMS) de 3% em relação ao peso corporal dos mesmos e 10% de sobras em relação à oferta total de alimentos. Ofertou-se a proporção de 75:25 de gramínea:leguminosa para os animais suplementados com macrotiloma. Para o cálculo do CMS, as sobras dos alimentos foram coletadas e pesadas três vezes por semana (segunda, quarta e sexta-feira).

Ao longo do experimento, os cordeiros foram pesados no dia 0 e a cada 14 dias no período da manhã, antes de receberem as dietas, para se calcular o ganho médio diário em peso (GMD). Por meio da divisão do CMS (g/d), pelo GMD (g/d) obteve-se o índice de conversão alimentar (CA).

As análises de composição bromatológica dos alimentos utilizados foram realizadas de acordo com procedimentos da AOAC (2011), nos quais foram determinados teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibras em detergente neutro (FDN), fibras em detergente ácido (FDA) e matéria mineral (MM). No caso do feno de macrotiloma, também foram determinados os teores de compostos fenólicos totais, taninos totais e taninos condensados, de acordo com Makkar (2000) (Tabela 3.1 do capítulo anterior).

4.2.3. Emissão de CH_4

A determinação da emissão de CH_4 pelos animais foi realizada utilizando-se a técnica o gás traçador hexafluoreto de enxofre (SF_6), descrita por Johnson et al. (1994), com adaptações de Embrapa (2004) e Lima et al. (2010). Ao longo do experimento, foram realizados três períodos de coleta e mensuração da produção de CH_4 entérico, com quatro dias de duração cada. As coletas foram realizadas nos períodos do dia 28 ao 32; dia 57 ao 61; e dia 85 ao 89. As amostras foram coletadas e analisadas em seguida em cromatógrafo a gás Shimadzu ® GC-2010, equipado com detectores de ionização de chama (FID) e captura de elétrons (ECD).

4.2.4. Parâmetros de fermentação ruminal

Logo após o término da última coleta de CH_4, utilizando-se uma sonda esofágica, foram coletadas amostras de líquido ruminal dos cordeiros respeitando-se intervalo de três a quatro horas após o fornecimento da dieta aos mesmos. As amostras de líquido ruminal foram utilizadas para determinação de nitrogênio amoniacal ($N\text{-}NH_3$), ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e contagem de protozoários seguindo metodologias descritas por Preston (1995); Palmquist e Conrad (1971) (adaptado) e Nocek, Hart e Polan (1987); e Dehority, Damron e McLaren 1983 respectivamente. Para as análises de $N\text{-}NH_3$ e AGCC, as amostras foram armazenadas em refrigerador, em temperatura de - 20 ºC, e para a contagem de protozoários, 2 mL das amostras de líquido ruminal foram diluídos em 4 mL de solução a base de verde de metila e formol salino (M.F.S.) e mantidas em temperatura ambiente, ao abrigo da luz.

Ainda utilizando-se as amostras de líquido ruminal, foi determinada a abundância relativa dos grupos de micro-organismos ruminais: bactérias totais (BACT), *Ruminococcus flavefaciens* (RUMI), *Fibrobacter succinogenes* (FIBRO), *Archaea* metanogênicas (METH), e fungos totais anaeróbios (FUNG). Para estas determinações, utilizou-se a técnica da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR). Para as análises de RT-qPCR, as amostras coletadas foram armazenadas em temperatura de -80 ºC e encaminhadas ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP.

A extração do DNA das amostras de líquido ruminal foi realizada utilizando-se kit comercial PowerLyzer™ PowerSoil (MoBio) seguindo as instruções do fabricante. A quantificação dos micro-organismos BACT, RUMI, FIBRO, METH e FUNG foi realizada com iniciadores (*primers*) específicos (Tabela 4.1) de 16S rRNA como descrito por Denman e McSweeney (2006) e Denman, Tomkins e McSweeney (2007). Para o cálculo foi utilizado o método de ΔΔCt (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), de acordo com a equação:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct\ (\text{tratamento}) - \Delta Ct\ (\text{controle})$$

Onde:

ΔCt = diferença entre Ct (gene alvo) – Ct (gene normalizador)

ΔCt = Delta Ct

A amplificação do DNA foi realizada no equipamento Step One Plus ™ 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 ºC por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 ºC por 15 s, 60 ºC por 30 s e 72 ºC por 30 s, com coleta de dados de fluorescência e ao final da reação foi incluída uma curva de melting nas seguintes condições: 95 ºC por 15 s, 60 ºC por 1 min e 95 ºC por 15 s. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

As mudanças na abundância relativa das populações microbianas devido à suplementação de macrotiloma na dieta foram determinadas de acordo com a equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), utilizando o gene 16S rRNA BACT como gene de referência para o cálculo dos valores de ΔCt e considerando a abundância relativa das populações alvo nos animais do grupo CON como 1.

Tabela 4.1 - Primers específicos utilizados na análise de RT-qPCR

Micro-organismos	**Sequência dos Primers (5' a 3')**
Bactérias totais	I[1], CGGCAACGAGCGCAACCC R, CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC
Ruminococcus flavefaciens	I, CGAACGGAGATAATTTGAGTTTACTTAGG R, CGGTCTCTGTATGTTATGAGGTATTACC
Fibrobacter succinogenes	I, GTTCGGAATTACTGGGCGTAAA R, CGCCTGCCCCTGAACTATC
Archaea metanogênicas	I, TTCGGTGGATCDCARAGRGC R, GBARGTCGWAWCCGTAGAATCC
Fungos totais anaeróbios	I, GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTC R, CAAATTCACAAAGGGTAGGATGATT

[1] I - Indicador direto; R - Reverso

4.2.5. Características de carcaça e perfil de ácidos graxos

Ao fim dos 90 dias de ensaio, os animais foram submetidos a jejum de sólidos e líquidos por um período de 16 horas para realização de abate, seguindo normas vigentes no Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA (BRASIL, 1952), para que fossem obtidos dados referentes às características de carcaça dos animais.

Imediatamente antes do abate, os animais foram pesados para que se pudesse obter o peso corporal ao abate (PA). Os animais foram insensibilizados por choque elétrico e então

foi realizada sangria, esfola e evisceração das carcaças. Em seguida, as carcaças foram pesadas para a obtenção do peso de carcaça quente (PCQ), e foram encaminhadas para câmara de refrigeração, onde permaneceram por 24 horas em temperatura de 2 ºC.

