UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

CIBELLE BORGES FIGUEIREDO

# O nitrato encapsulado aumenta a eficiência de utilização do suplemento para bovinos de corte em pastejo

GOIÂNIA
2021

UFG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES**

**E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

**1. Identificação do material bibliográfico**

[ ] Dissertação [X ] Tese

**2. Nome completo do autor**

CIBELLE BORGES FIGUEIREDO

**3. Título do trabalho**

O Nitrato Encapsulado Aumenta a Eficiência de Utilização do Suplemento para Bovinos de Corte em Pastejo

**4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)**

Concorda com a liberação total do documento [ X ] SIM [ ] NÃO[1]

**[1]** Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:
**a)** consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
**b)** novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.
O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.
Casos de embargo:
- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.

---

Documento assinado eletronicamente por **Victor Rezende Moreira Couto, Professor do Magistério Superior**, em 03/03/2022, às 11:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **CIBELLE BORGES FIGUEIREDO, Discente**, em 03/03/2022, às 17:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2628884** e o código **CRC 11EE09C2**.

---

**Referência:** Processo nº 23070.065157/2021-95 SEI nº 2628884

CIBELLE BORGES FIGUEIREDO

# O nitrato encapsulado aumenta a eficiência de utilização do suplemento para bovinos de corte em pastejo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Escola de Veterinária e Zootecnia, da Universidade Federal de Goiás (UFG), como requisito para obtenção do título de Doutora em Zootecnia.
Área de concentração: Produção Animal
Linha de pesquisa: Nutrição e Produção de Ruminantes

Orientador: Prof. Dr. Victor Rezende Moreira Couto
Coorientador: Prof. Dr. Juliano José de Resende Fernandes
Coorientadora: Dra. Maurícia Brandão da Silva

GOIÂNIA
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Figueiredo, Cibelle Borges
O nitrato encapsulado aumenta a eficiência de utilização do suplemento para bovinos de corte em pastejo [manuscrito] / Cibelle Borges Figueiredo. - 2021.
69 f.

Orientador: Prof. Dr. Victor Rezende Moreira Couto; co orientadora Maurícia Brandão da Silva; co-orientador Dr. Juliano José de Resende Fernandes.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Goiânia, 2021.
Bibliografia.
Inclui siglas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. bovino. 2. metano. 3. nitrato encapsulado. 4. pasto. 5. suplemento. I. Couto, Victor Rezende Moreira, orient. II. Título.

CDU 635

UFG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ATA DE DEFESA DE TESE**

**Ata nº 57** da sessão de Defesa de Tese de **CIBELLE BORGES FIGUEIREDO** que confere o título de **Doutora em Zootecnia** pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, na área de concentração em Produção Animal.

**Aos quatorze dias do mês de dezembro de dois mil e vinte e um** - (14/12/2021) a partir das **14h00min**, por meio de videoconferência pelo link: meet.google.com/chb-taqh-aow, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada "**Efeito do Nitrato em Suplementos Múltiplos para Bovinos de Corte em Pastejo**". Os trabalhos foram instalados pelo Orientador **Victor Rezende Moreira Couto** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Paulo Henrique Jorge da Cunha**, membro titular externo; **Sergio Lucio Salomon Cabral Filho**, membro titular externo; **Marinaldo Divino Ribeiro**, membro titular interno; e **Rafael Canonenco de Araújo – Iniciativa Privada**, membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca **fizeram** sugestão de alteração do título do **trabalho conforme explicitado abaixo**. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido a candidata **Aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Orientador e Presidente da Banca Examinadora **Victor Rezende Moreira Couto**, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

**O Nitrato Encapsulado Aumenta a Eficiência de Utilização do Suplemento para Bovinos de Corte em Pastejo**

Documento assinado eletronicamente por **Victor Rezende Moreira Couto, Professor do Magistério Superior**, em 12/03/2022, às 19:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Marinaldo Divino Ribeiro, Professor do Magistério Superior**, em 12/03/2022, às 20:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Paulo Henrique Jorge Da Cunha, Professor do Magistério Superior**, em 16/03/2022, às 10:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Sergio Lucio Salomon Cabral Filho, Usuário Externo**, em 16/03/2022, às 20:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Rafael Canonenco de Araujo, Usuário Externo**, em 17/03/2022, às 09:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2744612** e o código CRC **395085D0**.

**Referência**: Processo nº 23070.065157/2021-95 SEI nº 2744612

Soli Deo Gloria

## AGRADECIMENTOS

Á Deus por me conceder a oportunidade de realizar um doutorado e me proporcionar situações para que eu amadurecesse;

Aos meus pais José Carlos e Maria do Socorro por todo amor e por acreditarem em mim investindo recursos, palavras, e orações que me fortaleceram e não me fizeram desistir;

Aos meus irmãos Vinícius e Júnior por todo apoio, parceria e incentivo;

Às minhas sobrinhas Lara e Helena que com muita pureza me ensinam dia após dia sobre as coisas simples da vida;

Aos meus avós Ribamar e Gracildes, meus tios, primos, padrinhos pelo incentivo e orações que me fizeram chegar até aqui;

À tia Berenice e Dr. Araújo (*in memorian*) por todo carinho e ajuda nos meus primeiros meses em Goiânia;

Ao meu orientador professor Victor que com muita paciência me orientou e me deu conselhos sábios que levarei para o resto da vida. Aos meus coorientadores Maurícia e Juliano pelas ricas contribuições ao meu trabalho;

Á equipe CEBC pela amizade e por me ceder os animais para a realização de avaliações referentes à minha pesquisa;

Ao melhor time: CEPPEX! Sou grata por realizar a minha pesquisa neste local, pois eu cresci pessoalmente e profissionalmente. E aos estagiários: Adilson, Bruna, Carlos, Dudinha, Eduardo, Estêvão, Pitaluga, Jade, Lara, Leo, Let, Natão, Nat, Nivaldo, Sabrina e Rui Barbosa... meu muito obrigada por todo incentivo, momentos de descontração e ajuda no laboratório. Vocês são incríveis!

Ao professor Sérgio, Reginaldo e todos da equipe do SEFID (Luis Fernando, Luis Eduardo, Vitor, Rodrigo, Pepê, Michele, Nath Doces, Daniel, Maria, Graciele) que fizeram tanto por mim e possibilitaram a realização do experimento *in vitro*;

Á Eliane Miyagi por todo suporte e amizade. Obrigada por acreditar em mim. Seus conselhos não foram em vão kkk

Aos meus amigos que o PPGZ me presenteou: Daniel, Sarah, Lorena, Kaique, Luan, Daiana, Alana, Miron e Higor. Muitas vezes vocês foram meu braço direito, esquerdo, minhas pernas... Jamais esquecerei de vocês;

À toda família ICESO pelas orações, suporte, incentivo, encorajamento, e por me fazerem questão de sempre demonstrar amor a mim;

À GRASP na pessoa do Rafael Araújo por tornar esse estudo possível;

Á FAPEG/CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

Á toda comunidade do PPGZ/EVZ/UFG;

Enfim... a todos que contribuíram de forma direta e indireta, muito obrigada!

# SUMÁRIO

**LISTA DE FIGURAS** ..... x

**LISTA DE TABELAS** ..... xi

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS** ..... xiii

**RESUMO** ..... xv

**ABSTRACT** ..... xvi

**1 INTRODUÇÃO** ..... 17

**2 REVISÃO DE LITERATURA** ..... 18

2. 1 Considerações sobre emissão de gases de efeito estufa e o potencial da pecuária sustentável ..... 18

2.2 Produção entérica de metano por ruminantes a pasto ..... 19

2.3 Uso do nitrato na alimentação de ruminantes ..... 20

2.3.1 Parâmetros ruminais ..... 20

2.3.2 Desempenho ..... 23

**3 REFERÊNCIAS** ..... 25

**CAPÍTULO 2 - EFEITOS DO USO DE NITRATO ENCAPSULADO NA SUPLEMENTAÇÃO DE BOVINOS DE CORTE EM PASTEJO** ..... 31

**RESUMO** ..... 31

**ABSTRACT**. ..... 32

**1 INTRODUÇÃO** ..... 33

**2 MATERIAL E MÉTODOS** ..... 33

**3 RESULTADOS** ..... 37

**4 DISCUSSÃO** ..... 42

**5 CONCLUSÃO** ..... 47

**6 REFERÊNCIAS** ..... 48

**CÁPITULO 3 - AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA PRODUÇÃO DE METANO COM USO DE NITRATO ENCAPSULADO** ..... 51

**RESUMO** ..... 51

**ABSTRACT** ..... 52

**1 INTRODUÇÃO** ..... 53

**2 MATERIAL E MÉTODOS** ..... 53

**3 RESULTADOS** ..... 56

**4 DISCUSSÃO** ..... 65

**5 CONCLUSÃO** ..... 68

**6 REFERÊNCIAS** ..... 69
**CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS**..... 72

# LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1 - Resumo da conversão de monossacarídeos a ácidos graxos de cadeia curta ..... 18

CAPÍTULO 2

FIGURA 1 - Flutuação diária de consumo de matéria seca de suplemento (kg/dia) por bovinos de corte na época seca, transição seca águas e águas..... 32

FIGURA 2 - Taxa de consumo por bovinos de corte suplementados a pasto no período de transição seca águas (A) e período de águas (B) ..... 38

CAPÍTULO 3

FIGURA 1 – Curva de produção de gás acumulativa dos tratamentos FS e NE na época seca ajustada por meio do modelo logístico..... 55

FIGURA 2 – Concentrações de N-$NH_3$ ao longo do tempo de incubação (h) no período da seca ..... 56

FIGURA 3 – Curva de produção de gás acumulativa dos tratamentos FS e NE na época de transição seca-águas ajustada por meio do modelo logístico. 58

FIGURA 4 - Concentrações de N-$NH_3$ ao longo do tempo de incubação (h) no período de transição seca águas ..... 59

FIGURA 5 – Curva de produção de gás acumulativa dos tratamentos FS e NE na época de águas ajustada por meio do modelo logístico..... 61

FIGURA 6 - Concentrações de N-$NH_3$ ao longo do tempo de incubação (h) no período de período de águas ..... 62

## LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1 - Estequiometria da conversão de glicose em AGCC..... 17

CAPÍTULO 2

TABELA 1 - Composição de ingredientes e composição química dos suplementos fornecidos aos animais durante o período experimental..... 31

TABELA 2 - Dados médios de temperatura, umidade e pluviosidade durante o período experimental..... 33

TABELA 3 - Composição química do pastejo simulado (g/kg) durante o período experimental..... 33

TABELA 4 - Disponibilidade média de matéria seca e frações da pastagem (kg/ha) composta por *Urochloa brizantha* nos períodos de seca, transição seca-águas, águas e período total..... 35

TABELA 5 - Efeito do nitrato encapsulado no suplemento sobre o desempenho de novilhos de corte no período seco, transição seca águas, águas e período total..... 36

CAPÍTULO 3

TABELA 1 - Composição química (g/kg) do pastejo simulado utilizado como substrato na incubação..... 51

TABELA 2 - Proporção de ingredientes utilizados para compor o substrato e composição química do concentrado dos tratamentos..... 51

TABELA 3 - Degradabilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e degradabilidade *in vitro* de fibra em detergente neutro (DIVFDN) com a inclusão ou não de nitrato encapsulado no substrato de época de seca em diferentes tempos de incubação..... 56

TABELA 4 - Proporção molar de ácidos graxos de cadeia curta (m*M*/L, AGCC), 56

produção de gás total (mL), produção de metano total (mg) e concentração média de nitrogênio amoniacal (mg/dL, $N\text{-}NH_3$) com a inclusão ou não de nitrato encapsulado no substrato de época de seca.....

TABELA 5 - Degradabilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e degradabilidade *in vitro* de fibra em detergente neutro (DIVFDN) com a inclusão ou não de nitrato encapsulado no substrato de época de transição seca-águas em diferentes tempos de incubação..... 57

TABELA 6 - Produção de gás total, produção de metano total (mg), concentração média de nitrogênio amoniacal ($N\text{-}NH_3$) e proporção molar de ácidos graxos de cadeia curta com a inclusão ou não de nitrato encapsulado no substrato de época de transição seca-águas..... 59

TABELA 7 - Degradabilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e degradabilidade *in vitro* de fibra em detergente neutro (DIVFDN) com a inclusão ou não de nitrato encapsulado no substrato de época de águas em diferentes tempos de incubação..... 60

TABELA 8 - Produção de gás total, produção de metano total (mg), concentração média de nitrogênio amoniacal ($N\text{-}NH_3$) e proporção molar de ácidos graxos de cadeia curta com a inclusão ou não de nitrato encapsulado no substrato de época de águas..... 61

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

GEE – Gás de efeito estufa

$CO_2$eq – Dióxido de carbono equivalente

$CH_4$ - Metano

$CO_2$ – Dióxido de carbono

AGCC – Ácidos graxos de cadeia curta

FDN – Fibra em detergente neutro

PB – Proteína bruta

ILPF – Integração lavoura pecuária floresta

$NO_3$ - Nitrato

NDT – Nutrientes digestíveis totais

PC – Peso corporal

NO – Óxido nítrico

GMD – Ganho médio diário

NE – Nitrato encapsulado

MS – Matéria seca

MO – Matéria orgânica

EE – Extrato etéreo

FDNcp – Fibra em detergente neutro corrigido para cinza e proteína

FDNi – Fibra em detergente neutro indigestível

MSpd – Matéria seca potencialmente digestível

CMSS – Consumo de matéria seca de suplemento

EA – Eficiência de ganho de peso em relação ao consumo de suplemento

PCf – Peso corporal final

$\Delta G$ – Variação da energia livre de Gibbs

$\Delta H$ = Variação de entalpia

ATP – Adenosina trifosfato

$N\text{-}NH_3$ – Nitrogênio amoniacal

## RESUMO

O nitrato encapsulado tem sido apontado como uma ferramenta promissora para redução de produção de metano por animais ruminantes. Objetivou-se avaliar, no Capítulo 2, os efeitos do uso do nitrato encapsulado sobre o desempenho de bovinos de corte a pasto nas épocas seca, transição seca águas e águas, e no Capítulo 3 os parâmetros fermentativos em ensaios *in vitro* utilizando substratos em proporções e composições semelhantes do experimento de desempenho. Os tratamentos avaliados foram: Controle – suplemento proteico-energético sem inclusão de nitrato encapsulado, e NE – suplemento proteico-energético com inclusão de 50 g de nitrato encapsulado por kg de matéria seca. No experimento de desempenho (Capítulo 2), o suplemento foi fornecido diariamente na proporção de 1,0% do peso corporal. A sobra do concentrado foi pesada diariamente para estimar o consumo de suplemento. Os animais foram pesados a cada 28 dias, e também avaliada a taxa de consumo de suplemento. Houve redução no consumo de matéria seca do suplemento com a inclusão de NE no suplemento no período seco ($P < 0,01$) (2,404 para 2,283 kg/dia), transição seca-águas ($P < 0,01$) (2,922 kg para 2,496 kg/dia), águas ($P < 0,01$) (3,631 para 3,143 kg/dia) e período total ($P < 0,01$) (2,943 para 2,605 kg/dia). O ganho médio diário não foi influenciado pela inclusão de NE em nenhum dos períodos avaliados ($P > 0,13$). A inclusão do NE resultou em elevação da eficiência alimentar dos animais no período de transição seca-águas de 0,362 para 0,411 ($P < 0,01$). No Capítulo 3 foram realizados três experimentos, correspondendo a época seca, transição seca-águas e águas, a fim de avaliar os tratamentos Controle e NE. Os tempos de avaliação foram zero, três, seis, nove, 12, 24 e 48 horas após incubação. Cada tempo era composto por suas respectivas triplicadas. Nesses tempos, foram avaliados a degradabilidade *in vitro* de matéria seca (DIVMS) e fibra em detergente neutro (DIVFDN), nitrogênio amoniacal ($N\text{-}NH_3$), metano e produção de gases. No tempo 24 horas foi avaliado a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Houve redução na produção de metano de 22,2 para 19,3 mg ($P < 0,01$) na época seca. O tempo total de incubação (48 horas) foi marcado com redução de 5% na DIVMS com a inclusão no NE (741,4 vs 703,9 g/kg) ($P < 0,02$) no substrato da época de transição seca-águas. Foi observado aumento da proporção molar de acetato de 14,36 para 20,33 m*M*/L ($P < 0,04$) com a inclusão do nitrato encapsulado no substrato da época de águas. Não houve efeito significativo da inclusão do nitrato no substrato da época de águas sobre a DIVMS e DIVFDN ($P > 0,06$). A inclusão de nitrato encapsulado na proporção de 50 g/kg de MS de suplemento aumenta a eficiência alimentar de animais sob pastejo, e reduz a produção de metano com uso de forragem de época seca.

**Palavras-chave:** bovino, metano, nitrato encapsulado, pasto, ruminante, suplemento

## ABSTRACT

Encapsulated nitrate has been pointed out as a promising tool for reducing methane production by ruminant animals. The objective was to evaluate, in Chapter 2, the effects of the use of encapsulated nitrate on the performance of beef cattle on pasture in the dry season, dry transition of water and water, and in Chapter 3 the fermentative parameters in *in vitro* assays using substrates in proportions and similar compositions of the performance experiment. The evaluated treatments were: Control – protein-energy supplement without inclusion of encapsulated nitrate, and EN – protein-energy supplement with inclusion of 50 g of encapsulated nitrate per kg of dry matter. In the performance experiment (Chapter 2), the supplement was given daily at 1.0% of body weight. The leftover concentrate was weighed daily to estimate supplement intake. The animals were weighed every 28 days, and the rate of supplement consumption was also evaluated. There was a reduction in supplement dry matter intake with the inclusion of EN in the supplement in the dry period ($P < 0.01$) (2.404 to 2.283 kg/day), dry-water transition ($P < 0.01$) (2.922 kg to 2.496 kg/day), water ($P < 0.01$) (3.631 to 3.143 kg/day) and total period ($P < 0.01$) (2.943 to 2.605 kg/day). The average daily gain was not influenced by the inclusion of NE in any of the evaluated periods ($P > 0.13$). The inclusion of EN resulted in an increase in the feed efficiency of the animals in the dry-water transition period from 0.362 to 0.411 ($P < 0.01$). In Chapter 3, three experiments were carried out, corresponding to the dry season, dry-water transition and water, in order to evaluate the Control and EN treatments. The evaluation times were zero, three, six, nine, 12, 24 and 48 hours after incubation. Each time was composed of its respective triplicates. In these times, the *in vitro* degradability of dry matter (IVDDM) and neutral detergent fiber (IVDNDF), ammonia nitrogen ($N\text{-}NH_3$), methane and gas production were evaluated. At 24 hours, the production of short-chain fatty acids (SCFA) was evaluated. There was a reduction in methane production from 22.2 to 19.3 mg ($P < 0.01$) in the dry season. The total incubation time (48 hours) was marked with a 5% reduction in IVDDM with inclusion in EN (741.4 vs 703.9 g/kg) ($P < 0.02$) in the dry transition season substrate. waters. An increase in the molar proportion of acetate from 14.36 to 20.33 m*M*/L ($P < 0.04$) was observed with the inclusion of encapsulated nitrate in the wet season substrate. There was no significant effect of including nitrate in the wet season substrate on IVDDM and IVDNFD ($P > 0.06$). The inclusion of encapsulated nitrate in the proportion of 50 g/kg of supplement DM increases the feed efficiency of grazing animals, and reduces the methane production with the use of dry season forage.


**Keywords:** beef, methane, encapsulated nitrate, pasture, ruminant, supplement

# CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

## 1 INTRODUÇÃO

A produção de carne bovina a pasto representa a maior parcela do sistema produtivo no Brasil, cerca de 86% dos animais abatidos são provenientes de terminação a pasto[1]. Sabe-se que a produção no Brasil tem como desafio a utilização de gramíneas de alto potencial produtivo de massa verde, porém há o efeito da sazonalidade de produção. Assim, estratégias de nutrição são fundamentais para garantir aumento da produtividade e otimização do sistema.

O uso de suplementação é uma ferramenta indispensável para intensificação da produção de animais em pastejo. As pesquisas têm se concentrado para estabelecer técnicas de utilização a fim de proporcionar estratégias de suplementação para épocas específicas do ano. Atrelado a isso, a crescente preocupação mundial com o aquecimento global suscitou diversas pesquisas em nutrição e produção de ruminantes visando estratégias para mitigar a produção de metano pelos animais, que representa uma perda de aproximadamente 6,5% da energia bruta das dietas[2].

Com isso, os estudos têm avaliado fatores mais específicos na nutrição animal para a redução da produção de gás de efeito estufa (GEE) e aumento da eficiência alimentar, como o efeito da inclusão de diferentes fontes de óleos na dieta[3–8], utilização de aditivos e seu efeito sobre o desempenho animal[9–15], e o nitrato[11,16–19].

O uso de nitrato torna-se atrativo devido à proposta de incremento no desempenho produtivo em virtude da melhor eficiência. A energia que seria perdida para a produção de metano é direcionada ao processo bioquímico de conversão do nitrato à amônia, sendo este produto utilizado pelas bactérias ruminais para síntese de proteína microbiana. Diante disso, objetiva-se levantar discussões ambientais que envolve a importância da produção de bovinos a pasto, bem como o uso do nitrato como ferramenta nutricional mitigadora de gás de efeito estufa.

# 2 REVISÃO DE LITERATURA

## 2. 1 Considerações sobre emissão de gases de efeito estufa e o potencial da pecuária sustentável

Em 1997, visando reduzir a emissão de gases de efeito estufa (GEE), foi criado, a partir do Protocolo de Kyoto, um mercado de comercialização de crédito de carbono[20,21]. O Mecanismo de Desenvolvimento Limpo (MDL) permite que os países desenvolvidos que não conseguirem cumprir suas metas de redução dos GEE compensem adquirindo os Certificados de Emissões Reduzidas (CER), que funcionam com unidade certificada de uma tonelada de dióxido de carbono equivalente ($tCO_2eq$) comercializados de forma direta entre países e empresas[20,22]. Dessa forma, os países obrigados a reduzirem suas emissões de GEE subsidiam reflorestamento (sequestro de carbono) ou formas de produção não poluentes ou menos poluentes em países em desenvolvimento (que não têm a obrigação de redução), podendo cumprir suas metas e estimular o desenvolvimento sustentável nesses países.

