



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EMISSÃO DE METANO *IN VITRO* E *IN VIVO* EM OVINOS ALIMENTADOS COM  
MUCUNA-PRETA (*STIZOLOBIUM ATERRIMUM*)**

**GUILHERME DIAS MOREIRA**

**TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**BRASÍLIA/DF  
MARÇO DE 2017**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EMISSÃO DE METANO *IN VITRO* E *IN VIVO* EM OVINOS ALIMENTADOS COM  
MUCUNA-PRETA (*STIZOLOBIUM ATERRIMUM*)**

**GUILHERME DIAS MOREIRA**

**ORIENTADOR: HELDER LOUVANDINI**

**COORIENTADORA: LUCIANA GERDES**

**TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**PUBLICAÇÃO: 182D/2017**

**BRASÍLIA/DF  
MARÇO DE 2017**

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

MOREIRA, G. D. **Emissão de metano *in vitro* e *in vivo* em ovinos alimentados com mucuna-preta (*Stizolobium aterrimum*)**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2017, 103 p. Tese de Doutorado.

Documento formal, autorizando reprodução desta tese de doutorado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e seu orientador reservam para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Moreira, Guilherme Dias. **Emissão de metano *in vitro* e *in vivo* em ovinos alimentados com mucuna-preta (*Stizolobium aterrimum*)**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2017, 103 p. Tese (Doutorado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2017.

1. Leguminosas taniníferas. 2. Metano entérico. 3. Câmaras respirométricas. 4. Hexafluoreto de enxofre (SF<sub>6</sub>). 5. Produção de gases. 6. Digestibilidade aparente. 7. Ácidos graxos de cadeia curta. 8. Nutrição de ruminantes. I. Louvandini, H. II. Título.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

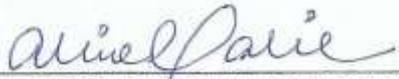
EMISSÃO DE METANO *IN VITRO* E *IN VIVO* EM OVINOS ALIMENTADOS COM  
MUCUNA-PRETA (*STIZOLOBIUM ATERRIMUM*)

GUILHERME DIAS MOREIRA

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
ANIMAIS, COMO PARTE DOS REQUISITOS  
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE  
DOUTOR EM CIÊNCIAS ANIMAIS.

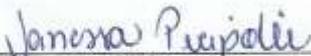
APROVADA POR:

  
HELDER LOUVANDINI, Prof. Dr. (CENA-USP/PPGCA-UnB)  
(ORIENTADOR)

  
ALINE MONDINI CALIL RACANICCI, Prof. Dr. (PPGCA-UnB)  
(EXAMINADOR INTERNO)

  
CONCEPTA MCMANUS PIMENTEL, Prof. Dr. (CAPES-MEC/PPGCA-UnB)  
(EXAMINADOR INTERNO)

  
ELIANE SAYURI MIYAGI OKADA, Prof. Dr. (Universidade Federal de Goiás – UFG)  
(EXAMINADOR EXTERNO)

  
VANESSA PERIPOLLI, Prof. Dr. (Instituto Federal Catarinense – IFC)  
(EXAMINADOR EXTERNO)

BRASÍLIA/DF, 31 de março de 2017

## ESPERAR E ALCANÇAR

“E assim, esperando com paciência, alcançou a promessa.” – *Paulo*. (HEBREUS, 6:15)

A esperança de atingir a paz divina, com felicidade inalterável, vibra em todas as criaturas.

O anseio dos patriarcas da antiguidade é análogo ao dos homens modernos.

O lar coroado de bênçãos.

O dever bem cumprido.

A consciência edificada.

O ideal superior convenientemente atendido.

O trabalho vitorioso.

A colheita feliz.

As aspirações da alma são sempre as mesmas em toda parte.

Contudo, esperar significa persistir sem cansaço, e alcançar expressa triunfar definitivamente.

Entre o objetivo e a meta, faz-se imperativo o esforço constante e inadiável.

Esperança não é inação.

E paciência traduz obstinação pacífica na obra que nos propomos realizar.

Se pretendes materializar os teus propósitos com o Cristo, guarda a fórmula da paciência como a única porta aberta para a vitória.

Há sofrimento em teus sonhos torturados? incompreensão de muitos em derredor de teus desejos? a ingratidão e a dor te visitam o espírito?

Não chores perdendo os minutos, nem maldigas a dificuldade.

Aguarda as surpresas do tempo, agindo sem precipitação.

Se cada noite é nova sombra, cada dia é nova luz.

Lembra-te de que nem todas as águas se acham no mesmo nível e nem todas as árvores são iguais no tamanho, no crescimento ou na espécie.

Recorda as palavras do apóstolo dos gentios.

Esperando com paciência, alcançaremos a promessa.

Não te esqueças de que o êxito seguro não é de quem assalta, mas sim daquele que sabe agir, perseverar e esperar por ele.

(*Fonte viva*: Ditado pelo espírito Emmanuel ao médium Chico Xavier)

*Dedico este trabalho aos meus pais, David e Kátia, pelo exemplo, carinho e incentivo; à minha esposa Paula, pelo amor e apoio incondicional; e aos meus filhos Henrique e Ricardo por demandarem e proporcionarem o meu melhor.*

*Amo vocês!*

## AGRADECIMENTOS

A Deus e a Jesus pelas orientações seguras, pela saúde e vontade de perseverar e por todas as oportunidades e conquistas atingidas; agradeço também e sempre pela proteção e cuidado comigo e com a minha família, principalmente nos momentos em que eu estive fisicamente distante.

Agradeço aos meus pais Kátia e David, não só pelo incentivo, pelo exemplo, pela dedicação, mas pelo esforço em proporcionar todo o meu custeio e a maior parte do meu deslocamento, necessários a execução dos experimentos em Piracicaba. Se não fosse pelo seu exemplo e pelos seus esforços, a realização desse sonho se tornaria mais difícil.

Agradeço a minha esposa Paula pelo companheirismo, cumplicidade, pelo amor, pela paciência e principalmente pela dedicação em exercer meu papel em casa enquanto estava me dedicando à realização deste sonho. Seus esforços sempre serviram e servirão de alicerce e incentivo para o planejamento e a construção de todos os nossos projetos de vida.

Agradeço aos meus filhos Henrique e Ricardo, pelo aprendizado e pela felicidade que têm me proporcionado, pelo estímulo em realizar e em ser um homem melhor em todas as iniciativas em que me proponha.

Aos meus avós Dylka (*in memoriam*), David (*in memoriam*), Áurea, Ocacyr e Terezinha (*in memoriam*); aos meus tios Leleca, Vânia, Rosa, Marcus e Ocacyr Júnior; aos meus irmãos Carolina e Leonardo; ao meu sobrinho Eduardo; aos meus sogros Paulo Frederico (*in memoriam*) e Ignez, aos meus cunhados e concunhada Marcelo, Raíssa e Cristiane; meu muito obrigado pela participação fundamental na formação do meu caráter e do eterno aprendizado através da convivência!

À Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAV/UnB) pela oportunidade.

Ao Laboratório de Nutrição Animal do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo – LANA-CENA/USP por toda estrutura física necessária ao andamento dos experimentos realizados.

Ao Instituto de Zootecnia – IZ de Nova Odessa pela parceria e pela estrutura física e de pessoal necessários ao cultivo e fenação de toda a leguminosa mucuna-preta utilizada no presente trabalho.

À Secretaria de Estado de Educação do Distrito Federal (SEDF), em especial ao programa de afastamento remunerado e bolsas de estudo, por possibilitar aos profissionais seu aperfeiçoamento e, no meu caso, a possibilidade em seguir cursando o doutorado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Helder Louvandini pela dedicação, por todo apoio na organização, planejamento e execução do presente trabalho; pela sua integridade, pelo comprometimento com a ciência e com o ensinar; e, principalmente, pelos puxões de orelha, que, desde o mestrado, têm bastante importância, não só na formação profissional, mas também na minha formação moral e ética.

À minha coorientadora Dra. Luciana Gerdes pelos ensinamentos, pela enorme contribuição durante a execução do projeto, principalmente pela mobilização e coordenação das ações realizadas no IZ para o perfeito andamento do presente trabalho.

Ao Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla pela contribuição, pelos ensinamentos, pelas orientações e direcionamentos. Grande parte desse trabalho se deve, e foi inspirado, em seus esforços científicos. Muito obrigado professor!

À Profa. Dra. Concepta McManus (Connie) por todo suporte, apoio, incentivo, orientações e direcionamentos que vêm desde o mestrado, culminando com sua participação na avaliação da minha defesa da tese. Sua dedicação e disposição para ensinar e contribuir me inspiram. Muito obrigado professora, pela sua importante participação na minha formação!

Ao meu nobre companheiro e amigo Dr. Paulo de Mello Tavares Lima por ter sido meus olhos, meus braços e muitas vezes meu cérebro, nos momentos em que não pude estar presente fisicamente em Piracicaba. Agradeço também a sua família, seus pais Sr. José Carlos e Sra. Jussara, à sua avó Sra. Carmen (*in memoriam*), sua noiva Ana Maria e seu irmão

Bruno, que me receberam muito bem durante toda a minha permanência em Piracicaba. A força de todos vocês foi fundamental para a concretização deste sonho.

Aos funcionários do LANA-CENA/USP Maria Regina S. R. Peçanha, Lécio Aparecido Castilho, Aparecido Elpídio e Joaquim Everaldo M. Santos, muito obrigado pelo auxílio na correta condução dos experimentos e pela amizade!

A todos colegas do LANA-CENA/USP Adibe Luiz Abdalla Filho, Alessandra Romero, Alline Schumann, Ana Claudia Koki Sampaio Issakowicz, André Joaquim, Andressa Santanna, Dinesh Kumar Dhanasekaran, Egon Ieda, Frederico, Gabriel Sakita, Juliano Issakowicz, Linander Campos, Patricia Righetto, Samy Emanuelle, Tairon Pannunzio, Thiago Bompadre, Pierre Crouzoulon, Wilian Costa e a todos os demais colegas que por ventura eu possa ter esquecido, muito obrigado!

Ao meu grande amigo Dr. Bruno Stéfano Lima Dallago pela sua amizade e pelas contribuições e elucidações científicas que engrandeceram e muito a compreensão a respeito dos dados analisados.

Aos colegas da UnB, companheiros de realização de sonho, principalmente os que dividiam a “salinha”, Candice Bergmann Garcia e Silva Tanure, Fernanda Paulini, João Batista Gonçalves Costa Júnior, José Luiz Jivago de Paula Rôlo, Juliana Lis Mendes de Brito, Luiza de Souza Seixas Melo, Marcella Motta da Costa, Paulo Ricardo Martins Lima, Tiago do Prado Paim, pelas contribuições, incentivos e momentos de descontração, o meu muito obrigado.

A todos que tenham contribuído, direta ou indiretamente, na realização do presente trabalho e por ventura eu tenha esquecido de mencionar!

## ÍNDICE

RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
LISTA DE TABELAS.....	xvi
LISTA DE FIGURAS.....	xvii
LISTA DE ABREVIACÕES.....	xviii
<b>CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS .....</b>	<b>1</b>
1. INTRODUÇÃO .....	2
1.1. Objetivos.....	3
1.1.1. Objetivos específicos .....	3
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Produção Pecuária e Alimentação Humana.....	4
2.2. Panorama da Ovinocultura Brasileira .....	6
2.2.1. Sistemas de produção a pasto .....	6
2.3. Gases de Efeito Estufa na Produção Agrícola .....	7
2.3.1. Potencial de aquecimento global .....	9
2.4. Ecossistema e microbiota ruminal .....	11
2.5. Emissão de Metano por Ruminantes .....	13
2.5.1. Manipulação da dieta como estratégia de mitigação do metano entérico .....	14
2.5.2. Utilização de forrageiras leguminosas.....	15
2.5.2.1. Mucuna-preta ( <i>Stizolobium aterrimum</i> ).....	17
2.5.3. Taninos .....	19
2.5.3.1. Polietilenoglicol (PEG) .....	21
2.6. Metodologias de Avaliação e Mensuração na Emissão de Metano em Ruminantes.....	23
2.6.1. Técnica <i>in vitro</i> de produção de gases.....	23

2.6.2.	Técnica <i>in vivo</i> do gás traçador – Hexafluoreto de Enxofre (SF <sub>6</sub> ) .....	24
2.6.3.	Técnica <i>in vivo</i> das câmaras respirométricas/calorimétricas .....	25
2.7.	Parâmetros Ruminais .....	26
2.7.1.	Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) .....	27
2.7.2.	pH ruminal .....	28
2.7.3.	Nitrogênio amoniacal (N-NH <sub>3</sub> ) no rúmen .....	29
2.7.4.	Contagem de protozoários .....	30
3.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	31

**CAPÍTULO 2 –PRODUÇÃO DE METANO *in vitro* E AVALIAÇÃO NUTRICIONAL *in vivo* DA LEGUMINOSA MUCUNA-PRETA (*Stizolobium aterrimum*) EM OVINOS...**

	.....	50
1.	RESUMO.....	51
2.	ABSTRACT .....	53
3.	INTRODUÇÃO.....	55
4.	MATERIAL E MÉTODOS .....	57
4.1.	Local .....	57
4.2.	Leguminosa Testada .....	57
4.3.	Animais e Tratamentos .....	58
4.3.1.	<i>In vitro</i> .....	58
4.3.2.	<i>In vivo</i> .....	58
4.4.	Incubação <i>in vitro</i> .....	59
4.5.	Digestibilidade Aparente dos Nutrientes .....	60
4.6.	Parâmetros de Fermentação Ruminal .....	61
4.7.	Análise Estatística.....	61
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	63
5.1.	Resultados.....	63
5.1.1.	Bioensaio <i>in vitro</i> .....	63
5.1.2.	Digestibilidade aparente .....	64
5.2.	Discussão .....	65
5.2.1.	Bioensaio <i>in vitro</i> .....	65
5.2.2.	Digestibilidade aparente .....	67
6.	CONCLUSÃO .....	70
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	71

<b>CAPÍTULO 3 – EMISSÃO DE METANO E PARÂMETROS FERMENTATIVOS RUMINAIS DE OVINOS SUPLEMENTADOS COM MUCUNA PRETA (<i>Stizolobium aterrimum</i>)</b> .....	77
1. RESUMO.....	78
2. ABSTRACT.....	80
3. INTRODUÇÃO.....	82
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	84
4.1. Local .....	84
4.2. Leguminosa Testada .....	84
4.3. Técnica das câmaras respirométricas – CR .....	84
4.4. Técnica do hexafluoreto de enxofre – SF <sub>6</sub> .....	85
4.5. Parâmetros de Fermentação Ruminal .....	86
4.6. Análise Estatística.....	86
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	88
5.1. Resultados.....	88
5.1.1. Câmaras respirométricas – CR .....	88
5.1.2. Hexafluoreto de enxofre – SF <sub>6</sub> .....	90
5.2. Discussão .....	91
5.2.1. Mucuna-preta.....	91
5.2.2. Câmaras respirométricas – CR .....	93
5.2.3. Hexafluoreto de enxofre – SF <sub>6</sub> .....	94
6. CONCLUSÃO .....	96
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	97
 <b>CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	 102
1. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	103

## RESUMO

**EMISSÃO DE METANO *IN VITRO* E *IN VIVO* EM OVINOS ALIMENTADOS COM MUCUNA-PRETA (*STIZOLOBIUM ATERRIMUM*)** Guilherme Dias Moreira<sup>1</sup> e Helder Louvandini<sup>1,2</sup>, PhD

Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais – Faculdade de Agronomia e Veterinária/Universidade de Brasília (FAV/UnB), DF<sup>1</sup>, Laboratório de Nutrição Animal – Centro de Energia Nuclear na Agricultura/Universidade de São Paulo (CENA/USP)<sup>2</sup>

Objetivou-se com este trabalho avaliar a utilização da leguminosa taninífera mucuna-preta (M) (*Stizolobium aterrimum*) na dieta de ovinos Santa Inês. Foram realizados três experimentos um *in vitro* e dois *in vivo* com e sem adição do polietilenoglicol (PEG) para avaliar o efeito do tanino condensado (TC) presente na M. No estudo *in vitro* realizou-se bioensaio pela técnica de produção de gases em garrafas por 24 h, avaliando-se a fermentação ruminal e produção total de gases (PGT). Houve elevação da PGT e do teor nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) e queda do pH em no tratamento com PEG em relação ao sem PEG (p < 0,05). No primeiro ensaio *in vivo* avaliou-se a digestibilidade aparente dos nutrientes (DA), em 15 ovinos machos, castrados, divididos em 3 grupos de tratamentos: dieta exclusiva de feno de capim-aruaana (*Panicum maximum* Jacq. cv. Aruana) (CON); e feno de capim-aruaana suplementado com feno de mucuna com adição (MP) e sem adição de PEG (MSP). Houve maior ingestão de matéria seca e consequente maior ingestão de componentes nutricionais no grupo CON quando comparado aos demais tratamentos (p < 0,05), com exceção da proteína bruta (PB) e das fibras em detergente ácido (FDA) (p > 0,05). Houve redução nos coeficientes de DA (CDA) de todos os nutrientes, e elevação do teor de N-NH<sub>3</sub> (p < 0,05) nos grupos MP e MSP em relação ao CON, com exceção do CDA da PB (p > 0,05). No segundo estudo *in vivo* foram analisadas as emissões de CH<sub>4</sub>, onde foram utilizados 18 animais, machos castrados, divididos conforme descrição do ensaio de DA, para a técnica das câmaras respirométricas (CR) e 8 animais machos, castrados,

divididos apenas em MP e MSP, porém com alternância de tratamentos (delineamento *swichtback*), para a técnica do hexafluoreto de enxofre (SF<sub>6</sub>). Ao término de ambas avaliações de CH<sub>4</sub> foi coletado conteúdo ruminal para análises do teor de N-NH<sub>3</sub>, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), e contagem de protozoários. No método CR, houve maior ingestão de matéria seca (MS), de matéria orgânica (MO) e de fibras em detergente neutro (FDN) no grupo MSP, quando comparado ao CON ( $p < 0,05$ ). A inclusão de mucuna (MP e MSP) proporcionou maior ingestão de proteína bruta (PB) e de PB digestível, maiores teores de N-NH<sub>3</sub>, maior quantidade de AGCC total e de propionato, e menor relação acetato:propionato, quando comparados ao CON ( $p < 0,05$ ). A adição de PEG proporcionou redução na contagem de protozoários ruminais. No método do SF<sub>6</sub>, não houve diferenças entre os grupos MP e MSP em nenhum dos parâmetros analisados. Em ambos os métodos, CR e SF<sub>6</sub>, não houve diferenças entre todos tratamentos analisados nos parâmetros de emissão de CH<sub>4</sub> ( $p > 0,05$ ).

**Palavras-chave:** Ácidos Graxos de Cadeia Curta. Câmaras Respirométricas. Hexafluoreto de Enxofre. Polietilenoglicol. Protozoários. Taninos.

## ABSTRACT

### **EMISSION OF METHANE *IN VITRO* AND *IN VIVO* IN SHEEP FED WITH *STIZOLOBIUM ATERRIMUM***

The aim of this study was to evaluate the use of *Stizolobium aterrimum* (M) tannin legume in Santa Inês sheep diet. Three experiments were carried out, one *in vitro* and two *in vivo* with and without addition of polyethylene glycol (PEG) to evaluate the effect of the condensed tannin (TC) present in M. In the *in vitro* study, a bioassay was carried out using the technique of gas production in bottles for 24 h, evaluating ruminal fermentation and total gas production (PGT). There was elevation of PGT and ammoniacal nitrogen (N-NH<sub>3</sub>) content and drop in pH in PEG treatment compared with no PEG ( $p < 0.05$ ). In the first *in vivo* test, the apparent nutrient digestibility (DA) was evaluated in 15 castrated male sheep, divided into 3 groups of treatments: exclusive diet of Aruana grass hay (*Panicum maximum* Jacq.); aruana hay supplemented with M with addition (MP) and without addition of PEG (MSP). There was a higher intake of dry matter and consequent higher intake of nutritional components in the CON group when compared to the other treatments ( $p < 0.05$ ), except crude protein (PB) and acid detergent fiber (FDA) ( $p > 0.05$ ). There was a reduction in DA (CDA) of all nutrients, and elevation of N-NH<sub>3</sub> content ( $p < 0.05$ ) in the MP and MSP groups in relation to the CON, except for the CDA of PB ( $p > 0.05$ ). In the second *in vivo* study, the CH<sub>4</sub> emissions were analyzed, in which 18 castrated male lambs were divided according to the DA test for the respirometric chambers (CR) and 8 male castrated animals, divided into MP and MSP, but with alternating treatments (*swichtback design*), for the sulfur hexafluoride technique (SF<sub>6</sub>). At the end of both evaluations of CH<sub>4</sub> ruminal content was collected for analysis of N-NH<sub>3</sub>, short chain fatty acids (AGCC), and protozoal account. In the CR method, there was higher intake of dry matter (MS), organic matter (MO) and neutral detergent fiber (FDN) in the MSP group when compared to the CON ( $p <$

0.05). The inclusion of mucuna (MP and MSP) resulted in a higher intake of crude protein (PB) and digestible PB, higher N-NH<sub>3</sub> levels, higher amount of total AGCC and propionate, and lower acetate:propionate ratio when compared to CON ( $p < 0.05$ ). The addition of PEG provided a reduction in the ruminal protozoal account. In the SF<sub>6</sub> method, there were no differences between MP and MSP groups in any of the analyzed parameters. In both methods, CR and SF<sub>6</sub>, there were no differences among all treatments analyzed in the CH<sub>4</sub> emission parameters ( $p > 0.05$ ). Therefore, it is necessary to study M in various physiological stages to determine the nutritional content suitable for its use in methane mitigation, and it is suggested to further study the effects of PEG on ruminal protozoa.