Logo após o período de refrigeração, as carcaças foram novamente pesadas (peso de carcaça fria - PCF) e foram calculados índices de rendimento de acordo com as seguintes equações: Rendimento de carcaça quente (RCQ): RCQ = PCQ/PA*100; rendimento de carcaça fria (RCF): RCF = PCF/PA*100; e perda por resfriamento (PR): PR = (PCQ – PCF)/PCQ*100.

No músculo *Semimembranosus* foram realizadas as leituras do pH inicial (0 horas, durante o abate) e final (24 horas após o abate) utilizando-se um pH metro portátil (QUIMIS®, modelo Q400HM). Logo após esta etapa, as carcaças foram seccionadas longitudinalmente ao longo da coluna vertebral, e na meia carcaça esquerda foram obtidos e pesados os seguintes cortes cárneos (SANTOS et al., 2001, adaptado): pescoço - corresponde às sete vértebras cervicais, efetuando um corte entre a sétima cervical e a primeira torácica; paleta - região que tem como base anatômica a escápula, o úmero, a ulna, o rádio e o carpo; costela e fralda - localizada entre a 1º e 12º vértebra torácica, sem aproximadamente 1/3 dorsal do corpo das costelas correspondentes, juntamente com região correspondente à musculatura da parede abdominal; e pernil - seccionado entre a cabeça do fêmur e o acetábulo.

A avaliação da cor da carne foi realizada no músculo *Longissimus lumborum*, que foi removido e exposto ao oxigênio por 30 minutos e três medidas em pontos diferentes foram tomadas para o cálculo do valor médio. Utilizou-se espectrofotômetro (MINOLTA modelo CM-600d) para leitura dos parâmetros L* (luminosidade), a* (intensidade de vermelho) e b* (intensidade de amarelo) de acordo com MacDougall (1994).

Para análise do perfil de ácidos graxos da carne, foram coletadas amostras do músculo *Longissimus lumborum* na região da 12º costela e estas foram encaminhadas ao Laboratório de Nutrição e Crescimento Animal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Juntamente com estas amostras, também foram encaminhadas amostras dos alimentos oferecidos aos animais para realização desta mesma análise, com o objetivo de também caracterizá-los quanto ao perfil de ácidos graxos (Tabela 4.2).

A extração dos lipídios das amostras de carne foi realizada de acordo com Hara e Radin (1978) e a metilação de acordo com Christie (1982). No caso das amostras de alimentos, a extração e metilação foram realizadas de acordo com Rodriguez-Ruiz et al. (1998).

As amostras transmetiladas foram analisadas em cromatógrafo a gás modelo Focus CG- Finnigan, com detector de ionização de chama, coluna capilar CP-Sil 88 (Varian), com 100 m de comprimento e 0,25 µm de diâmetro interno e 0,20 µm de espessura do filme. Os gás de arraste utilizado foi o hidrogênio, em vazão de 1,8 mL/minuto. As condições cromatográficas utilizadas assim como o cálculo dos índices de ácidos graxos desejáveis (DFA), atividade das enzimas elongase e Δ^9-desaturase (C16 e C18) e de aterogenicidade (ATHERO) seguiram metodologia descrita por Paim et al. (2014).

4.2.6. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada por meio do programa estatístico SAS® v. 9.4 (Analysis System Institute, Cary NC, USA). Os dados de emissão de CH_4 foram analisados utilizando-se análise de medidas repetidas no tempo, considerando-se os animais como unidades experimentais, em modelo misto, por meio do proc MIXED, tendo as dietas como efeito fixo e os animais como efeito aleatório. Para se comparar as médias utilizou-se o teste de Tukey e aplicou-se o proc PLM para se comparar os tratamentos entre si em cada um dos períodos de coleta. Para as demais variáveis analisadas neste experimento, foi utilizada análise de variância por meio do proc GLM e as médias obtidas foram comparadas por meio do teste de Tukey. Os dados de GMD foram calculados pelo coeficiente de regressão linear dos pesos individuais de cada animal, utilizando-se o proc REG. Para todas as análises adotou-se nível de significância de 5 %.

Tabela 4.2 - Perfil de ácidos graxos dos fenos de capim-aruana (ARU) e de macrotiloma (MAC)

Ácido graxo (g/100g)	ARU	MAC
C10:0	1,48[1]	0,73
C12:0	3,92	1,59
C13:0 iso	2,05	1,02
C13:0 anteiso	1,17	0,74
C12:1	0,17	0,14
C13:0	0,15	-
C14:0	1,10	0,85
C15:0 iso	0,19	0,11
C15:0	0,25	0,72
C16:0	34,13	33,48
C17:0 iso	-	0,98
C17:0	0,57	0,94
C18:0	4,19	8,64
C18:1 trans	-	0,54
C18:1 cis - 9	3,51	3,82
C18:1 cis - 11	0,47	0,37
C18:1 cis - 12	0,29	0,25
C18:1 cis -13	0,18	0,13
C18:2 c-9 c-12	15,07	13,59
C20:0	2,08	6,74
C18:3 n-3	20,37	9,38
C20:1	2,76	0,99
C21:0	-	0,24
C20:2	-	0,20
C22:0	1,25	3,71
C20:3 n-6	0,93	4,57
C23:0	0,43	0,44
C24:0	2,01	2,77
C22:5	-	0,44
C22:6 n-3	-	0,39
SFA	55,07	63,85
UFA	44,10	35,05
MUFA	7,55	6,41
PUFA	36,55	28,64
n-6	0,96	4,59
n-3	20,52	9,82
n-6:n-3	0,05	0,46
UFA:SFA	0,80	0,54
PUFA:SFA	0,66	0,44

[1] - São apresentados apenas os ácidos graxos com valores maiores que 0,1 g/100 g.

4.3. Resultados

Não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$) entre os ovinos dos dois tratamentos para o CMS, GMD e CA (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 - Peso inicial, final e parâmetros de desempenho produtivo de cordeiros alimentados com dietas controle (CON) e macrotiloma (MAC).

	CON	MAC	EPM[2]	Valor de "p"
Peso inicial (kg)	18,21	18,35	1,28	n.s. [3]
Peso final (kg)	23,64	24,50	1,43	n.s.
CMS g (animal^{-1} dia^{-1})[1]	768,02	790,99	15,82	n.s.
GMD g (animal^{-1} dia^{-1})	57,71	65,42	8,98	n.s.
C.A. (g CMS/g GMD)	15,02	12,99	1,76	n.s.