Na COP21 (Conferência das Nações Unidas sobre Mudança do Clima) em 2015 foi acordado que os países iriam trabalhar juntos para limitar o aquecimento global abaixo de 2ºC, e se adaptar aos impactos do clima em mudança e disponibilizar recursos para cumprir esse objetivo, surgindo assim o Acordo de Paris. A cada cinco anos os países precisam apresentar ou atualizar seus planos de redução de emissões, que devido à pandemia, a COP26 foi realizada no ano de 2021 com o objetivo de firmar o acordo de limitar o aquecimento global em 1,5ºC[23]. Segundo o Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC)[24], para limitar o aquecimento global em 1,5ºC, as emissões de $CO_2$ precisam ser reduzidas em 45% até 2030 (na comparação com 2010) e neutralidade de liberação de $CO_2$ até 2050. Ainda, na COP26, o metano ganhou muita importância no Brasil por apresentar maior retenção de calor do que o CO2, mas se decompõe na atmosfera mais rapidamente. Isso significa que as reduções na produção de metano pode ter um impacto rápido no controle do aquecimento global[23].

De acordo com dados do Sistema de Estimativas de Emissões e Remoções de Gases de Efeito Estufa[25], o Brasil emitiu 2,17 bilhões de $tCO_2eq$ em 2019. Do total das emissões, a agropecuária representou 28% (598,7 milhões de $tCO_2eq$), sendo 61,1% (366,1 milhões de $tCO_2eq$) desta última originada da fermentação entérica. Mas, atrelado a isso, Figueiredo el al.[26] relataram que em cenário de pastagens bem manejadas, ou seja, adubadas anualmente com N, P e K, calcário, suplementos para animais, herbicidas e diesel para operações no campo, o que justifica maior produção de forragem, aumento na taxa de lotação e menor

tempo para atingir o peso de abate, possuem capacidade de sequestro de carbono de 0,44 $tCO_2$/ha/ano.

A baixa intensificação da pecuária de corte, bem como o uso de animais ineficientes e vacas com ciclos reprodutivos longos têm contribuido para o aumento da pegada de carbono por meio de maiores emissões de metano ($CH_4$)[27], podendo produzir aproximadamente três a quatro vezes mais do que sistemas intensivos de produção[28]. Esse efeito foi observado por Figueiredo et al.[26] em que verificaram maior pegada de carbono em sistemas de pastagens degradadas do que em pastagens bem manejadas, sendo 18,5 kg e 7,6 kg de $CO_2$ eq/kg de peso corporal animal, respectivamente. Os mesmos autores verificaram que em área de integração lavoura-pecuária-floresta (ILPF) a pegada de carbono observada foi – 28,1 kg de $CO_2$ eq/kg de peso corporal. Além disso, Carvalho et al.[29] verificaram que a rotação de pastagem com culturas de soja possui capacidade de fixar carbono no solo a uma taxa de 0,733 t/ha/ano, resultando em emissão negativa de GEE com taxa de - 0,36 t/ha/ano. Isso significa que o aumento da produção de bovinos de corte a pasto no Brasil contribui positivamente no cumprimento dos acordos firmados para a redução de emissão de GEE.

Comparando dois cenários apresentados por Brunes e Couto[30], sendo sistema média brasileira (SMB): 9,4 t/ha de produção de forragem, 88 animais abatidos, produção de carne de 19.857 kg; e sistema intensivo a pasto (SIP): 13,5 t/ha de produção de forragem, 531 animais abatidos e 125.559 kg de carne produzida. Esses autores verificaram redução de produção de metano de 1,88 para 0,60 kg/kg de carcaça produzida ao comparar o SMB e SIP, respectivamente. Ao comparar emissão de metano na fase de terminação nesses sistemas citados anteriormente, os mesmos autores verificaram redução de 63,44 para 24,84 kg/ciclo. Diante disso, a intensificação da produção de bovinos de corte a pasto demonstra efeito altamente positivo, tornando o sistema de pecuária a pasto sustentável e atrativo diante do cenário de agronegócio mundial.

## 2.2 Produção entérica de metano por ruminantes a pasto

O metano proveniente do processo fermentativo varia de acordo com a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), animais de produção, fatores nutricionais, manejo, qualidade da forragem, digestibilidade da fibra, consumo de matéria seca, uso de carboidratos rapidamente digestíveis[31,32], sendo que em dietas à base de grãos a perda de energia na forma de metano varia de 2% a 3%, o que representa cerca da metade do valor perdido em dietas à base de volumoso[33]. Kozloski[34] apresenta a estequiometria da conversão de um mol de glicose em ácidos graxos na TABELA 1.

TABELA 1 – Estequiometria da conversão de glicose em AGCC

| | | |
|---|---|---|
| GLICOSE | = 2 acetato + 2 $CO_2$ + 4$H_2$ | ΔH = - 251 kcal/mol |
| GLICOSE | = butirato + 2 $CO_2$ + 2$H_2$ | ΔH = - 118 kcal/mol |
| GLICOSE + 2$H_2$ | = 2 propionato | ΔH = + 60 kcal/mol |
| GLICOSE | = 2 lactato | ΔH = - 16 kcal/mol |

Fonte: Kozloski[34]

De acordo com a variação da entalpia, a produção de acetato resulta em maior perda de energia por meio da produção de $CH_4$ devido a maior geração de $H_2$. Tendo em vista que o ácido acético representa a maior proporção molar dos ácidos graxos de cadeia curta[35,36], a margem de redução da produção de metano pode ser aumentada.

Ao longo do período de transição águas-seca, cerca de 90 dias, ao ingressar no período seco as pastagens brasileiras encontram-se no estado mais crítico em termos de disponibilidade e valor nutricional. Com a chegada da seca, as pastagens apresentam alto teor de fibra em detergente neutro (FDN) e baixo teor de PB, o que reduz a taxa de passagem e degradabilidade, resultando em maior tempo de fermentação e produção de metano[37]. O incremento desses componentes de baixa digestibilidade ou indigestíveis na planta é resultado de fenômeno sazonal que acontece anualmente no Brasil central, sendo necessárias estratégias de produção e manejo nutricional para contornar essas situações.

O nível de suplementação e o manejo da pastagem também são fatores que influenciam na emissão de GEE. Koscheck et al.[38] observaram que manejar o capim Marandú com altura de pastejo de 15 cm e suplementação proteico energética de 0,6% do peso vivo resultou em aumento de eficiência de uso da forragem, maior desempenho por unidade de área, além de reduzir a produção de metano por animal de 161 g para 103,1 g/animal/dia, quando comparado com animais submetidos a maior altura de pastejo (35 cm) e sem suplementação.

## 2.3 Uso do nitrato na alimentação de ruminantes

### 2.3.1 Parâmetros ruminais

As moléculas de hidrogênio são liberadas no ambiente ruminal de diversas formas e rotas metabólicas, uma delas é durante a formação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)[39]. Kozloski[39] apresenta que a produção de AGCC mais oxidados (acetato e butirato) possuem efeitos inversos no que se refere à liberação de íons $H^+$ comparado aos mais reduzidos (propionato) (FIGURA 1).

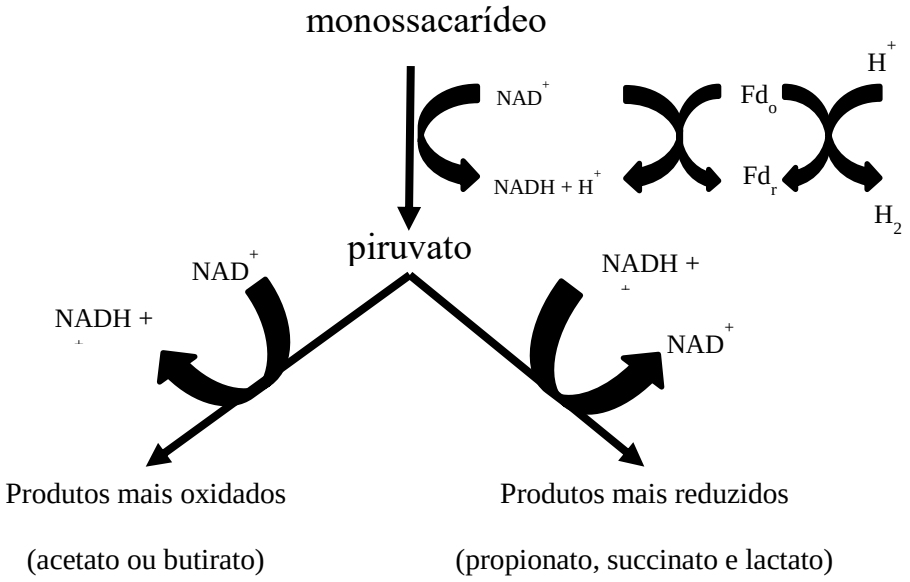


FIGURA 1 – Resumo da conversão de monossacarídeos a ácidos graxos de cadeia curta. Fonte: adaptado de Kozloski [39]

Os monossacarídeos são convertidos em metabólito comum (piruvato) e nesse processo há formação de coenzimas reduzidas (NADH) com a liberação de um íon de $H^+$. Como o $NAD^+$ é utilizado para oxidar metabólitos e produtos intermediários de rotas metabólicas há constante formação de NADH + $H^+$ no ambiente ruminal. Além da via glicolítica a formação de acetato também libera NADH + $H^+$ no ambiente ruminal. O acetato, independente do manejo alimentar, é o maior produto formado entre os AGCC e, portanto, há intensa liberação de íons de $H^+$ no ambiente ruminal. Esses íons de hidrogênio são convertidos por ferrodoxinas, que pegam os íons $H^+$ e convertem a $H_2$ (gás hidrogênio), regenerando o $NAD^+$ para funcionar como agente oxidante nas rotas metabólicas. O gás hidrogênio é utilizado pelas *Archaea* para formação do metano, onde utilizam $2H_2$ + fonte de carbono para formar o $CH_4$[39]. O nitrato atuará na captura dessas moléculas de $H_2$ livres no ambiente ruminal para formar amônia que outrora seriam utilizadas para formar metano[16].

Teoricamente, a ação do nitrato no ambiente ruminal está em sua redução a amônia através da captação de $H_2$, que é mais favorável a redução de nitrato a nitrito ($\Delta G$ = - 130 kJ $mol^{-1}$ de hidrogênio) e nitrito a amônio ($\Delta G$ = - 124 kJ/mol de hidrogênio) que a redução de dióxido de carbono ($CO_2$) a $CH_4$ ($\Delta G$ = - 16,9 kJ/mol de hidrogênio)[40]. A equação abaixo apresenta o esquema de redução de nitrato no rúmen:

$$NO_3^- + H_2 \rightarrow H_2O + NO_2^-$$

$$NO_2^- + 3H_2 + 2H^+ \rightarrow 2H_2O + NH_3 + H^+$$

Desta forma, usando os cálculos estequiométricos, para cada 1 mol de nitrato são necessários 4 moles de hidrogênio, o que significa que será formado 1 mol de metano a menos para cada mol de nitrato reduzido. Além disso, o nitrato pode ser tóxico aos microrganismos ruminais incluindo os metanogênicos, sendo a redução da produção de metano explicada de modo estequiométrico e por meio de competição entre microrganismos[41]. Dessa forma, acredita-se que a redução da produção de metano no rúmen pode ser tanto pela possível toxicidade do nitrato ou seus intermediários às *Archaea* quanto pela competição por hidrogênio que é fonte de energia para os microrganismos metanogênicos[42]. Além disso, o metano pode ser oxidado em ambientes anaeróbicos na presença de nitrato e nitrito [43–45], de forma que o metano formado se torna doador de elétrons nas seguintes reações: 1) $CH_4 + 4NO_3^- \rightarrow CO_2 + 4NO_2^- + 2H_2O$[44]; 2) $3CH_4 + 8NO_2^- + 8H^+ \rightarrow 3CO_2 + 4N_2 + 10H_2O$[43].

Efeitos do uso do nitrato sobre a redução na produção de metano em dietas contendo alta inclusão de forragem foi observado na literatura, sendo redução de 4% com inclusão de 1% de nitrato na MS da dieta (410,8 g/kg de FDN na MS)[46] e 33% com inclusão de 2,7% na MS da dieta (676,7 g/kg de FDN na MS)[47]. Esse resultado pode ser atribuído à correlação positiva entre *Methanobrevibacter* sp. e as emissões de metano, e correlação negativa entre a população das *Archaea* e a concentração de amônia ruminal observado em trabalhos utilizando novilhos Nelore fistulados e suplementados a pasto com nitrato encapsulado (70 g/100 kg PC)[48], fortalecendo a hipótese de que o uso de nitrato pode reduzir a população dos microrganismos metanogênicos.

Em experimento *in vitro*[41], foi observado aumento cumulativo de $H_2$ em 114% até 24h, e em estudos *in vivo* com vacas leiteiras, aumento de $H_2$, com aumento de produção de 12,6 vezes[49] e 3,3 vezes de $H_2$[50] quando o nitrato foi adicionado comparando-se com o tratamento controle contendo ureia. Esse resultado sugere que a possível causa de redução da produção de metano entérico é a toxicidade do nitrato (ou nitrito) aos microrganismos metanogênicos, além da competividade por hidrogênio. A variação nas concentrações de $H_2$ no ambiente ruminal com a inclusão de nitrato em dietas de animais pode refletir diretamente sobre o pH ruminal[48–51]. Novilhos Nelore suplementados a pasto durante 13 meses apresentaram aumento de pH de 6,36 com o tratamento controle (contendo ureia) para pH de 6,60 com inclusão de nitrato encapsulado[48]. Todos os trabalhos (*in vivo* e *in vitro*) citados[48–51]

obtiveram pH entre 6,20 e 6,60, com picos e quedas de acordo com as dietas e o horário após o fornecimento destas.

Ausência de efeito do nitrato sobre a concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) foi relatado por Lee et al.[51]. Por outro lado, o nitrato resultou em redução de concentração total de AGCC de 111,9 e 102,6 m*M*, além de aumento na razão acetato:propionato de 4,48 e 5,03, três horas após a alimentação dos animais, para os tratamentos controle e nitrato respectivamente[49]. Em ambientes em que há concentração de $H_2$ elevada (acima de 1 *mM*) e presença de agente anti-metanogênico, a via de utilização de hidrogênio mais favorecida é a acetogênese[52]. Ao comparar, em experimento *in vitro*, três tratamentos contendo diferentes compostos nitrogenados: ureia (UR), nitrato não encapsulado (NNE) e nitrato encapsulado (NE) a produção total de AGCC não foi influenciada, porém o percentual de acetato foram aumentadas 63,3%, 71,1% e 69,5%, respectivamente, e propionato diminuído em 7,3% com inclusão de nitrato[41]. Termodinamicamente, o nitrato no rúmen tem maior afinidade por $H_2$ para a redução à nitrito e à amônia do que com a metanogênese e propiogênese[40], de modo que pode ocorrer redução na produção de metano e propionato ao adicionar nitrato na dieta[41].

### 2.3.2 Desempenho

Como já foi mencionado, o nitrato atua na captação de hidrogênio para redução de nitrato a nitrito e nitrito a amônia. Devido à menor perda de energia do alimento na forma de $CH_4$ e da maior disponibilidade de amônia para síntese de proteína microbiana, espera-se maior desempenho por unidade de alimento consumido contendo nitrato, sobretudo aos animais em sistema de pastejo.

Tem sido verificado que a inclusão de nitrato na ração ocasiona redução do consumo, bem como alimentação mais fracionada ao longo do dia[53,54,55]. Porém, ainda não está claro a forma como o nitrato age para que ocorra esse efeito, seja pelo sabor amargo ou devido à produção do intermediário do nitrato, o óxido nítrico (NO), que tem sido identificado em outros estudos como um mensageiro de sinalização de controle de consumo[56]. Hulshof et al.[57] verificaram redução de 7% no consumo de matéria seca com inclusão de 2,2% de nitrato na dieta, enquanto Velazco et al.[58] observaram redução de 16% no consumo quando o nível de inclusão do nitrato na dieta era de 2,6% na MS. Em alguns estudos, a redução no consumo de matéria seca tem contribuído com o aumento na eficiência alimentar dos animais alimentados com nitrato[59].

Fernandes[60] avaliaram o desempenho de novilhos Nelore, e verificaram que na fase de terminação houve incremento de ganho médio diário (GMD) de 0,097 kg $dia^{-1}$ e 29 kg no peso corporal final para os animais suplementados com nitrato (492 kg para controle e 521 kg de PC para nitrato). Por outro lado, Alemu et al.[54] não observaram efeitos significativos sobre o GMD e eficiência alimentar. Lee et al.[46] avaliando a inclusão de nitrato em dieta com 65% de MS de silagem de milho, também não verificaram efeitos significativos no desempenho, porém quando elevou-se a proporção de concentrado na dieta (80% de grãos de cevada), houve redução de 7,5% no consumo de matéria seca e aumento de 11% na eficiência alimentar de bovinos de corte em terminação. A inclusão de nitrato na dieta tem afetado negativamente a degradabilidade da fibra, bem como as bactérias fibrolíticas[17,61], mas outros estudos apresentaram efeitos inversos[62] ou ausência de efeitos significativos[63]. Esses efeitos podem estar relacionados à dose[19], ao acúmulo de intermediários do nitrato[61] e consequentemente redução na concentração de $NH_3$. Porém, mais estudos são necessários para avaliar os efeitos do nitrato sobre o uso em dietas totais e em animais suplementados a pasto, para que haja conclusões mais consistentes quanto aos seus efeitos.

Lee[41] relataram que o processo de encapsulamento resulta em uma taxa de solubilidade do nitrato no fluido ruminal mais lenta quando comparada ao nitrato não encapsulado; sendo o encapsulamento realizado com intuito de redução de riscos de intoxicação aos microrganismos ruminais e ao animal (metemoglobinemia). Estes autores relataram através de dados ainda não publicados que o encapsulamento do nitrato resultou na diminuição da fração solúvel de 100% para 35%, aumento da fração lentamente degradável de 0 para 55%, e 72% de degradabilidade efetiva de N a uma taxa de passagem de 5%/h, com taxa de degradação de 10%/h no rúmen. Espera-se que o efeito resultante do encapsulamento poderá resultar em concentrações de $N\text{-}NH_3$ ruminal mais constante ao longo do dia, resultando melhor condição de sobrevivência de microrganismos fibrolíticos, e consequentemente, aumento da eficiência de utilização do pasto consumido.

## 3 REFERÊNCIAS


1. ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. Brazilian beef cuts book. Beef Rep. Perf. da Pecuária no Bras. 2020. Disponível em: http://abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2020. Acessado em 28 de junho de 2021

2. IPCC. Intergovernmental panel on climate change 2006 IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas inventories. Inst. Glob. Environ. Strateg. 2006;1–20.

3. Bianchi AE, Macedo VDP, Schafer A, Silva D, Ari J, Hill G, et al. Effect of the addition of protected fat from palm oil to the diet of dairy sheep. Rev. Bras. Zootec. 2018;47.

4. Lima LA, Silva AM de A, Bezerra LR, Morais JS de, Araújo MJ de, Oliveira RL, et al. Effects of the buriti (*Mauritia flexuosa L.*) oil supplementation on crossbred lactating goats: Behavioral, physiological, and hematological responses. Rev. Bras. Zootec. 2018;47.

5. Beck MR, Thompson LR, Williams GD, Place SE, Gunter SA, Reuter RR. Fat supplements differing in physical form improve performance but divergently influence methane emissions of grazing beef cattle. Anim. Feed Sci. Technol. 2019;254:114210.

6. Majewska MP, Miltko R, Krawczyńska A, Bełżecki G, Kowalik B. Rapeseed and linseed oil supplementation affects hydrolytic activities in the rumen of sheep. Livest. Sci. 2020;240:104175.

7. Castro Filho ES, Roma Júnior LC, Ezequiel JMB, Salles MSV, Almeida MTC, Perez HL, et al. Effect of thyme essential oil supplementation on feed intake, apparent digestibility, rumen fermentation, blood parameters and in vitro methane yield of Nellore cattle. Livest. Sci. 2021;244.

8. Westphalen MF, Carvalho PHV, Oh J, Hristov AN, Staniar WB, Felix TL. Effects of feeding rumen-protected Capsicum oleoresin on growth performance, health status, and total tract digestibility of growing beef cattle. Anim. Feed Sci. Technol. [Internet]. 2021;271:114778.

9. Souza KA De, Cooke RF, Schubach KM, Brandaõ AP, Schumaher TF, Prado IN, et al. Performance, health and physiological responses of newly weaned feedlot cattle supplemented with feed-grade antibiotics or alternative feed ingredients. Animal 2018;12(12):2521–2528.

10. Paula RM de, Zotti CA, D'Abreu LF, Cônsolo NRB, Leme PR, Luz e Silva S da, et al. Roughage-free finishing diet based on whole corn grain and a mixture of additives for Nellore heifers. Rev. Bras. Zootec. 2019;48:1–8.

11. Rebelo LR, Luna IC, Messana JD, Araujo RC, Simioni TA, Granja-Salcedo YT, et al. Effect of replacing soybean meal with urea or encapsulated nitrate with or without elemental sulfur on nitrogen digestion and methane emissions in feedlot cattle. Anim. Feed Sci. Technol. 2019;257:114293.

12. Vedovatto M, Silva Diogo JM da, Beltrame JAM, D'Oliveira MC, Silva2 CJ da, Mendes CQ, et al. Effects of antibiotic growth promoters mixed with mineral

supplement on growth performance, ingestive behavior, and mineral intake of grazing bulls. Rev. Bras. Zootec. 2019;48:1–9.

13. Jiang X, Xu HJ, Cui ZQ, Zhang YG. Effects of supplementation with *Lactobacillus plantarum* 299v on the performance, blood metabolites, rumen fermentation and bacterial communities of preweaning calves. Livest. Sci. 2020;239.

14. Perna F, Vásquez DCZ, Gardinal R, Meyer PM, Berndt A, Friguetto RTS, et al. Short-term use of monensin and tannins as feed additives on digestibility and methanogenesis in cattle. Rev. Bras. Zootec. 2020;49.

15. Górka P, Budzińska K, Budziński W, Jankowiak T, Kehoe S, Kański J. Effect of probiotic and nucleotide supplementation in milk replacer on growth performance and fecal bacteria in calves. Livest. Sci. 2021;250.

16. Lee C, Araujo RC, Koenig KM, Beauchemin KA. Effects of encapsulated nitrate on growth performance, carcass characteristics, nitrate residues in tissues, and enteric methane emissions in beef steers: Finishing phase. J. Anim. Sci. 2017;95:3712–3726.