**Key words:** Polyethylene glycol. Protozoa. Respirometric Chambers. Short Chain Fatty Acids. Sulfur hexafluoride. Tannins.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. – Valores de referência no Potencial de Aquecimento Global (GWP) do metano (CH <sub>4</sub> ) e do óxido nitroso (N <sub>2</sub> O) em relação ao dióxido de carbono (CO <sub>2</sub> ).....	10
Tabela 1.2 – Principais componentes bromatológicos da Mucuna Preta ( <i>Stizolobium aterrimum</i> ) em g/kg de MS. ....	18
Tabela 2.1 – Composição nutricional dos fenos utilizados nos ensaios experimentais, com base na MS.....	58
Tabela 2.2 – Médias dos parâmetros fermentativos ruminais in vitro da mucuna preta com adição de polietilenoglicol (PEG) ou sem (MSP) em sua composição.....	64
Tabela 2.3 – Consumo médio diário, coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da matéria seca (MS), da matéria orgânica (MO) e dos principais componentes nutricionais, e parâmetros ruminais em ovinos alimentados exclusivamente com feno de capim-aruaana (CON) e suplementados com mucuna-preta com adição de polietilenoglicol (PEG) ou sem (MSP) em sua composição.....	65
Tabela 3.1 – Peso vivo, consumo e de emissão de metano (CH <sub>4</sub> ) aferidos em câmaras respirométricas com ovinos alimentados exclusivamente com feno de capim-aruaana (CON) e suplementados com mucuna-preta com adição de polietilenoglicol (PEG) ou sem (MSP) em sua composição.....	89
Tabela 3.2 – Parâmetros ruminais de ovinos alimentados exclusivamente com feno de capim-aruaana (CON) e suplementados com mucuna-preta com adição de polietilenoglicol (PEG) ou sem (MSP) em sua composição.....	90
Tabela 3.3 – Peso vivo, consumo de matéria seca (MSI) e emissão de metano (CH <sub>4</sub> ) aferida pelo método do gás traçador SF <sub>6</sub> em ovinos, suplementados com mucuna-preta com adição de polietilenoglicol (PEG) ou sem (MSP) em sua composição.....	90
Tabela 3.4 – Quantidade de protozoários e ácidos graxos de cadeia curta em ovinos alimentados com feno de capim-aruaana e suplementados com mucuna-preta com adição de polietilenoglicol (PEG) ou sem (MSP) em sua composição. ....	91

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1.1. – Área total destinada à produção agrícola: 333.682.455 ha. ....	5
Figura 1.2. – Contribuição dos principais Gases de Efeito Estufa (GEE) no Potencial de Aquecimento Global .....	11

## LISTA DE ABREVIACOES

AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AGCR	Ácidos graxos de cadeia ramificada
AGV	Ácidos graxos voláteis
AOAC	Association of analytical communities - associação das comunidades analíticas
AR2	Publicação do segundo relatório do painel intergovernamental sobre mudanas climáticas
AR3	Publicação do terceiro relatório do painel intergovernamental sobre mudanas climáticas
AR4	Publicação do quarto relatório do painel intergovernamental sobre mudanas climáticas
AR5	Publicação do quinto relatório do painel intergovernamental sobre mudanas climáticas
CDA	Coefficiente de digestibilidade aparente
CDAMS	Coefficiente de digestibilidade aparente da matéria seca
CDAPB	Coefficiente de digestibilidade aparente da proteína bruta
CENA	Centro de energia nuclear na agricultura
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CFT	Compostos fenólicos totais
CH <sub>4</sub>	Metano
CH <sub>4</sub> D	Emissão de metano em 24 horas
CH <sub>4</sub> DFDNI	Emissão de metano em relação às fibras em detergente neutro digestíveis ingeridas
CH <sub>4</sub> MODI	Emissão de metano em relação matéria orgânica digestível ingerida

CH <sub>4</sub> MSDI	Emissão de metano em relação matéria seca digestível ingerida
CH <sub>4</sub> MSI	Emissão de metano em relação matéria seca ingerida
CMS	Consumo de matéria seca
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CO <sub>2</sub> Eq.	Equivalência em dióxido de carbono
CON	Grupo controle
CR	Câmaras respirométricas
DA	Digestibilidade aparente dos nutrientes
DFDN	Fibras em detergente neutro degradadas
DFDNI	Fibras em detergente neutro digestíveis ingeridas
DMO	Matéria orgânica degradada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPBI	Proteína bruta digestível ingerida
DVMO	Degradabilidade verdadeira da matéria orgânica
EB	Energia bruta
ECD	Detector de captura de elétrons
EE	Estrato etéreo
EPM	Erro padrão da média
FAO	Organização das Nações Unidas para a agricultura e alimentação
FAV	Faculdade de agronomia e medicina veterinária
FDA	Fibras em detergente ácido
FDAI	Fibras em detergente ácido ingeridas
FDN	Fibras em detergente neutro
FDNI	Fibras em detergente neutro ingeridas
FID	Detector por ionização de chama
FP	Fator de partição (medida de eficiência da fermentação baseada na razão entre a matéria orgânica verdadeiramente degradável e a produção de gases totais)
FTE-BR16	<i>Fritted Trace Elements</i> – Fritas (fertilizante de microelementos composto por 1,5% de B, 3,5% de Cu, 0,4% de Mo e 3,5% de Zn)
GEE	Gases de efeito estufa
GWP	Potencial de aquecimento global
H <sub>2</sub>	Hidrogênio

IBGE	Instituto brasileiro de geografia e estatística
IPCC	Painel intergovernamental sobre mudanças climáticas
IVD	Degradabilidade <i>in vitro</i>
IVGPT	Técnica <i>in vitro</i> de produção de gases
IZ	Instituto de Zootecnia de São Paulo
LANA	Laboratório de Nutrição Animal
M	Mucuna-preta ( <i>Stizolobium aterrimum</i> )
MCTI	Ministério da ciência, tecnologia e inovação
MDIC	Ministério da indústria, comércio exterior e serviços
M.F.S.	Solução de verde de metila e formol salino
MM	Matéria mineral
MO	Matéria orgânica
MODI	Matéria orgânica digestível ingerida
MOI	Matéria orgânica ingerida
MP	Grupo mucuna com adição de polietilenoglicol
MS	Matéria seca
MSDI	Matéria seca digestível ingerida
MSI	Matéria seca ingerida
MSP	Grupo mucuna sem adição de polietilenoglicol
N <sub>2</sub> O	Óxido nitroso
N-NH <sub>3</sub>	Nitrogênio amoniacal
NRC	National research council – conselho nacional de pesquisa
n.s.	Não significativo
PB	Proteína bruta
PBI	Proteína bruta ingerida
PD	Proteína digestível
PDR	Proteína degradável no rumem
PEG	Polietilenoglicol
PGT	Produção de gases totais
pH	Potencial hidrogeniônico
PNDR	Proteína não degradável no rumem
PV	Peso vivo
PVP	Polivinilpirrolidona

RNA	Ácido ribonucleico
SAS	Statistical analysis system – software
SEBRAE	Serviço brasileiro de apoio às micro e pequenas empresas
SF <sub>6</sub>	Hexafluoreto de enxofre
TC	Taninos condensados
Tg	Teragrama
TH	Taninos hidrolisáveis
TT	Taninos totais
UN	Organização das Nações Unidas
UnB	Universidade de Brasília
USA	Estados Unidos da América
USEPA	Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos
USP	Universidade de São Paulo

## **CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS**

## 1. INTRODUÇÃO

A produção pecuária é um elo importante da cadeia produtiva de alimentos para a humanidade. A carne dos animais e os cereais produzidos pelas lavouras são produtos fundamentais no suprimento proteico para atender as necessidades nutricionais em todas as nações. A população mundial vem crescendo em ritmo acelerado, o que impõe necessidade de crescimento do setor agrícola para atender as futuras demandas.

Uma parte importante na produção de proteínas de origem animal é ocupada pelos ruminantes que, independente da tecnificação dos sistemas de produção, utilizam forragens como principal fonte de alimento. Além disto, no Brasil 41,1 % das áreas destinadas ao pastoreio poderiam ter a sua capacidade de produção forrageira melhorada (IBGE, 2015).

Seguindo esse raciocínio, índices superiores de produtividade podem ser atingidos com a utilização de cultivares mais produtivas, bem como a melhora no processo fermentativo de ruminantes, pois a produção animal, além de fonte de alimentos importantes para humanidade e fonte de renda para muitos, é responsável por grandes entraves, a maior parte deles ambientais, como a poluição de águas, degradação de terras, redução da biodiversidade e principalmente afetando a atmosfera e o clima (FAO, 2006). Os ruminantes são a maior fonte de origem antropogênica do gás metano ( $\text{CH}_4$ ), que além de proporcionarem perdas econômicas, com redução em até 12 % de toda energia bruta (EB) consumida pelos ruminantes (Johnson & Johnson, 1995), é responsável por até 20 % do potencial de aquecimento global.

A maior parte do  $\text{CH}_4$  oriunda dos ruminantes é de origem entérica, ou seja, fruto de processos fermentativos decorrentes da digestão, e pode ser alterada levando-se em consideração fatores relacionados à alimentação, como digestibilidade e tamanho de partícula, bem como a composição e a qualidade da dieta. Em termos de composição, o uso adequado de

componentes bioativos presentes no alimento, como por exemplo os taninos condensados (TC), que podem ser elementos mitigadores de CH<sub>4</sub> (Makkar, 2003) e podem auxiliar no melhor desempenho animal (Frutos et al., 2004), têm demonstrado ser excelente estratégia a ser considerada.

O manejo nutricional representa um ponto chave na mitigação do CH<sub>4</sub> entérico em ruminantes e, por conseguinte, a redução na emissão de CH<sub>4</sub> de origem antropogênica. Uma das opções que surge para a alimentação de ruminantes é a leguminosa mucuna-preta (*Stizolobium aterrimum*), a qual apresenta qualidade nutricional superior à maioria das gramíneas tropicais (Delgado et al., 2010), e contém TC em teores ao redor de 4% em sua composição, considerados benéficos aos animais, o que favorece os índices produtivos (Makkar, 2003; Frutos et al., 2004) e apresenta potencial mitigador de CH<sub>4</sub> entérico (Moreira et al., 2013).

## **1.1. Objetivos**

Objetivou-se com este trabalho avaliar, *in vitro* e *in vivo*, o efeito do tanino condensado, presente no feno da leguminosa mucuna-preta (*Stizolobium aterrimum*), como potencial componente mitigador na emissão de metano (CH<sub>4</sub>) entérico em ovinos.

### **1.1.1. Objetivos específicos**

- 1) Avaliar a cinética de degradação e de fermentação ruminal da mucuna-preta em bioensaio *in vitro* na presença e na ausência do agente complexante de tanino o polietilenoglicol (PEG), em inóculo de origem ovina;
- 2) Avaliar a mucuna-preta (*Stizolobium aterrimum*) em ensaio *in vivo* pelas técnicas de digestibilidade aparente da dieta, parâmetros ruminais, e emissão de metano através das técnicas do gás traçador Hexafluoreto de Enxofre (SF<sub>6</sub>) e da Câmara Respirométrica, em ovinos Santa Inês com ou sem polietilenoglicol (PEG).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Produção Pecuária e Alimentação Humana

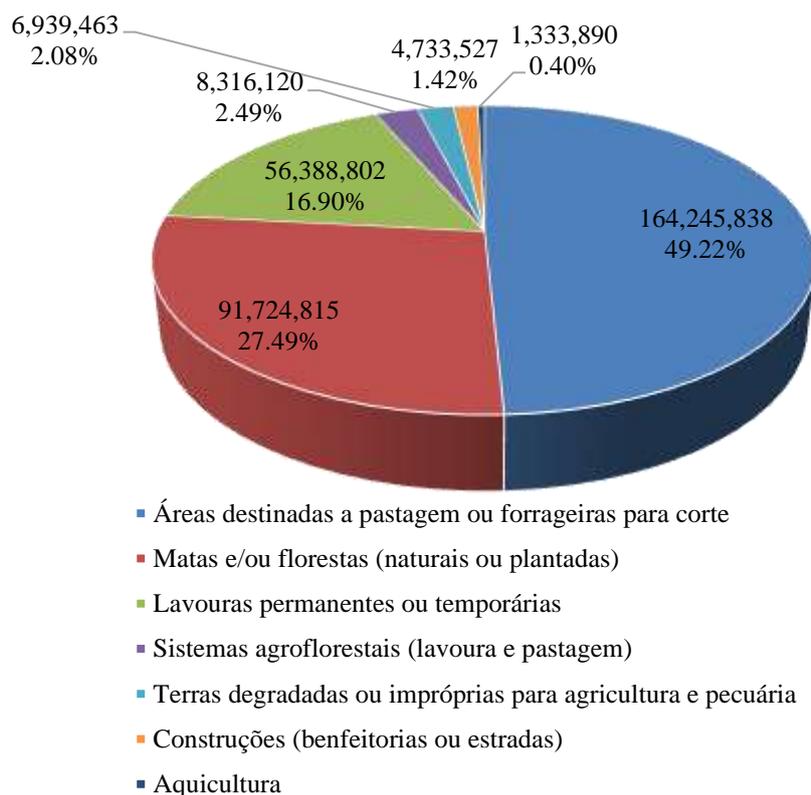
A pecuária exerce papel importante na produção agrícola mundial, com a produção aproximada de 310,4 milhões de toneladas de carne e 746,7 milhões de litros de leite no ano de 2013. Estes alimentos foram responsáveis por suprir, aproximadamente, 16 % da ingestão proteica e 32 % do consumo de gordura da população mundial no ano de 2011 (FAO, 2015). No Brasil, no ano de 2013, a ingestão de 48 % de proteína e 40 % de gordura foi oriunda da carne e do leite atendida pela produção aproximada de 26 milhões de toneladas de carne e 34,4 milhões de leite.

Para se atingir as referidas quantidades de carne e leite, em âmbito mundial, estima-se que 38,5 % das áreas de todos os países são utilizadas para fins agrícolas, onde aproximadamente 68,4 % das áreas agrícolas são ocupadas por pastos ou pradarias de forma permanente (FAO, 2015). No Brasil, com base nos dados do Censo Agropecuário de 2006 (IBGE, 2015), estimou-se a destinação de aproximadamente 39,2 % dos 851.576.704,9 hectares (ha) do território nacional (BRASIL, 2013) para atividades agrícolas, onde a maior extensão de terra também é empregada para a produção de animais em sistemas de pastejo, ocupando até 51,7 % das áreas permanentes cultivadas no país com pastagens ou forrageiras para corte (Figura 1).

O Departamento de Assuntos Econômicos e Sociais da Organização das Nações Unidas (UN, 2015) constatou aumento médio anual da população mundial, que superou 7,3 bilhões de pessoas em 2015, de 1,66% entre os anos de 1950 e 2015; para o ano de 2050 a previsão é de que a população atinja 9,7 bilhões de pessoas. Esse aumento na população poderá exercer acréscimo na produção alimentar mundial na ordem de 85 % na produção de carnes e

76 % em outros produtos de origem animal (Bruinsma, 2009), ou seja, um crescimento médio anual de 2,4 % na produção de carnes e 2,2 % na produção de leite, demandando aproximadamente mais 263,8 milhões de toneladas de carnes e de 567,5 milhões de toneladas de leite produzidos a cada ano a partir de 2050.

Figura 1.1. – Área total destinada à produção agrícola: 333.682.455 ha. Fonte: adaptado do Censo Agropecuário 2006 – IBGE (2015)



Para o Brasil, que apresentou no censo demográfico realizado em 2010, população estimada de aproximadamente 190,8 milhões de pessoas (IBGE, 2015), assumindo os índices de crescimento médio para o país (UN, 2015), a população brasileira aumentará aproximadamente 18,3 %, totalizando quase 228,8 milhões de brasileiros. Segundo Bruinsma (2009) os países em desenvolvimento poderão aumentar sua demanda em até 132 % para carnes e 117 % para leite, totalizando 34,3 milhões de toneladas de carne e 40,3 milhões de toneladas de leite adicionais por ano, a partir de 2050.

Para se alcançar o referido aumento de produção no âmbito da produção animal, faz-se necessário uma melhor tecnificação nos setores produtivos, principalmente em sistemas a pasto, haja visto a maior porção de terras agrícolas já serem destinadas a essa finalidade.

## **2.2.Panorama da Ovinocultura Brasileira**

O rebanho ovino nacional é o quarto rebanho produtivo no país em termos de número de animais (IBGE, 2015), e o 18º maior rebanho ovino em âmbito mundial (FAO, 2015). O mercado cárneo é a principal fatia da ovinocultura explorada no Brasil e apesar de ainda estar em desenvolvimento (Guimarães & Souza, 2014) vem apresentando sinais de crescimento na demanda por carne. Um desses indícios foi o aumento de 40 % da importação de carnes de origem ovina, que passou de quase 584 mil toneladas anuais no ano de 2012, para 817 mil toneladas em 2013 (MDIC, 2015).

Dentro da ovinocultura ocorre ainda dois potenciais mercados a serem explorados: o de peles e o de laticínios. O mercado de peles que pode representar até 30 % do valor total do animal, em decorrência da excelente qualidade do produto originado pelos animais deslanados, é prejudicado com a inabilidade em produzir e retirar material classificado como de qualidade (SEBRAE, 2005). Quanto ao mercado lácteo, ainda é incipiente no Brasil (Guimarães & Souza, 2014), porém o elevado teor de gordura presente no leite ovino, 6,5 %, o torna altamente favorável à industrialização de produtos lácteos (Corrêa et al., 2014).

Outros indicativos que evidenciam o interesse na produção ovina foram o percentual de 65,5 de todos estabelecimentos agropecuários nacionais que apresentaram alguma forma de criação de ovinos em suas áreas e o fato de, pelo menos, 24,5 % de todo efetivo nacional de ovinos se encontrar em estabelecimentos que não estavam relacionados diretamente com a produção pecuária (IBGE, 2015). Isso também ressalta a capacidade de se integrar o ovino a outras culturas, como a bovinocultura (Carvalho et al., 2002; Carvalho et al., 2005; Silva Sobrinho, 2009; Santos, 2010) e a produção vegetal (Silva Sobrinho, 1996; Assis & Mancio, 2009; Silva Sobrinho, 2009).

### **2.2.1. Sistemas de produção a pasto**

A ovinocultura, assim como a bovinocultura, por se tratarem de sistemas de produção de ruminantes, apresentam a pastagem como a base alimentar. Sistemas de produção a pasto podem ser empregados desde formas mais extensivas, com pastagens de baixa produtividade e pouco uso de insumos, ou de formas mais intensivas, com pastagens de alta produtividade e suplementação alimentar em pasto ou em confinamento (Cezar et al., 2005;

Poli & Osório, 2014). O aumento da produção a pasto, para atender ao crescimento iminente da demanda por produtos de origem animal, pode ser atingido através de incorporação de novas áreas de pastagens ao sistema de produção ou aumentando a produtividade das áreas já existentes no sistema, simultaneamente ou não (Martha Jr. et al., 2012).

Na pecuária, em particular a de corte, é possível se produzir com baixa eficiência, de forma extensiva, sem o devido manejo para manutenção ou intensificação de pastagens, o que pode induzir, em sistemas de menor tecnificação, a busca pelo aumento na produção através da ampliação das áreas de pastejo (Dias-Filho, 2011). A ocupação inadequada de áreas com baixa fertilidade, utilizando, em geral, forrageiras de valor nutricional insatisfatório, constitui grande desvantagem na produção pecuária tropical, tanto em aspectos produtivos quanto ambientais, causado não só pela ausência de manejo dos solos, mas também por práticas inadequadas (Bustamante et al., 2012; Vitória et al., 2014).

A baixa produtividade também é influenciada pela senescência das forragens e pela alta pressão de pastejo, que além de propiciar a queda da fertilidade e a degradação dos solos, pode gerar impactos ambientais generalizados (Ferreira et al., 2013), principalmente associados com a produção direta ou indireta de gases de efeito estufa (GEE) oriundos da derrubada e queimada de vegetação nativa para implementação ou manutenção de áreas de pastagem, da fermentação entérica e dos dejetos animais (Bustamante et al., 2012).

### **2.3. Gases de Efeito Estufa na Produção Agrícola**

Os gases de efeito estufa (GEE), como o próprio nome sugere, atuam como retentores de calor e, conseqüentemente, exercem papel altamente significativo no aquecimento global. Os GEE são gases presentes na atmosfera terrestre que possuem propriedade de reter parte da irradiação infravermelha, auxiliando na regulação climática do planeta (MCTI, 2010). Eles ocorrem naturalmente na atmosfera, porém as atividades humanas vêm acentuando sua concentração, principalmente de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), metano (CH<sub>4</sub>) e óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) (USEPA, 2015).

A principal origem do aquecimento global é o aumento nas emissões de origem antropogênica de GEE, onde o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) representa 76 % destes gases, o

metano (CH<sub>4</sub>) 16 % e o óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) 6 % (IPCC, 2014a). A produção agrícola<sup>1</sup>, responsável por 24 % das emissões de GEE de origem antropogênica (IPCC, 2014b), é grande responsável pela emissão do CH<sub>4</sub> e do N<sub>2</sub>O, principalmente devido ao CH<sub>4</sub> de origem entérica, dos dejetos animais e da produção de arroz, e do N<sub>2</sub>O oriundo também dos dejetos animais, mas principalmente da adubação e manejo de solos (FAO, 2013; IPCC, 2014).