[1] - CMS: Consumo médio de matéria seca; GMD: Ganho médio diário; CA: Conversão alimentar.
[2] - EPM - Erro padrão da média.
[3] - n.s. - Não significativo ($p > 0,05$).

Ao se analisar os dados de emissão de CH_4, também não se observou diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos para os parâmetros avaliados em relação a esta varável (CH_4/dia; CH_4/MS; CH_4/GMD) ao longo de todo o período experimental (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 - Emissão de CH_4 de cordeiros alimentados com dietas controle (CON) e macrotiloma (MAC) durante os 3 períodos de coleta do experimento

	Período(s)	CON	MAC	EPM [2]	Valor de "p"
CH_4 g/ (animal dia^{-1})[1]	1	15,55	14,91	1,42	n.s. [3]
CH_4 g/MS kg	1	23,72	23,97	2,18	n.s.
CH_4 g/ (animal dia^{-1})	2	15,36	17,47	1,37	n.s.
CH_4 (g/MS kg)	2	21,64	21,16	2,09	n.s.
CH_4 g/ (animal dia^{-1})	3	11,52	14,00	1,58	n.s.
CH_4 g/MS kg	3	16,31	19,46	2,40	n.s.
CH_4 g/GMD g	1,2 e 3	0,29	0,26	0,06	n.s.

[1] - CH_4/animal/dia: emissão de CH_4 em 24 horas; CH_4/MS: emissão de CH_4 em relação ao consumo de matéria seca; CH_4/GMD: emissão de CH_4 em relação ao ganho em peso médio diário.
[2] - EPM - Erro padrão da média.
[3] - n.s. - Não significativo ($p > 0,05$).

Quanto aos parâmetros de fermentação ruminal (Tabela 4.5), observou-se maior produção ($p < 0,05$) de N-NH_3 para os animais que receberam a suplementação de macrotiloma (MAC) quando comparados aos animais que não a receberam (CON).

A proporção dos AGCC produzidos durante a fermentação ruminal, assim como a relação acetato:propionato e a produção total de AGCC não foram influenciados pelos tratamentos utilizados ($p > 0,05$).

Observou-se também maior contagem de protozoários no líquido ruminal do CON (5,58 x 10^5 /mL) em relação a MAC (3,73 x 10^5 /mL) ($p < 0,05$). Na determinação da abundância relativa dos micro-organismos ruminais, observou-se menor presença de METH nos animais alimentados com MAC quando comparados aos alimentados com CON ($p < 0,05$). Em relação à FUNG, o contrário foi observado, com maior abundância destes micro-organismos nos animais que receberam MAC ($p < 0,05$). Não se verificou diferença entre os grupos para os demais micro-organismos avaliados ($p > 0,05$).

Tabela 4.5 - Parâmetros de fermentação e composição da microbiota ruminal de cordeiros alimentados com dietas controle (CON) e macrotiloma (MAC)

	CON	MAC	EPM [2]	Valor de "p"
$N\text{-}NH_3$ (mg/dL) [1]	12,87	15,90	0,95	0,044
Protozoários (x10^5/mL)	5,58	3,73	0,33	0,003
AGCC				
Total (mmol/L)	72,93	72,40	2,27	n.s. [3]
Acetato (%)	74,95	77,25	2,36	n.s.
Propionato (%)	16,45	16,78	0,55	n.s.
Butirato (%)	6,22	5,65	0,60	n.s.
Valerato (%)	0,68	0,71	0,08	n.s.
Isobutirato (%)	0,40	0,50	0,08	n.s.
Isovalerato (%)	1,28	1,19	0,17	n.s.
Acetato/Propionato	4,56	4,47	0,17	n.s.
RT-qPCR [4]				
RUMI	1,0	3,67	1,48	n.s.
FIBRO	1,0	11,27	4,25	n.s.
METH	1,0	0,31	0,04	< 0,0001
FUNG	1,0	4,32	0,82	0,014

[1] - $N\text{-}NH_3$ - Nitrogênio amoniacal; AGCC - Ácidos graxos de cadeia curta; RUMI - *Ruminococcus flavefaciens*; FIBRO - *Fibrobacter succinogenes*; METH - *Archaea* metanogênicas; e FUNG - fungos totais anaeróbios.
[2] - EPM - Erro padrão da média.
[3] - n.s. - Não significativo ($p > 0,05$).
[4] - RT-qPCR - Análise de PCR quantitativa em tempo real. Valores expressos em abundância relativa da população microbiana do rúmen mediante suplementação de macrotiloma na dieta.

A partir das informações coletadas ao abate (Tabela 4.6), não foram observadas diferenças entre os grupos para as características de carcaça ($p > 0,05$). Do mesmo modo, na análise do perfil de ácidos graxos no músculo *Longissimus lumborum*, tanto na proporção dos ácidos graxos individualmente (Tabela 4.7), assim como na análise dos índices calculados a partir do perfil de ácidos graxos da carne (Tabela 4.8), também não se observou diferença ($p > 0,05$) entre os cordeiros de ambos os tratamentos.

Tabela 4.6 - Peso ao abate e características de carcaça de cordeiros alimentados com dietas controle (CON) e macrotiloma (MAC)

	CON	MAC	EPM [2]	Valor de "p"
PA[1] (kg)	22,07	24,00	1,31	n.s.[3]
PCQ (kg)	8,49	9,34	0,63	n.s.
PCF (kg)	8,23	9,01	0,61	n.s.
RCQ (kg)	38,37	38,71	0,91	n.s.
RCF (kg)	37,16	37,37	0,92	n.s.
PR (%)	3,18	3,45	0,40	n.s.
pH - Inicial	6,90	6,83	0,06	n.s.
pH - Final	5,76	5,67	0,05	n.s.
Cor L	44,80	44,24	1,68	n.s.
Cor A	11,71	13,09	0,77	n.s.
Cor B	13,48	13,86	0,66	n.s.
Pernil (kg)	1,38	1,41	0,88	n.s.
Paleta (kg)	0,74	0,89	0,83	n.s.
Fralda+Costela(kg)	1,59	1,75	0,14	n.s.
Pescoço (kg)	0,35	0,37	0,02	n.s.