17. Lee C, Araujo RC, Koenig KM, Beauchemin KA. Effects of encapsulated nitrate on enteric methane production and nitrogen and energy utilization in beef heifers. J. Anim. Sci. 2015;93:2391–2404.

18. El-Zaiat HM, Araujo RC, Louvandini H, Patiño HO, Abdalla AL. Effects of dietary replacement of urea with encapsulated nitrate and cashew nut shell liquid on nutrient digestibility, nitrogen balance, and carcass characteristics in growing lambs. Anim. Feed Sci. Technol. 2020;266:114515.

19. Silveira RF, Fernandes MHMR, Almeida AK, Araujo RC, Biagioli B, Lima ARC, et al. Energy partition and nitrogen utilization by male goats fed encapsulated calcium nitrate as a replacement for soybean meal. Anim. Feed Sci. Technol. 2019;248:67–76.

20. Simão GL, Amodeo NBP. As cooperativas rurais brasileiras e o mercado de crédito de carbono-Análise da influência dessas operações no empreendimento cooperativo. Rev. Política Agrícola. 2011;:37–49.

21. Silva A, Junior WL. Algumas considerações sobre o mercado de créditos de carbono e os seus aspectos comerciais. Caminhos Geogr. 2012;18–29.

22. Scanavaca Júnior L. Base teórica para o crédito de carbono. Embrapa Meio Ambiente. 2009. Disponível em: https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/577694/base-teorica-para-o-credito-de-carbono.

23. COP26. 26ª Climate Change Conference, Negotiations Explained Un Clim. Chang. Conf. UK. 2021;18. Available from: https://ukcop26.org/uk-presidency/negotiations/

24. IPCC. Global Warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change,. Intergov. PANEL Clim. Chang. 2018;24.

25. SEEG. Sistema de Estimativas de Emissões e Remoções de Gás de Efeito Estufa.

Análise da evolução das emissões de GEE no Brasil [Internet]. 2020 [acessado em 26 Mar 2021];41. Disponível em: https://seeg-br.s3.amazonaws.com/Documentos Analiticos/SEEG_8/SEEG8_DOC_ANALITICO_SINTESE_1990-2019.pdf

26. Figueiredo EB de, Jayasundara S, Oliveira Bordonal R de, Berchielli TT, Reis RA, Wagner-Riddle C, et al. Greenhouse gas balance and carbon footprint of beef cattle in three contrasting pasture-management systems in Brazil. J. Clean. Prod. 2016;142:420–431.

27. Berndt A, Tomkins NW. Measurement and mitigation of methane emissions from beef cattle in tropical grazing systems: a perspective from Australia and Brazil. Animal. 2013;7 Suppl 2:363–372.

28. Nijdam D, Rood T, Westhoek H. The price of protein: Review of land use and carbon footprints from life cycle assessments of animal food products and their substitutes. Food Policy. 2012;

29. Carvalho JLN, Raucci GS, Frazão LA, Cerri CEP, Bernoux M, Cerri CC. Crop-pasture rotation: A strategy to reduce soil greenhouse gas emissions in the Brazilian Cerrado. Agric. Ecosyst. Environ. 2014;183:167–175.

30. Brunes LC, Couto VRM. Balanço de gases de efeito estufa em sistemas de produção de bovinos de corte. Arch. Zootec. 2017;66:287–288.

31. Melo LF de O. Produção de metano entérico e parâmetros ruminais de bovinos em pastos de capim marandu manejados com diferentes doses de adubação nitrogenada. [Tese - Doutorado]. Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho", Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2019; 79p.

32. Berchielli TT, Pires AV, Oliveira SG de. Nutrição de Ruminantes. Ed. Jaboticabal: FUNEP; 2006.

33. Johnson KA, Johnson DE. Methane Emissions from Cattle. J. Anim. Sci. 1995;73:2483–2492.

34. Kozloski G V. Bioquímica dos ruminantes. 2 ed. Santa Maria: Editora UFSM; 2009.

35. Kim SH, Lee C, Pechtl HA, Hettick JM, Campler MR, Pairis-Garcia MD, et al. Effects of 3-nitrooxypropanol on enteric methane production, rumen fermentation, and feeding behavior in beef cattle fed a high-forage or high-grain diet. J. Anim. Sci. 2019;97:2687–2699.

36. Goularte SR, Ítavo LC V, Santos GT, Ítavo CCBF, Oliveira LCS, Favaro SP, et al. Ácidos graxos voláteis no rúmen de vacas alimentadas com diferentes teores de concentrado na dieta [Volatile fatty acids in rumen of cows fed different concentrate level diets]. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 2011;63:1479–1486.

37. Ku-vera JC, Castelán-ortega OA, Galindo-maldonado FA, Arango J, Chirinda N, Valencia-salazar SS, et al. Review: Strategies for enteric methane mitigation in cattle fed tropical forages. Animal. 2020;14:453–463.

38. Koscheck JFW, Romanzini EP, Barbero RP, Delevatti LM, Ferrari AC, Mulliniks JT,

et al. How do animal performance and methane emissions vary with forage management intensification and supplementation? Anim. Prod. Sci. 2020;60(9):1201–1209.

39. Kozloski G V. Bioquímica dos Ruminantes. 2ªed. Santa Maria: Editora UFSM; 2011.

40. Ungerfeld EM, Kohn RA. The role of thermodynamics in the control of ruminal fermentation. In: K. Sejrsen K, Hvelplund T, Nielsen MO, editors. Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism and Impact of Nutrition on Gene Expression, Immunology and Stress. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers; 2006. p. 55–85.

41. Lee C, Araujo RC, Koenig KM, Beauchemin KA. In situ and in vitro evaluations of a slow release form of nitrate for ruminants: Nitrate release rate, rumen nitrate metabolism and the production of methane, hydrogen, and nitrous oxide. Anim. Feed Sci. Technol. 2017;231:97–106.

42. Lee C, Beauchemin KA. A review of feeding supplementary nitrate to ruminant animals: nitrate toxicity, methane emissions, and production performance. Can. J. Anim. Sci. 2014;94:557–570.

43. Ettwig KF, Butler MK, Paslier D Le, Pelletier E, Mangenot S, Kuypers MMM, et al. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. Nature. 2010;464:543–548.

44. Haroon MF, Hu S, Shi Y, Imelfort M, Keller J, Hugenholtz P, et al. Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage. Nature 2013;500:567–570.

45. Raghoebarsing AA, Pol A, Pas-Schoonen KT Van De, Smolders AJP, Ettwig KF, Rijpstra WIC, et al. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. Nature. 2006;440:918–921.

46. Lee C, Araujo RC, Koenig KM, Beauchemin KA. Effects of encapsulated nitrate on growth performance, nitrate toxicity, and enteric methane emissions in beef steers: Backgrounding phase. J. Anim. Sci. 2017;95:3700.

47. El-Zaiat HM, Araujo RC, Soltan YA, Morsy AS, Louvandini H, Pires A V., et al. Encapsulated nitrate and cashew nut shell liquid on blood and rumen constituents, methane emission, and growth performance of lambs. J. Anim. Sci. 2014;92:2214–2224.

48. Granja-Salcedo YT, Fernandes RMI, Araujo RC De, Kishi LT, Berchielli TT, Resende FD De, et al. Long-term encapsulated nitrate supplementation modulates rumen microbial diversity and rumen fermentation to reduce methane emission in grazing steers. Front. Microbiol. 2019;10:1–12.

49. Guyader J, Eugène M, Meunier B, Doreau M, Morgavi DP, Silberberg M, et al. Additive methane-mitigating effect between linseed oil and nitrate fed to cattle. J. Anim. Sci. 2015;93:3564–3577.

50. Olijhoek DW, Hellwing ALF, Brask M, Weisbjerg MR, Højberg O, Larsen MK, et al.

Effect of dietary nitrate level on enteric methane production, hydrogen emission, rumen fermentation, and nutrient digestibility in dairy cows. J. Dairy Sci. 2016;99:6191–6205.

51. Lee C, Araujo RC, Koenig KM, Beauchemin KA. Effects of encapsulated nitrate on eating behavior, rumen fermentation, and blood profile of beef heifers fed restrictively or ad libitum. J. Anim. Sci. 2015;93:2391–2404.

52. Weimer PJ. Manipulating Ruminal Fermentation: A Microbial Ecological Perspective 1. J. Anim. Sci. 1998;76:3114–3122.

53. Lee C, Araujo RC, Koenig KM, Beauchemin KA. Effects of feed consumption rate of beef cattle offered a diet supplemented with nitrate ad libitum or restrictively on potential toxicity of nitrate. J. Anim. Sci. 2015;93:4956–4966.

54. Alemu AW, Romero-Pérez A, Araujo RC, Beauchemin KA. Effect of encapsulated nitrate and microencapsulated blend of essential oils on growth performance and methane emissions from beef steers fed backgrounding diets. Animals. 2019;9:1–19.

55. Araujo RC, Pereira MLR, Couto VRM, Lemos BJM, Jorge da Cunha PH, Arnhold E, et al. Dose-response effect of encapsulated nitrate replacing soybean meal on growth performance, ingestive behavior, and blood metabolites of feedlot finishing bulls. Livest. Sci. 2021;247:104–475.

56. Khan MS, Tachibana T, Hasebe Y, Masuda N, Ueda H. Peripheral or central administration of nitric oxide synthase inhibitor affects feeding behavior in chicks. Comp. Biochem. Physiol. 2007;148:458–462.

57. Hulshof RBA, Berndt A, Gerrits WJJ, Dijkstra J, Zijderveld SM van, Newbold JR, et al. Dietary nitrate supplementation reduces methane emission in beef cattle fed sugarcane-based diets. J. Anim. Sci. 2012;90:2317–2323.

58. Velazco JI, Cottle DJ, Hegarty RS. Methane emissions and feeding behaviour of feedlot cattle supplemented with nitrate or urea. Anim. Prod. Sci. 2014;54:1737–1740.

59. Newbold JR, Zijderveld SM van, Hulshof RBA, Fokkink WB, Leng RA, Terencio P, et al. The effect of incremental levels of dietary nitrate on methane emissions in Holstein steers and performance in nelore bulls. J. Anim. Sci. 2014;92:5032–5040.

60. Fernandes RM. Efeito da adição de nitrato encapsulado na alimentação de bovinos de corte durante recria e terminação em pastejo. [Tese - Doutorado]. Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho", Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias 2018; 58p.

61. Asanuma N, Yokoyama S, Hino T. Effects of nitrate addition to a diet on fermentation and microbial populations in the rumen of goats, with special reference to Selenomonas ruminantium having the ability to reduce nitrate and nitrite. Anim. Sci. J. 2014;86(4):378–384.

62. Zhao L, Meng Q, Ren L, Liu W, Zhang X, Huo Y, et al. Effects of nitrate addition on rumen fermentation, bacterial biodiversity and abundance. Asian-Australasian J. Anim. Sci. 2015;28:1433–1441.

63. Natel AS, Abdalla AL, Araujo RC de, McManus C, Paim T do P, Abdalla Filho AL de, et al. Encapsulated nitrate replacing soybean meal changes in vitro ruminal fermentation and methane production in diets differing in concentrate to forage ratio. Anim. Sci. J. 2019;90:1350–1361.

## CAPÍTULO 2 - EFEITOS DO USO DE NITRATO ENCAPSULADO NA SUPLEMENTAÇÃO DE BOVINOS DE CORTE EM PASTEJO

**RESUMO:** Objetivou-se avaliar os efeitos do uso do nitrato encapsulado na suplementação de bovinos de corte em pastagem nas épocas de seca, transição seca-águas e águas, sobre o desempenho e taxa de consumo de suplemento. Foram utilizados 64 bovinos machos não castrados com raça predominantemente Nelore, com peso corporal inicial (PC) de 177,46 ± 3,77 kg e nove meses de idade, distribuídos aleatoriamente em 16 piquetes de *Urochloa brizantha* com 1,0 ha cada, permanecendo quatro animais por piquete. Os tratamentos avaliados foram: FS (suplemento proteico-energético contendo farelo de soja) e NE (suplemento proteico-energético com inclusão de nitrato encapsulado na proporção de 33,4 g/kg de matéria seca em substituição parcial pelo farelo de soja). O concentrado foi fornecido diariamente na proporção de 1,0% do PC. Houve redução no consumo de matéria seca do suplemento (CMSS) quando o NE foi adicionado ao suplemento no período seco (2,40 para 2,28 kg/dia) ($P < 0,01$), transição seca-águas (2,92 kg para 2,50 kg/dia) ($P < 0,01$), águas (3,63 para 3,14 kg/dia) ($P < 0,01$) e período total (2,94 para 2,61 kg/dia) ($P < 0,01$). O ganho médio diário não foi influenciado pelo tratamento em nenhum dos períodos avaliados, apresentando médias de 0,834, 1,042, 0,954 e 0,935 nos períodos de seca, transição seca-águas, águas e período total respectivamente ($P > 0,13$). A inclusão do NE resultou em elevação da eficiência de uso do suplemento no período de transição seca-águas de 0,362 para 0,411 ($P < 0,01$), e no período total de 0,324 para 0,353 ($P < 0,01$). Não houve diferenças no PC final dos animais nas épocas avaliadas, assim como no período total, com a inclusão de NE ($P > 0,16$). A taxa de consumo de suplemento foi influenciada pela inclusão de NE nas épocas de transição seca-águas e águas ($P < 0,01$), sendo observado reduções na quantidade de alimento consumido nas primeiras 3 h de 2,79 para 0,80 kg e 2,63 para 1,36 kg, respectivamente. A inclusão de nitrato encapsulado na proporção de 33,4 g/kg de matéria seca de suplemento reduz consumo de concentrado sem afetar negativamente o ganho de peso dos animais, acarretando no aumento de eficiência de uso de suplemento por animais sob pastejo.

**Palavras-chave**: concentrado, eficiência, Nelore, nitrito, pastagem, ruminante

**ABSTRACT:** The objective was to evaluate the effects of the use of encapsulated nitrate in the supplementation of beef cattle on pasture in the dry season, dry-water transition and wet season, on performance and supplement consumption rate. Sixty-four non-castrated male bulls, predominantly Nellore, with initial body weight (BW) of 177.46 ± 3.77 kg and nine months of age were used, randomly distributed in 16 Urochloa brizantha paddocks with 1.0 ha each, remaining four animals per paddock. The treatments evaluated were: SM (protein-energy supplement containing soybean meal) and EN (protein-energy supplement with encapsulated nitrate in the proportion of 33.4 g/kg of dry matter in partial replacement by soybean meal). The concentrate was supplied daily in the proportion of 1.0% of the BW. There was a reduction in the dry matter intake of the supplement (DMSI) when EN was added to the supplement in the dry period (2.40 to 2.28 kg/day) ($P < 0.01$), dry-water transition (2.92 kg to 2.50 kg/day) ($P < 0.01$), water (3.63 to 3.14 kg/day) ($P < 0.01$) and total period (2.94 to 2.61 kg/day) day) ($P < 0.01$). The average daily gain was not influenced by the treatment in any of the evaluated periods, presenting averages of 0.834, 1.042, 0.954 and 0.935 in the dry periods, dry-water transition, waters and total period respectively ($P > 0.13$). The inclusion of EN resulted in an increase in the efficiency of supplement use in the dry-water transition period from 0.362 to 0.411 ($P < 0.01$), and in the total period from 0.324 to 0.353 ($P < 0.01$). There were no differences in the final BW of the animals in the evaluated periods, as well as in the total period, with the inclusion of EN ($P > 0.16$). The supplement consumption rate was influenced by the inclusion of EN in the dry-water and wet transition seasons ($P < 0.01$), with reductions in the amount of food consumed in the first 3 h from 2.79 to 0.80 kg and 2.63 for 1.36 kg, respectively. The inclusion of encapsulated nitrate in the proportion of 33.4 g/kg of supplement dry matter reduces the consumption of concentrate without negatively affecting the weight gain of the animals, resulting in an increase in the efficiency of supplement use by animals under grazing.

**Keywords:** concentrate, efficiency, Nelore, nitrite, pasture, ruminant

## 1 INTRODUÇÃO

O uso do nitrato encapsulado ($NO_3^-$) em dietas de ruminantes tem sido amplamente avaliado[1–4] devido ao fato deste contribuir para mitigação de metano ($CH_4$)[5]. A redução entérica da produção de $CH_4$ em bovinos representa diminuição do impacto ambiental (por se tratar de um gás que contribui para o efeito estufa)[6], bem como aumento de saldo energético para a conversão de produto de origem animal, uma vez que a perda de energia na forma de $CH_4$ pode variar de 2% a 6% do total consumido[7].

Outra particularidade relacionada ao $NO_3^-$ encapsulado é a redução no consumo de matéria seca, que em muitos casos esse efeito vem acompanhado de ausência de efeitos negativos sobre o desempenho[8–11]. Com isso, aumento na eficiência de uso do alimento pode ser esperado em bovinos de corte recebendo $NO_3^-$ encapsulado[1].

O processo de encapsulamento do $NO_3^-$ resulta em taxa de solubilidade mais lenta quando comparado à solubilidade do nitrato não encapsulado[12], o que reflete no acúmulo de nitrito no rúmen, e consequentemente sobre os níveis de nitrogênio amoniacal podendo se tornar mais constante ao longo do dia. Para animais em pastejo, ambiente ruminal estável favorece o crescimento microbiano, e dessa forma resulta em melhor utilização de carboidratos fibrosos[13–15].

Diante disso, objetivou-se avaliar os efeitos do uso do nitrato encapsulado na suplementação de bovinos de corte em pastagem nas épocas de seca, transição seca-águas e águas, sobre o desempenho produtivo e taxa de consumo de suplemento.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

A Comissão de Ética de Uso de Animais/CEUA da Universidade Federal de Goiás aprovou a utilização dos animais sob o protocolo número 011/18. O experimento foi realizado no Centro de Pesquisa em Pecuária Extensiva (CEPPEX) da Universidade Federal de Goiás, localizado no município de São Francisco de Goiás – Goiás.

O estudo foi realizado durante os períodos de seca, transição seca-águas e águas, entre agosto de 2018 e abril de 2019, totalizando 244 dias de avaliação. Foram utilizados 64 bovinos machos não castrados predominantemente Nelore, com peso corporal inicial de 177,46 ± 3,77 kg e nove meses de idade. Todos os animais foram identificados com brinco, vacinados e vermifugados antes de iniciar o experimento. Os animais foram adquiridos do mesmo rebanho, portanto, oriundo do mesmo sistema de criação a pasto.

Os animais foram distribuídos segundo o delineamento inteiramente casualizado em 16 piquetes de 1,0 hectare cada, contendo pastagem *Urochloa brizantha*, permanecendo, assim, quatro animais por piquete e oito piquetes por tratamento. Os animais permaneceram no mesmo piquete do início ao fim do experimento. O pasto foi vedado e adubado com 45 kg de N/ha 124 dias antes do início do experimento.

Foram avaliados dois tratamentos: FS - suplemento contendo farelo de soja e; NE - suplemento com inclusão de nitrato de cálcio e amônio decahidratado encapsulado ($5Ca(NO_3)_2.NH_4NO_3.10H_2O$, GRASP Ind. & Com. LTDA, Curitiba, Brasil) na proporção de 33,4g/kg de MS, em substituição parcial da proteína do farelo de soja. Os suplementos foram formulados para serem isoproteicos dentro de cada fase do ano; sendo 250, 220 e 200 g/kg de proteína bruta (PB) na matéria seca (MS) para os períodos de seca, transição seca-águas e águas, respectivamente (TABELA 1). A adaptação dos animais ao $NO_3^-$ encapsulado ocorreu durante seis dias, sendo três dias com dose de 20g/kg de MS e três dias com dose de 27g/kg de MS.

TABELA 1 - Composição de ingredientes e composição química dos suplementos fornecidos aos animais durante o período experimental

| | FS[a] | | | NE[b] | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Seca | Seca-águas | Águas | Seca | Seca-águas | Águas |
| Ingredientes (g/kg de MS) | | | | | | |
| Milho | 628,1 | 709,9 | 766,5 | 730,3 | 812,0 | 868,6 |
| Farelo de soja | 299,8 | 223,1 | 171,5 | 173,1 | 96,3 | 44,7 |
| Ureia | 16,7 | 16,7 | 16,7 | 16,7 | 16,7 | 16,7 |
| Mistura mineral | 30,0 | 25,0 | 20,0 | 30,0 | 25,0 | 20,0 |
| Nitrato | 0 | 0 | 0 | 50,0 | 50,0 | 50,0 |
| Calcário | 25,4 | 25,4 | 25,4 | 0 | 0 | 0 |
| Composição química (g/kg de MS) | | | | | | |
| Matéria seca | 883,2 | 876,8 | 886,4 | 878,7 | 874,9 | 879,0 |
| Proteína bruta | 260,5 | 220,0 | 189,0 | 258,3 | 216,1 | 186,1 |
| NNP[c] | 99,6 | 99,6 | 99,6 | 47,1 | 47,1 | 47,1 |
| Cálcio | 10,6 | 10,4 | 10,2 | 10,6 | 10,4 | 10,2 |

[a]Suplemento contendo farelo de soja; [b]Suplemento com inclusão de 50g/kg de MS de nitrato de cálcio e amônio decahidratado encapsulado (33,4g de $NO_3^-$ por kg de MS do suplemento) (composição química: 85,17% de matéria seca, 16,47% de nitrogênio (102,9% PB-equivalente), 66,86% de $NO_3$ e 19,61% de cálcio); [c]Nitrogênio não proteico.

As amostras dos ingredientes dos suplementos foram coletadas a cada batida de ração e realizada uma composta por tratamento e por época, para posteriormente realizar as análises bromatológicas seguindo a metodologia de Detmann et al.[16].

Os bebedouros equipados com boia possuíam capacidade para 300 litros de água eram compartilhados para dois piquetes para permitir o fornecimento de água à vontade. O suplemento foi fornecido diariamente ao nível de 1,0% do peso corporal. O trato foi realizado todos os dias às 10:00 h em cochos com dimensionamento de 2,5 × 0,5 m para permitir o acesso simultâneo dos animais. As sobras do concentrado no cocho (sempre que presentes) eram recolhidas diariamente antes do trato (10:00h), pesadas para quantificar a flutuação de consumo diário de suplemento (FIGURA 1) e demais variáveis relacionadas ao consumo de matéria seca de suplemento.