O aumento na concentração de CO<sub>2</sub> se deve, principalmente, à queima de combustíveis fósseis, produção de cimento e mudança no uso do solo, principalmente com o desflorestamento (IPCC, 2013). Nos Estados Unidos, como exemplo de país altamente industrializado, a queima de combustíveis fósseis representa 93,8 % da emissão do gás (USEPA, 2015). No Brasil em 2005, diferente dos países mais industrializados, a principal fonte de emissão do CO<sub>2</sub> foi a mudança do uso da terra (74,6 % da emissão de CO<sub>2</sub>), sobretudo a conversão de florestas para uso agropecuário (MCTI, 2010), e atualmente, a principal fonte de emissão do CO<sub>2</sub> é o setor de geração de energia elétrica que corresponde a 64,7 % da emissão do gás (MCTI, 2014).

As principais fontes antropogênicas de emissão de CH<sub>4</sub>, além das atividades agrícolas, são: a emissão na extração de combustíveis fósseis, sobretudo sistemas de gás natural; aterros; e a extração de carvão (IPCC, 2013; USEPA, 2015). Nos Estados Unidos a produção pecuária representou apenas 35,5 % da emissão total de CH<sub>4</sub> (25,7 % fermentação entérica e 9,8 % do manejo de dejetos) registrada pela Agência de Proteção Ambiental Norte Americana, que foi de 647,6 teragramas de CO<sub>2</sub> equivalente (Tg CO<sub>2</sub> Eq.), seguido pelos sistemas de gás natural e aterros, responsáveis por 23,8 % e 17,8 % da emissão do gás, respectivamente, em 2012 (USEPA, 2015). No Brasil, também em 2012, o Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), na segunda edição das estimativas anuais de emissões de gases de efeito estufa, relatou apenas o setor pecuário como responsável pela emissão de 77,4 % da emissão total de CH<sub>4</sub> (71,3 % fermentação entérica e 6,1 % do manejo de dejetos) dos 349,7 Tg CO<sub>2</sub> Eq. de CH<sub>4</sub> emitidos no país, no mesmo ano de 2012 (MCTI, 2014).

As emissões de N<sub>2</sub>O são mais difíceis de estimar devido a heterogeneidade da metodologia no tempo e no espaço da estimativa, que consiste em escalonamento de medições de fluxo na superfície que pode ocorrer tanto em ambientes terrestres quanto ambientes aquáticos (IPCC, 2013). O relatório do IPCC (2013) ainda afirmou que essas emissões são de

---

<sup>1</sup> A produção agrícola nesse caso, segundo o IPCC (2014a), engloba a agricultura, pecuária, silvicultura e também outros usos do solo que abrangem queimadas e desmatamentos, para o uso agrícola ou não.

caráter secundário, decorrente do acúmulo do nitrogênio oriundo do uso agrícola, principalmente na utilização de fertilizantes e esterco na adubação, utilização de combustíveis fósseis e atividades industriais. Tanto nos Estados Unidos, 75,6 % (USEPA, 2015) quanto no Brasil, 82,3 % (MCTI, 2014) do  $N_2O$  são oriundos da aplicação de fertilizantes sintéticos e esterco animal, porém no Brasil a principal porção é decorrente de dejetos animais, 65,9 %, enquanto que nos Estados Unidos ocorre o inverso, onde 72,8 % é oriundo do manejo de solos.

### **2.3.1. Potencial de aquecimento global**

Pela necessidade de se avaliar e comparar a capacidade de cada gás reter o calor na atmosfera e influenciar o aquecimento do planeta o Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC) da Organização Mundial de Meteorologia (WMO) introduziu o termo Potencial de Aquecimento Global (GWP) como uma maneira de viabilizar essas análises (IPCC, 1995).

A metodologia utilizada para estimar o GWP consiste em tomar como base a capacidade de 1 kg de um GEE referência reter calor, no caso o  $CO_2$  devido a sua maior abundância na atmosfera, e comparar a retenção exercida por 1 kg de um outro GEE que se deseja confrontar. A capacidade do gás comparado é relatada em teragramas de  $CO_2$  equivalente (Tg  $CO_2$  Eq.) para um determinado horizonte de tempo; o IPCC adota 20, 100 e 500 anos sendo o horizonte de 100 anos o mais utilizado (USEPA, 2014; IPCC, 2001).

O quarto relatório do IPCC (AR4), publicado no ano de 2007, ainda trazia valores de GWP que foram descritos primeiramente no segundo relatório, autorizado em 1995, porém já se propunha algumas correções nos valores de referência do GWP (IPCC, 2007). A partir de 2013, com a publicação do quinto relatório do IPCC (AR5), uma nova atualização foi feita nos valores de referência para GWP, levando em consideração estimativas de duração de vida na atmosfera e eficiência radiativa dos GEE (IPCC, 2013), conforme a tabela 1.1.

Tabela 1.1. – Valores de referência no Potencial de Aquecimento Global (GWP) do metano (CH<sub>4</sub>) e do óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) em relação ao dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Fonte: adaptado de IPCC (2001; 2007; 2013)

<b>GEE</b>	<b>AR2 – 1995</b>	<b>AR3 – 2001</b>	<b>AR4 – 2007</b>	<b>AR5 – 2013</b>
<b>CO<sub>2</sub></b>	1	1	1	1
<b>CH<sub>4</sub></b>	21	23	25	28
<b>N<sub>2</sub>O</b>	310	296	298	265

**GEE** – Gases de Efeito Estufa

**AR2 – 1995:** valor de GWP para horizonte de 100 anos do segundo relatório do IPCC

**AR3 – 2001:** valor de GWP para horizonte de 100 anos do terceiro relatório do IPCC

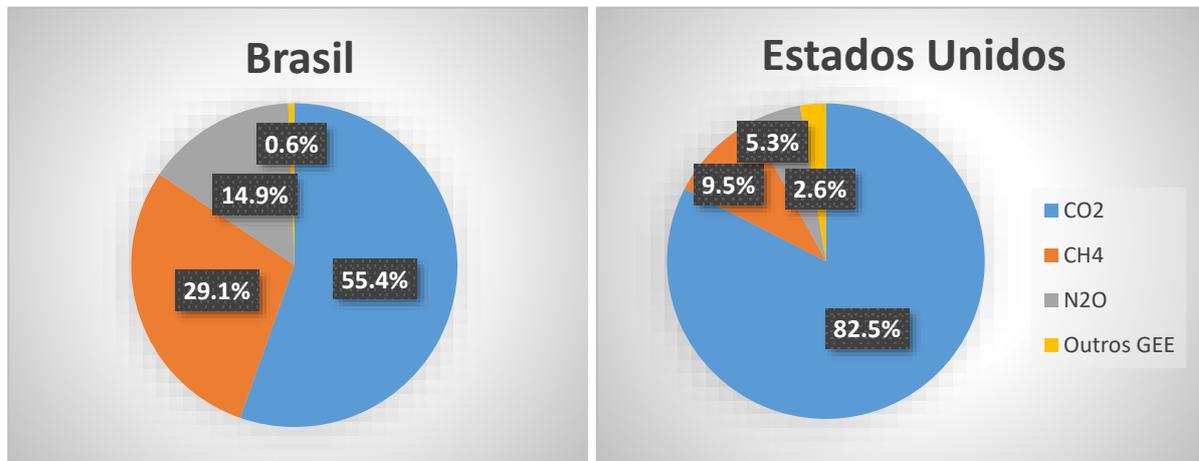
**AR4 – 2007:** valor de GWP para horizonte de 100 anos do quarto relatório do IPCC

**AR5 – 2013:** valor de GWP para horizonte de 100 anos do quinto relatório do IPCC

Apesar das atualizações anteriores às datas de publicação do inventário de emissões e sumidouros de GEE do Brasil (MCTI, 2014), bem como a última atualização do sistema de dados FAO (2015), realizada em 2013, os valores utilizados para determinação GWP foram os publicados ainda no segundo relatório do IPCC (AR2), em 1995. Os Estados Unidos, até o ano de 2014 (USEPA, 2014), também utilizava os valores de 1995 do AR2, porém em 2015, em seu inventário de emissões e sumidouros de GEE, os valores de GWP foram atualizados pelas referências do AR4 (USEPA, 2015).

Em termos de emissão total o Estados Unidos, responsável pela emissão de 6.545,10 Tg de CO<sub>2</sub>Eq em 2012 (USEPA, 2015), emitiu 5,44 vezes mais GEE quando comparado ao Brasil que emitiu 1.203,40 Tg de CO<sub>2</sub>Eq no mesmo período (MCTI, 2014). Desse total, em ambos os países, os gases que mais contribuem em termos de GWP são o CO<sub>2</sub>, o CH<sub>4</sub> e o N<sub>2</sub>O, respectivamente, porém com teores de participação diferentes, conforme expresso na figura 1.2. A maior emissão de GEE pelos países industrializados constantes no Anexo I do Protocolo de Quioto, 18.845,34 Tg de CO<sub>2</sub>Eq, quando comparado aos países menos desenvolvidos, 252,11 Tg de CO<sub>2</sub>Eq no ano de 2010 também evidencia a maior emissão de GEE pelos países industrializados, responsáveis por 40 % da emissão total global, quando comparados aos países menos desenvolvidos, que contribuem com pouco mais de 0,51 % do GWP mundial (FAO, 2016).

Figura 1.2. – Contribuição dos principais Gases de Efeito Estufa (GEE) no Potencial de Aquecimento Global – (adaptado de MCTI, 2014; USEPA, 2015)



#### 2.4.Ecosistema e microbiota ruminal

O rúmen é um ambiente anaeróbico habitado por uma microbiota bastante diversificada composta principalmente por bactérias, protozoários, fungos, *Archaea* (metanogênicos) e bacteriófagos que, em simbiose com seus hospedeiros, se desenvolveram ao longo de milhões de anos desempenhando funções metabólicas essenciais à saúde e à nutrição dos ruminantes (Morgavi et al., 2010).

As bactérias, que possuem tamanho variando de 1 a 5  $\mu\text{m}$ , se apresentam em maior número sendo encontradas de  $10^9$  a  $10^{10}$  bactérias/mL de conteúdo ruminal (McDonald et al., 2011) não devendo ser a população bacteriana inferior a  $10^6$  /g de conteúdo ruminal (Arcuri et al., 2011) e divididas em pelo menos 353 filotipos (Yu et al., 2006) sendo que alguns autores já relataram até 400 filotipos isolados do rúmen (Morgavi et al., 2010; Arcuri et al., 2011). Além de apresentarem o maior número de indivíduos, a população de bactérias também é a que apresenta maior habilidade metabólica capazes de fermentar carboidratos estruturais e não-estruturais, principalmente; aminoácidos e peptídeos; e lipídios produzindo os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (Allison, 1996; Arcuri et al., 2011).

Os protozoários apresentam uma população de  $10^6$ /mL de conteúdo ruminal estão presentes no rúmen em menor número quando comparados às bactérias (McDonald et al., 2011) mas devido ao seu tamanho bem maior, variando de 20 a 200  $\mu\text{m}$  (Arcuri et al., 2011), correspondem a 50% da biomassa ruminal (Newbold et al., 2015). Apesar da importância dos protozoários em processos digestivos como a estabilidade do processo fermentativo ruminal e

do pH, facilitação da digestão da MO e da fibra (Arcuri et al., 2011; Tymensen et al., 2012) eles não são essenciais ao ecossistema ruminal nem ao bem-estar de ruminantes (Nguyen et al., 2016). Animais defaunados (eliminação dos protozoários ruminais) apresentam melhores índices de desempenho produtivo, como maiores taxas de crescimento e ganho médio diário (Newbold et al., 2015; Nguyen et al., 2016) e menor produção de CH<sub>4</sub> (Tymensen, et al., 2012; Guyader et al., 2014).

O domínio *Archaea*, representado no rúmen pelos metanogênicos, unificados como produtores de CH<sub>4</sub> (assunto abordado no tópico **Emissão de Metano por Ruminantes**), pois apesar de possuírem outras características como: membranas celulares monolípídicas ligadas por éter (Barber, 2007), presença de algumas coenzimas e carreadores de elétrons raros, bem como particularidades relacionadas ao RNA e DNA, essas características ainda não são muito conhecidas por requererem cuidados especiais no cultivo e estudo delas (Mackie et al., 2013).

Há ainda os fungos que, capazes de degradar a quitina e a queratina (Arcuri et al., 2011) e o conteúdo lignificado da parede celular (Sekhavati et al., 2009), são responsáveis pelo rompimento físico e enzimático do material vegetal ampliando a superfície disponível para a colonização bacteriana resultando em um incremento na degradação da parede celular (Gruninger et al., 2014); e os vírus que apresentam importante papel na transferência de genes e equilíbrio da microbiota, porém a respeito dos bacteriófagos presentes no rúmen, pouco se sabe dos tipos de vírus presentes e sua interação com a microbiota ruminal, além da importância na transferência horizontal de genes entre *Archaea*, bactérias e protozoários, transmitindo desde a resistência a antibióticos entre bactérias, até a transmissão de informação genética para produção de polisacarídeos das bactérias para os protozoários (Miller et al., 2012).

O processo fermentativo ocorrido no rúmen é resultado da relação de mutualismo presente entre a microbiota e o ruminante, onde o hospedeiro proporciona a entrada e a motilidade de alimentos e nutrientes (bicarbonato, fosfato e ureia) no sistema, regulação de temperatura (38-42 °C), controle do pH (5.5-7.0) através da alta produção de saliva (até 16 L/d em ovinos e até 180 L/d em bovinos) com pH alcalino (8,1); e os microrganismos proporcionam a digestão das células de origem vegetal (celulose e hemicelulose) gerando ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) que são responsáveis por 60-80% da energia dietética dos ruminantes, a síntese de proteína microbiana a partir do nitrogênio disponível no rúmen e a síntese de vitaminas do complexo B e K (McDonald et al., 2011; Furlan et al., 2011; Mackie et al., 2013).

## 2.5. Emissão de Metano por Ruminantes

A emissão de CH<sub>4</sub> tem se tornado alvo de vários estudos minuciosos, não só na área ambiental por ser um potente GEE, mas também relacionados à perda energética do alimento provocada na síntese de CH<sub>4</sub> e que poderia ser melhor utilizada na conversão de produtos de origem animal (Madsen e Bertelsen, 2012). Os ruminantes são a categoria animal em maior destaque quando se levam em consideração a emissão de CH<sub>4</sub>, pois, apesar de serem a maior fonte de emissão desse GEE (Lassey, 2007; MCTI, 2014; USEPA, 2015), são a categoria onde se apresentam a maior intensividade de pesquisas e esforços sendo realizadas para a redução na emissão de CH<sub>4</sub> (Madsen e Bertelsen, 2012).

O metano entérico é produzido a partir do CO<sub>2</sub> e do H<sub>2</sub> presentes no rúmen em condições anaeróbicas pelo metabolismo de microrganismos metanogênicos denominados *Archaea* (Eckard et al., 2010; Broucek, 2014). A formação do CH<sub>4</sub> pelos metanogênicos *Archaea* ocorre com a utilização de apenas 3 substratos, o acetato, compostos metílicos e o CO<sub>2</sub>. Apesar de dois terços do CH<sub>4</sub> formado biologicamente ser gerado através do acetato, no rúmen a principal origem do CH<sub>4</sub> é a redução do CO<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub> por metanogênicos hidrogenotróficos (Liu & Whitman, 2008). O formato, através da conversão por reação enzimática, também é um substrato importante na produção de CH<sub>4</sub>, responsável pela formação de 18 % do metano de origem ruminal (Hungate et al., 1970; Cieslak et al., 2013).

A produção de CH<sub>4</sub> desempenha papel fundamental na fermentação anaeróbia, evitando a queda de pH do rúmen pela remoção do excesso de hidrogênio (H<sub>2</sub>) e de formato (Liu & Whitman, 2008), para viabilizar o processo de degradabilidade da fibra (Zhou et al., 2010), porém essa proteção natural contra a acidose pode representar perdas de 2 % a 12 % da energia bruta do alimento ingerido, variando principalmente em decorrência da quantidade de carboidratos fermentados e da disponibilidade de H<sub>2</sub> nas regiões do retículo e do rúmen (Johnson e Johnson, 1995; Berends et al., 2014).

Outro fator que contribui para produção do CH<sub>4</sub> é a associação próxima que existe entre os *Archaea* metanogênicos e os protozoários; onde os protozoários realizam alta produção de butirato e acetato, que liberam grande quantidade de H<sub>2</sub> no processo de fermentação ruminal, e os *Archaea* metanogênicos utilizam metade desse H<sub>2</sub> produzido na síntese de CH<sub>4</sub> (Guyader et al., 2014). Apesar de animais defaunados apresentarem menor produção de CH<sub>4</sub> (Newbold et al., 2015; Nguyen et al., 2016) a defaunação não é indicada como

estratégia de mitigação de CH<sub>4</sub> devido a variabilidade encontrada nos resultados obtidos e o fato de não se levar em consideração o efeito da diminuição de protozoários na redução do processo fermentativo das fibras (Hristov et al., 2013).

Murray et al. (1976)<sup>2</sup> constataram que aproximadamente 87 % do CH<sub>4</sub> entérico produzidos em ruminantes tem origem ruminal e o restante tem origem na porção final do trato gastrintestinal (TGI). Desse total, 95 % do CH<sub>4</sub> produzido no rúmen é eructado e 89 % do CH<sub>4</sub> produzido na porção inferior do TGI é absorvido pela veia porta e excretado integralmente pelos pulmões através das vias aéreas (expiração), totalizando aproximadamente 95 % do CH<sub>4</sub> entérico produzido; o que vem enfatizar a importância de estratégias nutricionais que venham mitigar a produção e emissão de CH<sub>4</sub> por esses animais.

### **2.5.1. Manipulação da dieta como estratégia de mitigação do metano entérico**

A manipulação da dieta tem sido apontada como um meio eficiente de diminuir a emissão de metano em ruminantes. Neste sentido os carboidratos solúveis, ou rações baseadas em cereais reduzem a relação acetato:propionato, pois o processo digestivo de alimentos volumosos potencializa a produção de ácido acético, enquanto a ingestão de alimentos concentrados proporciona um aumento do ácido propiônico (Na et al., 2013; Hristov et al., 2013), esse processo tende a minimizar a produção de metano no trato.

Existe uma relação clara entre degradabilidade de matéria orgânica, consumo energético e o padrão fermentativo ruminal, onde a inclusão de carboidratos prontamente degradados no rúmen tendem a reduzir o pH ruminal, elevar o teor de propionato e reduzir a relação acetato:propionato o que favorecerá uma redução na produção de CH<sub>4</sub> entérico (Hristov et al., 2013), demonstrando a importância da manipulação da dieta na redução da emissão de CH<sub>4</sub> por ruminante.

Outros fatores como a taxa de passagem e a digestibilidade dos alimentos (USEPA, 2015) influenciam a produção de metano. Quanto maior o tempo de permanência do alimento no rúmen, ou seja, quanto menor for a qualidade do alimento, ou maior for o tamanho de sua partícula, mais elevada será a produção de metano. Na et al. (2013), avaliando o efeito

---

<sup>2</sup> Apesar de, supostamente antigo, o modelo sugerido por Murray et al. (1976) ainda é o mais utilizado quando se leva em consideração a emissão de metano entérico por ruminantes, como pode-se ver, por exemplo, nos recentes trabalhos Muñoz et al. (2012), Berends et al. (2014), Hammond et al. (2016).

da inclusão de volumoso de melhor qualidade e a relação de volumoso:concentrado na dieta, encontraram emissões de CH<sub>4</sub> até 25 % inferiores ao substituir o rolão de milho pela silagem de milho e alterar a relação concentrado:volumoso de 40:60 para 60:40.

Tendo em vista a capacidade dos ruminantes de transformar forragens de baixo valor nutricional para o consumo humano em alimentos nobres como o leite e a carne, ao custo inevitável da emissão de metano, devem-se buscar alternativas para minimizar esta perda por meio de substâncias artificiais ou naturais, favorecendo o uso de volumoso na dieta dos ruminantes. Uma forma que vem sendo pesquisada é o uso de tanino como agente mitigador de metano, fruto do metabolismo secundário dos vegetais, tem ação de defesa contra bactérias, fungos e consumo de herbívoros (Guimarães-Beelen et al., 2006; Hristov et al., 2013), porém em pequenas quantidades pode modular o processo fermentativo no rúmen e favorecer a redução da produção de gases devido a melhor síntese microbiana e a sincronização da liberação dos nutrientes (Makkar, 2003).

O manejo nutricional com a presença de leguminosas disponibiliza, pelo menos, dois fatores que, segundo Louvandini et al. (2011), proporcionam a redução na produção de metano entérico, devido a melhora na qualidade nutricional do alimento e a presença de taninos, principalmente quando comparadas a gramíneas. Archimède et al. (2011) sugerem a inclusão de leguminosas na dieta como uma estratégia viável na redução da emissão de CH<sub>4</sub> em ruminantes.

### **2.5.2. Utilização de forrageiras leguminosas**

Em animais a pasto pode-se reduzir em até 28 % a produção de CH<sub>4</sub> apenas com a melhora na qualidade das forragens ofertadas a ruminantes (Cottle et al., 2011), onde os principais entraves são as baixas digestibilidade e qualidade dos alimentos, bem como o balanço nutricional inadequado.

A introdução de forrageiras leguminosas também vem se mostrando uma alternativa viável, pois a utilização dessas forragens viabiliza tanto alimento de melhor qualidade para os animais, disponibilizando nitrogênio (N) e outros nutrientes essenciais, suprimindo a menor disponibilidade de nutrientes das gramíneas tropicais (Boval & Dixon, 2012), quanto a melhora da nutrição dos pastos, quando consorciadas as gramíneas, possibilitando

fixação biológica de N por meio da simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium* no solo e consequentemente, garantido maiores ganhos por animal/área (Valentim e Carneiro, 2001).