[1] - PA: peso corporal ao abate; PCQ: peso de carcaça quente; PCF: peso de carcaça fria; RCQ: rendimento de carcaça quente; RCF: rendimento de carcaça fria; PR: perda por resfriamento; cor L: valores colorimétricos de luminosidade da carne; cor A: valores colorimétricos de vermelho da carne; cor B: valores colorimétricos de amarelo da carne.

[2] - EPM - Erro padrão da média.

[3] - n.s. - Não significativo ($p > 0,05$).

Tabela 4.7 - Perfil de ácidos graxos da carne de cordeiros alimentados com dietas controle (CON) e macrotiloma (MAC)

Ácido graxo (g/100g) [1]	CON	MAC	EPM [2]	Valor de "p"
C10:0	0,095	0,110	0,30	n.s. [3]
C12:0	0,115	0,174	0,02	n.s.
C14:0 iso	0,073	0,107	0,01	n.s.
C14:0	1,938	2,573	0,24	n.s.
C15:0 iso	0,273	0,314	0,02	n.s.
C15:0.anteiso	0,326	0,389	0,03	n.s.
C14:1 cis-9	0,058	0,075	0,01	n.s.
C15:0	0,448	0,514	0,04	n.s.
C16:0 iso	0,215	0,231	0,05	n.s.
C16:0	24,135	24,554	0,55	n.s.
C17:0 iso	0,486	0,535	0,01	n.s.
C16:1 cis - 9	2,449	2,636	0,10	n.s.
C17:0	1,575	1,655	0,06	n.s.
C17:1	0,575	0,503	0,05	n.s.
C18:0	20,246	20,118	0,90	n.s.
C18:1 trans	0,722	0,849	0,09	n.s.
C18:1 cis - 9	32,088	31,288	0,85	n.s.
C18:1 cis - 11	3,188	3,055	0,13	n.s.
C18:1 cis - 12	1,592	1,639	0,05	n.s.
C18:1 cis - 13	0,905	0,848	0,02	n.s.
C18:1 trans - 16	0,326	0,316	0,02	n.s.
C18:1 cis - 15	0,248	0,275	0,01	n.s.
C18:2 c-9 c-12	1,417	1,680	0,23	n.s.
C20:0	0,156	0,188	0,01	n.s.
C18:3 n-3	0,833	0,661	0,07	n.s.
C20:1	0,161	0,141	0,02	n.s.
C18:2 c-9 t-11	0,117	0,189	0,04	n.s.
C22:0	0,098	0,089	0,04	n.s.
C20:4 n-6	2,115	1,486	0,17	n.s.
C20:5 n-3	0,436	0,265	0,09	n.s.
C22:6 n-3	0,448	0,425	0,09	n.s.

[1] - São apresentados apenas os ácidos graxos com valores maiores que 0,05 g / 100 g.

[2] - EPM - Erro padrão da média.

[3] - n.s. - Não significativo ($p > 0,05$).

Tabela 4.8 - Grupos de ácidos graxos e índices calculados da carne de cordeiros alimentados com dietas controle (CON) e macrotiloma (MAC)

	CON	MAC	EPM [2]	Valor de "p"
SFA[1]	50,21	51,57	0,93	n.s. [3]
UFA	47,75	46,39	0,88	n.s.
MUFA	42,32	41,63	0,95	n.s.
PUFA	4,58	4,77	0,34	n.s.
n-6	1,52	1,51	0,18	n.s.
n-3	1,43	1,35	0,13	n.s.
n6:n3	1,08	1,11	0,07	n.s.
UFA:SFA	0,96	0,90	0,35	n.s.
PUFA:SFA	0,09	0,09	0,01	n.s.
DFA	67,99	66,51	0,68	n.s.
Δ^9-desaturase C16	9,23	9,68	0,32	n.s.
Δ^9-desaturase C18	61,23	61,02	1,56	n.s.
Elongase	66,33	65,39	0,63	n.s.
ATHERO	0,58	0,62	0,03	n.s.

[1] - SFA: ácidos graxos saturados; UFA: ácidos graxos insaturados; MUFA: ácidos graxos monoinsturados; PUFA: ácidos graxos poli-insaturados; n-6: ácidos graxos ômega 6; n-3: ácidos graxos ômega 3; DFA: ácidos graxos desejáveis; ATHERO: índice de aterogenicidade.
[2] - EPM - Erro padrão da média.
[3] - n.s. - Não significativo ($p > 0,05$).

4.4. Discussão

O CMS apresentado pelos animais de CON e MAC foi o esperado de acordo com NRC (2007), que estima consumo na faixa de 0,61 a 1,05 kg de MS por dia para cordeiros com peso corporal de 20 a 30 kg.

O GMD verificado no presente experimento para os dois tratamentos foi semelhante ao verificado por Menezes et al. (2013) e Kim et al. (2016), que relataram médias em torno de 45,0 e 74,0 g/animal/dia respectivamente, para ovinos com idade de 4 a 6 meses no início destes estudos. No caso de Menezes et al. (2013), utilizaram-se feno de gramínea tropical (Coast-cross - *Cynodon dactylon*) e ovinos da raça Santa Inês, enquanto Kim et al. (2016) utilizaram duas gramíneas de clima temperado, em ovinos da raça Suffolk, sendo ambos os casos em dietas com proporção de 60:40 de volumoso e concentrado. No presente experimento, não foi utilizado concentrado, e ainda assim foram verificados valores de GMD semelhantes aos mencionados.

Apesar de se tratar de uma leguminosa e, portanto apresentar compostos secundários como os taninos, potencialmente nocivos à saúde e ao bom desempenho de ruminantes (RODRÍGUEZ et al., 2014), a macrotiloma, aparentemente, não apresentou este efeito, uma vez que os animais suplementados com esta planta tiveram CMS, GMD e, consequentemente, CA, semelhantes aos dos animais alimentados com a dieta CON, sem suplementação de macrotiloma. Taninos são relatados como causadores de efeitos tóxicos em ruminantes quando ingeridos em concentrações de 60 a 120 g/kg da dieta total (FRUTOS et al., 2002; LOUVANDINI et al., 2011). Os referidos valores são notoriamente superiores aos praticados aqui, uma vez que a macrotiloma, incluída a 25 % na dieta total, apresentou teores de taninos totais de 23,23 g/kg.