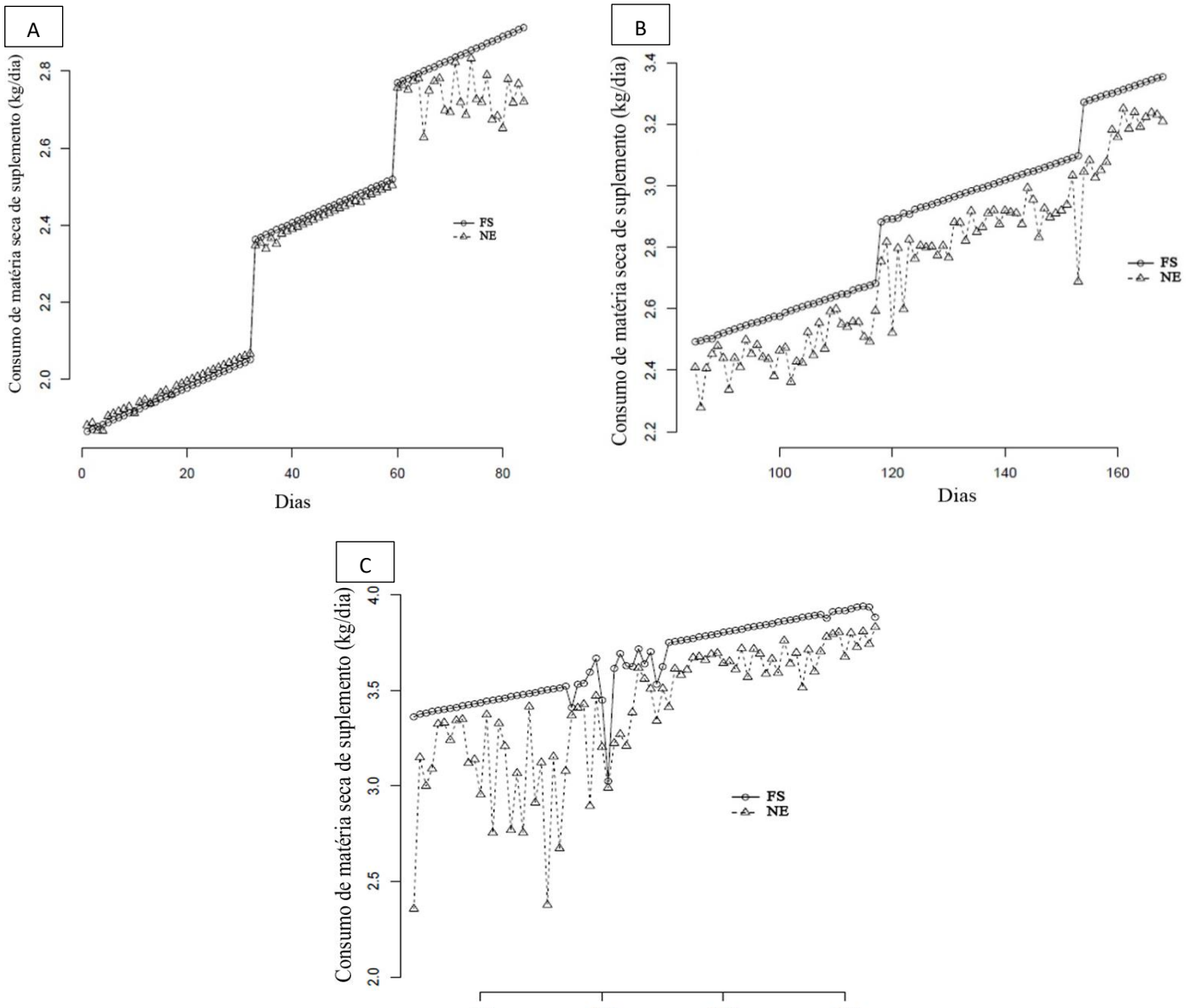


FIGURA 2 – Flutuação diária de consumo de matéria seca de suplemento por bovinos de corte em pastejo nas épocas de seca (A), transição seca-águas (B) e águas (C)

A temperatura máxima (°C), temperatura mínima (°C), umidade máxima (%) e umidade mínima (%) foram registradas diariamente através de um termômetro instalado na área experimental. Um pluviômetro também instalado na área experimental foi utilizado para registrar índices pluviométricos (TABELA 2).

TABELA 2 - Dados médios de temperatura, umidade e pluviosidade durante o período experimental

| | Seca | Transição seca-águas | Águas | Período total |
|---|---|---|---|---|
| Temperatura (°C) | | | | |
| Máxima | 40,8 | 37,3 | 38,0 | 38,7 |
| Mínima | 16,5 | 18,6 | 18,8 | 18,0 |
| Média | 22,0 | 21,3 | 21,7 | 21,7 |
| Umidade (%) | | | | |
| Máxima | 86,3 | 97,9 | 98,0 | 94,1 |
| Mínima | 15,7 | 27,2 | 30,9 | 24,6 |
| Média | 51,0 | 65,9 | 64,5 | 60,5 |
| Pluviosidade (mm) | 225 | 597,9 | 300,7 | 1.123,6 |

A avaliação qualitativa da forragem consumida pelos animais foi realizada a cada 14 dias via pastejo simulado, conforme Johnson[17], identificando o tipo de material colhido e coletando uma amostra semelhante. Por se tratar de avaliação visual, impediu-se o discernimento do comportamento alimentar dos animais em cada piquete. Com isso, as amostras coletadas de cada piquete foram pré-secadas em estufa de 55°C por 72h, moídas à 1 mm e homogeneizadas por período. Posteriormente foram avaliados os teores de MS, cinza, matéria orgânica (MO), PB, extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína (FDNcp) de acordo com Detmann et al.[16]. O teor de carboidratos não fibrosos foi determinado segundo a equação de Mertens[18]: CNF = 100 – Cinza – PB – EE - FDNcp (TABELA 3).

TABELA 3 - Composição química do pastejo simulado (g/kg) durante o período experimental

| | Seca | Transição seca-águas | Águas | Período total |
|---|---|---|---|---|
| Matéria seca | 625,3 | 257,9 | 256,1 | 379,8 |
| Cinza | 63,4 | 74,9 | 75,0 | 71,1 |
| Matéria orgânica | 936,6 | 925,1 | 925,0 | 928,9 |
| FDNcp[a] | 653,1 | 569,5 | 601,0 | 607,9 |
| Proteína bruta | 64,4 | 111,8 | 109,4 | 95,2 |
| Extrato etéreo | 18,1 | 19,6 | 16,4 | 18,0 |
| Carboidratos não fibrosos | 201,0 | 224,2 | 198,3 | 207,8 |

[a]Fibra insolúvel em detergente neutro corrigido para cinza e proteína

A disponibilidade de MS do pasto foi estimada a cada 28 dias utilizando um quadrado metálico de 0,25 $m^2$ (50 × 50 cm), com o corte realizado rente ao solo segundo a metodologia proposta por McMeniman[19]. O material coletado foi pesado, homogeneizado e uma subamostra foi separada em duas frações: uma para avaliação de disponibilidade total de

matéria seca por hectare e outra para separação das frações correspondente à folha verde, folha seca, colmo verde e colmo seco para estimar a disponibilidade das mesmas em MS por hectare. A fração indigestível da fibra em detergente neutro (FDNi) da forragem foi determinada segundo Detmann et al.[16] e, posteriormente, utilizada para compor a equação descrita por Paulino[20] para determinação da matéria seca potencialmente digestível (MSpd), sendo: MSpd = 0,98 (100 – FDN) + (FDN – FDNi).

Sem jejum, os animais foram pesados no início do experimento e a cada 28 dias para o acompanhamento do ganho de peso. O ganho médio diário foi determinado subtraindo o peso final do peso inicial e dividido pelo número de dias que o animal levou para ganhar aquele peso. A eficiência de uso do suplemento foi calculada dividindo-se o ganho médio diário pelo consumo de matéria seca de suplemento (GMD:CMSS). A taxa de consumo de suplemento foi monitorada às três, seis, nove, 12 e 24 h após a alimentação a cada 28 dias. O concentrado remanescente foi pesado em cada ponto de tempo. A quantidade de suplemento consumido em cada ponto de tempo foi calculado subtraindo o peso do concentrado remanescente no cocho daquele tempo pelo peso do ponto de tempo anterior[9].

As comparações entre as médias dos dados de consumo de matéria seca de suplemento, ganho médio diário, eficiência de uso do suplemento, peso corporal final foram analisados através da ANOVA e teste Tukey. A taxa de consumo de suplemento foi analisada por meio de medidas repetidas no tempo (sendo o horário pós alimentação a medida repetida), e comparada através do teste Tukey, com utilização do software R. Todas as comparações entre tratamentos foram realizadas ao nível de 5% de probabilidade de erro.

## 3 RESULTADOS

Não houve diferenças significativas na disponibilidade média de matéria seca e frações da pastagem entre os tratamentos nas época seca, transição seca-águas e águas (TABELA 4). Na época seca, a disponibilidade média de matéria seca dos pastos foram 7.691,3 e 7.710,0 kg/ha para tratamentos FS e NE (P > 0,96). A MSpd para o tratamento FS foi 4.613,5 e NE de 4.806 kg/ha (P > 0,49). As disponibilidades de folhas verdes, folhas secas, colmos verdes e colmos secos para os tratamentos FS e NE foram 581,2 e 441,7 kg/ha (P > 0,17), 2.575,4 e 2.524,2 kg/ha (P > 0,72), 1.978,8 e 1.872,4 kg/ha (P > 0,59) e 2.555,9 e 2.871,7 kg/ha (P > 0,38), respectivamente. A relação folha:colmo dos pastos na época seca foi 0,71 para FS e 0,64 para NE (P > 0,24) (TABELA 4).

TABELA 4 – Efeito do nitrato encapsulado no suplemento sobre a disponibilidade de pasto e frações da pastagem (kg/ha) composta por *Urochloa brizantha* nos períodos de seca, transição seca-águas e águas

| Item | FS[a] | NE[b] | EPM[c] | P-valor |
|---|---|---|---|---|
| | | Seca | | |
| Matéria seca[d] | 7.691,3 | 7.710,0 | 309,97 | 0,9666 |
| MSpd[e] | 4.613,5 | 4.806,5 | 194,52 | 0,4944 |
| Folha verde | 581,2 | 441,7 | 69,66 | 0,1787 |
| Folha seca | 2.575,4 | 2.524,2 | 101,95 | 0,7278 |
| Colmo verde | 1.978,8 | 1.872,4 | 138,65 | 0,5958 |
| Colmo seco | 2.555,9 | 2.871,7 | 247,56 | 0,3823 |
| Relação folha:colmo | 0,71 | 0,64 | 0,04 | 0,2402 |
| | | Transição seca-águas | | |
| Matéria seca[d] | 6.162,0 | 5.767,5 | 396,09 | 0,4929 |
| MSpd[e] | 3.927,8 | 3.624,7 | 232,83 | 0,3729 |
| Folha verde | 1.918,1 | 1.787,4 | 96,64 | 0,3550 |
| Folha seca | 894,2 | 850,5 | 87,27 | 0,7283 |
| Colmo verde | 2.056,4 | 2.087,0 | 189,64 | 0,9108 |
| Colmo seco | 1.293,3 | 1.029,6 | 161,08 | 0,2664 |
| Relação folha:colmo | 0,88 | 0,89 | 0,0731 | 0,8867 |
| | | Águas | | |
| Matéria seca[d] | 6.491,1 | 6.035,0 | 288,37 | 0,2822 |
| MSpd[e] | 3.733,3 | 3.468,6 | 158,52 | 0,2572 |
| Folha verde | 1.716,5 | 1.612,1 | 60,83 | 0,2449 |
| Folha seca | 1.095,0 | 999,7 | 91,50 | 0,4736 |
| Colmo verde | 2.324,8 | 2.208,3 | 156,27 | 0,6061 |
| Colmo seco | 1.354,8 | 1.215,0 | 105,62 | 0,3652 |
| Relação folha:colmo | 0,77 | 0,78 | 0,04 | 0,9465 |

[a]FS – suplemento contendo farelo de soja; [b]NE - suplemento com adição de nitrato encapsulado; [c]Erro padrão da média; [d]Disponibilidade de matéria seca do pasto; [e]Disponibilidade de matéria seca potencialmente disponível.

A disponibilidade média de matéria seca dos pastos na época de transição seca-águas foram 6.162,0 kg/ha para o tratamento FS e 5.767,5 kg/ha para o tratamento NE (P > 0,49). Foi observado disponibilidade média de matéria seca potencialmente digestível de 3.927,8 e 3.624,7 kg/ha para os tratamentos FS e NE (P > 0,37) respectivamente. As disponibilidades de folhas verdes, folhas secas, colmos verdes e colmos secos para os tratamentos FS e NE foram 1.918,1 e 1.787,4 kg/ha (P > 0,35), 894,2 e 850,5 kg/ha (P > 0,72), 2.056,4 e 2.087,0 kg/ha (P > 0,91), respectivamente. A relação folha:colmo dos pastos na época de transição seca-águas apresentaram valores médios de 0,88 e 0,89 para os tratamentos FS e NE (P > 0,88), respectivamente (TABELA 4).

Na época de águas, a disponibilidade média de matéria seca dos pastos 6.491,1 kg/ha e 6.035,0 kg/ha para os tratamentos FS e NE (P > 0,28) respectivamente (TABELA 4). A MSpd dos pastos apresentaram médias de 3.733,3 e 3.468,6 kg/ha para os tratamentos FS e NE (P > 0,25). As disponibilidades médias de folhas verdes, folhas secas, colmos verdes e colmos secos foram 1.716,5 e 1.612,1 kg/ha (P > 0,24), 1.095,0 e 999,7 kg/ha (P > 0,47), 2.324,8 e

2.208,3 kg/ha (P > 0,60) e 1.354,8 e 1.215,0 kg/ha (P > 0,36) para os tratamentos FS e NE, respectivamente. A relação folha:colmo dos pastos nos tratamentos FS e NE foram 0,77 e 0,78 (P > 0,94), respectivamente.

Houve diferença significativa no consumo de matéria seca do suplemento (CMSS) entre os tratamentos (P < 0,01) no período seco (TABELA 5), apresentando redução de 5,0% (2,40 *vs* 2,28 kg/dia para FS e NE, respectivamente).

TABELA 5 - Efeito do nitrato encapsulado no suplemento sobre o desempenho de novilhos de corte no período seco, transição seca águas, águas e período total

| Item | FS[a] | NE[b] | EPM[c] | P-valor |
|---|---|---|---|---|
| | | Seca | | |
| PCi[d] | 177,7 | 177,2 | 1,3769 | 0,8157 |
| CMSS[e] | 2,40 | 2,28 | 0,0268 | 0,0068 |
| CMSST[f] | 199,5 | 196,9 | 1,6249 | 0,2751 |
| GMD[g] | 0,853 | 0,815 | 0,0202 | 0,2057 |
| GMD:CMSS[h] | 0,355 | 0,357 | 0,0086 | 0,8405 |
| PCf[i] | 248,5 | 244,9 | 2,6347 | 0,3487 |
| | | Transição seca-águas | | |
| PCi[d] | 248,5 | 244,9 | 2,6347 | 0,3487 |
| CMSS[e] | 2,92 | 2,50 | 0,0486 | < 0,001 |
| CMSST[f] | 242,7 | 231,4 | 2,0837 | 0,0018 |
| GMD[g] | 1,059 | 1,024 | 0,0238 | 0,3121 |
| GMD:CMSS[h] | 0,362 | 0,411 | 0,0081 | < 0,001 |
| PCf[i] | 336,4 | 329,9 | 3,5018 | 0,2063 |
| | | Águas | | |
| PCi[d] | 336,4 | 329,9 | 3,5018 | 0,2063 |
| CMSS[e] | 3,63 | 3,14 | 0,0834 | 0,0010 |
| CMSST[f] | 281,2 | 261,4 | 2,904 | < 0,001 |
| GMD[g] | 0,975 | 0,932 | 0,0332 | 0,3710 |
| GMD:CMSS[h] | 0,268 | 0,298 | 0,0102 | 0,0579 |
| PCf[i] | 410,5 | 400,7 | 4,7892 | 0,1694 |
| | | Período total | | |
| PCi[d] | 177,7 | 177,2 | 1,3769 | 0,8157 |
| CMSS[e] | 2,94 | 2,61 | 0,0441 | < 0,001 |
| CMSST[f] | 723,4 | 689,7 | 5,7099 | < 0,001 |
| GMD[g] | 0,954 | 0,916 | 0,0170 | 0,1320 |
| GMD:CMSS[h] | 0,324 | 0,353 | 0,0067 | 0,0097 |
| PCf[i] | 410,5 | 400,7 | 4,7892 | 0,1694 |

[a]FS– suplemento sem adição de nitrato encapsulado; [b]NE - suplemento com adição de nitrato encapsulado na proporção de 33,4g/kg de MS, em substituição parcial da proteína do farelo de soja; [c]Erro padrão da média; [d]Peso corporal inicial; [e]Consumo de matéria seca de suplemento (kg/dia); [f]Consumo de matéria seca de suplemento total do período (kg); [g]Ganho médio diário (kg/dia); [h]Eficiência de uso do suplemento (ganho médio diário:consumo de matéria seca de suplemento); [i]Peso corporal final (kg).

O consumo de matéria seca de suplemento total (CMSST) no período da seca não diferiu significativamente, apresentando médias de 199,5 kg para o tratamento FS e 196,9 para NE (P > 0,27). O ganho médio diário (GMD) durante a época seca não apresentou

diferenças significativas, sendo 0,853 kg/dia para FS e 0,815 kg/dia para NE (P > 0,20). A eficiência de uso do suplemento (GMD:CMSS) não apresentou diferença significativa (P > 0,84), sendo médias observadas de 0,355 e 0,357 para FS e NE, respectivamente. Não houve diferença significativa no peso corporal final (PCf) com a inclusão do nitrato encapsulado (NE) no suplemento, apresentando médias de 248,5 e 244,9 kg para FS e NE, respectivamente (P > 0,34).

No período de transição seca-águas, a adição do NE no suplemento influenciou na redução do CMSS (P < 0,01) em 14,6%, sendo 2,922 kg e 2,496 kg/dia para animais do tratamento FS e NE, respectivamente (TABELA 5). Houve redução no CMSST de 242,7 para 231,4 kg com a inclusão de NE no suplemento (P < 0,01). Embora não tenha havido diferenças significativas no GMD no período de transição-seca águas (1,042 kg) (P > 0,31), a inclusão do NE resultou em aumento da eficiência de uso do suplemento de 0,362 para 0,411 (P < 0,01), representando aumento de 13,5%. O PCf dos animais no período de transição seca-águas apresentou médias de 336,4 e 329,9 kg para os tratamentos FS e NE, respectivamente (P > 0,20).

A inclusão de NE reduziu o CMSS no período das águas (P < 0,01) de 3,631 para 3,143 kg/dia, ou seja, houve diminuição de 13,4% no consumo de matéria seca de suplemento (TABELA 5). Foi observado que o CMSST reduziu de 281,2 para 261,4 kg com inclusão de NE no suplemento dos animais (P < 0,01). A redução no consumo de suplemento não influenciou no GMD dos animais (P > 0,37), apresentando médias de 0,975 e 0,932 kg/dia para animais do tratamento FS e NE, respectivamente. A GMD:CMSS não apresentou diferença significativa (P > 0,05) quando o NE foi adicionado ao suplemento, sendo observado valores médios de 0,268 e 0,298 para FS e NE, respectivamente. O PCf médio dos animais foi de 410,5 e 400,7 kg para os animais do tratamento FS e NE, respectivamente (P > 0,16).

Houve redução no CMSS no período total de 11,5% com a inclusão de NE (2,943 *vs* 2,605 kg/dia) (P < 0,01) (TABELA 5). O CMSST foi reduzido com a inclusão de NE em 4,7%, sendo 723,4 kg para o tratamento FS e 689,7 kg para o tratamento NE (P < 0,01). O GMD dos animais não foi influenciado pela adição de NE no suplemento (P > 0,13), apresentando médias de 0,954 e 0,916 kg para os tratamentos FS e NE, respectivamente. A eficiência de uso de suplemento foi aumentada em 9,0% com a inclusão do NE (P < 0,01), sendo 0,324 para o tratamento FS e 0,353 para o tratamento NE.

A inclusão do NE reduziu a taxa média de consumo de suplemento por bovinos a pasto no período de transição seca-águas de 78,1% para 49,1% (P < 0,01). Foi observado menor percentual de suplemento consumido por intervalo de tempo observado (P < 0,01) (FIGURA 2 A).