Desta forma, a pastagem consorciada requer alguns cuidados, levando-se em consideração principalmente o manejo agrônômico que priorize a leguminosa, favorecendo seu desenvolvimento e produtividade (Jerba et al., 2004). Outro fator que pode reduzir a persistência de leguminosas em pastagens consorciadas é a aceitabilidade das forrageiras utilizadas (Camarão e Azevedo, 2005), bem como a diferença na seletividade interespécies, onde ovinos são mais seletivos que bovinos, em decorrência da forma de apreensão alimentar, e consomem preferencialmente a forrageira de maior aceitabilidade em detrimento da outra (Silva Sobrinho, 2006); e intra espécie, como em ovinos, onde os lanados, que apresentam comportamento de pastejo coletivo mais arraigado e preferência por pastos mais rentes ao solo, tendem a ser menos seletivos do que os deslanados, que preferem porte de pastejo mais arbustivo e buscam explorar mais o pasto individualmente (Valverde, 2000).

Visando minimizar problemas de persistência da leguminosa em sistemas de pastejo consorciado, a introdução de leguminosas no sistema de pastejo pode ser feita na forma de monocultivo, onde se perde o benefício da adubação de N para as gramíneas, porém se assegura uma maior permanência da leguminosa sob pastejo, principalmente na criação de espécies mais seletivas, como ovinos e caprinos. Uma maneira de se propiciar de forma econômica e satisfatória o acesso a leguminosas são os bancos de proteína ou pastejos periódicos, onde o animal permanece de 1 a 2 horas diárias a cada 2 ou 3 dias, propiciando o acesso animal a forrageiras de maior qualidade nutricional, garantindo produtividades satisfatórias (Camarão e Azevedo, 2005).

A utilização de leguminosas, tidas como forragens de qualidade superiores na alimentação animal, podem apresentar uma alternativa importante, principalmente como fonte de proteína, em locais áridos onde se torna quase que a totalidade dos alimentos ingeridos por animais criados nessas regiões (Seresinhe e Pathirana, 2003). Porém o teor nutricional dessas forragens pode estar sujeito a fatores de natureza química (metabólitos secundários), ou de natureza física (estrutural), que podem interferir na digestibilidade, na aceitabilidade desses alimentos e, no caso dos metabólitos secundários, até se tornarem antinutricionais e inibirem a fermentação bacteriana podendo atingir níveis de toxicidade (Jerba et al., 2004; Njidda, 2010). Os principais metabólitos secundários são os alcaloides; os terpenoides, onde se encontram

incluídas as saponinas; e compostos fenólicos, principalmente a lignina e o tanino (Jerba et al., 2004).

Tadele (2015) ainda ressaltou a importância dos inibidores de protease como a classe de fatores antinutricionais mais comumente encontrada em plantas, inclusive nas sementes, mas que alguns desses fatores antinutricionais pode ser usada de forma benéfica, como por exemplo: o índice anticancerígeno que os inibidores de protease exerceram em pâncreas de animais; resultados de redução de colesterol, anticancerígenos e antioxidantes das saponinas; e os efeitos antiparasitários, incremento na eficiência de utilização proteica, melhora na qualidade dos produtos de origem animal e desempenho dos animais e redução de CH<sub>4</sub> entérico dos taninos.

#### **2.5.2.1. Mucuna-preta (*Stizolobium aterrimum*)**

Esta leguminosa estolonífera, originária das Antilhas (Seno et al., 1996), apesar de ser anual pode se tornar endêmica na região utilizada devido ao seu vigor no crescimento e na produção de sementes. Tem sido muito utilizada no plantio consorciado com o milho devido à qualidade e a quantidade de fitomassa, produzindo uma ótima cobertura de solo com excepcional qualidade (Arf et al., 1996). Além do seu potencial como adubo verde o seu rápido estabelecimento e capacidade de cobertura de solo são capazes de controlar o surgimento de plantas invasoras, bem como evitar processos de erosão (Whitmore, 2000).

Devido sua excelente composição bromatológica, digestibilidade, e sua facilidade de manejo apresenta enorme potencial forrageiro, podendo ser também fornecida na forma de silagem ou feno (Whitmore, 2000) apresentando elevada aceitabilidade, tanto verde quanto enfenada, por bovinos (Seno et al., 1996) e por ovinos (Silva Sobrinho, 2006 e 2014). As sementes e vagens moídas são ótimo alimento concentrado, rico em nitrogênio e carboidratos (Seno et al., 1996). A composição bromatológica de alguns componentes da mucuna-preta pode ser observada na tabela 1.2.

Tabela 1.2 – Principais componentes bromatológicos da mucuna-preta (*Stizolobium aterrimum*) em g/kg de MS.

PB	FDN	FDA	CFT	TT	TC	Fontes
176	–	–	–	–	–	Borges et al. (2003)
90	714	555	–	–	–	Nascimento & Silva (2004)
188	463	292	–	–	–	La O et al. (2006)
250	678	–	24	–	–	Savón et al. (2007)
257	680	440	55	38	20	Longo (2007)
176	–	–	–	–	–	Bueno et al. (2007)
257	463	292	21	–	23	Delgado et al. (2010)
241	496	–	55	39	20	Abdalla et al. (2012)
241	637	412	55	38	20	Longo et al. (2012)
98	822	645	72	48	46	Moreira et al. (2013)
<b>Valores médios</b>						
197,40	619,13	439,33	47,00	40,75	25,80	

PB – proteína bruta; FDN – fibras em detergente neutro; FDA – fibras em detergente ácido; CFT – compostos fenólicos totais; TT – taninos totais; e TC – taninos condensados.

Os valores nutricionais encontrados por Savón et al. (2007) para a mucuna-preta foram de 25 % de PB e 67,8 % de fibra em detergente neutro (FDN). Com relação aos compostos fenólicos, eles não foram quantificados, apenas classificados pelos autores em quatro categorias (ausente, baixo, moderado e abundante), sendo a mucuna categorizada como moderada.

La O et al. (2006) testando a digestibilidade e a composição química da mucuna-preta *in situ* com bovinos encontraram valores de 18,82 % de PB, 46,33 % de FDN, 29,18 % de fibra em detergente ácido (FDA) e 2,36 % de compostos fenólicos totais (CFT), porém os autores trabalharam apenas com folhas e pecíolos. Longo (2007) relatou valores de 25,72 % de PB, 67,98 % de FDN, 43,97 % de FDA, 5,5 % de CFT, 3,8 % de taninos totais (TT) e 2 % de taninos condensados (TC).

Borges et al. (2003) e Bueno et al. (2007) encontraram, em valores convertidos a partir do teor de N, aproximadamente 17,6 % de PB, em análises para a cobertura de solos. Nascimento & Silva (2004), objetivando a fertilidade dos solos, encontraram valores de 9,02 % de PB, 71,39 % de FDN e 55,46 % de FDA, porém os autores não utilizaram adubação mineral e nem corretiva.

Delgado et al. (2010), também avaliando o potencial de plantas tropicais em reduzir a produção entérica de CH<sub>4</sub>, encontraram valores de 25,69 % de PB, 46,33 % de FDN, 29,18 % de FDA, 2,14 % de CFT e 2,30 % de TC, classificando a mucuna com alto nível de

TC, porém com baixo nível de saponina, e também encontraram resultado positivo utilizando a mucuna como alimento mitigador de CH<sub>4</sub> em ensaios *in vitro*.

Moreira et al. (2013), buscando a utilização de leguminosas taniníferas como potenciais alimentos mitigadores na emissão de CH<sub>4</sub> entérico, encontraram valores de 9,79 % de PB, 82,23 % de FDN, 64,48 % de FDA e em relação aos compostos fenólicos, 7,16 % CFT e 4,75 % de TC e observaram uma tendência da mucuna em mitigar a produção de CH<sub>4</sub> entérico, quando comparado às demais leguminosas testadas (*Leucaena leucocephala* e *Mimosae Caesalpiniaefolia* Benth). Isso vem demonstrar o grande potencial forrageiro dessa leguminosa, que aliada com o tanino em sua composição, se mostra excelente opção na alimentação de ruminantes.

### 2.5.3. Taninos

Taninos são substâncias polifenólicas com variados pesos moleculares e complexidades. Inicialmente identificados em duas classes: hidrolisáveis e condensados (Krueger, et al., 2010). Os taninos hidrolisáveis (TH) são mais encontrados em folhas, frutos e galhos de dicotiledôneas enquanto os taninos condensados (TC) são mais facilmente encontrados por toda a planta (Bhat, et al. 2013).

Os taninos podem apresentar efeitos adversos na produção animal que irão variar de acordo com o tipo e o estado fisiológico do animal, a composição da dieta, bem como em função da diferença entre cultivares e o grau de desenvolvimento fisiológico das plantas taniníferas, além da influência de fatores externos, como os aspectos ligados ao ambiente e ao clima (Frutos et al., 2004; Louvandini et al., 2011). A principal propriedade dos taninos é sua propensão em formar complexos químicos (Bhat et al., 2013) apresentando forte afinidade por moléculas proteicas, acarretando a mobilização de proteínas de origem alimentar e enzimas (Seresinhe e Pathirana, 2003; Bhat et al., 2013), principalmente em meio aquoso (Makkar, 2003) e em pH ruminal (Jones e Mangan, 1977; Bhat et al., 2013).

Algumas das consequências conhecidas do tanino são a redução da aceitabilidade dos vegetais; a redução do potencial de utilização dos nutrientes, principalmente a proteína; a diminuição no desenvolvimento animal; e o retardo no funcionamento de algumas enzimas (Makkar, 2003). Frutos et al. (2004) relataram que a redução na aceitabilidade pode estar relacionada a reação adstringente diretamente nos receptores gustativos ou devido a reação

entre o tanino e muco-proteínas salivares, com exceção dos complexos formados entre o tanino e as proteínas ricas em prolina, que são estáveis em todo pH do trato digestivo, o que parece inibir o efeito negativo na palatabilidade. Em animais seletores a secreção de proteínas ricas em prolina ocorre constantemente, já em ovinos ocorre somente com a ingestão de taninos e em bovinos ocorre a secreção de outras proteínas com afinidade por tanino (Frutos et al., 2004).

Os efeitos desejáveis que estão sendo estudados são a liberação gradual de nutrientes (Louvandini et al., 2011), o incremento na síntese de proteínas microbianas quando associado ao polietilenoglicol (PEG) (Makkar, 2003; Ben Salem et al., 2004), proteção de proteína com melhora digestiva dos alimentos por ruminantes, principalmente devido a maior disponibilidade de aminoácidos para absorção no intestino delgado, aprimorando ganho em peso, maior produção de leite com teores de proteína e lactose do leite mais elevados, redução do timpanismo ocasionado no pastejo excessivo de leguminosas (Frutos et al., 2004), e o potencial na redução na produção de gases (Makkar, 2003; e Moreira et al., 2013), além da ação antiparasitária, principalmente anti-helmíntica (Maciel et al., 2006; Max et al., 2009; Ramírez-Rastrepo, 2010; Louvandini et al., 2011; Hoste et al., 2015; Lopes et al., 2016).

Segundo Makkar (2003) taninos purificados de diferentes espécies, em mesmas concentrações, produziram diferentes efeitos de diversas magnitudes na produção de gases, e Frutos et al. (2004) relataram a forte influência de fatores ambientais e climáticos, como o estágio de desenvolvimento da planta, a alta temperatura, o estresse hídrico, solos de baixa qualidade e a intensidade de luz, na formação de tanino. Além dos fatores já mencionados, ainda citaram que em situações extremas de desfolhação, como ataque de insetos e pastejo severo por exemplo, os níveis podem ser momentaneamente elevados para tentar evitar o risco para o vegetal (Seresinhe e Pathirana, 2003; Bhat et al., 2013).

De acordo com o descrito por Makkar (2003) e Seresinhe e Pathirana (2003) os níveis de tanino condensado (TC) na dieta de até 4 %, e de acordo com o descrito por Frutos et al. (2004), níveis até 5 %, refletiram os efeitos benéficos da utilização do composto; valores entre 5 % e 9 % resultaram em efeitos adversos; acima de 9 % Seresinhe e Pathirana (2003) relataram níveis com risco de toxicidade e até letalidade. Bhat et al. (2013) verificaram que consumo de taninos por ruminantes em valores acima de 5 % da MS proporcionam redução do consumo e diminuição da performance dos ruminantes; essa redução na produção pode ocorrer também devido a formação de complexos com proteínas que podem se tornar indigeríveis pelos animais.

Existe a possibilidade de se evitar ou reduzir os efeitos negativos do tanino, quer de plantas com elevado nível tânico para fornecimento a animais, quer para avaliação do efeito do tanino na produção animal. São relatados como meios de “destanificação” o corte das folhas e armazenamento antes do fornecimento para os animais, umedecimento do alimento com soluções alcalinas (que podem ser preparadas com cinza de madeira), adição de ureia para o armazenamento (Makkar, 2003; Frutos et al., 2004; Bhat et al., 2013). Makkar (2003) ainda cita solventes orgânicos e a fermentação com fungos dos alimentos, porém as formas mais eficazes de inibição de taninos (Kumar e Singh, 1984; Makkar, 2003; Frutos et al., 2004; Bhat et al., 2013) são a utilização dos polímeros PEG e polivinilpirrolidona (PVP), que apresentam afinidade superior aos taninos do que às proteínas.

#### **2.5.3.1. Polietilenoglicol (PEG)**

Os polímeros PEG e PVP, que apresentam alta afinidade ao tanino, são utilizados como tratamento para se evitar os efeitos negativos do tanino na nutrição animal (Frutos et al., 2004; Bhat et al., 2013). Essa afinidade conhecida por mais de 3 décadas (Makkar, 2003), mais elevada do que a existente entre tanino e proteínas, evita a formação de complexos proteína-tanino (Makkar, 2003; Seresinhe e Pathirana, 2003) e até possibilitando a liberação da proteína dessas composições pré-formadas (Ben Salem et al., 2004; Frutos et al., 2004).

Segundo Makkar (2003), efeitos e consequências da utilização do tanino, bem como avaliações sistemáticas vêm sendo realizadas visando comparar a eficiência entre esses polímeros em formar complexos com o tanino e a afinidade entre o tanino e o PEG se mostrou superior em relação à do PVP e o referido composto fenólico. Pode-se observar também na utilização em ensaios *in vivo* e *in vitro* do PEG, que se apresenta em variados pesos moleculares (de 2.000 a 35.000), obtiveram-se melhores respostas *in vivo* com o PEG 6000 por ser mais efetivo em se ligar aos taninos em valores de pH neutros, apesar de vários ensaios terem sido realizados com PEG 3500-4000, e *in vitro* não houve diferença nos resultados utilizando o PEG com pesos moleculares entre 4000 e 6000 (Makkar et al., 1995; Makkar, 2003; Jayanegara et al., 2015).

A utilização do PEG 4000 se mostrou eficaz na destanificação de folhas de acácia, que tem baixos teores nutricionais e é rica em taninos, melhorando a disponibilidade de proteínas e contribuindo para o desempenho animal satisfatório, esperado para ovinos nesse

cenário (Ben Salem et al., 2004). A utilização do PEG vem se mostrando eficaz também em ensaios experimentais, *in vivo* e *in vitro*, visando averiguar o efeito dos taninos naturais das plantas, condensados ou hidrolisáveis, ou administrados na forma de ácido tânico ou extrato de TC obtido a partir da árvore quebracho (Frutos et al., 2004).

O PEG pode ser administrado misturado ao concentrado, na água, borrifado sobre os alimentos ricos em tanino (Ben Salem et al., 2004), ou ainda, incluso junto a agentes de peletização, em alimentos que contenham tanino ou na forma de blocos para lamber, semelhantes aos de sal mineral, ou intraruminalmente, porém esta técnica é pouco efetiva (Makkar, 2003). A quantidade de PEG a ser administrada *in vivo*, além de variar de acordo com a forma na utilização, também sofre influência da espécie animal a ser utilizada. Silanikove et al. (1996) comparando os dados obtidos para caprinos com os dados publicados para ovinos (Silanikove et al., 1994), em ambos os casos consumindo a alfarroba, relataram que a dosagem em caprinos, que são animais seletores, para atingir o máximo consumo, 10 g de PEG diários, foi muito menor do que em ovinos, 50 g de PEG diários, porém 25 g já seriam suficientes para trazer resultados estatisticamente semelhantes.

Em geral, visando assegurar ao máximo a inibição TC, os trabalhos seguem a relação PEG:TC de 1,5:1 proposta por Waghorn (1990), como pode-se observar em: Priolo et al. (2000), com 40 g de PEG por kg de dieta contendo 2,5 % de TC totais; Vasta et al. (2007), com 42 g de PEG por kg de dieta contendo 2,7 % TC; Tshabalala et al. (2013), que pulverizou 40 kg de frutos da *Acacia nilotica*, com 4,4 % de TC, com solução de 2,7 kg de PEG; Soltan et al. (2013) que utilizou 20 g de PEG para, aproximadamente, cada 13,55 g de TC de leucena ingerido.

Já em ensaios *in vitro* a melhor relação PEG:TC tem se mostrado a 1:1, conforme pode ser visto nos ensaios conduzido por Getachew et al. (2001), e relatado por Makkar (2003). Longo (2007), trabalhando com diferentes leguminosas, com variados níveis de TC, utilizou a relação 1:1 PEG:amostra de leguminosa. Jayanegara et al. (2015), também utilizando variada fontes de tanino, trabalharam com 750 mg de PEG para 410 mg de amostra (380 mg – 70 % feno e 30 % concentrado, e 30 mg de tanino).

## 2.6. Metodologias de Avaliação e Mensuração na Emissão de Metano em Ruminantes

As estratégias de mitigação de metano devem ser balizadas nas estimativas de emissão do referido gás, de modo a demonstrarem a sua real eficácia. Dessa maneira é importante que metodologias confiáveis de avaliação sejam analisadas, comparadas e validadas, de forma a respaldarem os meios adotados para a redução na emissão de CH<sub>4</sub>, bem como imprimir confiabilidade aos dados gerados (Storm et al., 2012).

A quantidade de metano produzida por animais também pode ser estimada a partir de modelos matemáticos, que diminuiriam custos e tempo dispendidos em experimentos de campo, porém ainda há uma certa dificuldade na obtenção de algumas variáveis, que não se encontram facilmente disponíveis, principalmente no nível dos sistemas de produção, bem como garantir a confiabilidade dos dados inseridos nos modelos (Kebreab et al., 2006; Ellis et al., 2007; Sejian et al., 2011; Moraes et al., 2014).

Existem metodologias de mensuração de CH<sub>4</sub> *in vivo* e *in vitro*. Os métodos *in vivo* são mais dispendiosos devido à utilização e manutenção de maior número de animais, porém são mais abrangentes e detalhados, simulam situações práticas e podem utilizar poucos ou até muitos animais para se gerar os dados de emissão de metano almejados. O método *in vitro*, que consiste em simular o processo de fermentação ocorrido no rúmen sob condições controladas em laboratório, é menos oneroso e mais rápido, possibilitando respostas semelhantes aos métodos *in vivo* (Storm et al., 2012).

Aferições precisas na emissão de CH<sub>4</sub> são necessárias para a construção dos inventários nacionais de emissões de GEE e para balizar estratégias de mitigação e desenvolvimento de protocolos (Moraes et al., 2014; Hammond et al., 2016). Desta maneira se torna fundamental estabelecer a relação entre os métodos de avaliação de metano *in vitro* e *in vivo* visando maior confiabilidade e precisão nos dados gerados a serem utilizados.

### 2.6.1. Técnica *in vitro* de produção de gases

Técnicas *in vitro* de produção de gases foram desenvolvidas para estimar a capacidade de fermentação de um determinado elemento, onde o gás produzido é um indicador indireto da cinética de fermentação (Rymer et al., 2005). O princípio básico da técnica *in vitro* de produção de gases (IVGPT) é simular a fermentação ruminal em condições controladas,

mantendo-se a temperatura ruminal de 39 °C e misturando o substrato (alimento a ser testado) ao inóculo (líquido ruminal), soluções tamponante e de minerais, possibilitando a determinação do CH<sub>4</sub> *in vitro* através da mensuração e análise do gás total (GT) produzido (Storm et al., 2012). Como o substrato é primeiro degradado para posteriormente ser fermentado, é possível através da mesma análise se determinar a degradabilidade *in vitro* (IVD) do substrato e, combinando os resultados da IVGPT e IVD, o teor do alimento que é fermentado e a interferência desse processo na formação do CH<sub>4</sub> (Rymer et al., 2005; Storm et al., 2012).

Os primeiros ensaios *in vitro* foram descritos a partir de McBee (1953) avaliando a atividade microbiana a partir de mensurações manométricas (respirômetro de Warburg) e, posteriormente, a técnica foi recebendo evoluções em sua metodologia como a utilização de seringas e garrafas, a homogeneização da parte líquida com a sólida do inóculo ruminal e a utilização de transdutores semiautomáticos ou sistemas completamente automatizados, possibilitando maior confiabilidade nos resultados, bem como a utilização de um maior número de amostras/variáveis nas análises (Getachew et al., 1998; Rymer et al., 2005; Storm et al., 2012).