O tipo e a qualidade das forrageiras empregadas na dieta de ruminantes são fatores de grande influência na produção de CH_4 destes animais (MARTIN; MORGAVI; DOREAU, 2010). No presente experimento, foram utilizados dois tipos de forrageiras, uma gramínea tropical, de metabolismo C4 (capim-aruana) e uma leguminosa (macrotiloma) e, no entanto, assim como a inclusão de 25 % de macrotiloma não influenciou os índices de produção dos animais, também não foi responsável por gerar menores níveis de emissão de CH_4, tendo sido a qualidade das fibras de ambas forrageiras utilizadas um fator possivelmente determinante para que isto ocorresse.

De acordo com Hristov et al. (2013), o teor de carboidratos estruturais das forragens é uma característica de grande influência na emissão de CH_4, estando maiores teores de FDN relacionados a maiores emissões de CH_4. Dewhurst (2013) relatou que os menores teores de fibra, associados a maiores taxas de passagem das leguminosas são características destacadas destas plantas que podem levar a menores emissões de CH_4.

Em meta-análise reunindo resultados de 22 publicações científicas, totalizando 112 tratamentos experimentais, a respeito do efeito de diversos tipos de forragem sobre a emissão de CH_4 em ruminantes, Archimède et al. (2011) observaram que animais alimentados com leguminosas de clima tropical, como a macrotiloma, produziram 20 % menos CH_4 (L/consumo de matéria orgânica) que animais alimentados com gramíneas C4, como é o caso do capim-aruana. No estudo destes autores, observam-se médias de FDN de 646,40 g/kg MS para gramíneas C4 e 568,20 g/kg MS para as leguminosas de clima tropical enquanto que no presente experimento, os teores de FDN do capim-aruana e da macrotiloma foram superiores, 731,06 e 626,58 g/kg MS respectivamente, apresentando, portanto, maior potencial de produção de CH_4.

A qualidade das fibras também pareceu afetar o nível de desempenho animal observado aqui, uma vez que, mesmo o tratamento MAC tendo apresentando teor de PB na dieta superior ao CON, esta superioridade não se refletiu em GMD maior para os animais alimentados com esta dieta. Provavelmente, isto se deveu à falta de sincronia entre a disponibilidade de energia e proteína no rúmen destes animais.

Gramíneas C4, como o capim-aruana, são na maioria dos casos, menos degradáveis no rúmen que leguminosas e, as maiores degradabilidade e teor de PB da macrotiloma podem ter levado a maior desaminação de aminoácidos no rúmen dos animais alimentados com a leguminosa, sem, no entanto, aporte suficiente de carboidratos, que forneceriam a energia necessária para metabolização adequada desta proteína. A falta de energia prontamente disponível na dieta ainda é agravada pelo fato de as forragens terem sido utilizadas na forma de feno, situação em que os teores de carboidratos solúveis das mesmas estão reduzidos e estruturais aumentados. O adequado aporte energético aumentaria a produção de massa microbiana no rúmen e reduziria a perda de nitrogênio na forma de amônia, o que certamente conferiria aos animais suplementados com a leguminosa, superior desempenho animal (YU; HART; DU, 2009; ARCHIMÈDE et al., 2011; McDONALD et al., 2011).

Dessa forma, a qualidade e o teor de fibras das dietas utilizadas no presente experimento, associados à proporção de fornecimento da macrotiloma (75:25), constituem fatores que podem ser apontados como motivos pelos quais não se observou desempenho produtivo superior ou redução na emissão de CH_4 nos animais suplementados com esta leguminosa.

A presença de taninos é outra característica das leguminosas que frequentemente é apontada como razão da mitigação da emissão de CH_4 observada em ruminantes consumindo estas plantas (WAGHORN, 2008; MARTIN; MORGAVI; DOREAU, 2010; JAYANEGARA; LEIBER; KREUZER, 2012). Grupo de substâncias polifenólicas com ampla variedade de pesos moleculares e níveis de complexidade, os taninos são classificados em duas classes, hidrolisáveis e condensados, ambas apresentando efeitos antimetanogênicos, sendo, porém, os taninos condensados, foco maior de estudos devido a seu menor risco de toxicidade (BEAUCHEMIN et al., 2008; GOEL; MAKKAR, 2012).

Os taninos são capazes de reduzir a produção de CH_4 por meio de mecanismos diretos de inibição, como efeito tóxico sobre as *Archaea* metanogênicas, micro-organismos responsáveis pela produção de CH_4, e também de modo indireto, reduzindo a população de protozoários no rúmen, micro-organismos produtores de hidrogênio (H_2), molécula utilizada na metanogênese, e que vivem muitas vezes em associação às metanogênicas ou também, se

pode observar redução na produção de CH_4 como consequência da redução da degradabilidade da dieta (BHATTA et al., 2009; JAYANEGARA; LEIBER; KREUZER, 2012).

Goel e Makkar (2012) afirmaram que associar a magnitude do efeito antimetanogênico dos taninos à concentração destes na dieta é algo a ser evitado, uma vez que atividade biológica destas moléculas varia tanto em função da concentração, como em função da natureza química das mesmas.

Por outro lado, na meta-análise de Archimède et al. (2011), ao se incluir os teores de taninos no modelo, observou-se menor produção de CH_4 nos casos em que foram empregadas leguminosas com maiores teores destas moléculas (superiores a 300 g/kg MS) do que em leguminosas com baixos teores de taninos (inferiores a 100 g/kg MS). O teor de taninos totais verificados na macrotiloma (23,23 g/kg MS) é considerado baixo utilizando a classificação empregada pelo estudo citado acima, podendo, portanto, ser esta uma das causas de não ter se verificado efeito da macrotiloma sobre a produção de CH_4.

Ao se analisar os resultados aqui apresentados, sejam eles referentes ao desempenho produtivo animal ou à produção de CH_4 e parâmetros de fermentação ruminal, deve-se tomar cuidado ao se atribuir algum destes à presença ou ausência de taninos na dieta, uma vez que, a maneira ideal de se evidenciar efeito destas moléculas na fermentação ruminal é com o uso de algum agente neutralizador dos taninos, como o polietilenoglicol (PEG) (GOEL; MAKKAR, 2012; RODRÍGUEZ et al., 2014). No presente experimento, não foi incluído um tratamento recebendo macrotiloma e PEG, ou algum outro agente neutralizador dos taninos. Portanto, os resultados observados podem ser sugestivos de efeitos dos taninos, mas não podem ser atribuídos irrefutavelmente a estes.