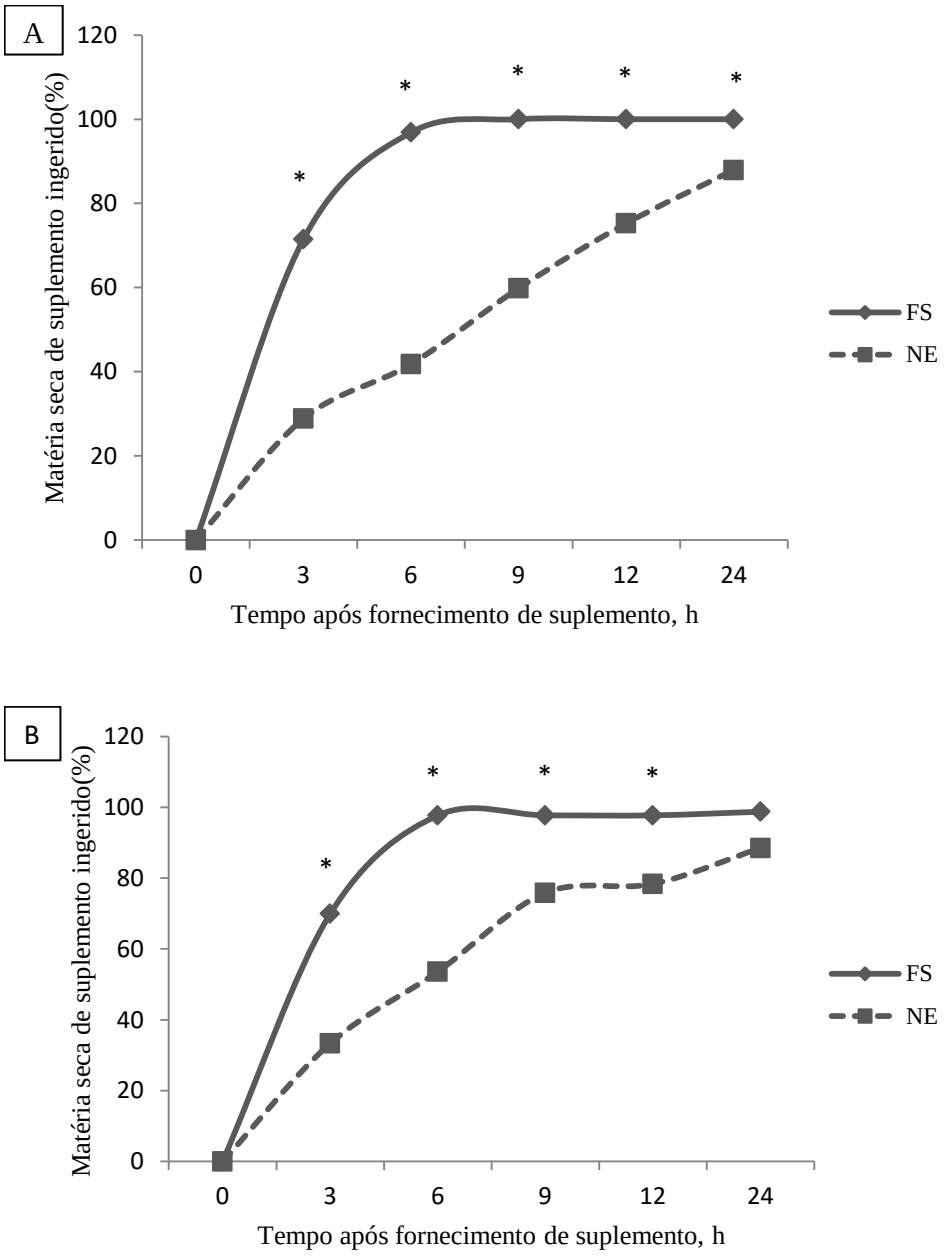


FIGURA 2 - Taxa de consumo por bovinos de corte suplementados a pasto no período de transição seca-águas (A) e período de águas (B)
*Médias dos tratamentos diferem entre si pelo teste Tukey (P < 0,05)

No tempo 3 h, houve redução da taxa de consumo de 71,5% para 29,9% com a inclusão do nitrato (P < 0,01). Seis horas após o fornecimento de suplemento houve diferença significativa na taxa de consumo de suplemento entre os tratamentos (P > 0,01), apresentando diminuição de 96,9% para 41,8% com inclusão de NE. Nove horas após a suplementação,

100% do suplemento contendo FS foi consumido, enquanto que os animais do tratamento NE havia consumido 59,9% do suplemento ($P < 0,01$). Nos tempos 12 e 24 horas, as taxas de suplementos consumidos pelos animais do tratamento NE foram 75,3 e 87,9% que diferiram do tratamento FS ($P < 0,01$) (FIGURA 2A).

A FIGURA 2B apresenta a taxa de consumo de suplemento no período de águas. Foi observada taxa média de consumo mais rápida para os animais do tratamento FS, sendo 77,0% contra 55,0% para os animais do tratamento NE ($P < 0,01$). No tempo três horas após o fornecimento do concentrado foi observado redução na taxa de consumo de suplemento de 69,9% para 33,3% com a inclusão de NE ($P < 0,01$). No tempo seis horas, os animais alimentados com NE apresentaram taxa de consumo mais baixa (53,6%) em comparação com os animais do tratamento FS (97,7%) ($P < 0,01$). No tempo nove horas após o fornecimento de suplemento, os animais do tratamento FS não consumiu suplemento (97,7%) enquanto que os animais do tratamento NE consumiram 75,8% ($P < 0,01$). Doze horas após o fornecimento de suplemento, o percentual de alimento consumido pelos animais do tratamento FS ainda se encontrava com 97,7% enquanto que os animais do tratamento NE haviam consumido 78,4% ($P < 0,02$). Não foi observado diferenças significativas entre o percentual de suplemento fornecido entre os tratamentos no tempo 24 horas ($P > 0,21$), sendo médias observadas de 98,7% e 88,5% para os tratamentos FS e NE, respectivamente.

## 4 DISCUSSÃO

Estudos têm relatado efeitos do uso de nitrato encapsulado em dietas sobre a redução do consumo em animais[2,10,11]. Sugere-se que esse efeito pode estar associado a mudanças nas características organolépticas advindo do sabor amargo do nitrato[2], ou pelo produto intermediário do nitrato, o óxido nítrico (NO), que foi identificado em outro estudo como mensageiro de sinalização de controle de consumo[21]. Apesar de não mensurado, os riscos de toxidade por nitrito que leva ao quadro de metemoglobinemia foi descartado, pois estudos realizados por Lee et al.[22] em que os animais consumiam 50 g de $NO_3^-$ para cada 100 kg de peso corporal (174,7 g/d) em dieta total não apresentaram intoxicação (< 1,02% da hemoglobina total), enquanto que no presente estudo o consumo máximo estimado de $NO_3^-$ proveniente da inclusão no suplemento foi de aproximadamente 36 g para cada 100 kg de peso corporal. A pastagem foi adubada com 45 kg de N/ha e não poderia apresentar efeitos de redução e consumo, ou riscos de intoxicação aos animais, pois Primavesi et al.[23] avaliando níveis de 0, 50, 100 e 200 kg de N/ha verificaram que adubação com 200 kg de N/ha

apresentou maior acúmulo de nitrato na forragem e que ainda assim estava na faixa permissível para alimentação dos animais (-3.400 a 4.500 mg/kg)[24].

Apesar de, em alguns casos, o nitrato apresentar redução de consumo de alimento, estudos demonstram ausência de efeitos negativos sobre o ganho médio diário[1,10,11,22,25], assim como ocorreu no presente estudo em todas as épocas avaliadas, bem como no período total do experimento. A redução do consumo de matéria seca de suplemento, seguido de ausência de efeitos significativos sobre o GMD pode apresentar benefícios diante de um potencial aumento na eficiência de uso do suplemento. Porém na época de seca, apesar da redução em 5,0% no consumo de matéria seca de suplemento, não houve aumento na eficiência de uso do suplemento. A relação folha:colmo (0,71 e 0,64 dos piquetes referentes aos tratamentos FS e NE, respectivamente) e oferta de folhas verdes de 581,2 e 441,7 kg/ha observados nas pastagens dos tratamentos FS e NE, respectivamente, (TABELA 4) nessa época pode ter limitado os animais na seleção de frações da forragem que possuem melhor qualidade. A concentração de 653,1 g de FDNcp por kg de MS observada nas amostras de simulação de pastejo (TABELA 3) fornece fortes indícios de que houve limitação de entrada de nutrientes via consumo de pasto, seja por limitação física e baixa taxa de passagem ocasionada pela baixa digestibilidade da forragem evidenciada pela concentração de 64,4 g de PB por kg de MS. Estudos realizados por Franco et al.[26] com pastagem *Urochloa brizantha* no período seco apresentando teores de PB e FDN de 32,0 e 746,0 g/kg de MS, respectivamente, verificaram que quando a oferta de folhas verdes reduziu de 1.634,2 para 561,4 kg/ha, a digestibilidade *in vitro* da matéria seca reduziu de 450,0 para 370,0 g/kg. Os mesmos autores relataram que o aumento no desempenho dos animais nessa época se dá por meio da contribuição de nutrientes por meio do uso de suplementação devido ao efeito associativo positivo atribuído à adição de compostos limitantes para os microrganismos. Ainda, segundo Detmann et al.[27], concentrações de PB inferiores a 80 g/kg de MS influenciam negativamente a multiplicação de microrganismos fibrolíticos e, consequentemente na taxa de passagem e redução de consumo de pasto, bem como seu aproveitamento. Van Wyngaard et al.[28] fornecendo níveis de 0, 24 ou 48 g de nitrato não encapsulado por kg de MS de suplemento para vacas em pasto (5,4 kg de MS/vaca/dia), verificaram que o maior nível de nitrato utilizado resultou em efeito substitutivo, e que apesar de não haver diferenças significativas no consumo total de matéria seca, a entrada de nutrientes provenientes do pasto foi limitada pelo teor de fibra acarretando na redução da produção de leite. Diante disso, é possível que a diferença de consumo de 120 g de MS de suplemento entre os tratamentos FS e NE na época seca tenha sido compensada

pelo aumento de saldo energético gerado pelo uso do nitrato e não pela elevação de ingestão de matéria seca do pasto evidenciado pela ausência de efeitos significativos na disponibilidade média de matéria seca na época seca, sendo 7.691,3 e 7.710,0 kg/ha nos piquetes dos tratamentos FS e NE, respectivamente (TABELA 4).

O percentual de redução de consumo de matéria seca de suplemento entre os animais FS e NE nas épocas de transição seca-águas (14,6%) e águas (13,4%) podem ser explicados, em parte, pelo aumento da oferta de folhas verdes nesses períodos (1.853,3 e 1.662,9 kg/ha, respectivamente *vs* 517,0 kg/ha na época seca) (TABELA 4). A precipitação pode ter exercido influencia sobre a flutuação de consumo de matéria seca de suplemento (FIGURA 1), pois verificou-se 225 mm de chuva no final do período seco (TABELA 1), e juntamente a isso variações na ingestão de suplemento. O aumento de 13,5% na eficiência alimentar dos animais alimentados com nitrato encapsulado no período de transição seca-águas possivelmente tenha ocorrido por meio de maior saldo energético devido à maior qualidade de forragem nessa época (569,5, 111,8 e 224,2 g/kg de MS). Durante a fermentação, $H_2$ são produzidos e precisam ser utilizados para que haja continuidade do catabolismo intracelular, e os microrganismos metanogênicos são os principais agentes captadores de $H_2$ para a metanogênese ($\Delta G$ = - 67,4 kJ/mol de $H_2$)[29,30], que uma vez sendo produzido, ocorre perca energética na forma de gás. Com isso, a inclusão do NE na dieta, parte do $H_2$ que seria direcionado para a produção de metano é direcionado à redução de nitrato a amônia ($\Delta G$ = - 254 kJ/mol de $H_2$)[29], favorecendo o crescimento de microrganismos fibrolíticos, proporcionando maior fermentação dos alimentos, maior produção de energia e síntese de proteína microbiana[31]. A otimização da concentração de amônia ruminal em épocas do ano com altas precipitações (597 mm no período de transição-seca águas, TABELA 2) é de suma importância, pois durante essa época a pastagem apresenta um ganho potencial (ou ganho latente) de aproximadamente 200 g/animal/dia, devido ao desequilíbrio no teor de energia e proteína (com excesso relativo de energia), que pode ser obtido por meio de estratégias de suplementação proteica[20,27]. Lee et al.[1] observaram aumento de 11% na eficiência alimentar de bovinos alimentados com 25 g de nitrato encapsulado por kg de MS quando houve a substituição da ureia. Esses dados demonstram que o tipo de fonte de nitrogênio não proteico fornecido na dieta (no presente caso, o nitrato encapsulado) pode alterar as vias metabólicas dos produtos gerados pela fermentação do alimento, fornecendo mais energia ao animal por kg de alimento consumido. Aumento da proporção molar de acetato foi observado por Berti[32] quando substituiu parcialmente o farelo de soja por nitrato encapsulado (50 g/kg de MS) no

suplemento de bovinos de corte em pastagens em condições semelhantes à época transição seca-águas do presente estudo. Esse autor relata ainda que ausência de efeitos significativos foi observado na concentração de N-$NH_3$ e digestibilidade de FDN com a inclusão de NE, sugerindo que os íons de $H_2$ proveniente da fermentação estão sendo direcionados para acetogênese ($\Delta G$ = - 8,8 kJ/mol de $H_2$)[29]. O acetato possui grande importância no fornecimento de energia para bovinos, uma vez que é absorvido por difusão através do epitélio do rúmen-retículo e utilizado na oxidação direta para a produção de energia, que leva a produção final de 10 ATP para cada mol produzido[33]. A redução de consumo de matéria seca de suplemento contendo NE observada durante todos os períodos sem afetar negativamente o ganho de peso dos animais, refletiu em aumento de eficiência de uso do suplemento em 9% quando avaliado o período total, e redução na quantidade total de suplemento fornecido para os animais de 4,7%. Fernandes[34] avaliando inclusão de nitrato encapsulado em substituição da ureia em suplemento de bovinos de cortes em pastejo durante a época seca, águas e terminação verificaram aumento no GMD no período de terminação, que coincidiu com o consumo de PB do suplemento representar 82% de toda a PB ingerida pelos animais, demonstrando que a concentração de nitrogênio amoniacal ruminal influenciou de maneira mais positiva no aumento do desempenho do que o saldo energético oriundo da redução de produção de metano nesse período sendo 75% do esperado baseado na estequiometria contra 139% no período seco e 92% no período de águas. Por outro lado, El-Zaiat et al.[35] observaram redução de concentração de amônia ruminal com a inclusão de nitrato encapsulado, e aumento na produção total de AGCC. Com isso, mais pesquisas são necessárias para que possa relacionar os efeitos do uso do nitrato encapsulado com o aumento de saldo de energia líquida.

Ao longo de 24 horas, foi observado que a taxa de consumo de suplemento pelos animais foi alterada em função da inclusão de nitrato encapsulado, resultando em menor ingestão por horário observado. Maiores taxas de consumo de suplemento foram registradas três horas após o fornecimento de concentrado para os animais do tratamento FS, sendo 71,5% e 69,9% nos períodos de transição seca-águas e águas respectivamente. Esse mesmo efeito foi observado por De Quadros et al.[36] que avaliando o comportamento ingestivo de bovinos de corte em clima e pastagem tropical, verificaram decréscimo de atividade de pastejo e maior frequência de cocho entre os horários mais quentes do dia, sendo as nove e 13 horas. Alterações no padrão alimentar com a inclusão de NE na dieta foi relatado por Velazco et al.[37] em que observaram aumento no número de refeições de 7,4 para 14,7 quando o nitrato

foi adicionado na proporção de 20 g/kg de MS da dieta. Os mesmos autores verificaram redução na quantidade de alimento consumido por refeição de 1,82 para 0,77 kg com a inclusão de nitrato. A porção de suplemento consumido por animais do tratamento NE no período de transição seca-águas foi de 0,58 kg por horário observado. Com exceção das primeiras 3 horas, a porção de suplemento ingerido pelos animais alimentados com NE por horário observado não ultrapassou 20% do total remanescente no cocho. Apesar dos valores médios da quantidade de suplemento consumido ao longo do dia serem próximos entre as duas épocas do ano (transição seca-águas e águas), a diferença é que na época de transição seca-águas o consumo de suplemento contendo NE foi constante desde as primeiras horas após o fornecimento do suplemento. Esse efeito pode trazer benefícios por meio da manutenção contínua do ambiente ruminal através da entrada de proporções semelhantes de nutrientes ao longo do dia. Além disso, o nitrato encapsulado pode ser melhor estudado para ser utilizado também como uma ferramenta reguladora de consumo de suplemento por bovinos, pois baseado nos dados observados no presente estudo, a ingestão máxima de nitrato encapsulado por horário observado foi de 28 g para cada 100 kg de peso corporal.

## 5 CONCLUSÃO

A inclusão de 33,4 gramas de $NO_3^-$ por quilograma de matéria seca de suplemento para bovinos de corte a pasto suplementados na proporção de 1,0% do peso corporal reduz o consumo de matéria seca de suplemento e diminui a porção de suplemento consumido ao longo do dia sem afetar negativamente o ganho de peso. A flutuação diária de consumo de suplemento pode nortear possíveis efeitos residuais de nitrato ou nitrito no ambiente ruminal que exerce influência na ingestão do suplemento. A inclusão do nitrato encapsulado em substituição parcial por farelo de soja resultou em aumento da eficiência de uso do suplemento.

## 6 REFERÊNCIAS


1. Lee C, Araujo RC, Koenig KM, Beauchemin KA. Effects of encapsulated nitrate on growth performance, carcass characteristics, nitrate residues in tissues, and enteric methane emissions in beef steers: Finishing phase. J. Anim. Sci. 2017;95:3712–3726.

2. Rebelo LR, Luna IC, Messana JD, Araujo RC, Simioni TA, Granja-Salcedo YT, et al. Effect of replacing soybean meal with urea or encapsulated nitrate with or without elemental sulfur on nitrogen digestion and methane emissions in feedlot cattle. Anim. Feed Sci. Technol. 2019;257:114293.

3. El-Zaiat HM, Araujo RC, Louvandini H, Patiño HO, Abdalla AL. Effects of dietary replacement of urea with encapsulated nitrate and cashew nut shell liquid on nutrient digestibility, nitrogen balance, and carcass characteristics in growing lambs. Anim. Feed Sci. Technol. 2020;266:114515.

4. Henry DD, Ciriaco FM, Araujo RC, Fontes PLP, Oosthuizen N, Mejia-Turcios SE, et al. Effects of bismuth subsalicylate and encapsulated calcium ammonium nitrate on ruminal fermentation of beef cattle. J. Anim. Sci. 2020 Aug 1;98.

5. Lee C, Beauchemin KA. A review of feeding supplementary nitrate to ruminant animals: nitrate toxicity, methane emissions, and production performance. Can. J. Anim. Sci. 2014;94:557–570.

6. Oliveira PPA, Berndt A, Pedroso AF, Alves TC, Pezzopane JRM, Sakamoto LS, et al. Greenhouse gas balance and carbon footprint of pasture-based beef cattle production systems in the tropical region (Atlantic Forest biome). Animal. 2020;1–11.

7. Johnson KA, Johnson DE. Methane Emissions from Cattle. J. Anim. Sci. 1995;73:2483–2492.

8. Newbold JR, Zijderveld SM van, Hulshof RBA, Fokkink WB, Leng RA, Terencio P, et al. The effect of incremental levels of dietary nitrate on methane emissions in Holstein steers and performance in nelore bulls. J. Anim. Sci. 2014;92:5032–5040.

9. Lee C, Araujo RC, Koenig KM, Beauchemin KA. Effects of encapsulated nitrate on eating behavior, rumen fermentation, and blood profile of beef heifers fed restrictively or ad libitum. J. Anim. Sci. 2015;93:2405–2418.

10. Alemu AW, Romero-Pérez A, Araujo RC, Beauchemin KA. Effect of encapsulated nitrate and microencapsulated blend of essential oils on growth performance and methane emissions from beef steers fed backgrounding diets. Animals. 2019;9:1–19.

11. Araujo RC, Pereira MLR, Couto VRM, Lemos BJM, Jorge da Cunha PH, Arnhold E, et al. Dose-response effect of encapsulated nitrate replacing soybean meal on growth performance, ingestive behavior, and blood metabolites of feedlot finishing bulls. Livest. Sci. 2021;247:104–475.

12. Lee C, Araujo RC, Koenig KM, Beauchemin KA. In situ and in vitro evaluations of a slow release form of nitrate for ruminants: Nitrate release rate, rumen nitrate metabolism and the production of methane, hydrogen, and nitrous oxide. Anim. Feed Sci. Technol. 2017;231:97–106.

13. Detmann E, Paulino MF, Mantovani HC, Filho S de CV, Sampaio CB, Souza MA de,

et al. Parameterization of ruminal fibre degradation in low-quality tropical forage using Michaelis-Menten kinetics. Livest. Sci. 2009;126:136–146.

14. Lazzarini I, Detmann E, Sampaio CB, Paulino MF, Valadares Filho SC, Souza MA, et al. Intake and digestibility in cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogenous compounds. Rev. Bras. Zootec. 2009;38:2021–2030.

15. Sampaio CB, Detmann E, Paulino MF, Filho SCV, Souza MA de, Lazzarini I, et al. Intake and digestibility in cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogenous compounds. Trop. Anim. Health Prod. 2010;42:1471–1479.

16. Detmann E, Souza MA, Valadares Filho SC, Queiroz AC, Berchielli TT, Saliba EOS, et al. Métodos para análise de alimentos-Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Ciência Animal. Eds. Visconde do Rio Branco: Suprema: 2012.

17. Johnson A. Sample preparation and chemical analysis of vegetation. In: Measurement of grassland vegetation and animal production. Aberustwyth: Commonwealth Agricultural Bureaux.; 1978. p. 96–102.

18. Mertens DR. Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. J. Dairy Sci. 1997;80:1463–1481.

19. McMeniman NP. Methods of estimating intake of grazing animals. In: Simpósio sobre tópicos especiais em zootecnia. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 34. Juiz de Fora: 1997. p. 131–168.

20. Paulino MF, Detmann ED, Valadares Filho SC. Bovinocultura funcional nos trópicos. In: Simpósio de Produção de Gado de Corte, 2. 2008. p. 275–305.

21. Khan MS, Tachibana T, Hasebe Y, Masuda N, Ueda H. Peripheral or central administration of nitric oxide synthase inhibitor affects feeding behavior in chicks. Comp. Biochem. Physiol. 2007;148:458–462.

22. Lee C, Araujo RC, Koenig KM, Beauchemin KA. Effects of encapsulated nitrate on growth performance, nitrate toxicity, and enteric methane emissions in beef steers: Backgrounding phase. J. Anim. Sci. 2017;95:3700.

23. Primavesi, Ana Cândida; Primavesi O, Corrêa, Luciano De Almeida; Gabriel, Aliomar; Cantarella H. Nutrientes na fitomassa capim-marandu. Ciência Agrotecnológica. 2006;30:562–568.

24. Whitehead DC. Volatilization of ammonia. In: Grassland nitrogen. Wallingford: CAB International; 1995. p. 152–179.

25. Granja-Salcedo YT, Fernandes RMI, Araujo RC De, Kishi LT, Berchielli TT, Resende FD De, et al. Long-term encapsulated nitrate supplementation modulates rumen microbial diversity and rumen fermentation to reduce methane emission in grazing steers. Front. Microbiol. 2019;10:1–12.

26. Franco GL, Vedovatto M, D'Oliveira MC, Neto IMC, Graça Morais M Da, Silva Diogo JM Da. Effect of frequency of protein-energetic supplementation on the performance and ingestive behavior of Nellore calves kept in a tropical pasture in the dry season. Semin. Agrar. 2018;39:2555–2564.

27. Detmann E, Valente ÉEL, Batista ED, Huhtanen P. An evaluation of the performance and efficiency of nitrogen utilization in cattle fed tropical grass pastures with supplementation. Livest. Sci. 2014;162:141–153.

28. Wyngaard JDV van, Meeske R, Erasmus LJ. Effect of dietary nitrate on enteric methane emissions, production performance and rumen fermentation of dairy cows grazing kikuyu-dominant pasture during summer. Anim. Feed Sci. Technol. 2018;244:76–87.