A IVGPT apresenta limitações como: não levar em consideração taxa de passagem e a forma física da dieta, quantidade de matéria seca (MS) ingerida, e a incerteza de se atingir um estágio estacionário (onde não ocorrem mudanças significativas na dinâmica do processo fermentativo); porém vantagens como: o menor custo quando comparado a análises *in vivo*, menor tempo de duração dos ensaios, a capacidade de manutenção do ambiente físico e químico de degradação constante, e sua alta correlação entre a digestibilidade *in vivo*; fazem com que a IVGPT seja a melhor opção para se testar alimentos antes de submetê-los a análises *in vivo* (Bhatta et al., 2006; Bhatta et al., 2008; Storm et al., 2012; Hill et al., 2016)

### **2.6.2. Técnica *in vivo* do gás traçador – Hexafluoreto de Enxofre (SF<sub>6</sub>)**

A técnica do gás traçador SF<sub>6</sub> que obteve adaptações e adequações às condições brasileiras realizadas por Primavesi et al. (2004) foi inicialmente descrita por Johnson et al. (1994) e consiste na inserção ruminal de cápsula de permeação previamente preenchida com o gás traçador SF<sub>6</sub>, e pesadas repetidas vezes para se obter a quantidade de SF<sub>6</sub> emitida por cada cápsula. Em ovinos a emissão das cápsulas é menor que em bovinos e não de verão exceder 1,7 mg de SF<sub>6</sub>/dia (Lasseby et al., 2001).

As amostras de gás a serem analisadas por cromatografia gasosa são captadas a partir do focinho dos animais (eructação e expiração), por sistemas de regulação de fluxo e tubos dispostos a partir de cabrestos que levam as amostras captadas às cangas (câmaras de pressão negativa que captam e armazenam as amostras) que normalmente são fixadas ao pescoço dos animais, presas ao próprio cabresto, ou no dorso, em arreios próprios, porém, no caso de animais em ensaios que ocorram em gaiolas para avaliação de metabolismo, a canga pode ser fixada na própria gaiola (Johnson et al., 1994; Primavesi et al., 2004; Lima et al., 2010; Moreira et al., 2013).

Conhecidas as concentrações de SF<sub>6</sub> e CH<sub>4</sub>, armazenadas nas cangas e excluídas as concentrações desses gases presentes no ambiente (cangas “branco” dispostas no ambiente em que os animais se encontram) e a emissão de SF<sub>6</sub> das cápsulas de permeação, através do processo de calibração das emissões das cápsulas de permeação, por regra de três é possível estimar a emissão de CH<sub>4</sub> (Johnson et al., 1994; Primavesi et al., 2004; Storm et al., 2012).

Apesar de as emissões de CH<sub>4</sub> obtidas pela técnica do SF<sub>6</sub> poderem variar entre 5 e 10 % dos valores obtidos pelas câmaras respirométricas, o que pode em parte ser justificado pela parte do metano que é liberada pelo reto, esse viés não é recorrente (Hammond et al., 2016; Hill et al., 2016). A variação entre animais durante as análises no método do SF<sub>6</sub> é maior quando comparadas à técnica das câmaras, o que deve ser levado em consideração no estabelecimento do número de animais e a quantidade de dias em que serão coletadas amostras de SF<sub>6</sub> e CH<sub>4</sub> a serem analisados (Berndt et al., 2014; Hammond et al., 2016).

A técnica do SF<sub>6</sub> apresenta como principais vantagens a possibilidade de se mensurar a emissão de CH<sub>4</sub> a pasto, permitindo que os animais mantenham seus comportamentos naturais habituais, o menor custo quanto comparada às câmaras respirométricas, tornando-se uma opção concisa na comparação de estratégias de mitigação (Storm et al., 2012; Hammond et al., 2016; Hill et al., 2016).

### **2.6.3. Técnica *in vivo* das câmaras respirométricas/calorimétricas**

As câmaras respirométricas (CR) são os métodos mais precisos em termos de emissão de CH<sub>4</sub> individuais, porém são também os métodos mais caros, mesmo havendo câmaras com custo menos elevado (Hammond et al., 2016). Usadas a partir do último século com o intuito de estudar o metabolismo da energia animal, as CR podem ser de circuito fechado

e aberto, porém as de circuito aberto são as mais utilizadas e são confeccionadas desde câmaras clássicas para avaliação de metabolismo, com todas condições de ambientes controladas, até modelos menos sofisticados cobertos com capas ou paredes de policarbonato (Abdalla et al., 2008; Storm et al., 2012).

O circuito aberto das CR consiste na sucção dos gases presentes no ambiente da câmara por um duto onde, ou os gases são analisados por sensores presentes no sistema, ou são amostrados e posteriormente analisados em cromatografia gasosa, desconsiderando a concentração de CH<sub>4</sub> presente no ambiente, que é ventilado do exterior para o interior da câmara (Abdalla et al., 2008; Storm et al., 2012). Os dados devem ser corrigidos para condições normais de temperatura e pressão, levando em consideração a temperatura, umidade e a pressão atmosférica, bem como a velocidade do influxo com que ar é bombeado para ser amostrado (Hammond et al., 2016).

Os principais entraves na utilização das câmaras são o auto custo de implantação, capacidade reduzida no número de animais utilizados impossibilitando análise de grandes rebanhos em situações produtivas, variações entre pesquisas devido ao tipo de câmara utilizada, e na comparação com animais livres, não só pela diferença entre técnicas, mas pela redução na mobilidade natural dos animais; apesar disso é a forma mais precisa de se analisar a emissão de CH<sub>4</sub> de origem animal, utilizada inclusive na validação de padrões de emissão, possibilitando a identificação de variações diárias na emissão de CH<sub>4</sub> (Storm et al., 2012; Hammond et al., 2016; Hill et al., 2016).

## **2.7. Parâmetros Ruminais**

Em decorrência do processo fermentativo no rúmen, através da ação microbiana, ocorre a transformação de polímeros de origem vegetal, não digeríveis por enzimas de origem animal, em compostos assimiláveis pelas enzimas, ou capazes de serem absorvidos diretamente no epitélio ruminal, como os AGCC (McDonald et al., 2011; Mackie et al., 2013). Em relação aos compostos nitrogenados metabolizado no rúmen, eles podem ser de origem dietética, na forma proteica ou não proteica, ou de origem endógena, proveniente da ureia reciclada, descamação epitelial, ou de origem microbiana (Teixeira, 2001). As proteínas dietéticas no rúmen são hidrolisadas a peptídeos e aminoácidos pelos microrganismos que, junto com a amônia produzida, são utilizados na síntese de proteína microbiana e geram alguns ácidos

orgânicos, como os ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR), amônia e CO<sub>2</sub> (McDonald et al., 2011).

O tipo de alimento consumido pelo animal, mais volumoso ou mais concentrado, com ou sem aditivos, com presença ou não de taninos, promove uma série de variações nas condições ruminais que interferem no processo fermentativo, afetando a estrutura da microbiota, o pH, a quantidade e o perfil de AGCC e a disponibilidade de nutrientes para a degradação ruminal. Com a avaliação de alguns parâmetros ruminais é possível revelar resultados significativos na digestão e no metabolismo dos alimentos avaliados e a relação desses parâmetros com a síntese de metano entérico.

### **2.7.1. Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)**

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), anteriormente conhecidos como ácidos graxos voláteis (AGV), são a principal fonte de energia utilizada pelos ruminantes totalizando de 60 a 80 % da energia diária metabolizada (Lana, 2007; Mackie et al., 2013). Os AGCC contêm até 7 átomos de carbono e os principais são: fórmico, acético, propiônico, láctico, butírico, isobutírico, succinato, valérico, isovalérico, 2-metil- butírico, hexanoico (ou caproico) e heptanoico; onde os predominantes são o acético, o propiônico e o butírico (Teixeira, 2001; Lana, 2007; Valadares Filho & Pina, 2011), e os demais correspondem a 4 % do total (Lana, 2007).

Os AGCC são produtos do processo fermentativo que é dividido em duas etapas: a primeira consiste na hidrólise, principalmente por bactérias, de polímeros de origem vegetal tais como celulose, hemicelulose, pectina, amido e dextrinas, e proteína, a oligômeros e monômeros; a segunda etapa compreende o metabolismo microbiano intracelular desses substratos, resultando na formação de células microbianas e a produção dos principais produtos finais da fermentação, acetato, propionato, butirato, CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> (McDonald et al., 2011; Valadares Filho & Pina, 2011; Mackie et al., 2013).

As variações na proporção dos AGCC são decorrentes da alimentação ingerida pelo ruminante onde alimentos volumosos elevam a proporção de acetato e alimentos mais degradáveis no rúmen elevam o teor de propionato, prevalecendo na maioria das vezes o teor de acetato sobre os demais AGCC (Teixeira, 2001; Lana, 2005; Hirstov et al., 2013). Normalmente a proporção acetato:propionato:butirato encontrada no rúmen é 65:21:14 (Mackie

et al., 2013) mas varia de acordo com a dieta, a espécie de ruminante e o tempo de amostragem em relação a alimentação, onde pode-se chegar a uma proporção de 74:17:7 em bovinos consumindo silagem e de 40:40:15 em ovinos consumindo uma dieta contendo 20 % de feno e 80 % de concentrado (McDonald et al., 2011) e apresentou uma variação de 7 % no teor do acetato e de 15 % no teor do propionato em ovinos ao longo do dia (Teixeira, 2001).

O teor de acetato e de propionato são importantes indicadores da emissão de CH<sub>4</sub> onde dietas com maior teor de propionato tendem a produzir menos CH<sub>4</sub> (Hirstov et al., 2013) pois a produção de propionato utiliza H<sub>2</sub> na sua formação enquanto a produção de acetato e butirato disponibiliza H<sub>2</sub> para o meio (Cottle et al., 2011), principal substrato na formação do CH<sub>4</sub> entérico no rúmen (Liu & Whitman, 2008).

### **2.7.2. pH ruminal**

O pH ruminal em situações normais varia de 5,5 a 7, onde as situações em que o pH se encontra mais ácido ocorrem imediatamente após a ingestão de concentrados, o pH médio é em torno de 6,4 e o pH ótimo para os organismos celulolíticos é 6,7 (Valadares Filho & Pina, 2011; Mackie et al., 2013). Valores de pH abaixo de 6,2 já retardam o processo de degradação da parede celular e abaixo de 6 ocorre diminuição significativa na síntese de proteína microbiana e inibição das bactérias celulolíticas (Valadares Filho & Pina, 2011).

O tipo de alimento ingerido também é determinante no pH ruminal. Quando são utilizados alimentos contendo grande proporção de grãos, sem a adequada adaptação do animal à dieta, o pH ruminal cai para níveis abaixo do normal, principalmente devido ao acúmulo de ácido lático, fruto do rápido crescimento dos microrganismos amilolíticos, o que reduz a microbiota e a diversidade dos organismos, podendo levar o animal a um quadro de acidose aguda (Mackie et al., 2002). O principal meio de controle do pH ruminal é a saliva com seu elevado pH de 8,1 e que apresenta sua secreção estimulada a partir de alimentos volumosos (Furlan et al., 2011), porém forragens de melhor qualidade, mais digestíveis também tendem a reduzir o pH ruminal, principalmente pelo aumento na taxa de passagem (Janssen, 2010).

Ambientes ruminais com pH mais ácido tendem a produzir menos CH<sub>4</sub>, quer seja pela maior presença de propionato e menor relação acetato:propionato, quer seja pela menor presença de protozoários e *Archaea* (Janssen, 2010; Sejian et al., 2011), mas o pH exclusivamente não é um fator para redução de CH<sub>4</sub> nem uma estratégia de mitigação

(Hünerberg et al., 2015). O pH estável também é importante na manutenção dos complexos formados entre TC e proteína que se dissociam em pH acima de 7,5 e inferior a 3,5, como ocorre nas exposições às secreções gástrica (pH 2,5-3,5) e pancreática (pH 8-9) (Bath et al., 2013).

### **2.7.3. Nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) no rúmen**

A proteína dietética em ruminantes é composta de uma fração degradável no rúmen (PDR) e outra parte que estará indisponível para o processo de degradação ruminal (PNDR) (Santos & Mendonça; 2011). No processo de fermentação ruminal, a PDR é hidrolisada a peptídeos e aminoácidos e, posteriormente, alguns aminoácidos são desaminados ou descarboxilados, resultando em AGCR, amônia (NH<sub>3</sub>) e CO<sub>2</sub> (Annison et al., 2002; Lana, 2007; McDonald et al., 2011; Santos & Pedroso, 2011).

A NH<sub>3</sub>, classificada como fração “A” do sistema Cornell de fracionamento de carboidratos e proteínas, é prontamente utilizada pelos microrganismos ruminais, principalmente bactérias fibrolíticas, na síntese de proteína microbiana, ou atravessa a parede ruminal e é transformada em ureia no fígado; parte é excretada via urina e o restante retorna via saliva ou por difusão através da parede ruminal (reciclagem da ureia) (Annison et al., 2002; McDonald et al., 2011; Silva & Silva, 2013).

O pico de concentração de NH<sub>3</sub> em ovinos se dá entre 2-4 h após a alimentação dos animais atingindo 0,4 g N-NH<sub>3</sub>/L de conteúdo ruminal (Annison et al., 2002). A concentração mais baixa de NH<sub>3</sub> é de 50 mg de N-NH<sub>3</sub>/L de conteúdo ruminal, e ocorrendo há quantidade insuficiente de proteína na dieta, ou com baixa disponibilidade desta proteína à degradação ruminal (McDonald et al., 2011). A baixa disponibilidade ao processo de degradação ruminal pode ser relacionado à presença de carboidratos (formação de proteína microbiana), alterações de pH e presença de complexos físicos (Mayllard) ou químicos (aminoácidos protegidos, taninos) (Lana, 2007).

Como os complexos de tanino e proteína se mantêm ligados em pH ruminal (Bath et al., 2013), a concentração de N-NH<sub>3</sub> pode funcionar como indicativo da atividade biológica do tanino em ambiente ruminal.

#### **2.7.4. Contagem de protozoários**

A contagem de protozoários é um indicador que traz informações a respeito do pH ruminal, pois esses microrganismos não resistem a pH inferior a 5 nem superior a 7,8 (Franzolin & Dehority, 2010) e auxiliam na estabilidade do pH devido ao consumo mais rápido de lactato do que o observado em bactérias (Newbold et al., 2015).

Outra importância deste indicador é a síntese de  $\text{CH}_4$  entérico, onde os protozoários apresentam elevada produção de acetato e butirato que liberam  $\text{H}_2$  através da biossíntese e sua forte relação às metanogênicas que sintetizam o  $\text{CH}_4$  em grande parte a partir do  $\text{H}_2$  livre em ambiente ruminal (Guyader et al., 2014).

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, A.L.; BUENO, I.C.S.; PEÇANHA, M.R.S.R.; et al. In vivo methane determination in a small chamber system. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, East Melbourne, v. 48, 2008. Presented at 3rd Greenhouse Gases and Animal Agriculture Conference, Christchurch, 2008.
- ABDALLA, A.L.; LOUVANDINI, H.; SALLAM, A.M.A.H.; et al. In vitro evaluation, in vivo quantification, and microbial diversity studies of nutritional strategies for reducing enteric methane production. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, p. 953-964, 2012.
- ALLEN, V.G.; BATELLO, C.; BERRETTA, E.J.; et al. An international terminology for grazing lands and grazing animals. **Grass and Forage Science**, 66, p. 2-28, 2011.
- ALLISON, M.J. Microbiologia do rúmen e intestinos delgado e grosso. In: SWENSON, M.J.; REECE, W.O. (Eds.) **DUKES Fisiologia dos Animais Domésticos**, Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, p. 380-389, 1996.
- ANNISON, E.F.; LINDSAY, D.B.; NOLAN, J.V. Digestion and Metabolism. In: FREER, M.; DOVE, H. (Eds.) **Sheep Nutrition**, Canberra-AU: CSIRO Plant Industry, p. 95-118, 2002.
- ARCHIMÈDE, H.; EUGÈNE, M.; MARIE MAGDELEINE, C.; et al. Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and legumes. **Animal Feed Science and Technology**, 166-167, p. 59-64, 2011.
- ARCURI, P.B.; LOPES, F.C.F.; CARNEIRO, J.C. Microbiologia do rúmen. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G.O. (Eds.) **Nutrição de Ruminantes**, Jaboticabal: FUNEP, p. 115-160, 2011.

- ARF, O.; DE SÁ, M. E.; BUZETTI, S. Incorporação de mucuna-preta e de restos culturais de milho antes da cultura do feijão (*phaseolus vulgaris* l.) de inverno. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 31, n. 8, p. 563-568, 1996.
- ASSIS, S.O.; MANCIO, A.B. Contribuições para a integração de ovinos ao café em um sistema agroflorestal. In: **VII Congresso Brasileiro de Sistemas Agroflorestais**. Luziânia-GO, 2009. Disponível em: < <http://www.sct.embrapa.br/cdagro/tema01/01tema34.pdf>> Acesso em 17.5.2015.
- BARBER, R.D. Methanogenesis: Ecology. In: **eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester**. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000475.pub2, p. 1-8, 2007.
- BARCELLOS, A.O.; ANDRADE, R.P.; KARIA, C.T.; et al. Potencial e uso de leguminosas forrageiras dos gêneros *Stylosanthes*, *Arachis* e *Leucaena*. In: PEIXOTO, A.M.; PEDREIRA, C.G.S.; MOURA, J.C.; et al. (Eds.) **Anais do 17º Simpósio sobre Manejo da Pastagem: A Planta Forrageira no Sistema de Produção**, Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz – FEALQ, p.365-425, 2001.
- BEEVER, D.E.; MOULD, F.L. Forage Evaluation for Efficient Ruminant Livestock Production. In: GIVENS, D. I.; OWEN, E.; AXFORD, R. F. E.; et al. (Eds.) **Forage Evaluation in Ruminant Nutrition**. Oxon: CAB International, 2000. p. 15-42.
- BEN SALEM, H.; MAKKAR, H.P.S.; NEFZAOU, A. Towards better utilisation of non-conventional feed sources by sheep and goats in some African and Asian countries. In: BEN SALEM, H.; NEFZAOU, A.; MORAND-FEHR, P. (Eds.) **Nutrition and feeding strategies of sheep and goats under harsh climates**. Zaragoza: CIHEAM, 2004. p. 177-187 (Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens; n . 59 ).
- BEN SALEM, H.; NEFZAOU, A.; MAKKAR, H.P.S. Feed supplementation blocks for increased utilization of tanniniferous foliages by ruminants. In: MAKKAR, H.P.S.; SÁNCHEZ, M.; SPEEDY, A.W. (Eds.) **Feed Supplementation Blocks – Urea-molasses multinutrient blocks: simple and effective feed supplement technology for ruminant agriculture**. Rome: FAO, 2007. p. 185-205.
- BERENDS, H.; GERRITS, W.J.J.; FRANCE, J.; et al. Evaluation of the SF<sub>6</sub> tracer technique for estimating methane emission rates with reference to dairy cow using a mechanistic model. **Journal os Theoretical Biology**, v. 353, p. 1-8, 2014.

- BERNDT, A.; BOLAND, T.M.; DEIGHTON, M.H.; et al. **Guidelines for use of sulphur hexafluoride (SF6) tracer technique to measure enteric methane emissions from ruminants**. Ministry for Primary Industries, New Zealand, 166 p., 2014.
- BHAT, T.K.; KANNAN, A.; BIRBAL SINGH; et al. Value Addition of Feed and Fodder by Alleviating the Antinutritional Effects of Tannins. **Agricultural Research**, v. 2, n. 3, p. 189-206, 2013.
- BHATTA, R.; TAJIMA, K.; TAKUSARI, N.; et al. Comparison of sulfur hexafluoride tracer technique, rumen simulation technique and in vitro gas production techniques for methane production from ruminant feeds. **International Congress Series**, v. 1293, p. 58-61, 2006.
- BHATTA, R.; ENISHI, O.; TAKUSARI, N.; et al. Diet effects on methane production by goats and a comparison between measurement methodologies. **Journal of Agricultural Science**, v. 146, p. 705-715, 2008.
- BHATTA, R.; SARAVANAN, M.; BARUAH, L; et al. Nutrient content, in vitro ruminal fermentation characteristics and methane reduction potential of tropical tannin-containing leaves. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 2929-2935, 2012.
- BORGES, A. L.; TRINDADE, A. V.; SOUZA, L. S.; et al. **Cultivo Orgânico de Fruteiras Tropicais – Manejo do Solo e da Cultura**. Cruz das Almas, BA: EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa em Mandioca e Fruticultura – CNPMF, Circular Técnica nº. 64 de 2003.
- BRASIL. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Resolução nº 1, de 15 de janeiro de 2013**. Diário Oficial da União – Seção 1, nº16 de 23 de janeiro, 2013.
- BROUCEK, J. Production of Methane Emissions from Ruminant Husbandry: A Review. **Journal of Environmental Protection**, v. 5, p. 1482-1493, 2014.
- BRUINSMA, J. Expert Meeting on How to Feed the World in 2050 The resource outlook to 2050: **By how much do land, water use and crop yields need to increase by 2050?** Rome: FAO and ESDD, 2009.