Apesar de não terem sido observados efeitos diretos da macrotiloma, nas proporções usadas aqui, sobre a emissão de CH_4, foram observados efeitos sobre os parâmetros ruminais como o teor de N-NH_3, a contagem de protozoários e a população de metanogênicas, estando estes dois últimos fatores mais diretamente relacionados à produção de CH_4.

O teor de N-NH_3 no rúmen está relacionado ao metabolismo de proteínas, confirmando, portanto, que a suplementação de macrotiloma, assim como aumentou o aporte, aumentou também a degradação de proteínas no rúmen, elevando o teor de N-NH_3 no líquido ruminal. Ao se incluir taninos nas dietas, o oposto é comumente relatado, observando-se níveis reduzidos de N-NH_3 devido à capacidade dos taninos de se ligarem às proteínas, impedindo a quebra destas moléculas e a desaminação de aminoácidos no rúmen (WANG et al., 2006; AUFRÈRE et al., 2013). O maior teor de N-NH_3 observado no líquido

ruminal dos animais alimentados com macrotiloma sugere que os baixos teores de taninos desta leguminosa não prejudicaram a degradabilidade ruminal das proteínas da dieta.

De acordo com Hristov et al. (2013), a defaunação, ou seja, eliminação de protozoários ruminais, seja ela completa, ou parcial como foi observada aqui, não pode ser considerada como uma estratégia de mitigação de CH_4 muito consistente, uma vez que a resposta a essa prática é bastante variada e incerta.

Como mencionado anteriormente neste trabalho, um dos modos pelo qual a defaunação pode afetar a metanogênse se dá pela íntima relação dos protozoários com as metanogênicas, podendo então a eliminação ou redução dos protozoários levar à diminuição na presença de metanogênicas, e por consequência, reduzir a produção de CH_4 (BHATTA et al., 2009). Por outro lado, este mecanismo nem sempre é observado. Hristov et al. (2011), em experimento com vacas holandesas suplementadas com ácidos graxos, observaram redução de 96% nos protozoários ruminais e no entanto não observaram redução tanto nas metanogênicas como na produção de CH_4.

No presente experimento, observou-se redução na contagem de protozoários e também na abundância relativa de metanogênicas dos animais alimentados com macrotiloma. Apesar disso, não foi verificada diferença na emissão de CH_4 entre os tratamentos. Williams et al. (2009), em experimento com ovinos Merino, em que testou-se a eficácia de vacina formulada com cinco tipos diferentes de metanogênicas, verificaram manutenção do nível de emissão de CH_4 mesmo após a diminuição da contagem de metanogênicas. Estes autores observaram mudança na composição da população de metanogênicas dos animais vacinados e sugeriram que, mesmo em menor número, estas novas componentes da população de metanogênicas seriam produtoras de CH_4 mais eficientes, levando assim à manutenção da emissão CH_4. De forma semelhante, sugere-se que este mesmo tipo de fenômeno possa também ter ocorrido no presente experimento.

Concomitantemente à diminuição nas metanogênicas, também se observou aumento de fungos totais anaeróbios nos animais alimentados com macrotiloma. Fungos anaeróbios do rúmen apresentam atividade fibrolítica (PUNIYA et al., 2014). Entretanto, não foram observados indícios de aumento da degradabilidade da dieta destes animais, tais como aumento do CMS, aumento da produção de AGCC ou até mesmo superior desempenho produtivo.

Dentre as características de carcaça avaliadas, apesar de não terem sido observadas diferenças entre os animais dos tratamentos testados, pode-se destacar o pH, que está relacionado à depleção de reservas de glicogênio no tecido muscular e é um importante

indicador de qualidade da carne, devendo se encontrar na faixa de 5,5 a 5,8 em período de 24 horas após o abate (SILVA SOBRINHO et al., 2005). No presente experimento, o pH final se manteve dentro desta faixa tanto para os animais tratados com MAC, assim como CON, indicando boa qualidade da carne oriunda destes animais. Médias de pH final superiores a 5,8, podem comprometer diversos atributos da carne, tais como maciez, firmeza, capacidade de retenção de água e tempo de prateleira (SILVA SOBRINHO et al., 2005; HOPKINS; MORTIMER, 2014).

A qualidade e quantidade de gorduras na carne são destacados pontos de interesse em discussões relacionadas à saúde humana, principalmente no que diz respeito à ocorrência de doenças cardiovasculares (PAIM et al., 2014). Dentre os ácidos graxos avaliados individualmente nas amostras de carne deste experimento, destaca-se a proporção de ácidos graxos n-6:n-3, a qual deve apresentar valor máximo de 4,0 para uma dieta humana saudável (AFFMAN; MULLER, 2012), e os valores obtidos aqui foram 1,08 e 1,11 para CON e MAC respectivamente, valores desejáveis de acordo com o recomendado.

A atividade das enzimas Δ^9-desaturase C16, Δ^9-desaturase C18 e elongases, estão relacionadas à conversão dos ácidos graxos saturados mirístico (14:0), palmítico (16:0) e esteárico (18:0) em ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) e, à de produção ácidos graxos com cadeias maiores que 16 carbonos respectivamente (De SMET; RAES; DEMEYER, 2004). Do mesmo modo que não foram observadas diferenças entres os animais de ambos os tratamentos para estes ácidos graxos, também não se observou efeito da macrotiloma no nível de atividade destas enzimas.

No que diz respeito à influência do perfil de ácidos graxos da dieta sobre o perfil da carne, observou-se que mesmo havendo diferenças, sobretudo, no teor de ácidos graxos n-6 e n-3 das forragens utilizadas (n-6: capim-aruana - 0,96 e macrotiloma - 4,59 g/100g; e n-3: capim-aruana - 20,52 e macrotiloma 9,82 g/100 g), estas diferenças não se refletiram na carne. Isto se explica pelo fato de que tanto os ácidos graxos da macrotiloma, quanto os do capim-aruana, forragens fornecidos na forma de feno picado, estiveram sujeitos ao processo de biohidrogenação por parte da microbiota ruminal, não se verificando dessa forma, diferenças na incorporação de ácidos graxos n-6 e n-3 na carne destes animais (WOOD et al., 2008).