29. Ungerfeld EM, Kohn RA. The role of thermodynamics in the control of ruminal fermentation. In: K. Sejrsen K, Hvelplund T, Nielsen MO, editors. Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism and Impact of Nutrition on Gene Expression, Immunology and Stress. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers; 2006. p. 55–85.

30. Kozloski G V. Bioquímica dos ruminantes. 2 ed. Santa Maria: Editora UFSM; 2009.

31. Guyader J, Ungerfeld EM, Beauchemin KA. Redirection of metabolic hydrogen by inhibiting methanogenesis in the rumen simulation technique (RUSITEC). Front. Microbiol. 2017;8:393.

32. Berti GF. Nitratato encapsulado na suplementação para novilhos de corte em pastejo. [Dissertação - Mestrado]. Universidade Federal de Goiás. Escola de Veterinária e Zootecnia. 2020; 33p.

33. Teixeira JC. Nutrição de ruminantes. Lavras, Minas Gerais: Edições FAEPE; 1996; 270p.

34. Fernandes RM. Efeito da adição de nitrato encapsulado na alimentação de bovinos de corte durante recria e terminação em pastejo. [Tese - Doutorado]. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus Jaboticabal. 2018; 58p.

35. El-Zaiat HM, Araujo RC, Soltan YA, Morsy AS, Louvandini H, Pires A V., et al. Encapsulated nitrate and cashew nut shell liquid on blood and rumen constituents, methane emission, and growth performance of lambs. J. Anim. Sci. 2014;92:2214–2224.

36. Quadros DG de, Souza HN de, Andrade AP, Bezerra ARG, Almeida RG de, Sá AM de, et al. Avaliação bioeconômica de estratégias de suplementação de novilhos zebuínos mantidos em pastagens diferidas de capim-marandu no período seco. Rev. Bras. Saude e Prod. Anim. 2016;17:461–473.

37. Velazco JI, Cottle DJ, Hegarty RS. Methane emissions and feeding behaviour of feedlot cattle supplemented with nitrate or urea. Anim. Prod. Sci. 2014;54:1737–1740.

# CÁPITULO 3 - AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA PRODUÇÃO DE METANO COM USO DE NITRATO ENCAPSULADO

**RESUMO:** O nitrato reduz a produção de metano em ruminantes. Com isso, objetivou-se avaliar, em experimento *in vitro*, a produção total de gases, produção de metano, degradabilidade de matéria seca (DIVMS), degradabilidade de fibra em detergente neutro (DIVFDN), ácidos graxos de cadeia curta e concentração de nitrogênio amoniacal ($N\text{-}NH_3$). Os tratamentos, avaliados segundo delineamento inteiramente casualizado, foram avaliados por meio da inclusão ou não de 20 g/kg de nitrato encapsulado na MS em substrato composto por concentrado e forragem oriunda de pastejo simulado realizado na época de seca, transição seca-águas e águas. Os substratos foram incubados em frascos de 160 mL, contendo 90 mL de meio de cultura, 5 mL de inóculo e *headspace* de 65 mL. As coletas dos dados foram realizadas nos tempos zero, três, seis, nove, 12, 24 e 48 horas após a incubação. Todas as análises foram realizadas por meio do programa R. A análise dos dados para determinação da produção de gás foi realizada por meio do modelo logístico. A DIVMS e DIVFDN e concentração de $N\text{-}NH_3$ foram analisadas por meio de medida repetida no tempo. A produção de metano e ácidos graxos de cadeia curta foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Houve redução de 533,0 para 493,2 g/kg na DIVFDN no tempo 48 horas ($P < 0,03$) e redução na produção de metano de 22,2 para 19,3 mg ($P < 0,01$) com a inclusão de NE no substrato de época seca. A inclusão de NE no substrato de época seca não influenciou na produção total de gás e *lag time*, apresentando médias de 137,1 mL e 0,13 horas, respectivamente. Por outro lado, reduziu a proporção molar de acetato de 15,81 para 14,85 m*M*/mL ($P < 0,03$). O tempo total de incubação (48 horas) foi marcado com redução de 5% na DIVMS com a inclusão no NE (741,4 vs 703,9 g/kg) ($P < 0,02$) no substrato da época de transição seca-águas. Aumento na concentração de $N\text{-}NH_3$ foi verificado com inclusão do NE no substrato de forragem de época de transição-seca águas nos tempos seis (20,8 para 18,2 mg/dL) ($P < 0,01$), nove (22,9 para 19,6 mg/dL) ($P < 0,01$) e 24 horas (30,2 para 14,2 mg/dL) ($P < 0,01$). Não houve efeito significativo da inclusão do nitrato no substrato da época de águas sobre a DIVMS e DIVFDN ($P > 0,06$). Houve aumento da produção total de gás (121,4 vs 142,0 mL) com inclusão no NE no substrato da época de águas. Ausência de efeitos significativos foram observados no *lag time*, na produção total de metano ($P > 0,44$) (média 17,75 mL) e média geral de concentração de $N\text{-}NH_3$ (21,4 mg/dL) ($P > 0,31$). Foi observado aumento da proporção molar de acetato de 14,36 para 20,33 m*M*/mL ($P < 0,04$) com a inclusão do nitrato encapsulado no substrato da época de águas. O uso do nitrato apresentou um potencial de redução de produção de metano em forragem de época seca. Em forragens de época de transição seca-águas e águas mostrou-se promissor no aumento de produção de energia para ruminantes.

**Palavras-chave:** bovino, $CH_4$, gás de efeito estufa, *in vitro*, ruminante

**ABSTRACT:** Nitrate reduces methane production in ruminants. Thus, the objective was to evaluate, in an in vitro experiment, the total production of gases, methane production, dry matter degradability (DIVMS), neutral detergent fiber degradability (DIVFDN), short chain fatty acids and nitrogen concentration ammoniacal ($N\text{-}NH_3$). The treatments, evaluated according to a completely randomized design, were evaluated through the inclusion or not of 20 g/kg of nitrate encapsulated in DM in a substrate composed of concentrate and forage from simulated grazing carried out in the dry season, dry-water transition and wet . The substrates were incubated in 160 mL flasks containing 90 mL of culture medium, 5 mL of inoculum and 65 mL of headspace. Data collection was performed at times zero, three, six, nine, 12, 24 and 48 hours after incubation. All analyzes were performed using the R program. Data analysis to determine gas production was performed using the logistic model. IVDMD and IVDNDF and $N\text{-}NH_3$ concentration were analyzed by means of repeated measurement in time. The production of methane and short-chain fatty acids were compared by Tukey's test at 5% probability. There was a reduction from 533.0 to 493.2 g/kg in NDFIVD at 48 hours ($P < 0.03$) and a reduction in methane production from 22.2 to 19.3 mg ($P < 0.01$) with the inclusion of EN in the dry season substrate. The inclusion of EN in the dry season substrate did not influence the total gas production and lag time, with averages of 137.1 mL and 0.13 hours, respectively. On the other hand, it reduced the acetate molar ratio from 15.81 to 14.85 mM/mL ($P < 0.03$). The total incubation time (48 hours) was marked with a 5% reduction in IVDMD with the inclusion in the NE (741.4 vs 703.9 g/kg) ($P < 0.02$) in the substrate from the dry- waters. An increase in the concentration of $N\text{-}NH_3$ was verified with the inclusion of NE in the dry transition season forage substrate waters at times six (20.8 to 18.2 mg/dL) ($P < 0.01$), nine (22 .9 to 19.6 mg/dL) ($P < 0.01$) and 24 hours (30.2 to 14.2 mg/dL) ($P < 0.01$). There was no significant effect of the inclusion of nitrate in the substrate of the wet season on IVDMD and IVDNDF ($P > 0.06$). There was an increase in total gas production (121.4 vs 142.0 mL) with inclusion in the NE in the wet season substrate. No significant effects were observed in lag time, total methane production ($P > 0.44$) (mean 17.75 mL) and overall mean $N\text{-}NH_3$ concentration (21.4 mg/dL) ($P > 0 .31$). An increase in the molar proportion of acetate from 14.36 to 20.33 mM/mL ($P < 0.04$) was observed with the inclusion of encapsulated nitrate in the wet season substrate. The use of nitrate showed a potential to reduce methane production in dry season forage. In dry-water and wet transition season forages, it showed promise in increasing energy production for ruminants.

**Keywords:** bovine, $CH_4$, greenhouse gas, *in vitro*, ruminant

## 1 INTRODUÇÃO

Assuntos relacionados ao aquecimento global tem se tornado cada vez mais frequentes no Brasil e no mundo. Atrelado a isso, a redução da pegada de carbono em diversos setores, inclusive na pecuária, têm alavancado discussões quanto a oportunidades de negociações de créditos de carbono no mercado internacional. Diante disso, intervenções na câmara fermentativa dos ruminantes têm se tornado alvo para o desenvolvimento de estratégias para diminuir a produção de metano. Nesse contexto, existe a importância de avaliar o uso do nitrato na alimentação de animais ruminantes por apresentar potencial significativo na redução de produção de metano ($CH_4$)[1–3].

Além dos efeitos diretos do nitrito sobre a diminuição da população de microrganismos metanogênicos[4], oxidação do metano[5–7], o processo de redução do nitrato a amônia fornece uma alternativa energeticamente mais favorável de via de utilização do $H_2$ gerado durante a fermentação[8]. Contudo, as vias metabólicas envolvidas na produção e utilização de $H_2$ precisam ser consideradas para o desenvolvimento de estratégias de redução da produção entérica de $CH_4$[9]. Estequiometricamente, se a redução do nitrato a amônia for completa, a produção de metano é diminuída em 25,8 g para cada 100 g de nitrato[10]. Porém, essa eficiência de redução da produção de metano com o uso do nitrato pode ser influenciada por outras vias metabólicas, de forma que os íons de $H_2$ também podem ser direcionados para a produção de ácidos mais reduzidos como propionato e valerato[11]. A mudança na qualidade da forragem consumida pelos bovinos altera a resposta na produção entérica de metano[12], com isso torna-se de grande relevância avaliar o potencial de utilização de nitrato encapsulado em substratos de pastagens tropicais de diferentes épocas.

Objetivou-se avaliar, através do estudo *in vitro*, a produção de metano com inclusão de 13,4 gramas de $NO_3^-$ por kg na matéria seca no substrato da época seca, transição seca-águas e águas, e os seus efeitos sobre a degradabilidade, concentração de ácidos graxos de cadeia curta e nitrogênio amoniacal.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento *in vitro* foi realizado no Laboratório de Nutrição Animal – LANA do Departamento de Zootecnia, pertencente a Universidade Federal de Goiás – UFG, localizado em Goiânia-Goiás, com altitude de 752 metros.

Em um substrato composto por 60% de volumoso e 40% de concentrado, foram realizados três experimentos, um para cada fase do ano: Seca, Transição seca-águas e Águas. Em cada experimento foram avaliados dois tratamentos: FS – substrato composto por forragem e concentrado contendo farelo de soja como fonte proteica e NE – substrato composto por forragem e concentrado com inclusão de 20 g de nitrato encapsulado de cálcio e amônio decahidratado ($5Ca(NO_3)_2.NH_4NO_3.10H_2O$, GRASP Ind. & Com. LTDA, Curitiba, Brasil) por kg de matéria seca.

As forragens de cada época do ano utilizadas para a incubação foram oriundas do pastejo simulado realizado no experimento de desempenho a fim de simular produção de gases e demais parâmetros ruminais em ambiente *in vitro*. Na TABELA 1 está apresentado a composição química da forragem.

TABELA 1 - Composição química (g/kg) do pastejo simulado utilizado como substrato na incubação

| Nutriente | Época | | |
|---|---|---|---|
| | Seca | Transição | Águas |
| Matéria seca* | 416,9 | 281,6 | 256,1 |
| Cinza | 63,4 | 73,1 | 75,0 |
| Matéria orgânica | 936,6 | 926,9 | 925,0 |
| FDNcp[a] | 653,1 | 567,9 | 611,0 |
| Proteína bruta | 64,4 | 109,0 | 109,4 |
| Extrato etéreo | 18,1 | 19,4 | 16,4 |
| Carboidratos não fibrosos | 201,0 | 230,6 | 198,3 |

[a]Fibra em detergente neutro corrigido para cinza e proteína.
*O teor de matéria seca refere-se ao material coletado *in natura* no pasto

A composição de ingredientes e composição química dos substratos incubados estão apresentados na TABELA 2.

TABELA 2 - Proporção de ingredientes utilizados para compor o substrato e composição química do concentrado dos tratamentos

| | Controle[a] | | | NE[b] | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Seca | Seca águas | Águas | Seca | Seca águas | Águas |
| Composição de ingredientes (g/kg) | | | | | | |
| Milho | 251,2 | 284,0 | 306,6 | 292,1 | 324,8 | 347,4 |
| Farelo de soja | 119,9 | 89,2 | 68,6 | 69,2 | 38,5 | 17,9 |
| Ureia | 6,67 | 6,67 | 6,67 | 6,67 | 6,67 | 6,67 |
| Mistura mineral | 12,0 | 10,0 | 8,0 | 12,0 | 10,0 | 8,0 |
| Nitrato | 0 | 0 | 0 | 20,0 | 20,0 | 20,0 |
| Calcário | 10,2 | 10,2 | 10,2 | 0 | 0 | 0 |
| Forragem | 600,0 | 600,0 | 600,0 | 600,0 | 600,0 | 600,0 |
| Composição química do concentrado (g/kg) | | | | | | |
| Matéria seca | 883,2 | 876,8 | 886,4 | 878,7 | 874,9 | 879,0 |
| NDT[c] | 778,2 | 787,6 | 795,3 | 765,4 | 774,8 | 782,5 |
| Proteína bruta | 250,0 | 220,0 | 200,0 | 250,0 | 220,0 | 200,0 |
| Cálcio | 10,6 | 10,4 | 10,2 | 10,6 | 10,4 | 10,2 |

[a]Substrato contendo farelo de soja; [b]Substrato com inclusão de 20g de nitrato encapsulado por kg de matéria seca (66,86% de $NO_3$, 105% de equivalente proteico e 19,5% de cálcio); [c]Nutrientes digestíveis totais.

Com exceção do nitrato encapsulado, todos os ingredientes foram moídos a 1 mm em moinho tipo Willey para a utilização na incubação *in vitro*. Um grama de cada substrato referente a cada tratamento foi pesado em saquinhos de TNT. O meio de cultura foi preparado

seguindo-se as recomendações de Theodorou [13]. Após o preparo da solução, a mesma foi mantida sob fluxo de gás nitrogênio para conferir anaerobiose do meio e, em seguida adicionada (90 mL) em frascos (160 mL), vedadas com rolha butílica, seladas com lacres de alumínio e mantidas em banho-maria à 39°C até o momento da inoculação.

Dois bovinos com predominância de sangue Nelore, fistulados no rúmen utilizados como doadores de líquido ruminal foram mantidos em pastagem de *Brachiaria decumbens* no Setor de Fisiologia da Digestão (SEFID) pertencente à Universidade Federal de Goiás, e suplementados, na proporção de 1,0% do peso corporal, com concentrado à base de milho, farelo de soja, ureia e mistura mineral.

Dois litros do líquido ruminal foram coletados de cada animal e armazenados em garrafas térmicas previamente aquecidas. No laboratório, o líquido ruminal foi homogeneizado, filtrado através de quatro camadas de tecido de algodão e mantido sob temperatura de 39°C. A inoculação foi realizada através da injeção de 5 mL do inóculo por frasco através de seringa plástica conectada a uma agulha.

A pressão originada pelos gases acumulados na *headspace* (65 mL) dos frascos foi medida por intermédio de um transdutor de pressão (modelo Presdata 800) conectado em sua extremidade uma agulha. A partir da inserção da agulha na tampa de borracha a pressão produzida no interior dos frascos foi verificada no leitor digital. Os dados de pressão (em psi) foram utilizados para o cálculo do volume de gases produzidos através de equação matemática, V (mL) = 2,3932 + 3,4053 × P ($R^2$ = 0,9146, n = 1.151), desenvolvida em condições semelhantes ao presente estudo em termos de composição de ingredientes, meio de incubação e altitude.

A contagem de tempo para a tomada das leituras de pressão e demais coletas foi iniciada após o alívio da pressão dos frascos, sendo assim as leituras foram realizadas nos tempos 3, 6, 9, 12, 24 e 48 horas após o tempo de alívio da pressão no tempo 0 h. Cada tratamento por tempo, bem como os frascos em branco (apenas meio de cultura e inóculo) possuía amostras triplicadas.

A mensuração da produção de metano foi realizada por meio da coleta dos gases, em cada tempo, produzidos nos frascos, através de uma seringa e injetado em *exteiners* à vácuo da marca *Labco*. O metano foi mensurado por cromatografia gasosa pelo equipamento *GC 2014* por meio de injeção manual. A temperatura do detector (FID) foi 240°C, com o Hélio usado como gás de arraste à pressão constante de 18,7 kPa e à 5,7 mL/min. A coluna utilizada foi *RT-QS-BOND*, 30m × 0.53mm × 20um. A produção de metano de cada horário foi somado para obtenção da produção total de metano em 48 horas. Para transformar a unidade de medida de mL para mg, foi utilizado a equação de Clapeyron:

$$P \times V = n \times R \times T,$$

P = pressão (atm); V = volume (L); n = número de mols; R = 0,082 (atm/L/mol/K) e T = temperatura (K).

Para a obtenção da curva de produção de N-$NH_3$, foi coletado 10 mL de líquido das triplicatas em cada horário, transferidos individualmente para tubos *Falcon* de 15 mL previamente identificados e imediatamente transferido para o congelador com temperatura de -80°C para posterior análise de N-$NH_3$ por meio de colorimetria segundo a metodologia de Detmann[14].

No tempo de 24 horas foram coletados 10 mL de liquido, individualmente, das triplicatas, transferidos para tubos Falcon de 15 mL, contendo 2 mL de solução de ácido metafosfórico a 20% de concentração, e imediatamente transferidos para o congelador com temperatura de -80°C para posterior análise de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) por meio da metodologia descrita por Ferreira [15].

A degradabilidade *in vitro* foi determinada em cada tempo de avaliação anteriormente citado. As triplicatas (saquinhos) foram retirados dos frascos, lavados com água deionizada, e secas em estufa de ar forçado a 55°C por 72 horas, depois foram colocados em estufa a 105°C por 3 horas e posteriormente pesados para a obtenção dos resíduos da matéria seca. Em seguida foi determinado a concentração de FDN do resíduo seguindo a metodologia de Detmann et al.[14] para a obtenção da degradabilidade *in vitro* de FDN.

O delineamento experimental foram o inteiramente ao acaso, com seis tratamentos e três repetições. Todas as análises foram realizadas por meio do programa R. Os volumes acumulativos de cada horário foram ajustados utilizando o modelo logístico:

$$VT = a*(1+b*(\exp(-c*x)))^{-1}$$

VT = volume total (mL); a = Volume de gases correspondente à completa digestão do substrato (mL); b = sem efeito biológico; c = tempo de colonização do substrato ou *lag time* (h).

As comparações entre as médias dos dados de produção de metano e ácidos graxos de cadeia curta foram analisados através da ANOVA e teste Tukey. Os dados de degradabilidade *in vitro* da matéria seca e da fibra em detergente neutro, e nitrogênio amoniacal foram analisados por meio de medida repetida no tempo (sendo o horário pós alimentação a medida repetida), e comparada através do teste Tukey. Todas as analises foram realizadas por meio do programa R, e as comparações entre tratamentos ao nível de 5% de probabilidade de erro.

## 3 RESULTADOS

Não houve diferenças significativas para degradabilidade *in vitro* de matéria seca (DIVMS) entre os tratamentos FS e NE dentro de cada tempo avaliado ($P > 0,05$), exceto no tempo 12 horas em que houve redução de 458,4 para 433,8 g/kg com inclusão de NE ($P < 0,05$) (TABELA 3).

TABELA 3 - Degradabilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e degradabilidade *in vitro* de fibra em detergente neutro (DIVFDN) com a inclusão ou não de nitrato encapsulado no substrato de época de seca em diferentes tempos de incubação

| | Tratamento | | | p-valor | |
|---|---|---|---|---|---|
| DIVMS (g/kg) | FS[a] | NE[b] | EPM[c] | Tratamento | Tempo |
| 3 horas | 365,8 E | 359,7 D | 8,26 | 0,6013 | < 0,001 |
| 6 horas | 375,2 DE | 360,5 D | 8,26 | 0,2202 | |
| 9 horas | 403,4 D | 383,4 D | 8,26 | 0,1001 | |
| 12 horas | 458,4 aC | 433,8 bC | 8,26 | 0,0449 | |
| 24 horas | 557,3 B | 578,1 B | 8,26 | 0,0863 | |
| 48 horas | 731,7 A | 705,7 A | 9,20 | 0,0565 | |
| DIVFDN (g/kg) | | | | | |
| 3 horas | 121,7 D | 106,5 D | 11,56 | 0,3620 | < 0,001 |
| 6 horas | 145,5 CD | 131,9 CD | 12,85 | 0,4474 | |
| 9 horas | 161,9 CD | 147,3 CD | 11,55 | 0,3797 | |
| 12 horas | 182,5 C | 160,8 C | 11,55 | 0,1956 | |
| 24 horas | 309,2 B | 293,7 B | 11,55 | 0,3498 | |
| 48 horas | 533,0 aA | 493,2 bA | 11,55 | 0,0220 | |

[a]Suplemento contendo farelo de soja como fonte proteica; [b]Suplemento contendo nitrato encapsulado em substituição parcial pelo farelo de soja; [c]Erro padrão da média.
Valores médios com a mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste Tukey (P < 0,05)
Valores médios com a mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey (P < 0,05)

A DIVMS no tratamento FS não apresentou diferenças significativas apenas entre os tempos 3 e 6 horas (P > 0,98) (365,8 *vs* 375,2 g/kg) e 6 e 9 horas (P > 0,23) (375,2 *vs* 403,4 g/kg), e no tratamento NE entre os tempos 3 e 6 horas (P > 0,99) (359,7 *vs* 360,5 g/kg), 3 e 9 horas (P > 0,41) (359,7 *vs* 383,4 g/kg) e 6 e 9 horas (P > 0,45) (360,5 *vs* 383,4 g/kg) (TABELA 3).