- BUENO, I.C.S.; CABRAL FILHO, S.L.S.; GOBBO, S.P.; et al. Influence of inoculum source in a gas production method. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 123-124, p. 95-105, 2005.
- BUENO, J. R.; SAKAI, R. H.; NEGRINI, A. C. et al. Caracterização química e produtividade de biomassa de quatro espécies de mucuna. Resumos do V CBA – Manejo de Agroecossistemas Sustentáveis. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, n. 2, p. 901-904, 2007.
- BUSTAMANTE, M.M.C.; NOBRE, C.A.; SMERALDI, R.; et al. Estimating greenhouse gas emissions from cattle raising in Brazil. **Climatic Change**, 115, p. 559-577, 2012.
- CALSAMIGLIA, S.; STERN, M.D. A 3-step *in vitro* procedure for estimating intestinal digestion of protein in ruminants. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 73, p. 1459-1465, 1995.
- CAMARÃO, A.P.; AZEVEDO, G.P.C. Formação e utilização de banco de proteína. In: VEIGA, J.B. (Ed.) **Criação de Gado Leiteiro na Zona Bragantina**. Manaus-AM: Embrapa Amazônia Oriental, 2005. (Sistemas de Produção / Embrapa Amazônia Oriental, ISSN 1809-4325: 2) Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/GadoLeiteiroZonaBragantina/index.htm>> Acesso em 24/3/2015.
- CARVALHO, P.C.F.; POLI, C.H.E.C.; HERINGER, I.; et al. Normas racionais de manejo de pastagens para ovinos em sistema exclusivo e integrado com bovinos. In: SIQUEIRA, E.R. (Org.) **Anais do VI Simpósio Paulista de Ovinocultura**. Botucatu: 6 ed., v. 1, 2002, p. 21-50.
- CARVALHO, P.C.F.; SANTOS, D.T.; BARBOSA, C.M.P.; et al. Otimizando o uso da pastagem pela integração de ovinos e bovinos. In: ZOOTEC, 2005. **Anais ZOOTEC 2005**. Campo Grande-MS: ZOOTEC, p. 1-30, 2005.
- CEZAR, I.M.; QUEIROZ, H.P.; THIAGO, L.R.L.S.; et al. **Sistemas de produção de gado de corte no Brasil: uma descrição com ênfase no regime alimentar e no abate**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2005, 40p. (Documentos / Embrapa Gado de Corte, ISSN 1517-3747 ; 151)

- CIESLAK, A.; SZUMACHER-STRABEL, M.; STOCHMAL, A.; et al. Plant components with specific activities against rumen methanogens. **Animal**, v. 7, n. s2, p. 253–265, 2013.
- COOP, I. E. Increased production and utilization of pasture and forage. In: TIMON, V.M.; HANRAHAN, J.P. (Eds.) **Small ruminant production in the developing countries**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO, 1986. p. 52-60.
- CORRÊA, G.F.; ROHENKOHL, J.E.; OSÓRIO, M.T.M. Agronegócio de Leite de Ovinos. In: SELAIVE, A.B.; OSÓRIO, J.C.S. (Eds.) **Produção de Ovinos no Brasil**. São Paulo: Roca, 2014. p. 589-599.
- CORSI, M.; MARTHA JR., G.B.; BALSALOBRE, M.A.A. et al. Tendências e perspectivas da produção de bovinos sob pastejo. In: PEIXOTO, A.M.; PEDREIRA, C.G.S.; MOURA, J.C.; et al. (Eds.) **Anais do 17º Simpósio sobre Manejo da Pastagem: A Planta Forrageira no Sistema de Produção**, Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz – FEALQ, 2001. p. 3-69.
- COTTLE, D.J.; NOLAN, J.V.; WIEDEMANN, S.G. Ruminant enteric methane mitigation: a review. **Animal Production Science**, 51, p. 491–514, 2011.
- DELGADO, D.C.; GALINDO, J.; GONZÁLEZ, L.; et al. Potential of Tropical Plants to Exert Defaunating Effects on the Rumen and to Reduce Methane Production. In: N.E. Odongo, M. Garcia & G.J. Viljoen (Eds) **Sustainable Improvement of Animal Production and Health**. Rome: FAO, p. 49–54, 2010.
- DIAS-FILHO, M.B. Os desafios da produção animal em pastagens na fronteira agrícola brasileira. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40 (supl. especial), p.243-252, 2011.
- ECKARD, R.J.; GRAINGER, C.; KLEIN, C.A.M. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: A review. **Livestock Science**, 130, p. 47-56, 2010.
- ELLIS, J.L.; KEBREAB, E.; ODONGO, N.E.; et al. Prediction of Methane Production from Dairy and Beef Cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 3456–3467, 2007.

- FERREIRA, L.G.; FERNANDEZ, L.E.; SANO, E.E; et al. Biophysical Properties of Cultivated Pastures in the Brazilian Savanna Biome: An Analysis in the Spatial-Temporal Domains Based on Ground and Satellite Data. **Remote Sensing**, 5, p. 307-326, 2013.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. **The FAOSTAT System**. Disponível no site: <http://faostat3.fao.org/home/E>. (Acesso em: 14.5.2015).
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. **Livestock's long shadow environmental issues and options**. Rome: FAO, 309 p., 2006.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. **The state of food and agriculture – Livestock in the balance**. Rome: FAO, 166 p., 2009.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. **Tackling Climate Change Through Livestock – A global assessment of emissions and mitigation opportunities**. Rome: FAO, 115 p., 2013.
- FRANZOLIN, R.; DEHORITY, B.A. The role of pH on the survival of rumen protozoa in steers. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 2262-2267, 2010.
- FRUTOS, P.; HERVÁS, G.; GIRÁLDEZ, F. J.; et al. Review. Tannins and ruminant nutrition. **Spanish Journal of Agricultural Research**, 2 (2), p. 191-202, 2004.
- FURLAN, R.L.; MACARI, M.; FARIA FILHO, D.E. Anatomia e fisiologia do trato gastrointestinal. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G.O. (Eds.) **Nutrição de Ruminantes**, Jaboticabal: FUNEP, p. 1-27, 2011.
- GETACHEW, G.; BLÜMMEL, M.; MAKKAR, H.P.S.; et al. In vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. **Animal Feed Science and Technology**. v. 72, p. 261-281, 1998.
- GETACHEW, G.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Method of polyethylene glycol application to tannin-containing browses to improve microbial fermentation and efficiency of microbial protein synthesis from tannin-containing browses. **Animal Feed Science and Technology**. v. 92, p. 51-57, 2001.
- GRUNINGER, R.J.; PUNIYA, A.K.; CALLAGHAN, T.M.; et al. Anaerobic fungi (phylum Neocallimastigomycota): advances in understanding their taxonomy, life cycle,

- ecology, role and biotechnological potential. **FEMS Microbiol Ecology**, v. 90, p. 1-17, 2014.
- GUIMARÃES, V.P.; SOUZA, J.D.F. Aspectos Gerais da Ovinocultura no Brasil. In: SELAIVE, A.B.; OSÓRIO, J.C.S. (Eds.) **Produção de Ovinos no Brasil**. São Paulo: Roca, 2014. p. 3-11.
- GUIMARÃES-BEELLEN, P. M.; BERCHIELLI, T. T.; BEELEN R. Efeitos dos taninos condensados de forrageiras nativas do semi-árido nordestino sobre o crescimento e atividades celulolíticas de *Ruminococcus flavefaciens* FD1. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 910-917, 2006.
- GUYADER, J.; EUGÈNE, M.; NOZIÈRE, P.; et al. Influence of rumen protozoa on methane emission in ruminants: a meta-analysis approach. **Animal**, v. 8, n. 11, p. 1816-1825, 2014.
- HAMMOND, K.J.; CROMPTON, L.A.; BANNIK, A.; et al. Review of current in vivo measurement techniques for quantifying enteric methane emission from ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v. 219, p. 13–30, 2016.
- HILL, J.; MCSWEENEY, C.; WRIGHT, A.D.G.; et al. Measuring Methane Production from Ruminants. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 1, p. 26-35, 2016.
- HRISTOV, A.N; OH, J.; FIRKINS, J.L.; et al. SPECIAL TOPICS—Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. **Journal of Animal Science**, v. 91, p. 5045-5069, 2013.
- HOSTE, H.; TORRES-ACOSTA, J.F.J.; SANDOVAL-CASTRO, C.A.; et al. Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock. **Veterinary Parasitology**, v. 212, p. 5-17, 2015.
- HUNGATE, R.E.; SMITH, W.; BAUCHOP, T.; et al. Formate as an Intermediate in the Bovine Rumen Fermentation. **Journal of Bacteriology**. v. 102, n. 2, p. 389-397, 1970.
- HÜNERBERG, M.; MCGINN, S.M.; BEAUCHEMIN, K.A.; et al. Impact of ruminal pH on enteric methane emissions. **Journal of Animal Science**, v. 93, p. 1760-1766, 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Disponível no site: [www.sidra.ibge.gov.br](http://www.sidra.ibge.gov.br) (Acesso em 17.6.2015).

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE – IPCC. **Climate Change 1995: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Second Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**, 1995.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE – IPCC. **Climate Change 2001: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**, 2001.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE – IPCC. **Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**, 2007.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE – IPCC. **Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**, 2013.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE – IPCC. **Climate Change 2014: Mitigation of Climate Change Working Group III Contribution to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**, 2014a.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE – IPCC. **Climate Change 2014: Synthesis Report**, 2014b.

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

JAYANEGARA, A.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Addition of Purified Tannin Sources and Polyethylene Glycol Treatment on Methane Emission and Rumen Fermentation *in vitro*. **Media Peternakan**. 38 (1), p. 57-63, 2015.

- JERBA, V.F.; MEDEIROS, S.R.; FERNANDES, C.D. **Forrageiras: Principais Fatores de Antiquidade**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2004, 38p. (Documentos / Embrapa Gado de Corte, ISSN 1517-3747 ; 150).
- JOHNSON, D.E.; WARD, G.M. Estimates of animal methane emissions. **Environmental Monitoring and Assessment**, n. 42, p. 133-141, 1996.
- JOHNSON, K.; HUYLER, M.; WESTBERG, H; et al. Measurement of Methane Emissions from Ruminant Livestock Using a SF<sub>6</sub> Tracer Technique. **Environmental Science & Technology**, v. 28, p. 359-362, 1994.
- JOHNSON, K.A.; JOHNSON, D.E. Methane Emissions from Cattle. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 2483-2492, 1995.
- JONES, W.T.; MANGAN, J.L. Complexes of the Condensed Tannins of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) with Fraction 1 Leaf Protein and with Submaxillary Mucoprotein, and their Reversal by Polyethylene Glycol and Ph. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 28, p. 126-136, 1977.
- KEBREAB, E.; CLARK, K.; WAGNER-RIDDLE, C.; et al. Methane and nitrous oxide emissions from Canadian animal agriculture: A review. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 86, n. 2, p. 135-157, 2006.
- KRUEGER, W.K.; GUTIERREZ-BAÑUELOS, H.; CARSTENS, G.E.; et al. Effects of dietary tannin source on performance, feed efficiency, ruminal fermentation, and carcass and non-carcass traits in steers fed a high-grain diet. **Animal Feed Science and Technology**, 159, p.1-9, 2010.
- KUMAR, R.; SINGH, M. Tannins: Their Adverse Role in Ruminant Nutrition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 32, p. 447-453, 1984.
- LA O, O.; CHONGO, B.; DELGADO, D. et al. Chemical composition, protein fractionation and rumen digestion of mucuna (*Stizolobium aterrimum*) components. **Cuban Journal of Agricultural Science**, v. 40, n. 3, p. 287-291, 2006.
- LANA, R.P. **Nutrição e alimentação animal (mitos e realidades)**. Viçosa: UFV, 344 p., 2007.

- LASSEY, K. R.; WALKER, C. F.; MCMILLAN, A. M. S.; et al. On the performance of SF<sub>6</sub> permeation tube used in determining methane emissions from grazing livestock. **Chemosphere-Global Change Science**, v. 3, p. 367-376, 2001.
- LASSEY, K.R. Livestock methane emission: From the individual grazing animal through national inventories to the global methane cycle. **Agricultural and Forest Meteorology**. 142, p. 120–132, 2007.
- LIMA, J.B.M.P.; RODRIGUEZ, N.M.; MARTHA JÚNIOR, G.B.; et al. [2012]. Suplementação de novilhos Nelore sob pastejo, no período de transição águas-seca. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.64, n.4, p.943-952, 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v64n4/v64n4a22.pdf>> Acesso em: 04/03/2015.
- LIMA, P.M.T.; MOREIRA, G.D.; LOUVANDINI, H.; et al. Adaptations of the methane determination SF<sub>6</sub> tracer technique from bovine to sheep in Brazil. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS - WBC, 26., 2010 Santiago, Chile. **Proceedings...** Santiago, Chile: WBC, 2010.
- LIU, Y.; WHITMAN, W.B. Metabolic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of the Methanogenic Archaea. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 1125, p. 171–189, 2008.
- LONGO, C. Avaliação *in vitro* de leguminosas taniníferas tropicais para mitigação de metano entérico. Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- LONGO, C.; BUENO, I. C.; NOZELLA, E. F.; et al. The influence of head space and inoculum dilution on *in vitro* ruminal methane measurement. **International Congress Series**, v. 1293, p. 62-65, 2006.
- LONGO, C.; HUMMEL, J.; LIEBICH, J.; et al. Chemical characterization and *in vitro* biological activity of four tropical legumes, *Stylobium aterrimum* L., *Stylobium deeringianum*, *Leucaena leucocephala*, and *Mimosa caesalpiniaefolia*, as compared with a tropical grass, *Cynodon* spp. for the use in ruminant diets. **Czech Journal of Animal Science**, v. 57, n. 6, p. 225-264, 2012.

- LOPES, S.G.; BARROS, L.B.G.; LOUVANDINI, H.; et al. Effect of tanniferous food from *Bauhinia pulchella* on pasture contamination with gastrointestinal nematodes from goats. **Parasites & Vectors**, n. 9, v. 102, p. 1-7, 2016.
- LOUVANDINI, H., ABDALLA, A. L., McMANUS, C., et al. Plantas taniníferas na nutrição de ovinos. **Veterinária e Zootecnia**, 18(4 supl. 3), p. 176-181, 2011.
- MACHADO, F. S.; PEREIRA, L. G. R.; GUIMARÃES JÚNIOR, R.; et al. **Emissões de metano na pecuária: conceitos, métodos de avaliação e estratégias de mitigação**. Juiz de Fora, MG: EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Leite – CNPGL, Documento nº. 147 de 2011.
- MACIEL, M. V.; MORAIS, S. M.; BEVILAQUA, C. M. I.; et al. Ovicidal and larvicidal activity of *Melia azedarach* extracts on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, xxx, p. xxx-xxx, 2006.
- MACKIE, R.I.; MCSWEENEY, C.S.; KLIEVE, A.V. Microbial Ecology of the Ovine Rumen. In: FREER, M.; DOVE, H. (Eds.) **Sheep Nutrition**, Canberra-AU: CSIRO Plant Industry, p. 71-94, 2002.
- MACKIE, R.I.; MCSWEENEY, C.S.; AMINOV, R.I. Rumen. In: **eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester**. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000404.pub2, p. 1-17, 2013.
- MADSEN, J.; BERTELSEN, M.F. Methane production by red-necked wallabies (*Macropus rufogriseus*). **Journal of Animal Science**, 90, p. 1364-1370, 2012.
- MAKKAR, H. P. S. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. **Small Ruminant Research**, n. 49, p. 241–256, 2003.
- MAKKAR, H.P.S.; BLÜMMEL, M.; BECKER, K. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in in vitro techniques. **British Journal of Nutrition**, 73, p. 897-913, 1995.
- MARTHA JR, G.B.; VILELA, L.; BARCELLOS, A.O.; et al. Pecuária de corte no Cerrado: aspectos históricos e conjunturais. In: MARTHA JR, G.B.; VILELA, L.; SOUSA,

- D.M.G. (Ed.) **CERRADO Uso Eficiente de corretivos e Fertilizantes em Pastagens**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. p. 17-42.
- MARTHA JR, G.B.; VILELA, L. Uso de fertilizantes em pastagens. In: MARTHA JR, G.B.; VILELA, L.; SOUSA, D.M.G. (Ed.) **CERRADO Uso Eficiente de corretivos e Fertilizantes em Pastagens**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. p. 43-68.
- MARTHA JR, G.B.; ALVES, E.; CONTINI, E. Land-saving approaches and beef production growth in Brazil. **Agricultural Systems**. v. 110, 2012, p. 173–177.
- MAX, R. A.; KASSUKU, A. A.; KIMAMBO, A. E.; et al. The effect of wattle tannin drenches on gastrointestinal nematodes of tropical sheep and goats during experimental and natural infections. **Journal of Agricultural Science**, v. 147, p. 211-218, 2009.
- MCDONALD, P.; EDWARDS, R.A.; GREENHALGH, J.F.D.; et al. **Animal Nutrition**, Harlow, Pearson, 692 p, 2011.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. **Projeções do Agronegócio : Brasil 2013/2014 a 2023/2024 projeções de longo prazo**. 2014.
- MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO – MCTI. **Segunda Comunicação Nacional do Brasil à Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre Mudança do Clima**. 2010.
- MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO – MCTI. **Estimativas Anuais de Emissões de Gases de Efeito Estufa no Brasil**. 2ª edição. 2014.
- MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR – MDIC. Sistema Radar Comercial. Disponível no site: <http://radarcomercial.desenvolvimento.gov.br/> (Acesso em 14.5.2015).
- MILLER, M.E.B.; YEOMAN, C.J.; CHIA, N.; et al. Phage–bacteria relationships and CRISPR elements revealed by a metagenomic survey of the rumen microbiome. **Environmental Microbiology** v. 14, n. 1, p. 207–227, 2012.
- MORAES, L.E.; STRATHE, A.B.; FADEL, J.G.; et al. Prediction of enteric methane emissions from cattle. **Global Change Biology**, v. 20, p. 2140–2148, 2014.

- MOREIRA, G. D.; LIMA, P. M. T.; BORGES, B. O.; et al. Tropical tanniniferous legumes used as an option to mitigate sheep enteric methane emission. **Tropical Animal Health and Production**, DOI 10.1007/s11250-012-0284-0, 2013.
- MOREIRA, G. D. **Desempenho, características de carcaça e emissão de metano em ovinos suplementados com leucena, mucuna-preta e sansão do campo**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2010 59p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2010.
- MORGAVI, D.P.; FORANO, E.; MARTIN, C.; et al. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. **Animal**, v. 4, n. 7, p. 1024-1036, 2010.
- MUÑOZ, C.; YAN, T.; WILLS, D.A.; et al. Comparison of the sulfur hexafluoride tracer and respiration chamber techniques for estimating methane emissions and correction for rectum methane output from dairy cows. **Journal of Dairy Science**, vol. 95, n. 6, 2012, p. 3139–3148.
- MURAY, R.M.; BRYANT, A.M.; LENG, R.A. Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. **British Journal of Nutrition**. 36, p. 1-14, 1976.
- NA, R.; DONG, H.; ZHU, Z.; et al. Effects of Forage Type and Dietary Concentrate to Forage Ratio on Methane Emissions and Rumen Fermentation Characteristics of Dairy Cows in China. **American Society of Agricultural and Biological Engineers**. Vol. 56(3), 2013, p. 1115-1122.
- NASCIMENTO, J. T. & DA SILVA, I. F. Avaliação quantitativa e qualitativa da fitomassa de leguminosas para uso como cobertura de solo. **Ciência Rural**, v. 34, n. 3, p. 947-949, 2004.
- NEWBOLD, C.J.; DE LA FUENTE, G.; BELANCHE, A.; et al. The Role of Ciliate Protozoa in the Rumen. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 1313, p. 1-14, 2015.
- NGUYEN, S.H.; BREMNER, G.; CAMERON, M.; et al. Methane emissions, ruminal characteristics and nitrogen utilisation changes after refaunation of protozoa-free sheep. **Small Ruminant Research**, v. 144, p. 48–55, 2016.

- NJIDDA, A.A. Chemical Composition, Fibre Fraction and Anti-Nutritional Substances of Semi-arid Browse Forages of North-Eastern Nigeria. **Nigerian Journal of Basic and Applied Science**, 18(2), p. 181-188, 2010.
- OLIVEIRA, S. G.; BERCHIELLI, T. T. Potencialidades da utilização de taninos na conservação de forragens e nutrição de ruminantes-revisão. **Archives of Veterinary Science**, v. 12, n. 1, p. 1-9, 2007.
- OMINISKY, K. H. & WITTENBERG, K. M. Strategies for reducing enteric methane emissions in forage-based beef production systems, IN: **The Science of Changing Climates-Impact on Agriculture, Forestry and Wetlands**. Canada, Alberta University, Alberta Canadian Society of Agronomy, Animal Science, and Soil Science, 2004.
- PEDREIRA, M. S.; OLIVEIRA, S. G.; BERCHIELLI, T. T.; et al. Aspectos relacionados com a emissão de metano de origem ruminal em sistemas de produção de bovinos. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 3, p. 24-32, 2005.
- PINARES-PATIÑO, C.S.; HOLMES, C.W.; LASSEY, K.R.; et al. Measurement of methane emission from sheep by the sulphur hexafluoride tracer technique and by the calorimetric chamber: failure and success. **The Animal Consortium**, 2:1, p. 141 – 148, 2008.
- POLI, C.H.E.C.; OSÓRIO, J.C.S. Introdução e conceitos básicos. In: SELAIVE, A.B.; OSÓRIO, J.C.S. (Eds.) **Produção de Ovinos no Brasil**. São Paulo: Roca, 2014. p. 99-101.
- PRIMAVESI, O; FRIGHETTO, R. T. S.; PEDREIRA, M. A.; et al. **Técnica do gás traçador SF<sub>6</sub> para medição de campo do metano ruminal em bovinos: adaptações para o Brasil**. São Carlos, SP: EMBRAPA, Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste – CPPSE, Documento 39 de 2004.
- PUCHALA, R.; MIN, B. R.; GOETSCH, A. L.; et al. The effect of condensed tannin-containing forage on methane emission by goats. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 182-186, 2005.