Os CLAs são isômeros *cis* e *trans* do ácido linoleico (C18:2), como é o caso do ácido rumênico (C18:2 c-9 t-11), forma predominante na carne e leite (PATRA; SAXENA, 2011). Estes ácidos graxos têm recebido crescente atenção nas pesquisas científicas, uma vez que o consumo destas moléculas tem sido associado a diversos efeitos benéficos à saúde humana,

tais como prevenção de aterosclerose, propriedades anticarcinogênicas, controle de hipertensão e modulação do sistema imune (BHATTACHARYA et al., 2006).

Aos taninos, atribui-se capacidade de inibirem etapas finais do processo de bio-hidrogenação de ácidos graxos no rúmen, o que leva ao acúmulo de ácido vacênico (C18:1 *t*-11), um importante precursor da biossíntese endógena de C18:2 c-9 t-11 (VASTA et al., 2009). No presente experimento, os baixos teores de taninos presentes na macrotiloma não foram capazes de aumentar os teores de CLAs na carne proveniente dos animais alimentados com esta planta.

4.5. Conclusão

O desempenho produtivo, emissão de CH_4, características de carcaça e perfil de ácidos graxos dos ovinos suplementados com a leguminosa macrotiloma foram semelhantes aos dos ovinos em dieta exclusiva de gramínea. No entanto, parâmetros ruminais como a contagem de protozoários e a abundância relativa de metanogênicas dos animais alimentados com esta leguminosa indicaram potencial do uso desta planta como possível estratégia de mitigação de CH_4, devendo esta ser alvo de novos estudos para melhor esclarecimento de seus mecanismos de ação e de seus atributos como alimento para ruminantes.

Referências

AFFMAN, L. A.; MÜLLER, M. Human nutrigenomics of gene regulation by dietary fatty acids. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 51, n. 1, p. 63-70, 2012.

ARCHIMÈDE, H. et al. Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and legumes. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 166-167, p. 59-64, 2011.

AUFRÈRE, J. et al. Mixing sainfoin and lucerne to improve the feed value of legumes fed to sheep by the effect of condensed tannins. **Animal**, Cambridge, v. 7, n. 1, p. 82-92, 2013.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis**. 18. ed. Arlington: AOAC International, 2011.

BEAUCHEMIN, K. A. et al. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v. 48, n. 2, p. 21-27, 2008.

BHATTA, R. et al. Difference in the nature of tannins on *in vitro* ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 11, p. 5512-5522, 2009.

BHATTACHARYA, A. et al. Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 17, n. 12, p. 789-810, 2006.

BLUMENTHAL, M. J.; STAPLES, I. B. Origin, evaluation and use of *Macrotyloma* as forage – a review. **Tropical Grasslands**, Brisbane, v. 27, n. 1, p. 16-29, 1993.

BRASIL. Casa Civil. Decreto Nº 30.691, de 29 de março de 1952. Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA. **Diário Oficial da União**, Brasília DF, p. 10.785, 07 jul. 1952.

CERRI, C. C. et al. Assessing the carbon footprint of beef cattle in Brazil: a case study with 22 farms in the State of Mato Grosso. **Journal of Cleaner Production**, Oxford, v. 112, n. 4, p. 2593-2600, 2016.

CHRISTIE, W. W. A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesteryl esters. **Journal of Lipid Research**, Memphis, v. 23, n. 7, p. 1072-1075, 1982.

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, n. 4, 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, n. 3, 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, n. 3, p. 313-322, 2007.

DE SMET, S.; RAES, K.; DEMEYER, D. Meat fatty acid composition as affected by fatness and genetic factors: a review. **Animal Research**, Les Ulis, v. 53, n. 2, p. 81-98, 2004.

DEWHURST, R. J. Milk production from silage: comparison of grass, legume, and maize silage and their mixtures. **Agricultural Food and Science**, Helsinki, v. 22, n. 1, p. 57-69, 2013.

ECKARD, R. J.; GRAINGER, C.; DE KLEIN, C. A. M. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: A review. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 130, n. 1-3, p. 47-56, 2010.

EMBRAPA. **Técnica do gás traçador SF_6 para medição de campo do metano ruminal em bovinos**: adaptações para o Brasil. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2004.

FRUTOS, P. et al. Condensed tannin content of several shrub species from a mountain area in northern Spain, and its relationship to various indicators of nutritive value. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 95, n. 3-4, p. 215-226, 2002.

GERDES, L. et al. Introdução de leguminosas em pastagem já estabelecida de capim Aruana em pastejo com ovinos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 46., 2009, Maringá. **Anais**... Maringá: UEM, 2009. p. 1-3.

GOEL, G.; MAKKAR, H. P. Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburg, v. 44, n. 4, p. 729-739, 2012.

HARA, A.; RADIN, N. S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 90, n.1, p. 420-426, 1978.

HRISTOV, A. N. et al. Effects of lauric and myristic acids on ruminal fermentation, production, and milk fatty acid composition in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, n. 1, p. 382-395, 2011.

HRISTOV, A. N. et al. Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 91, n. 11, p. 5045-5069, 2013.

HOPKINS, D. L.; MORTIMER, S. I. Effect of genotype, gender and age on sheep meat quality and a case study illustrating integration of knowledge. **Meat Science**, Barking, v. 98, n. 3, p. 544–555, 2014.

JAYANEGARA, A.; LEIBER, F.; KREUZER, M. Meta-analysis of the relationship between dietary tannin level and methane formation in ruminants from *in vivo* and *in vitro* experiments. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 96, n. 3, p. 365-375, 2012.

JOHNSON, K. et al. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a SF_6 tracer technique. **Environmental Science and Technology**, Washington, DC, v. 28, n. 2, p. 359-362, 1994.

KIM et al. Effects of grass forage species and long-termperiod of low quality forage diet feeding on growth performance, nutrient utilization and microbial nitrogen yield in growing wether lambs. **Animal Science Journal**, Tokyo, v. 87, n. 2, p. 202-208, 2016.

LIMA, P. M. T. et al. Adaptations of the methane determination SF6 tracer technique from bovine to sheep in Brazil. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS - WBC, 26., 2010 Santiago, Chile. **Proceedings…** Santiago, Chile: WBC, 2010.