Houve redução de 533,0 para 493,2 g/kg na DIVFDN no tempo 48 horas com a inclusão de NE (P < 0,03) Nos demais tempos não houveram diferenças significativas com a inclusão do NE (P > 0,19). Não houve diferença significativa na DIVFDN entre os tempos 3 e 6 horas (P > 0,76), 3 e 9 horas (P > 0,21), 6 e 9 horas (P > 0,94), 6 e 12 horas (P > 0,29) e 9 e 12 horas (P > 0,86) em ambos os tratamentos avaliados (TABELA 3). A FIGURA 1 apresenta a curva de produção de gás da época seca.

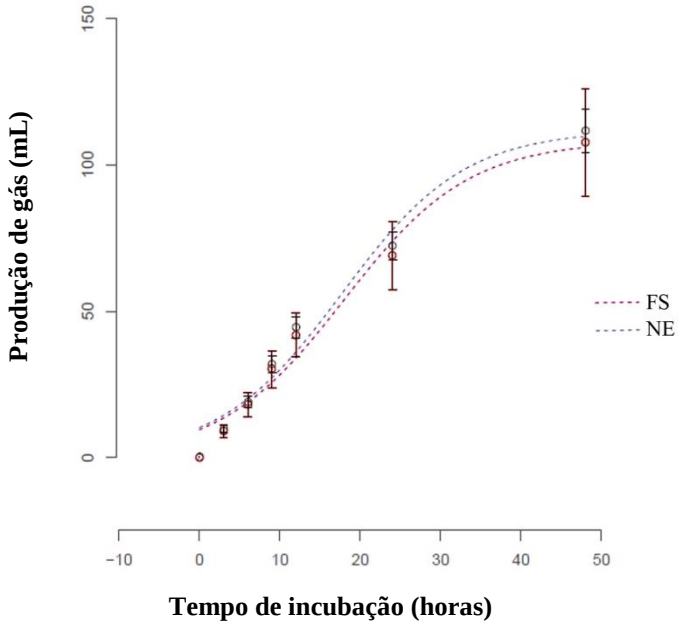


FIGURA 1 – Curva de produção de gás acumulativa dos tratamentos FS e NE e ajustada por meio do modelo logístico referente à época seca.

A inclusão de NE no substrato de época seca não influenciou na produção total de gás e *lag time*, apresentando médias de 110,1 mL e 0,13 horas, respectivamente. A inclusão de NE reduziu o total de $CH_4$ de 21,4 para 14,7 mg (P <0,02). Houve aumento na produção total de gás por grama de MS degradada (PG/MS) de 154,7 para 167,0 mL/g (P < 0,02). A inclusão de NE não influenciou na produção de $CH_4$ por grama de MS degrada ($CH_4$/MS), apresentando média de 13,2 mg/g. A produção de CH4 para cada 100 mL de gás produzido ($CH_4$/PG) foi reduzido com a inclusão de NE em 34,2% (20,2 *vs* 13,3 mg/100 mL). Houve redução de 13,1% (22,2 para 19,3 mg/dL) na média geral de concentração de N-$NH_3$ com a inclusão de NE (TABELA 4).

Por outro lado, reduziu a proporção molar de acetato de 15,81 para 14,85 m*M*/mL (P < 0,03). Não houve efeitos significativos entre os tratamentos sobre a concentração de propionato (P > 0,12), butirato (P < 0,12), isobutirato (P < 0,66), valerato (P < 0,07) e na relação acetato:propionato (C2:C3) (P > 0,37), apresentando médias de 4,93 m*M*/mL, 3,95 m*M*/mL, 0,22 m*M*/mL, 0,41 m*M*/mL e 3,12, respectivamente. Houve redução da proporção molar de isovalerato de 0,28 para 0,17 m*M*/L com a inclusão do NE no substrato da época seca (P < 0,01). A produção de metano foi reduzida em 30% quando o NE foi adicionado (23,7 vs 16,6 mg para o tratamento Controle e NE, respectivamente) (P < 0,01) (TABELA 4).

TABELA 4 - Proporção molar de ácidos graxos de cadeia curta (m*M*/L, AGCC), produção de gás total (mL), produção de metano total (mg) e concentração média de nitrogênio amoniacal (mg/dL, N-$NH_3$) com a inclusão ou não de nitrato encapsulado no substrato de época de seca

| | Tratamento | | | |
|---|---|---|---|---|
| | FS[a] | NE[b] | EPM[c] | p-valor |
| PTG (mL)[d] | 108,2 | 112,0 | 3,40 | * |
| *Lag time* (h) | 0,13 | 0,13 | 0,01 | ** |
| Total $CH_4$ (mg)[e] | 21,4 a | 14,7 b | 0,88 | 0,0115 |
| PG/MS (mL/g)[f] | 154,7 b | 167,0 a | 2,23 | 0,0176 |
| $CH_4$/MS (mg/g)[g] | 14,6 | 11,7 | 1,29 | 0,1935 |
| $CH_4$/PG (mg/100 mL)[h] | 20,2 a | 13,3 b | 0,79 | 0,0087 |
| N-$NH_3$ (mg/dL) | 22,2 a | 19,3 b | 0,23 | < 0,001 |
| Ácidos graxos de cadeia curta (m*M*/mL) | | | | |
| Acetato | 15,81 a | 14,85 b | 0,16 | 0,0253 |
| Propionato | 5,16 | 4,70 | 0,16 | 0,1294 |
| Butirato | 4,09 | 3,80 | 0,10 | 0,1295 |
| Isobutirato | 0,20 | 0,24 | 0,06 | 0,6600 |
| Valerato | 0,43 | 0,39 | 0,01 | 0,0742 |
| Isovalerato | 0,28 a | 0,17 b | 0,01 | 0,0084 |
| C2:C3[i] | 3,06 | 3,17 | 0,07 | 0,3778 |
| AGCC total | 25,97 a | 24,14 b | 0,31 | 0,0247 |

[a]Suplemento contendo farelo de soja como fonte proteica; [b]Suplemento contendo nitrato encapsulado em substituição parcial pelo farelo de soja; [c]Erro padrão da média; [d]Produção total de gases; [e]Produção total de metano; [f]Produção de gases por grama de matéria seca degradada; [g]Produção de metano por grama de matéria seca degradada; [h]Produção de metano para cada 100 mL de gás produzido; [i]Relação acetato:propionato.
*FS – IC 2,5%: 98,065 e IC 97,5%: 118,338 *vs* NE – IC 2,5%: 105,118 e IC 97,5%: 118,861
**FS – IC 2,5%: 0,100 e IC 97,5%: 0,159 *vs* NE – IC 2,5%: 0,111 e IC 97,2%: 0,151

Houve diferenças significativas na concentração de nitrogênio amoniacal (N-$NH_3$) nos tempos 9 horas (P < 0,01), 12 horas (P < 0,01) e 24 horas (P < 0,01), reduzindo de 23,9 para 21,6 mg/dL, 26,6 para 12,5 mg/dL e 20,1 para 15,2 mg/dL, respectivamente (FIGURA 2).

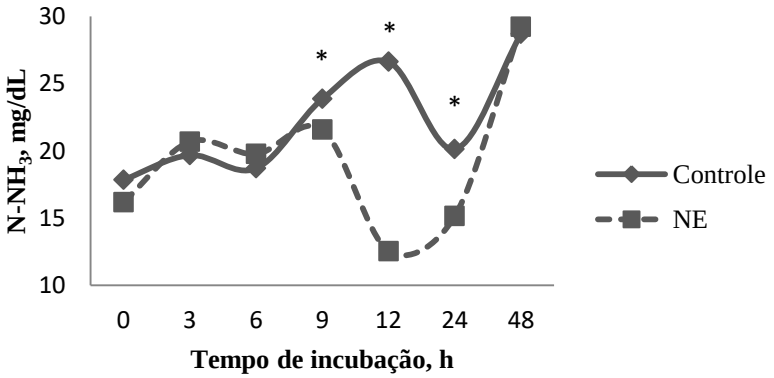


FIGURA 2 - Concentrações de N-$NH_3$ (mg/dL) ao longo do tempo de incubação (h) no período da seca *Valores médios diferem entre si pelo teste Tukey (P < 0,05).

Os tempos zero, três, seis e 48 horas após incubação não apresentaram diferenças significativas com a inclusão do NE no substrato da época de seca (P > 0,57), as médias foram 17,0, 20,2, 19,3, 29,0 mg/dL respectivamente.

A inclusão de NE não influenciou na degradabilidade *in vitro* da matéria seca na época de transição seca-águas nos tempos três (P > 0,22), seis (P > 0,19), nove (P > 0,38), 12 (P > 0,08) e 24 horas (P > 0,10) após a incubação, apresentando as seguintes médias: 358,8, 372,9, 414,9, 564,9 g/kg (TABELA 5). O tempo total de incubação (48 horas) foi marcado com redução de 5,0% na degradabilidade *in vitro* de matéria seca com a inclusão no NE (741,4 vs 703,9 g/kg) (P < 0,02).

TABELA 5 - Degradabilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e degradabilidade *in vitro* de fibra em detergente neutro (DIVFDN) com a inclusão ou não de nitrato encapsulado no substrato de época de transição seca-águas em diferentes tempos de incubação

| | Tratamento | | | p-valor | |
|---|---|---|---|---|---|
| DIVMS (g/kg) | FS[a] | NE[b] | EPM[c] | Tratamento | Tempo |
| 3 horas | 367,8 E | 349,8 E | 9,65 | 0,2248 | < 0,001 |
| 6 horas | 378,9 DE | 366,9 E | 9,65 | 0,1974 | |
| 9 horas | 412,5 CD | 417,3 D | 9,65 | 0,3868 | |
| 12 horas | 436,6 C | 461,2 C | 9,65 | 0,0827 | |
| 24 horas | 553,5 B | 576,2 B | 9,65 | 0,1069 | |
| 48 horas | 741,4 aA | 703,9 bA | 9,65 | 0,0105 | |
| DIVFDN (g/kg) | | | | | |
| 3 horas | 58,9 D | 42,1 E | 13,57 | 0,3905 | < 0,001 |
| 6 horas | 97,0 CD | 99,9 DE | 12,32 | 0,8702 | |
| 9 horas | 105,5 bCD | 149,0 aCD | 11,08 | 0,0107 | |
| 12 horas | 125,7 C | 156,6 C | 11,08 | 0,0608 | |
| 24 horas | 231,9 bB | 276,7 aB | 11,08 | 0,0089 | |
| 48 horas | 512,4 A | 493,4 A | 12,32 | 0,2890 | |

[a]Suplemento contendo farelo de soja como fonte proteica; [b]Suplemento contendo nitrato encapsulado em substituição parcial pelo farelo de soja; [b]Erro padrão da média.
Valores médios com a mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste Tukey (P < 0,05)
Valores médios com a mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey (P < 0,05)

Efeitos da inclusão do NE no substrato na época de transição seca-águas sobre a DIVFDN não foram observados nos tempos três (P > 0,39), seis (P > 0,87), 12 (P > 0,06) e 48 horas (P > 0,28) após a incubação, sendo verificado médias de 50,5, 98,5, 141,2, 502,9 g/kg respectivamente (TABELA 5). Aumentos na degradabilidade *in vitro* de FDN com a inclusão do NE no substrato da época de transição seca-águas foram verificados nos tempos nove (105,5 vs 149,0 g/kg para Controle e NE, respectivamente) (P < 0,02) e 24 horas após a incubação (231,9 vs 276,7 g/kg para Controle e NE, respectivamente) (P < 0,01), representando aumento de 41,2% e 19,3%, respectivamente.

A FIGURA 3 apresenta a curva de produção de gás referente à época de transição seca-águas.

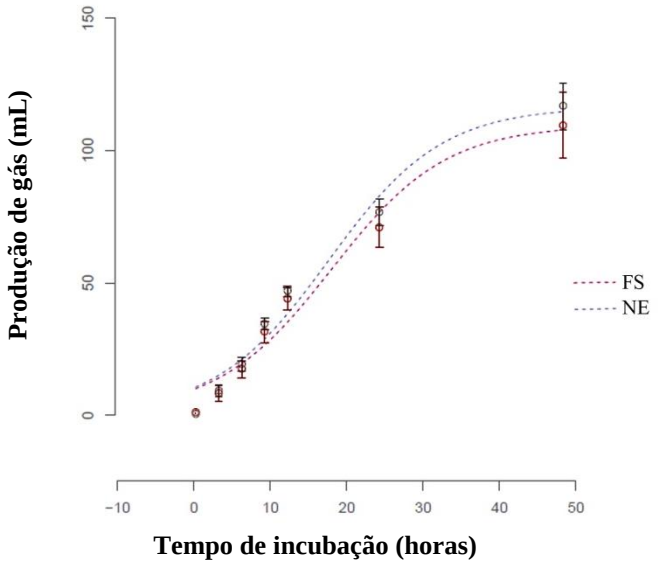


FIGURA 3 – Curva de produção de gás acumulativa dos tratamentos FS e NE e ajustada por meio do modelo logístico referente à época de transição seca-águas.

Não foi observado efeito significativo na produção total de gás, *lag time* e produção total de metano (P > 0,07), apresentando médias de 112,2 mL, 0,13 horas e 17,4 mg, respectivamente. A produção total de gás por grama de MS degradada (PG/MS) aumentou de 156,3 para 171,5 mL/g com a inclusão de NE (P < 0,04). A produção de $CH_4$ por grama de MS degradada não foi influenciada pela inclusão de NE, apresentando média de 13,9 mg/g (P > 0,76). Houve redução de produção de $CH_4$ para cada 100 mL de gás produzido com a inclusão de NE de 17,2 para 14,3 mg/100 mL (P < 0,05). Houve aumento de 18,8 para 22,0 mg/dL (17%) na média geral de concentração de N-$NH_3$ com inclusão de NE (P < 0,01) (TABELA 6).

Aumento de 25,3% foi observado na proporção molar de acetato quando o NE foi adicionado no substrato na época de transição seca-águas, sendo o aumento de 12,77 para 16,00 m*M*/mL (P < 0,01). Ausência de efeitos significativos com adição de NE no substrato de época de transição seca-águas foram verificados na proporção molar de propionato (P > 0,20), butirato (P > 0,07), isobutirato (P > 0,33), valerato (P > 0,61), isovalerato (P > 0,07) e AGGC total (P > 0,05) (TABELA 6), apresentando médias 5,2, 3,8, 0,13, 0,41, 0,25 e 24,13 m*M*/mL, respectivamente. Aumento de 2,35 para 3,23 na relação acetato:propionato (C2:C3) (P < 0,01) foram verificadas com a inclusão de NE (TABELA 6).

TABELA 6 - Produção de gás total, produção de metano total (mg), concentração média de nitrogênio amoniacal (N-$NH_3$) e proporção molar de ácidos graxos de cadeia curta (m*M*/mL) com a inclusão ou não de nitrato encapsulado no substrato de época de transição seca-águas

| | Tratamento | | | |
|---|---|---|---|---|
| | FS[a] | NE[b] | EPM[c] | p-valor |
| PTG (mL)[d] | 110,0 | 114,4 | 3,54 | * |
| *Lag time* (h) | 0,13 | 0,14 | 0,01 | ** |
| Total $CH_4$ (mg)[e] | 18,6 | 16,1 | 0,68 | 0,0830 |
| PG/MS (mL/g)[f] | 156,3 b | 171,5 a | 3,27 | 0,0301 |
| $CH_4$/MS (mg/g)[g] | 13,7 | 14,1 | 0,95 | 0,7659 |
| $CH_4$/PG (mg/100 mL)[h] | 17,2 a | 14,3 b | 0,61 | 0,0446 |
| N-$NH_3$ (mg/dL) | 18,8 b | 22,0 a | 0,26 | < 0,001 |
| Ácidos graxos de cadeia curta (m*M*/mL) | | | | |
| Acetato | 12,77 b | 16,00 a | 0,23 | < 0,001 |
| Propionato | 5,43 | 4,97 | 0,23 | 0,2051 |
| Butirato | 4,10 | 3,42 | 0,20 | 0,0737 |
| Isobutirato | 0,11 | 0,15 | 0,02 | 0,3332 |
| Valerato | 0,42 | 0,40 | 0,03 | 0,6167 |
| Isovalerato | 0,20 | 0,29 | 0,03 | 0,0779 |
| C2:C3[i] | 2,35 b | 3,23 a | 0,08 | 0,0016 |
| AGCC total | 23,03 | 25,22 | 0,57 | 0,0535 |

[a]Suplemento contendo farelo de soja como fonte proteica; [b]Suplemento contendo nitrato encapsulado em substituição parcial pelo farelo de soja; [c]Erro padrão da média; [d]Produção total de gases; [e]Produção total de metano; [f]Produção de gases por grama de matéria seca degradada; [g]Produção de metano por grama de matéria seca degradada; [h]Produção de metano para cada 100 mL de gás produzido; [i]Relação acetato:propionato.
*FS – IC 2,5%: 101,759 e IC 97,5%: 118,269 *vs* NE – IC 2,5%: 107,277 e IC 97,5%: 121,585
**FS – IC 2,5%: 0,109 e IC 97,5%: 0,159 *vs* NE – IC 2,5%: 0,114 e IC 97,2%: 0,156

A FIGURA 4 apresenta os efeitos da inclusão do NE no substrato de época de transição seca-águas sobre a concentração de N-$NH_3$ ao longo de 48 horas de incubação. Ausência de efeitos significativos foram observados nos tempos zero (P > 0,80), três (P > 0,08), 12 (P > 0,29) e 48 (P > 0,39) horas após incubação, apresentando médias de 17,9, 20,9, 13,5 e 27,8 mg/dL, respectivamente.

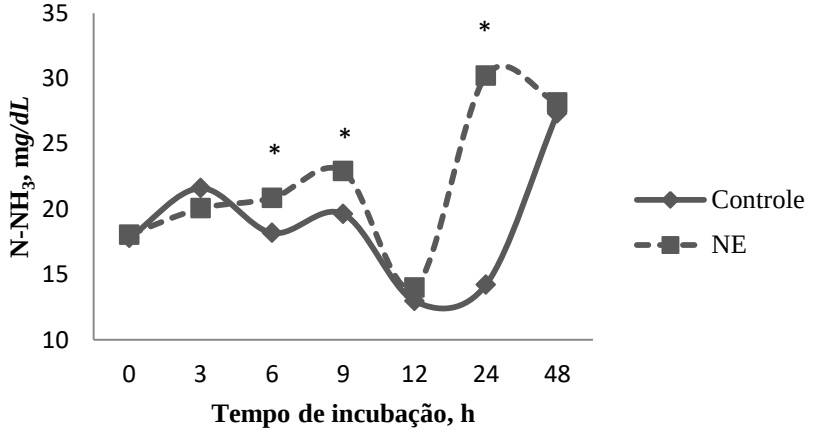


FIGURA 4 - Concentrações de N-$NH_3$ (mg/dL) ao longo do tempo de incubação (h) no período de transição seca-águas *Valores médios diferem entre si pelo teste Tukey (P < 0,05).

Aumento na concentração de N-$NH_3$ foi verificado com inclusão do NE no substrato de forragem de época de transição-seca águas nos tempos seis (20,8 para 18,2 mg/dL) (P < 0,02), nove (22,9 para 19,6 mg/dL) (P < 0,01) e 24 horas (30,2 para 14,2 mg/dL) (P < 0,01). Não houve diferenças significativas na DIVMS com a inclusão no NE dentro dos tempos três (P > 0,69), seis (P > 0,99), nove (P > 0,40), 12 (P > 0,06), 24 (P > 0,94) e 48 (P > 0,15) horas após incubação, apresentando médias de 359,9, 375,1, 384,7, 439,7, 571,3 e 715,6 g/kg (TABELA 7).

TABELA 7 - Degradabilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e degradabilidade *in vitro* de fibra em detergente neutro (DIVFDN) com a inclusão ou não de nitrato encapsulado no substrato de época de águas em diferentes tempos de incubação

| | Tratamento | | | p-valor | |
|---|---|---|---|---|---|
| DIVMS (g/kg) | FS[a] | NE[b] | EPM[c] | Tratamento | Tempo |
| 3 horas | 362,9 D | 356,8 D | 10,87 | 0,6944 | < 0,001 |
| 6 horas | 375,1 D | 375,1 D | 10,87 | 0,9991 | |
| 9 horas | 391,2 CD | 378,2 D | 10,87 | 0,4067 | |
| 12 horas | 424,8 C | 454,5 C | 10,87 | 0,0630 | |
| 24 horas | 571,8 B | 570,7 B | 10,87 | 0,9421 | |
| 48 horas | 726,9 A | 704,2 A | 10,87 | 0,1520 | |
| DIVFDN (g/kg) | | | | | |
| 3 horas | 67,1 C | 87,2 C | 18,52 | 0,4531 | < 0,001 |
| 6 horas | 90,6 C | 98,0 C | 16,64 | 0,7581 | |
| 9 horas | 137,9 C | 117,5 C | 16,64 | 0,3943 | |
| 12 horas | 139,9 C | 134,5 C | 18,52 | 0,8402 | |
| 24 horas | 263,8 B | 260,5 B | 16,64 | 0,8900 | |
| 48 horas | 534,8 A | 502,0 A | 18,52 | 0,2236 | |

[a]Suplemento contendo farelo de soja como fonte proteica; [b]Suplemento contendo nitrato encapsulado em substituição parcial pelo farelo de soja; [b]Erro padrão da média.
Valores médios com a mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste Tukey (P < 0,05)
Valores médios com a mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey (P < 0,05)

Ausência de efeitos significativos com a inclusão de NE foram verificados na DIVFDN no substrato de época de águas (Tabela 7). Ao longo de três (P > 0,45), seis (P > 0,75), nove (P > 0,39), 12 (P > 0,84), 24 (P > 0,88) e 48 (P > 0,22) horas de incubação foram verificadas, para ambos tratamentos, médias de 77,2, 94,3, 127,7, 137,2, 262,2 e 518,4 g/kg. A FIGURA 5 apresenta a curva de produção de gás acumulativa referente à época de águas.