- RAMIREZ-RASTREPO, C. A.; BARRY, T. N.; MARRINER, A.; et al. Effects of grazing willow fodder blocks upon methane production and blood composition in young sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v. 155, p. 33-43, 2010.
- REIS, R. A.; MORAIS, J. A. S.; SIQUEIRA, G. R. Aditivos Alternativos para a Alimentação de Ruminantes. **Anais... II congresso Latino-Americano de Nutrição animal – II CLANA**, São Paulo, 2006.
- ROMNEY, D.L.; GILL, M. Intake of Forages. In: GIVENS, D. I.; OWEN, E.; AXFORD, R. F. E.; et al. (Ed.) **Forage Evaluation in Ruminant Nutrition**. Oxon: CAB International, 2000. p. 43-62.
- RYMER, C.; HUNTINGTON, J.A.; WILLIAMS, B.A.; et al. In vitro cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. **Animal Feed Science and Technology**, v.123-124, p. 9-30, 2005.
- SANTOS, F.A.P.; PEDROSO, A.M. Metabolismo de proteínas. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G.O. (Eds.) **Nutrição de Ruminantes**, Jaboticabal: FUNEP, p. 265-297, 2011.
- SANTOS, Viviane Rodrigues Verdolin dos. **Efeito dos sistemas de pastejo isolado, simultâneo e alternado de ovinos com bovinos sobre as características da forragem, desempenho, consumo e características de carcaça dos ovinos**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2010 101p. Tese (Doutorado em Ciências Animais) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2010.
- SAVÓN, L.; SCULL, I.; ORTA, M. et al. Integral foliage meals of three tropical legumes for poultry feeding. Chemical composition, physical properties phytochemical screening. **Cuban Journal of Agricultural Science**, v. 41, n. 4, p. 339-341, 2007.
- SCOTT, J.T.; ROBERTSON, F.A. Environmental Effects of Sheep Farming. In: MCDOWELL, R.W. (Ed.) **Environmental Impacts of Pasture-based Farming**. London: CAB International, p. 146-186, 2008.
- SEJIAN, V.; LAL, R; LAKRITZ, J.; et al. Measurement and prediction of enteric methane emission. **International Journal of Biometeorology**, v. 55, p. 1-16, 2011.

- SEKHAVATI, M.H.; MESGARAN, M.D.; NASSIRI, M.R.; et al. Development and use of quantitative competitive PCR assays for relative quantifying rumen anaerobic fungal populations in both in vitro and in vivo systems. **Mycological Research**, v. 113, p. 1146-1153, 2009.
- SENO, M. S.; GOMES, L; CORTELAZZO, A. L. Caracterização do material de reserva em feijão-guandú, lablabe e mucuna. **Bragantia**, v. 55(1), p. 57-65, 1996.
- SERESINHE, T.; PATHIRANA, K.K. [2003]. Forage tannins in ruminant nutrition. **Tropical Agricultural Research and Extension**. v. 6, 2003. Disponível em: <<http://dl.nsf.ac.lk/bitstream/handle/1/8168/TARE-6-29.pdf?sequence=2>> Acesso em: 27/04/2015.
- SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS - SEBRAE. **Informações de Mercado sobre Caprinos e Ovinos – Relatório Completo**. Série Mercado, 2005.
- SILANIKOVE, N.; GILBOA, N.; NIR, I.; et al. Effect of a Daily Supplementation of Polyethylene Glycol on Intake and Digestion of Tannin-Containing Leaves (*Quercus calliprinos*, *Pistacia lentiscus*, and *Ceratonia siliqua*) by Goats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 44, p. 199-205, 1996.
- SILANIKOVE, N.; NITSAN, Z.; PEREVOLOTSKY, A. Effect of a Daily Supplementation of Polyethylene Glycol on Intake and Digestion of Tannin-Containing Leaves (*Ceratonia siliqua*) by Sheep. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 42, p. 2844-2847, 1994.
- SILVA, F.F.; SÁ, J.F.; SCHIO, A.R.; et al. [2009]. Suplementação a pasto: disponibilidade e qualidade x níveis de suplementação x desempenho. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.38, p.371-389, 2009 (supl. especial). Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbz/v38nspe/v38nspea37.pdf>> Acesso em: 04/03/2015.
- SILVA, S.C.; SBRISIA, A.F. A Planta forrageira no Sistema de Produção. In: PEIXOTO, A.M.; PEDREIRA, C.G.S.; MOURA, J.C.; et al. (Eds.) **Anais do 17º Simpósio sobre Manejo da Pastagem: A Planta Forrageira no Sistema de Produção**, Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz – FEALQ, 2001. p.71-88.

- SILVA, S.P.; SILVA, M.M.C. Fracionamento de carboidrato e proteína segundo o sistema CNCPS. **Veterinária Notícias**, Uberlândia: v. 19, n. 2, p.95-108, 2013.
- SILVA SOBRINHO, A.G. **Criação de Ovinos**. Jaboticabal-SP: Funep, 2006, 302p.
- SILVA SOBRINHO, A.G. [2009] Sistemas agrossilvipastoris na ovinocultura e integração com outras espécies animais. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**. v. 3, n. 4, p. 35-41, 2009. Disponível em: <[http://www.emepa.org.br/revista/volumes/tca\\_v3\\_n4\\_dez/tca04\\_sistemas.pdf](http://www.emepa.org.br/revista/volumes/tca_v3_n4_dez/tca04_sistemas.pdf)> Acesso em: 16/5/2015.
- SILVA SOBRINHO, A.G. Integração de ovinos com outras espécies animais e vegetais. In: SILVA SOBRINHO, A.G.; BATISTA, A.M.V.; SIQUEIRA, E.R.; et al. **Nutrição de ovinos**. Jaboticabal: FUNEP. 1996. p. 143-173.
- SILVA SOBRINHO, A.G. Nutrição e alimentação de ovinos. In: SELAIVE, A.B.; OSÓRIO, J.C.S. (Eds.) **Produção de Ovinos no Brasil**. São Paulo: Roca, 2014. p. 239-259.
- SOLTAN, Y.A.; MORSY, A.S.; SALLAM, S.M.A.; et al. Contribution of condensed tannins and mimosine to the methane mitigation caused by feeding *Leucaena leucocephala*. **Archives of Animal Nutrition**. Vol. 67, No. 3, p. 169–184, 2013.
- STAMFORD, N. P. & DA SILVA, R. A. EFEITO DA CALAGEM E INOCULAÇÃO DE SABIÁ EM SOLO DA MATA ÚMIDA E DO SEMI-ÁRIDO DE PERNAMBUCO. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 5, p. 1037-1045, 2000.
- STORM, I.M.L.D.; HELLWING, A.L.F.; NIELSEN, N.I.; et al. Methods for Measuring and Estimating Methane Emission from Ruminants. **Animals**, v. 2, p.160-183, 2012.
- TADELE, Y. Important Anti-Nutritional Substances and Inherent Toxicants of Feeds. **Food Science and Quality Management**, v. 36, p. 40-47, 2015.
- TEIXEIRA, J.C. **Nutrição de Ruminantes**. Lavras: UFLA/FAEPE, 183 p., 2001.
- TYMENSEN, L.; BARKLEY, C.; MCALLISTER, T.A. Relative diversity and community structure analysis of rumen protozoa according to T-RFLP and microscopic methods. **Journal of Microbiological Methods**, v. 88, p. 1–6, 2012.

- TSHABALALA, T.; SIKOSANA, J.L.N.; CHIVANDI, E. Nutrient intake, digestibility and nitrogen retention in indigenous goats fed on *Acacia nilotica* fruits treated for condensed tannins. **South African Journal of Animal Science**. 43, n. 4, 2013
- UNITED NATIONS – UN [2015a]. Department of Economic and Social Affairs. **World Population Prospects – The 2015 Revision – Key Findings and Advance Tables**. New York, 2015.
- UNITED NATIONS – UN [2015b]. Population Division of the Department of Economic and Social Affairs. **World Population Prospects: The 2015 Revision, DVD Edition**. Disponível em: < <http://esa.un.org/unpd/wpp/DVD/>> Acesso em: 15.10.2015.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA. **Meat Animals Production, Disposition, and Income – 2013 Summary**. 2014.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – USEPA. **Inventory of U.S. Greenhouse Gas Emissions and Sinks: 1990 – 2013**, U. S. Environmental Protection Agency: Washington-DC, 2015.
- VALADARES FILHO, S.C.; PINA, D.S. Fermentação ruminal. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G.O. (Eds.) **Nutrição de Ruminantes**, Jaboticabal: FUNEP, p. 161-191, 2011.
- VALENTIM, J.F.; CARNEIRO, J.C. *A Phueraria phaseoloides e Calopogonium mucunoides*. In: PEIXOTO, A.M.; PEDREIRA, C.G.S.; MOURA, J.C.; et al. (Eds.) **Anais do 17º Simpósio sobre Manejo da Pastagem: A Planta Forrageira no Sistema de Produção**, Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz – FEALQ, 2001. p.427-458.
- VALLE, C. B.; EUCLIDES, V. P. B.; MACEDO, M. C. M. Características das plantas forrageiras do gênero *Brachiaria*. In: PEIXOTO, A.M.; PEDREIRA, C.G.S.; MOURA, J.C.; et al. (Eds.) **Anais do 17º Simpósio sobre Manejo da Pastagem: A Planta Forrageira no Sistema de Produção**, Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz – FEALQ, 2001. p.133-176.
- VALVERDE, C.C. **250 Maneiras de Preparar Rações Balanceadas para Ovinos**. Viçosa-MG: Aprenda Fácil, 2000, 180p.

- VASTA, V.; LANZA, M.; PENNISI, P.; et al. Effect of dietary condensed tannins on lamb intramuscular fatty acids. In: PRIOLO, A.; BIONDI, L.; BEN SALEM, H.; et al. (Eds.). **Advanced nutrition and feeding strategies to improve sheep and goat**. Zaragoza: CIHEAM, 2007. p. 35-39 (Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 74).
- VITÓRIA, E.L.; FERNANDES, H.C.; TEIXEIRA, M.M.; et al. Produtividade de plantas forrageiras em função de manejo do solo. **Engenharia Agrícola**. Jaboticabal: Vol. 34, n. 5, p. 955-962, 2014.
- WAGHORN, G.C. Effect of condensed tannin on protein digestion and nutritive value of fresh herbage. In: **Proceedings Australian Society of Animal production**. Vol. 18, 1990, p. 412-415
- WATSON, R. T.; ZINYOWERA, M. C.; MOSS, R. H. **Technologies, Policies and Measures for Mitigating Climate Changes**. Intergovernmental Panel on Climate Change – IPCC, 1996.
- WILKINS, R. J. Forages and Their Role in Animal Systems. In: GIVENS, D. I.; OWEN, E.; AXFORD, R. F. E.; et al. (Ed.) **Forage Evaluation in Ruminant Nutrition**. Oxon: CAB International, 2000. p. 1-14.
- WHITMORE, J.S. **Drought Management on Farmland**. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000, 363p.
- YU, Z.; YU, M.; MORRISON, M. Improved serial analysis of V1 ribosomal sequence tags (SARST-V1) provides a rapid, comprehensive, sequence-based characterization of bacterial diversity and community composition. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 603–611, 2006.
- ZHOU, M.; HERNANDEZ-SANABRIA, E.; GUAN, L.L. Characterization of Variation in Rumen Methanogenic Communities under Different Dietary and Host Feed Efficiency Conditions, as Determined by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 12, 2010, p. 3776–3786.

**CAPÍTULO 2 –PRODUÇÃO DE METANO *IN VITRO* E AVALIAÇÃO  
NUTRICIONAL *IN VIVO* DA LEGUMINOSA MUCUNA-PRETA (*STIZOLOBIUM  
ATERRIMUM*) EM OVINOS**

## 1. RESUMO

Objetivou-se com o presente estudo: avaliar os efeitos dos taninos condensados (TC) presentes na leguminosa mucuna-preta (*Stizolobium aterrimum*) sobre a produção de gases totais (PGT), metano (CH<sub>4</sub>) e parâmetros de fermentação ruminal em ensaio *in vitro*; e, em experimento *in vivo*, avaliar a digestibilidade aparente (DA) dos nutrientes em ovinos Santa Inês alimentados com feno de gramínea tropical, suplementados ou não com mucuna-preta. Para se observar o efeito dos TC utilizou-se o polímero aglutinador de taninos polietilenoglicol (PEG) tanto no bioensaio *in vitro*, quanto no *in vivo*. No bioensaio *in vitro*, utilizou-se como substrato 0,5 g de mucuna moída a 1 mm, com ou sem adição de PEG em igual quantidade, incubadas com líquido ruminal de ovinos doadores em garrafas de 160 mL a 39°C, por 24 horas. Com 4, 8, 12 e 24 horas de incubação aferiu-se a pressão interna, por meio do sistema semiautomático, para se calcular o volume de gás produzido e colheu-se amostras de gás para análise de CH<sub>4</sub> produzido. Ao término do bioensaio todo conteúdo das garrafas foram utilizados para análises de nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>), pH e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). No experimento *in vivo* foram utilizados 15 ovinos machos, castrados, com aproximadamente 24 meses de idade e peso vivo médio de 46,8 ± 7,8 kg, divididos em 3 grupos de tratamentos: dieta exclusiva de feno de capim-aruaana (*Panicum maximum* Jacq. cv. Aruana) (CON); e feno de aruana suplementado com feno de mucuna com adição (MP) e sem adição de PEG (MSP). Os animais foram submetidos a 17 dias de período experimental (12 de adaptação), onde durante 5 dias permaneceram em gaiolas metabólicas para experimento de digestibilidade e coleta de líquido ruminal para análises de N-NH<sub>3</sub> e contagem de protozoários ruminais. No bioensaio *in vitro*, observou-se elevação da PGT e do teor N-NH<sub>3</sub> e acidificação do pH em função da adição de PEG (p < 0,05). Não se observou diferença para os demais parâmetros (p > 0,05). No experimento *in vivo*, observou-se maior ingestão de matéria seca e conseqüente maior ingestão de componentes nutricionais nos animais do grupo CON (p < 0,05), quando comparado a MP

e MSP, com exceção da proteína bruta (PB) e da fibra em detergente ácido (FDA) ( $p > 0,05$ ). Houve elevação do teor de N-NH<sub>3</sub> e redução nos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) de todos os nutrientes ( $p < 0,05$ ) nos grupos MP e MSP, quando comparados ao CON, com exceção do CDA da PB ( $p > 0,05$ ). A utilização de PEG proporcionou redução na contagem de protozoários ruminais quando comparados os grupos MP e CON. No bioensaio *in vitro* os taninos da mucuna-preta reduziram a PGT o N-NH<sub>3</sub> e elevaram o pH ruminal sem interferir na fermentação de carboidratos. No experimento *in vivo* os teores elevados de PB e FDA da mucuna foram determinantes na redução de consumo e na DA dos nutrientes. A inclusão de PEG proporcionou redução na contagem de protozoários ruminanis.

**Palavras-chave:** ácidos graxos de cadeia curta, bioensaio, digestibilidade, metano, protozoários, taninos.

## 2. ABSTRACT

### **NUTRITIONAL EVALUATION *IN VIVO* AND METHANE PRODUCTION *IN VITRO* OF LEGUMINOUS *STIZOLOBIUM ATERRIMUM* IN SHEEP**

The objective of this study was to evaluate the effects of condensed tannins (TC) on the total gases production (PGT) and methane production (CH<sub>4</sub>) *in vitro*, ruminal fermentation parameters in the leguminous *Stizolobium aterrimum* (M). The forage potential of the M was also evaluated through the apparent digestibility (DA) of nutrients in Santa Inês sheep fed with tropical grass hay, supplemented or not with M. To observe the effect of TC, the tannin binder polymer polyethylene glycol (PEG) was used both *in vitro* and *in vivo*. In the *in vitro* bioassay, 0.5 g of M hay ground to 1 mm, with or without PEG addition in equal quantity, were incubated with ruminal liquid from ovine donors in 160 mL bottles at 39 ° C for 24 hours. At 4, 8, 12 and 24 hours of incubation, the internal pressure was measured by the semi-automatic system to calculate the volume of gas produced and 2 ml of gas was collected for CH<sub>4</sub> analysis. At the end of the bioassay all the contents of the bottles were used for analysis of ammoniacal nitrogen (N-NH<sub>3</sub>), pH and short chain fatty acids (AGCC). In the *in vivo* test, 15 castrated male sheep divided into 3 groups of treatments: exclusive diet of aruana grass hay (*Panicum maximum* Jacq. cv. Aruana) (CON); aruana grass hay supplemented with M hay with PEG addition (MP) and without PEG addition (MSP). The animals were submitted to 17 days of experimental period (12 days of adaptation), during 5 days they remained in metabolic cages for the DA test and ruminal liquid collection for N-NH<sub>3</sub> analyzes and ruminal protozoa accounts. In the *in vitro* bioassay, elevation of PGT and N-NH<sub>3</sub> content and acidification of pH were observed as a function of the tannin inactivation (PEG addition) ( $p < 0.05$ ). No difference was observed for the other parameters ( $p > 0.05$ ). In the *in vivo* test, a higher intake of dry matter and a consequent higher intake of nutritional components ( $p < 0.05$ ) were observed, except for crude protein (PB) and acid detergent fiber (FDA) in the CON group ( $p > 0.05$ ) when compared to MP and MSP.

Except for the DA coefficient (CDA) of PB ( $p > 0.05$ ), there was a reduction in the CDA of all nutrients, and elevation of the N-NH<sub>3</sub> content in the MP and MSP groups ( $p < 0.05$ ), when compared to the CON. The PEG use provided a reduction in ruminal protozoa accounts when compared MP to CON group. In the in vitro assay the M tannins reduced the PGT, the N-NH<sub>3</sub> and raised the ruminal pH without interfering in the fermentation of carbohydrates. In the in vivo assay the high levels of PB and FDA of the M were determinants in the reduction of the consumption and in the DA of the nutrients. Inclusion of PEG provided a reduction in the protozoal account.

**Key words:** Bioassay, Digestibility, Methane, Protozoa, Short Chain Fatty Acids, Tannins.

### 3. INTRODUÇÃO

Ruminantes, que apresentam forragens como a base alimentar em seu sistema produtivo tem a capacidade de transformar volumosos de baixos teores nutricionais em alimentos de alta qualidade para o consumo humano, como o leite, a carne e os seus derivados (Cezar et al., 2005; Poli & Osório, 2014; Jayanegara et al., 2015). Isso é possível devido ao processo fermentativo ruminal, decorrente da relação de mutualismo entre microbiota e ruminante, que é capaz de gerar até 80 % da energia do indivíduo, porém à custa inevitável da produção de metano (CH<sub>4</sub>) (Johnson & Johnson, 1995; McDonald et al., 2011; Furlan et al., 2011; Mackie et al., 2013; Berends et al., 2014).

Apesar de o CH<sub>4</sub> não poder ser eliminado da produção de ruminantes, existem estratégias capazes de mitigar sua emissão, onde a manipulação da dieta, principalmente a melhora na qualidade das forragens, com a inclusão de leguminosas na dieta aparecem como opção viável e sustentável, capaz de reduzir em até 20 % a emissão de CH<sub>4</sub> entérico (Archimède et al., 2011; Hristov et al., 2013). A introdução de leguminosas na dieta pode proporcionar, além de alimentos que geralmente apresentam melhor qualidade nutricional, o fornecimento de taninos que apresentam reconhecido potencial mitigador na emissão de CH<sub>4</sub>.

Os taninos, que podem apresentar em ruminantes efeitos antinutricionais em teores acima de 40 g/kg de matéria seca (MS) dependendo da origem, tem como principais ações desejáveis: a formação de complexos em pH ruminal, principalmente com moléculas de origem proteica, disponibilizando maior absorção de aminoácidos em ambiente intestinal; redução no processo fermentativo de fibras, modulando a digestão de carboidratos e proteínas; e a ação direta sobre microrganismos metanogênicos (Frutos et al., 2004; Louvandini et al., 2011). Em experimentos *in vivo* e *in vitro* tem-se utilizado o polímero aglutinador de taninos polietilenoglicol (PEG), buscando separar os efeitos benéficos decorrentes da melhor qualidade nutricional da leguminosa e da ação do tanino (Makkar, 2003; Bhat et al., 2013)

A mucuna-preta (*Stizolobium aterrimum*), leguminosa estolonífera já utilizada como adubo verde, apresenta destacado potencial forrageiro, não só pela qualidade nutricional que apresenta, mas também pela facilidade na cultura e manejo, bem como na elevada aceitabilidade de ruminantes, quer seja verde, quer seja enfenada (Arf et al., 1996; Seno et al., 1996; Whitmore, 2000; Silva Sobrinho, 2014). Além das características como forrageira, a mucuna também apresenta em sua composição níveis de taninos abaixo do considerado antinutricional, apresentando potencial em mitigar a emissão de CH<sub>4</sub> entérico (Delgado et al., 2010; Moreira et al., 2013).

Buscando averiguar o potencial forrageiro da mucuna-preta, bem como avaliar a ação dos taninos desta leguminosa sobre a produção de gases totais, metano, e demais parâmetros fermentativos ruminais, realizou-se: bioensaio *in vitro* com substratos incubados com e sem polietilenoglicol; e experimento *in vivo* para se avaliar parâmetros ruminais e a digestibilidade aparente dos nutrientes em ovinos Santa Inês alimentados com feno de gramínea tropical e suplementados com mucuna-preta tratadas ou não com polietilenoglicol.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Local

As análises *in vitro* e *in vivo* do presente experimento foram desenvolvidas nas dependências do Laboratório de Nutrição Animal do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (LANA – CENA), localizado no Campus Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba – SP. O feno de mucuna-preta utilizado, tanto para o ensaio *in vitro* quanto para os experimentos *in vivo*, foi elaborado, desde o plantio até a colheita e enfeação, no Instituto de Zootecnia (IZ) de Nova Odessa – SP.

Todos os procedimentos realizados com uso direto e/ou indireto de animais foram autorizados por meio do certificado n. 003/2016 da Comissão de Ética no Uso de Animais do CENA (CEUA-CENA/USP).