LIMA, P. M. T. et al. *In vitro* gas production and fermentative parameters of the tropical legume *Macrotyloma axillare*. In: GREENHOUSE GAS AND ANIMAL AGRICULTURE CONFERENCE, 6., 2016, Melbourne. **Proceedings**… Melbourne,: GGAA, 2016. p. 77.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. **Methods**, Orlando, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LOUVANDINI, H. et al. Plantas taniníferas na nutrição de ovinos. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 18, n. 4, p. 176-181, 2011. Supl. 4.

MacDOUGALL, D. B. Color of meat. In: PEARSON, A. M.; DUTSON, T. R. **Quality attributes and their measurement in meat, poultry and fish products**. Heidelberg: Springer, 1994. p. 79-92.

MADSEN, J. et al. Methane and carbon dioxide ration in excreted air for quantification of production from ruminants. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 129, n. 1-3, p. 223-227, 2010.

MAKKAR, H. P. S. **Quantification of tannins in tree foliage**. Vienna: FAO/ IAEA, 2000.

MARTIN, C.; MORGAVI, D. P.; DOREAU, M. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. **Animal**, Cambridge, v. 4, n. 3, p. 351-365, 2010.

McDONALD, P. et al. **Animal nutrition**. Harlow: Pearson, 2011. 692 p.

MENEZES, A. M. et al. Performance and carcass traits of Santa Inês lambs finished with different sources of forage. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 42, n. 6, p. 428-437, 2013.

MORGAVI, D. P. et al. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. **Animal**, Cambridge, v. 4, n. 7, p. 1024-1036, 2010.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrition requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids and world camelids**. Washington, DC, 2007.

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, n. 3, p. 601-607, 1987.

PAIM, T. P. et al. Carcass traits and fatty acid profile of meat from lambs fed different cottonseed by-products. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 116, n. 2-3, p. 71-77, 2014.

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, n. 7, p. 1025-1031, 1971.

PATRA, A. K.; SAXENA, J. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 91, n. 1, p. 24-37, 2011.

PRESTON, T. R. **Tropical animal feeding**: a manual for research workers. Rome: FAO, 1995. 126 p.

PUNIYA, A. K. et al. Role of live microbial feed supplements with reference to anaerobic fungi in ruminant productivity. **Journal of Integrative Agriculture**, Peking, v. 14, n. 3, p. 550-560, 2014.

RODRÍGUEZ, R. et al. Biological effect of tannins from different vegetal origin on microbial and fermentation traits in vitro. **Animal Production Science**, Victoria, v. 54, n. 8, p. 1039-1046, 2014.

RODRÍGUEZ-RUIZ, J. et al. Rapid simultaneous lipid extraction and transesterification for fatty acid analyses. **Biotechnology Techniques**, Dordrecht, v. 12, n. 90, p. 689-691, 1998.

SANTOS, C. L. et al. Desenvolvimento relativo dos tecidos ósseo, muscular e adiposo dos cortes da carcaça de cordeiros Santa Inês. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 2, p. 487-492, 2001.

SILVA SOBRINHO, A. G. et al. Características de qualidade da carne de ovinos de diferentes genótipos e idades ao abate. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 34, n. 3, p. 1070-1078, 2005.

TIEMANN, T. et al. Effect of season, soil type and fertilizer on the biomass production and chemical composition of five tropical shrub legumes with forage potential. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 64, n. 3, p. 255-264, 2009.

VASTA, V. et al. Metabolic fate of fatty acids involved in ruminal biohydrogenation in sheep fed concentrate or herbage with or without tannins. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 8, p. 2674-2684, 2009.

WAGHORN, G. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production - Progress and challenges. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 147, n. 1-3, p. 116-139, 2008.

WANG, Y. et al. Comparison of alfalfa and mixed alfalfa-sainfoinpastures for grazing cattle: Effects on incidence of bloat, ruminal fermentation, and feed intake. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 86, n. 3, p. 383-392, 2006.

WILLIAMS, Y. J. et al. A vaccine against rumen methanogens can alter the composition of archaeal populations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 75, n. 7, p. 1860-1866, 2009.

WOOD, J. D. et al. Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. **Meat Science**, Barking, v. 78, n. 4, p. 343-358, 2008.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados observados neste estudo, confirmou-se a possibilidade do uso da leguminosa *Macrotyloma axillare* - NO 279 como opção de forragem em sistemas de produção de ruminantes. Os seus baixos teores de taninos não constituíram fator limitante para a inclusão desta planta na dieta dos animais, e embora não tenha sido verificado ganho médio em peso superior nos animais suplementados, acredita-se que, caso uma fonte de energia com qualidade superior ao feno de gramínea aqui utilizada tivesse sido incluída na dieta, poderia ter sido observado o melhor aproveitamento desta leguminosa, o que poderia também se refletir em melhor desempenho animal.

No que diz respeito à emissão de CH_4, a suplementação de macrotiloma não foi capaz de reduzir os níveis de emissão deste gás, considerando-se a emissão diária por animal, a emissão em relação ao consumo de MS, como também em relação ao GMD. Como discutido ao longo do trabalho, a qualidade da dieta como um todo, os baixos teores de taninos desta leguminosa, assim como o nível de inclusão utilizado, foram fatores apontados como motivos pelos quais não se observaram efeitos sobre a emissão de CH_4.

No entanto, levando-se em conta fatores como a redução na produção de CH_4 *in vitro* na ausência de PEG, a redução na contagem de protozoários verificada em dois ensaios *in vivo* e a diminuição na presença de metanogênicas observada no ensaio de desempenho animal, tem-se indícios de que esta leguminosa, talvez por meio de ação dos seus taninos, possua capacidade de mitigar a emissão de CH_4.

Assim sendo, sugere-se que estudos mais aprofundados devam ser realizados, buscando-se melhor compreender as interações desta planta e seus taninos com o complexo ecossistema ruminal, lançando-se mão de ferramentas como o uso de PEG em ensaios *in vivo* ou até mesmo técnicas de biologia molecular mais avançadas, as quais podem permitir maior detalhamento a respeito dos efeitos da macrotiloma sobre a microbiota ruminal. O potencial desta leguminosa em mitigar CH_4, associado a dietas mais equilibradas, que permitam melhor desempenho animal, é de grande valor, uma vez que, alcançar a seguridade alimentar de forma sustentável é um dos grandes objetivos da ciência para os próximos anos.