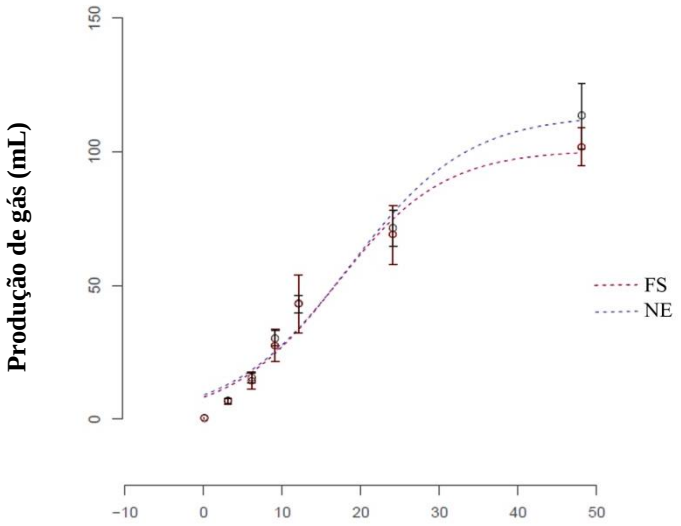


FIGURA 5 – Curva de produção de gás acumulativa dos tratamentos FS e NE e ajustada por meio do modelo logístico referente à época de transição seca-águas.

Não houve efeitos significativos da PTG, *lag time*, produção total de CH4 com inclusão de NE no substrato da época de águas, apresentando médias de 106,6 mL, 0,14 h e 15,9 mg (P > 0,35). (TABELA 8).

TABELA 8 - Produção de gás total, produção de metano total (mg), concentração média de nitrogênio amoniacal ($N\text{-}NH_3$) e proporção molar de ácidos graxos de cadeia curta (m*M*/mL) com a inclusão ou não de nitrato encapsulado no substrato de época de águas

| | Tratamento | | | |
|---|---|---|---|---|
| | FS[a] | NE[b] | EPM[c] | p-valor |
| PTG (mL)[d] | 99,9 | 113,3 | 3,95 | * |
| *Lag time* (h) | 0,15 | 0,13 | 0,02 | ** |
| Total $CH_4$ (mg)[e] | 16,5 | 15,2 | 0,79 | 0,3583 |
| PG/MS (mL/g)[f] | 143,3 b | 169,0 a | 4,72 | 0,0182 |
| $CH_4$/MS (mg/g)[g] | 12,2 | 12,2 | 0,59 | 0,9358 |
| $CH_4$/PG (mg/100 mL)[h] | 16,7 | 13,7 | 0,79 | 0,1143 |
| $N\text{-}NH_3$ (mg/dL) | 21,3 | 21,5 | 0,15 | 0,3134 |
| Ácidos graxos de cadeia curta (m*M*/mL) | | | | |
| Acetato | 14,36 b | 20,33 a | 1,13 | 0,0336 |
| Propionato | 5,74 | 7,71 | 0,44 | 0,0508 |
| Butirato | 3,85 b | 5,56 a | 0,17 | 0,0055 |
| Isobutirato | 0,20 | 0,22 | 0,03 | 0,5912 |
| Valerato | 0,44 b | 0,56 a | 0,02 | 0,0193 |
| Isovalerato | 0,25 | 0,33 | 0,03 | 0,1166 |
| C2:C3[i] | 2,51 | 2,64 | 0,08 | 0,3193 |
| AGCC total | 24,83 b | 34,71 a | 1,70 | 0,0262 |

[a]Suplemento contendo farelo de soja como fonte proteica; [b]Suplemento contendo nitrato encapsulado em substituição parcial pelo farelo de soja; [c]Erro padrão da média; [d]Produção total de gases; [e]Produção total de metano; [f]Produção de gases por grama de matéria seca degradada; [g]Produção de metano por grama de matéria seca degradada; [h]Produção de metano para cada 100 mL de gás produzido; [i]Relação acetato:propionato.

*FS – IC 2,5%: 91,873 e IC 97,5%: 107,858 *vs* NE – IC 2,5%: 105,271 e IC 97,5%: 121,228

**FS – IC 2,5%: 0,117 e IC 97,5%: 0,177 *vs* NE – IC 2,5%: 0,110 e IC 97,2%: 0,155

Foi observado aumento da PG/MS degradada de 143,3 para 169,0 mL/g (P < 0,02). Ausência de efeitos significativos foram observados na $CH_4$/MS degradada (12,2 mg/g) (P > 0,93), $CH_4$/PG (15,2 mg/100 mL) (P > 0,11) e na média geral de concentração de N-$NH_3$ (P > 0,31) (21,4 mg/dL) (TABELA 8).

Foi observado aumento da proporção molar de acetato de 14,36 para 20,33 m*M*/mL com a inclusão do nitrato encapsulado no substrato da época de águas (P < 0,04). Diferenças significativas na comparação entre os tratamentos Controle e NE para o período de águas foram observadas na proporção molar de butirato (3,85 vs 5,56 m*M*/mL) (P < 0,01), valerato (0,44 vs 0,56 m*M*/mL) (P < 0,02), produção total de AGCC (24,83 vs 34,71 m*M*/mL) (P < 0,03). A proporção molar de propionato (média 6,73 m*M*/mL) (P > 0,05), isobutirato (média 0,21 m*M*/mL) (P > 0,59), isovalerato (0,29 m*M*/mL) (P > 0,11), relação acetato:propionato (média 2,58 m*M*/mL) (P > 0,31) não foram influenciadas pela adição de nitrato encapsulado (TABELA 8).

Não foi observado diferenças significativas entre os tratamentos nos tempos zero (P > 0,37), três (P > 0,13), 24 (P > 0,81) e 48 (P > 0,33) horas após a incubação, apresentando médias de 17,95, 21,40, 29,33 e 25,07 mg/dL na época de águas (FIGURA 6).

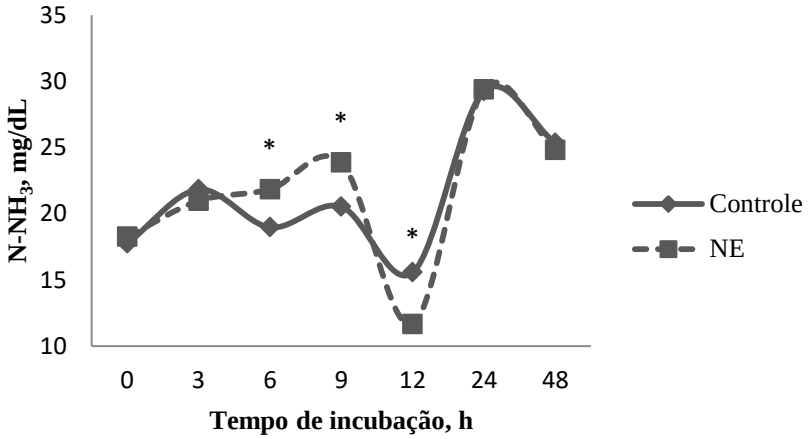


FIGURA 6 - Concentrações de N-$NH_3$ (mg/dL) ao longo do tempo de incubação (h) no período de águas. *Valores médios diferem entre si pelo teste Tukey (P < 0,05).

Houve aumento de 15,1% (19,0 vs 21,8 mg/dL, P < 0,01) e 16,3% (20,5 vs 23,9 mg/dL, P < 0,01) nas concentrações de N-$NH_3$ nos tempos seis e nove horas após incubação com a inclusão do NE no substrato de época de águas (FIGURA 3). No tempo 12 horas foi verificado redução de 15,6 para 11,7 mg/dL (P < 0,01) com a inclusão do NE.

## 4 DISCUSSÃO

Ausência de efeitos do uso do nitrato sobre a DIVMS e DIVFDN foi observada em outros estudos[16–18]. Por outro lado, Marais[19] observaram efeitos significativos do uso do nitrato sobre a digestibilidade da MS e redução na taxa de degradação. Esses mesmos autores verificaram que o nitrato reduziu a taxa de degradabilidade em menor grau do que o nitrito. No estudo realizado por Lund[20] a adição de nitrato não diminuiu significativamente a

DIVMS, mas um decréscimo na produção de gás (162,0 para 153,0 mL) indicou efeito tóxico da adição de nitrato na fermentação ruminal. No presente estudo houve rápida redução na DIVMS no tempo 12 horas no substrato de época seca (458,4 para 433,8 g/kg) com inclusão de nitrato encapsulado, coincidindo com a maior diferença observada na concentração de N-$NH_3$ entre os tratamentos, sendo 53% de redução (26,6 para 12,5 mg/dL, entre FS e NE respectivamente). Porém essa diferença não exerceu influência sobre a DIVFDN na época seca nesse mesmo tempo de observação (12 horas após a incubação). Verificou-se em estudos realizados por Santana Neto[21] que a eficiência máxima de crescimento de microrganismos fibrolíticos foi obtido com 15 mg/dL de nitrogênio amoniacal. Contudo, a redução na média geral de N-$NH_3$ de 22,2 para 19,3 mg/dL ocasionada pela inclusão de nitrato encapsulado pode ter influenciado na redução de 7,5% na DIVFDN no tempo 48h no substrato da época seca. Com base na estequiometria, se 100 g de nitrato é reduzido totalmente à amônia no ambiente ruminal, ocorre a redução de produção de 25,8g de $CH_4$, ou seja a inclusão de 1 mol de nitrato, reduz a produção de 1 mol de metano[4]. No presente estudo foi verificado eficiência de redução de produção de metano no substrato de época seca de 193,8% (redução de 6,7 mg de $CH_4$ com adição de 13,4 mg de $NO_3^-$). Eficiência acima de 100% foi observada por van Wyngaard[22] sendo 142%, que segundo esses autores, a maior eficiência pode indicar que o efeito de redução da produção de $CH_4$ com a inclusão do nitrato não está relacionada apenas à capacidade de utilização de $H_2$, mas, de acordo com Klüber e Conrad[23], a um efeito de toxidade aos microrganismos resultando em efeito antimicrobiano. Além disso, a oxidação do metano em ambientes anaeróbicos na presença de nitrato e nitrito pode ser considerada como um fator contribuinte para a elevação da eficiência de redução de produção de metano[5–7]. A redução na concentração molar de acetato e N-$NH_3$ com a inclusão de nitrato encapsulado dá indícios de possível acúmulo de nitrito e, consequentemente, toxicidade aos microrganismos metanogênicos[22]. Por outro lado, a concentração mais elevada de N-$NH_3$ observada no tratamento FS pode ter dependido da ação de enzimas proteolíticas sobre a proteína verdadeira degradando a aminoácidos, que após desaminados liberado amônia no meio[24].

O decréscimo na DIVMS no tempo 48h, seguido de aumento da DIVFDN nos tempos nove e 24 horas após a incubação do substrato no período de transição seca-águas, assim como ocorreu no período de seca (decréscimo da DIVMS no tempo 12 horas) pode indicar que outro nutriente possa estar sendo influenciado pela adição de nitrato encapsulado, sendo assim necessária a condução de mais estudos para elucidar tal efeito. O aumento significativo da proporção molar de acetato e nas concentrações de nitrogênio amoniacal no período de transição seca-águas pode indicar, apesar de não mensurado, elevação na concentração de hidrogênio com a adição de nitrato. Foi verificado aumento de hidrogênio com uso do nitrato não encapsulado em estudos realizados por Olijhoek[25]. Porém, Lee[2] verificaram que o processo de encapsulamento do nitrato reduziu a produção cumulativa de hidrogênio de 0,15 para 0,08 mL. A qualidade da forragem de época de transição seca-águas (CNF: 230,6 g/kg de MS e PB: 109,0 g/kg de MS) pode ter contribuído com o aumento de hidrogênio com inclusão de nitrato encapsulado conforme observado por Martinez-Fernandez[26] ao avaliar níveis de inclusão de agente antimetanogênico em dieta contendo feno de baixa qualidade e dieta contendo feno e concentrado. Esses mesmos autores relataram ainda que a quantidade prevista de $H_2$ emitido pelos animais foi menor do que a quantidade esperada de $H_2$ direcionada para

formação de $CH_4$ (quatro moles de $H_2$/mol de $CH_4$), sugerindo que quantidades significativas de hidrogênio foram direcionadas para produtos finais diferentes de $CH_4$ e $H_2$. Utilização de vias termodinamicamente mais favoráveis foram observadas no presente estudo, sendo a redução de nitrato à amônia ($\Delta G$ = - 254 kJ/mol de $H_2$) e acetogênese ($\Delta G$ = - 8,8 kJ/mol de $H_2$)[8]. A curva de produção total acumulativa de gás foi semelhante entre os tratamentos, porém o aumento da produção de gás por grama de MS degradada e elevação pontual na degradabilidade da fibra demonstra que grupamentos específicos de microrganismos são afetados negativamente e outros de forma positiva.

A atividade de degradação dos nutrientes não foi influenciada pela adição de nitrato encapsulado no substrato da época de águas, sendo verificada pela ausência de efeitos significativos nas DIVMS e DIVFDN. O aumento na proporção molar de acetato (14,36 para 20,33 m*M*/L) e butirato (3,85 para 5,56 m*M*/L) indica que vias alternativas foram utilizadas, reforçando a ideia de que o aumento na produção de com a inclusão do nitrato encapsulado ocorreu pelo aumento na produção de hidrogênio. Apesar da metanogênese possuir reação termodinamicamente mais favorável que a acetogênese[8], essa última precisa de concentração de $H_2$ mais elevada (acima de 1 m*M*) no meio para reduzir $CO_2$ a acetato em comparação com a redução de $CO_2$ a $CH_4$ que ocorre quando há baixa na concentração de hidrogênio no ambiente ruminal[27]. Esse efeito é satisfatório do ponto de vista de redução de acúmulo de $H_2$ no meio e aumento de energia disponível para o ruminante. O aumento da produção de gás por grama de MS degradada com inclusão de NE observada em todas as épocas avaliadas pode indicar que, além da elevação de produção de gás em si em decorrência da adição de nitrato, pode ocorrer atividade fermentativa de produtos intermediários de forma que a proporção molar de acetato no período de transição seca-águas e águas foi aumentada, enquanto que no período seco diminuída.

## 5 CONCLUSÃO

O uso de 20 g/kg de MS nitrato encapsulado (13,4 g/kg de $NO_3^-$) apresentou diferentes efeitos quando incluído nos substratos de forragem com concentrado (relação volumoso concentrado de 60:40) na época de seca, transição seca-águas e águas. Na época seca, a eficiência de redução da produção de metano foi de 193,8% com base na estequiometria. Na época de transição seca-águas, não houve efeitos significativos na redução da produção de metano total, mas para cada 100 mL de gás produzido o metano foi diminuído. Aumento na proporção molar de acetato na época de transição seca-águas, assim como ocorreu na época de águas, demonstra que o uso de nitrato encapsulado para animais nessas épocas apresenta um potencial de aumento de energia disponível por quilograma de alimento consumido.

## 6 REFERÊNCIAS


1. Lee C, Araujo RC, Koenig KM, Beauchemin KA. Effects of encapsulated nitrate on enteric methane production and nitrogen and energy utilization in beef heifers. J. Anim. Sci. 2015;93:2391–2404.

2. Lee C, Araujo RC, Koenig KM, Beauchemin KA. *In situ* and *in vitro* evaluations of a slow release form of nitrate for ruminants: Nitrate release rate, rumen nitrate metabolism and the production of methane, hydrogen, and nitrous oxide. Anim. Feed Sci. Technol. 2017;231:97–106.

3. Alemu AW, Romero-Pérez A, Araujo RC, Beauchemin KA. Effect of encapsulated nitrate and microencapsulated blend of essential oils on growth performance and methane emissions from beef steers fed backgrounding diets. Animals. 2019;9:1–19.

4. Lee C, Beauchemin KA. A review of feeding supplementary nitrate to ruminant animals: nitrate toxicity, methane emissions, and production performance. Can. J. Anim. Sci. 2014;94:557–570.

5. Ettwig KF, Butler MK, Paslier D Le, Pelletier E, Mangenot S, Kuypers MMM, et al. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. Nature 2010;464:543–548.

6. Haroon MF, Hu S, Shi Y, Imelfort M, Keller J, Hugenholtz P, et al. Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage. Nature 2013;500:567–570.

7. Raghoebarsing AA, Pol A, Pas-Schoonen KT Van De, Smolders AJP, Ettwig KF, Rijpstra WIC, et al. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. Nature. 2006;440:918–921.

8. Ungerfeld EM, Kohn RA. The role of thermodynamics in the control of ruminal fermentation. In: K. Sejrsen K, Hvelplund T, Nielsen MO, editors. Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism and Impact of Nutrition on Gene Expression, Immunology and Stress. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers; 2006. p. 55–85.

9. Martin C, Morgavi DP, Doreau M. Methane mitigation in ruminants: From microbe to the farm scale. Animal. 2010;4:351–365.

10. Leng RA, Preston TR. Further considerations of the potential of nitrate as a high affinity electron acceptor to lower enteric methane production in ruminants. Livest. Res. Rural Dev. 2010;22.

11. Czerkaw JW. Fate of metabolic hydrogen in the rumen. Proc. Nutr. Soc. 1972;31:141–146.

12. Montenegro J, Barrantes E, DiLorenzo N. Methane emissions by beef cattle consuming hay of varying quality in the dry forest ecosystem of Costa Rica. Livest. Sci. 2016;193:45–50.

13. Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB, France J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics

of ruminant feeds. Anim. Feed Sci. Technol. 1994;48:185–197.

14. Detmann E, Souza MA, Valadares Filho SC, Queiroz AC, Berchielli TT, Saliba EOS, et al. Métodos para análise de alimentos-Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Ciência Animal. Eds. Visconde do Rio Branco: Suprema: 2012.

15. Ferreira EM, Pires AV, Susin I, Biehl MV, Gentil RS, Parente M de OM, et al. Nutrient digestibility and ruminal fatty acid metabolism in lambs supplemented with soybean oil partially replaced by fish oil blend. Anim. Feed Sci. Technol. 2016;216:30–39.

16. Zhou Z, Meng Q, Yu Z. Effects of methanogenic inhibitors on methane production and abundances of methanogens and cellulolytic bacteria in in vitro ruminal cultures. Appl. Environ. Microbiol. 2011;77:2634–2639.

17. Patra AK, Yu Z. Combinations of nitrate, saponin, and sulfate additively reduce methane production by rumen cultures in vitro while not adversely affecting feed digestion, fermentation or microbial communities. Bioresour. Technol. 2014;155:129–135.

18. Wu H, Meng Q, Zhou Z, Yu Z. Ferric citrate, nitrate, saponin and their combinations affect in vitro ruminal fermentation, production of sulphide and methane and abundance of select microbial populations. J. Appl. Microbiol. 2019;127:150–158.

19. Marais JP, Therion JJ, Mackie RI, Kistner A, Dennison C. Effect of nitrate and its reduction products on the growth and activity of the rumen microbial population. Br. J. Nutr. 1988;59:301–313.

20. Lund P, Dahl R, Yang HJ, Hellwing ALF, Cao BB, Weisbjerg MR. The acute effect of addition of nitrate on in vitro and in vivo methane emission in dairy cows. Anim. Prod. Sci. 2014;54:1432–1435.

21. Santana Neto JA, Oliveira JS, Oliveira CJB, Santos EM, Costa ECB, Saraiva CAS, et al. Ammonia levels on in vitro degradation of fibrous carbohydrates from buffel grass. South African J. Anim. Sci. 2019;49:585–597.

22. Wyngaard JDV van, Meeske R, Erasmus LJ. Effect of dietary nitrate on enteric methane emissions, production performance and rumen fermentation of dairy cows grazing kikuyu-dominant pasture during summer. Anim. Feed Sci. Technol. 2018;244:76–87.

23. Klüber HD, Conrad R. Inhibitory effects of nitrate, nitrite, NO and $N_2O$ on methanogenesis by Methanosarcina barkeri and Methanobacterium bryantii. FEMS Microbiol. Ecol. 1998;25:331–339.

24. Kozloski G V. Bioquímica dos Ruminantes. 2ªed. Santa Maria: Editora UFSM; 2011.

25. Olijhoek DW, Hellwing ALF, Brask M, Weisbjerg MR, Højberg O, Larsen MK, et al. Effect of dietary nitrate level on enteric methane production, hydrogen emission, rumen fermentation, and nutrient digestibility in dairy cows. J. Dairy Sci. 2016;99:6191–6205.

26. Martinez-Fernandez G, Denman SE, Yang C, Cheung J, Mitsumori M, McSweeney CS. Methane inhibition alters the microbial community, hydrogen flow, and fermentation response in the rumen of cattle. Front. Microbiol. 2016;7:1–14.

27. Weimer PJ. Manipulating Ruminal Fermentation: A Microbial Ecological Perspective 1. J. Anim. Sci. 1998;76:3114–3122.

## CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do cenário atual na qual o mundo se encontra com relação a acordos firmados quanto a redução do aquecimento global para 1,5°C, o que configuraria a redução de aproximadamente 45% das emissões de dióxido de carbono ($CO_2$). O Brasil merece destaque pelo alto índice de produção de carne bovina a pasto, representando alta capacidade de remoção de $CO_2$ da atmosfera, se tornando um grande aliado no combate ao aquecimento global.

Discussões envolvendo uso de estratégias alimentares e aditivos, bem como de efeitos do uso de nitrato encapsulado como mitigador de metano em bovinos de corte a pasto torna-se um assunto de extrema relevância. Pois reduzindo a pegada de carbono via animal, amplia-se a margem de remoção de carbono atmosférico pelas pastagens e áreas de preservação permanente (Lei n° 12.651/2012).

Os dados de desempenho explicam parcialmente os efeitos do uso do nitrato encapsulado em bovinos de corte a pasto suplementados em diferentes épocas. Por isso buscou-se a realização dos ensaios *in vitro* a fim de avaliar parâmetros metabólicos que pudessem nortear os resultados observados nos animais de ensaio de desempenho.

Há a possibilidade de que a taxa de liberação de hidrogênio ($H_2$) oriundo da fermentação mais lenta na época de seca tenha favorecido o efeito do nitrato encapsulado por meio da lei da termodinâmica, pois verificou-se redução de produção de metano. Por outro lado, no período de transição seca-águas e águas entende-se que a liberação de $H_2$ tornou-se mais intensa devido ao menor tempo de rompimento da parede primária da forragem pelos microrganismos devido a baixa lignificação, acarretando em utilização de vias metabólicas alternativas para a acetogênese. Resultados verificados em ensaios *in vitro* pode nortear as futuras avaliações sobre o aumento da eficiência alimentar dos animais observado nessas duas épocas no experimento de desempenho sem ocorrer redução na produção de metano.

Visando a redução na produção de metano, o uso do nitrato encapsulado deve ser melhor avaliado na época de transição seca-águas, por exemplo fornecendo condições em que a suplementação permitisse redução na taxa de fermentação, seja por meio de maior granulometria ou outras fontes alimentares, como forma de compensar o aumento da digestibilidade da forragem nessa época e permitir maior sincronismo para a redução do nitrato à amônia, e assim redução da produção de metano.