### 4.2. Leguminosa Testada

A mucuna-preta foi semeada em dezembro de 2014 com plantadeira de milho com 4 linhas, espaçadas em 0,45 m, com peneira adaptada para o tamanho da semente da mucuna. No plantio foram usados 50 kg de semente/ha, 400 kg de superfosfato simples/ha, 120 kg de cloreto de potássio/ha e 30 kg de FTE-BR16/ha. O início da colheita para enfeação foi em abril de 2015. O feno foi feito à sombra, em “camas” sobrepostas confeccionadas de sombrite, revirado 3 vezes ao dia, levando o procedimento de enfeação 10 dias para completa secagem do material.

Após o processo de secagem, o material foi amostrado e moído em peneira de 1,0 mm em moinho tipo Willey para determinação dos teores de matéria seca (MS), proteína

bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibras em detergente neutro (FDN), fibras em detergente ácido (FDA) e matéria mineral (MM), conforme procedimentos descritos pela AOAC (2011), e compostos fenólicos totais (CFT), taninos totais (TT) e taninos condensados (TC), de acordo com Makkar (2000).

A análise bromatológica dos volumosos utilizados foi realizada antes do período experimental e sua composição nutricional encontra-se na tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Composição nutricional dos fenos utilizados nos ensaios experimentais, com base na MS.

Componente Nutricional	Capim-aruaana	Mucuna-preta
Matéria seca (g/kg)	953,85	924,85
Proteína bruta (g/kg)	91,10	153,76
Extrato etéreo (g/kg)	24,15	39,40
Fibra em detergente neutro (g/kg)	731,06	729,75
Fibra em detergente ácido (g/kg)	456,10	559,25
Matéria mineral (g/kg)	61,75	46,65
Compostos fenólicos totais (g ácido tânico/kg MS)	-	24,68
Taninos totais (g ácido tânico/kg MS)	-	15,31
Taninos condensados (g leucocianidina/kg MS)	-	5,67

### 4.3. Animais e Tratamentos

#### 4.3.1. *In vitro*

Para o bioensaio *in vitro* foi coletado líquido ruminal de três ovinos Santa Inês, machos, castrados, com cânula ruminal e peso vivo (PV) médio de  $65,0 \pm 2,3$  kg, do rebanho permanente do LANA/CENA. Os animais foram alimentados com dieta exclusiva de feno da gramínea tropical Tifton, água e sal mineral *ad libitum*.

#### 4.3.2. *In vivo*

Para o experimento de digestibilidade aparente, foram utilizados 15 ovinos Santa Inês, machos, castrados, com PV médio de  $46,8 \pm 7,8$  kg, com, aproximadamente, 24 meses de idade. Os animais foram submetidos a 17 dias de período experimental, divididos em 10 dias

de adaptação à dieta, onde os animais foram alocados em baias coletivas por 10 dias, 2 dias de adaptação às gaiolas individuais para experimento de metabolismo e 5 dias de coleta. Os animais foram divididos em três grupos: controle (CON), mucuna (MSP) e mucuna + PEG (MP).

A dieta fornecida ao grupo CON foi 100 % feno picado de *Panicum maximum* cv. Aruana disponibilizado *ad libitum*, calculada em 3 % de consumo de matéria seca (CMS) em relação ao PV e ofertada 2 vezes ao dia; a dieta do grupo MSP, também calculada em 3 % de CMS em relação ao PV, foi fornecida de forma a manter a relação 50 % de feno picado de mucuna-preta e 50 % de feno picado de *Panicum maximum* cv. Aruana, dessa maneira a quantidade de feno de aruana, ofertada no período vespertino, dependia do consumo de feno de mucuna, ofertado pela manhã; e MP mesma dieta do MSP, porém o feno da mucuna foi homogeneizado com 40 mL de solução de PEG, com concentração 0,5 g de PEG/mL, perfazendo uma relação PEG:TC de 3:1. Os três grupos receberam água e sal mineral *ad libitum*.

#### **4.4. Incubação *in vitro***

A técnica *in vitro* foi realizada conforme as adaptações de Longo et al. (2006) e Bueno et al. (2005) da técnica descrita por Mauricio et al. (1999) e Theodorou et al. (1994) da quantificação de gases produzidos em garrafas mantidas em temperatura ruminal para determinação dos parâmetros de fermentação *in vitro*, degradabilidade verdadeira da matéria orgânica (DVMO) e a produção líquida de gases.

Foi utilizado como substrato 0,5 g de feno de mucuna-preta, moído a 1,0 mm em moinho tipo Willey, em presença ou não de 0,5 g de PEG (Makkar et al., 1995), incubados em duplicata com 25 mL de inóculo e 50 mL de meio de incubação (tampão de Menke) em garrafas de vidro de 160 mL. Foram utilizadas a parte líquida e sólida do inóculo na proporção 50:50, homogeneizadas. As garrafas foram colocadas em estufa de ventilação forçada a 39 °C por de 24 horas (h).

Durante o período de 24 h foram realizadas leituras de pressão com transdutor e data logger (Pressure Press 800, LANA, CENA /USP, Piracicaba, SP, Brasil) e coletas de 2 mL de amostra gasosa com 4, 8, 12 e 24 h de incubação. O volume de gás produzido por garrafa em cada leitura foi determinado conforme a equação (Araujo et al., 2011):

$$V = (7,365 \times P);$$

onde: V = volume de gás em mL e P = pressão da garrafa em psi; para a produção de gases total (PGT) em 24 h somou-se o valor das 4 leituras. As amostras de 2 ml de gás coletadas foram armazenadas em tubos Vacutainer<sup>®</sup> para análise de CH<sub>4</sub> em Cromatógrafo gasoso (Shimadzu<sup>®</sup> GC-2010), após a coleta de gás a pressão interna das garrafas era aliviada e o conteúdo (substrato e inóculo) homogeneizado manualmente antes de retornarem à estufa.

Após o término do período de incubação, a fermentação foi interrompida através da quebra na temperatura (imersão em água gelada) e o conteúdo das garrafas foi submetido a análise de pH em pHmetro Tecnal<sup>®</sup> TEC-2, N-NH<sub>3</sub> conforme Preston (1995) e AGCC de acordo com a metodologia adaptada de Palmquist & Conrad (1971) e Nocek et al. (1987). A determinação da degradabilidade verdadeira da matéria orgânica (DVMO) restringiu-se às garrafas que não continham PEG devido a ocorrência de complexos formados com taninos que podem ser recuperados como material não degradado, subestimando a DVMO (Makkar et al., 1995; Rodriguez et al., 2014; Lima, 2016).

Para a determinação da DVMO ao conteúdo das garrafas com amostras sem PEG foram adicionados 70 mL de solução de FDN e as garrafas foram acondicionadas por 4 h em estufa a 105 °C, para posterior filtragem em cadinhos sinterizados, previamente pesados e lavados com água destilada quente. Após esse processo os resíduos foram queimados em mufla a 600 °C pra determinação da DVMO. A relação entre a DVMO e PGT determina o fator de partição (FP), utilizado como índice de eficiência na síntese microbiana (Blümmel et al., 1997; Lima, 2016).

#### **4.5. Digestibilidade Aparente dos Nutrientes**

Durante o período de coleta (5 dias) a urina, as sobras e as fezes foram recolhidas e tiveram seu peso e volume mensurados diariamente e 10 % de cada amostra diária foi armazenada sob refrigeração para formação do “pool” de amostras por animal. Após o período de coleta cada “pool” foi congelado em freezer a -20 °C.

Para a realização da análise das sobras e fezes, as amostras foram descongeladas, desidratadas em estufa com ventilação forçada a 60 °C por 5 dias, e moídas em moinho tipo Willey a 1,0 mm para determinação dos teores de MS, PB, FDN, FDA e MM de acordo com o

descrito pela AOAC (2011); e a 0,25 mm para a determinação de CFT, TT e TC conforme metodologia relatada por Makkar (2000).

O coeficiente de digestibilidade aparente dos nutrientes foi calculada de acordo com a seguinte equação descrita por Andrigueto et al. (2002):

$$CDA = \frac{(X_{consumido} - X_{excretado})}{X_{consumido}} \times 100,$$

onde CDA é o coeficiente de digestibilidade aparente de determinado nutriente em porcentagem, e X é a quantidade em g ou kg do nutriente avaliado.

Para obtenção do valor de nutrientes digestíveis totais (NDT) utilizou-se a equação descrita por Cappelle et al. (2001) para fenos:

$$NDT = 11,85 + 0,745 * CDAMS (r^2 = 0,95; P < 0,01)$$

onde o CDAMS é o CDA da MS em porcentagem.

#### **4.6. Parâmetros de Fermentação Ruminal**

No último dia do período de coleta no experimento de digestibilidade aparente dos nutrientes, após três horas do fornecimento da dieta, foram amostrados líquido ruminal de todos animais via sonda esofágica, para análise da concentração de N-NH<sub>3</sub>, conforme Preston (1995), ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), de acordo com a metodologia adaptada de Palmquist & Conrad (1971) e contagem de protozoários, de acordo com Dehority et al. (1983). Para as análises de N-NH<sub>3</sub> e AGCC as amostras foram armazenadas em freezer a -80 °C, e para a contagem de protozoários, 2 mL de líquido ruminal foram diluídos em 4 mL de solução de verde de metila e formol salino (M.F.S.) e mantidas ao abrigo da luz em temperatura ambiente.

#### **4.7. Análise Estatística**

Para o bioensaio *in vitro* os dados coletados foram submetidos à análise de variância por meio do procedimento MIXED do programa SAS<sup>®</sup>, onde foram avaliados a adição de PEG como efeito fixo, os inóculos como efeitos aleatórios e a interação entre eles. Para o experimento de digestibilidade aparente, os dados também foram analisados por meio do procedimento MIXED do programa SAS<sup>®</sup>, onde as dietas foram consideradas os efeitos fixos

e os animais os efeitos aleatórios. Em todas as análises as médias foram comparadas pelo teste de Tukey e foi utilizada a versão 9.4 do SAS<sup>®</sup> (Analysis System Institute, Cary NC, USA) adotando-se o nível de significância de 5 %.

Para a quantificação de protozoário por mL de conteúdo ruminal, os dados foram submetidos ao teste Shapiro-Wilk de normalidade, através do procedimento UNIVARIATE, também do programa SAS<sup>®</sup> (versão descrita acima), antes da análise de variância.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Resultados

#### 5.1.1. Bioensaio *in vitro*

A adição de PEG à mucuna durante o processo de incubação *in vitro* exerceu elevação média de 3,36 % na PGT em relação à MS incubada e de 2,27 mg de N-NH<sub>3</sub>/100 mL de conteúdo ruminal, quando comparada ao substrato sem adição de PEG ( $p < 0,05$ ). A inclusão de PEG no processo de incubação *in vitro* também proporcionou acidificação ( $p < 0,05$ ) de 0,14 pH do inóculo quando comparado ao inóculo sem adição de PEG. Em relação aos demais parâmetros analisados, não se observou diferença entre os tratamentos na produção de CH<sub>4</sub> em relação à MS ( $p > 0,05$ ), nem na quantidade total e nos teores de AGCC produzidos (Tabela 2.2).

Com a DVMO, realizada apenas no substrato sem adição de PEG, e os parâmetros de emissão de CH<sub>4</sub> relacionados aos resultados dessa análise, obteve-se os seguintes resultados: DVMO: 449,72 g/kg; degradabilidade da FDN: 302,93 g/kg; PGT em relação à MO degradada (DMO): 47,37 mL/g; produção de CH<sub>4</sub> em relação à DMO: 2,67 mL/g; PGT em relação à FDN degradada (DFDN): 31,97 mL/g; produção de CH<sub>4</sub> em relação à DFDN: 1,79 mL/g; fator de partição (FP): 1,84.

Tabela 2.2 – Médias dos parâmetros fermentativos ruminais *in vitro* da mucuna preta com (MP) ou sem (MSP) adição de polietilenoglicol (PEG) em sua composição.

Parâmetro	Tratamento		Incremento (%) <sup>1</sup>	EPM <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>
	(MP)	(MSP)			
PGT (mL/g MS)	238,76	230,99	3,36	2,77	0,0311
CH <sub>4</sub> (mL/g MS)	13,65	13,45	1,53	0,47	n.s.
Eficiência (%)	5,73	5,84	–	0,21	n.s.
N-NH <sub>3</sub> (mg/100 mL)	14,17	11,90	–	0,57	0,007
pH	6,75	6,96	–	0,03	0,0006
AGCC					
Total (mmol/L)	49,71	49,06	–	0,71	n.s.
Acetato (%)	76,53	76,74	–	0,14	n.s.
Propionato (%)	14,53	14,43	–	0,08	n.s.
Butirato (%)	6,58	6,54	–	0,04	n.s.
Isobutirato (%)	0,41	0,39	–	0,01	n.s.
Valerato (%)	0,67	0,66	–	0,01	n.s.
Isovalerato (%)	1,26	1,24	–	0,01	n.s.
Acetato:Propionato	5,28	5,32	–	0,04	n.s.

PGT – produção de gases totais em relação à matéria seca (MS) do substrato; CH<sub>4</sub> – produção de metano em relação à MS do substrato; Eficiência – teor de CH<sub>4</sub> em relação a PGT; N-NH<sub>3</sub> – nitrogênio amoniacal; AGCC – ácidos graxos de cadeia curta

<sup>1</sup> – Aumento na produção de gás em função da adição de PEG

<sup>2</sup> – Erro padrão da média

<sup>3</sup> –Significância / não significativo (n.s.)

### 5.1.2. Digestibilidade aparente

Avaliando o consumo e o CDA dos alimentos utilizados e dos nutrientes presentes em sua composição nutricional, observaram-se diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos em todos os parâmetros analisados. A inclusão de mucuna na dieta (MP e MSP) representou índices menores de ingestão e de digestibilidade de nutrientes quando comparado ao grupo CON ( $p < 0,05$ ). Apenas na ingestão de PB (PBI) de FDA (FDAI) e no CDAPB, que apresentaram volumes médios de 0,125 kg/dia, 0,543 kg/dia e 43,96 %, respectivamente, para todos tratamentos, não havendo diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Em relação aos parâmetros de fermentação ruminal a inclusão de mucuna na dieta proporcionou maior teor de N-NH<sub>3</sub> e a inclusão de PEG proporcionou menor quantidade de protozoários por mL de conteúdo ruminal ( $p < 0,05$ ).

Tabela 2.3 – Consumo médio diário, coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da matéria seca (MS), da matéria orgânica (MO) e dos principais componentes nutricionais e parâmetros ruminais em ovinos alimentados exclusivamente com feno de capim-aruaana (CON) e suplementados com mucuna-preta com (MP) ou sem (MSP) adição de polietilenoglicol (PEG) em sua composição.

	Tratamentos			EPM <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>
	CON	MP	MSP		
<b>Consumo médio diário (kg/dia)</b>					
Matéria seca	1,29 <sup>A</sup>	1,02 <sup>B</sup>	0,99 <sup>B</sup>	0,09	0,0069
Matéria orgânica	1,21 <sup>A</sup>	0,97 <sup>B</sup>	0,94 <sup>B</sup>	0,08	0,0099
Proteína bruta	0,12	0,13	0,13	0,01	n.s.
Nutrientes digestíveis totais <sup>3</sup>	0,63 <sup>A</sup>	0,53 <sup>B</sup>	0,50 <sup>B</sup>	0,01	0,0291
Fibra em detergente neutro	0,94 <sup>A</sup>	0,75 <sup>B</sup>	0,73 <sup>B</sup>	0,06	0,0066
Fibra em detergente ácido	0,59	0,53	0,51	0,04	n.s.
<b>Coeficientes de digestibilidade aparente (%)</b>					
Matéria seca	62,58 <sup>A</sup>	52,99 <sup>B</sup>	51,52 <sup>B</sup>	3,67	0,0291
Matéria orgânica	66,02 <sup>A</sup>	56,19 <sup>B</sup>	53,24 <sup>B</sup>	3,57	0,0157
Proteína bruta	44,29	45,03	42,55	3,88	n.s.
Fibra em detergente neutro	63,80 <sup>A</sup>	49,44 <sup>B</sup>	48,23 <sup>B</sup>	3,92	0,0014
Fibra em detergente ácido	60,38 <sup>A</sup>	44,58 <sup>B</sup>	44,90 <sup>B</sup>	3,89	0,0004
<b>Parâmetros ruminais</b>					
N-NH <sub>3</sub> (mg/100 mL)	10,37 <sup>B</sup>	18,53 <sup>A</sup>	17,85 <sup>A</sup>	2,21	0,0141
Protozoários (x10 <sup>5</sup> /mL)	11,20 <sup>A</sup>	5,95 <sup>B</sup>	8,55 <sup>AB</sup>	0,50	0,0019

N-NH<sub>3</sub> – nitrogênio amoniacal

<sup>1</sup> – Erro padrão da média

<sup>2</sup> – Significância / não significativo (n.s.)

<sup>3</sup> – NDT calculado com base na equação (NDT = 11,85+0745CDAMS), utilizada para fenos, descrita por Cappelle et al. (2001). CDAMS – Coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca

## 5.2. Discussão

### 5.2.1. Bioensaio *in vitro*

Apesar de o teor de taninos terem sido abaixo do relatado na literatura para a mucuna-preta, conforme descrito nas tabelas 1.2 (Longo, 2007; Savón et al., 2007; Delgado et al., 2010; Abdalla et al., 2012; Longo et al., 2012; Moreira et al., 2013) e 2.1, e não terem sido suficientes para ocasionar redução na produção de CH<sub>4</sub> *in vitro*, pode-se observar no presente bioensaio a influência do TC da mucuna com redução da PGT. Vários estudos (Rymer et al., 2005; Louvandini et al., 2011; Storm et al., 2012; Bhat et al., 2013), descreveram este efeito devido a capacidade dos TC em formar complexos, com componentes nutricionais de origem proteica, ou da microbiota ruminal acarretando inclusive a mobilização de enzimas, podendo ocasionar redução no processo fermentativo.

Os taninos representam molécula complexa e específica para cada planta podendo apresentar atividade biológica distinta (Makkar, 2003; Longo et al., 2012; Bhat et al., 2013), ou seja, baixo teor pode determinar alta atividade biológica ou vice e versa. Isso pode ser percebido ao se comparar os presentes resultados com os valores apresentados por Soltan et al. (2013), que apesar de terem encontrado na leguminosa *Leucaena leucocephala* maiores teores de TT e TC de 34,8 e 23,3 g/kg MS, respectivamente, não observaram diferenças na PGT e nem na produção de CH<sub>4</sub> *in vitro*.

A diferença entre os taninos de diferentes origens também pode ser vista através dos trabalhos desenvolvidos por Abdalla et al. (2012) e Longo et al. (2012) que utilizaram a mucuna-preta, dentre outras leguminosas, e encontraram valores próximos aos observados no presente trabalho para PGT (24 h), de 231 e 184 mL/g MS, respectivamente. Abdalla et al. (2012), que observaram valores superiores de produção de CH<sub>4</sub> de 30 mL/g MS, também verificaram ineficiência da mucuna-preta em mitigar a produção de CH<sub>4</sub> *in vitro*, quando comparada às outras leguminosas avaliadas. Longo et al. (2012), que perceberam uma elevação de apenas 3,8 % na PGT com a adição de PEG, próxima ao incremento descrito no presente trabalho (tabela 2.2), concluíram que a baixa eficiência da mucuna-preta em reduzir a PGT está associada ao alto teor de fibra e sua baixa degradabilidade. No presente trabalho a interferência dos altos teores de FDN e FDA no efeito mitigador de CH<sub>4</sub> do TC é igualmente percebida, porém a ação biológica de formação de complexos com a proteína fica evidente através das análises de N-NH<sub>3</sub> e AGCC, descritas a seguir.

O menor teor de N-NH<sub>3</sub>, maior pH e menor PGT, no tratamento com a mucuna sem PEG demonstrou que o tanino presente nesta planta interferiu no processo fermentativo das proteínas, no bioensaio *in vitro*. Conforme descrito anteriormente, a ação dos taninos na formação de complexos com a proteína, pode ter reduzido a disponibilidade desta para degradação ruminal (PDR), com menor quantidade de N-NH<sub>3</sub> e maior pH (Annison et al., 2002; Lana, 2007; McDonald et al., 2011; Santos & Pedroso, 2011). Isso vem enfatizar a atividade biológica do TC em formar complexos com a proteína (Goel & Makkar, 2012; Hristov et al., 2013). Esses complexos são capazes de proteger a proteína do processo fermentativo, possibilitando maior disponibilidade de proteína a ser digerida no intestino delgado.

Em relação aos parâmetros de produção de AGCC o efeito observação na PGT não foi confirmado nos AGCC, onde pode-se perceber que o TC da mucuna-preta não foi capaz de modificar a quantidade produzida de AGCC totais, bem como não alteraram as proporções

de acetato e propionato, nem a relação acetato:propionato, entre os substratos analisados com e sem PEG, o que seria indicativo da mitigação da produção de CH<sub>4</sub> (Liu & Whitman, 2008; Cottle et al., 2011; Hirstov et al., 2013). Sugerindo assim que a fermentação dos carboidratos não foi prejudicada pela presença do TC da mucuna e sim a degradabilidade da proteína que pode ter sido responsável pela menor PGT observada, em decorrência do menor teor de amônia (NH<sub>3</sub>) produzido.

### 5.2.2. Digestibilidade aparente

O consumo apresentado pelos animais nos tratamentos MP e MSP foi o esperado de acordo com as recomendações descritas no NRC (2007), que estima faixa de ingestão de 0,77 a 1,05 kg de MS e de 0,059 a 0,079 de kg de PB para animais adultos com PV entre 40 e 60 kg, respectivamente. Situação semelhante para o NDT que foi de 0,502 a 0,513 kg/dia, para MSP e MP, respectivamente, dentro da faixa preconizada pelo NRC (2007) de 0,410 a 0,560 kg/dia. Os carneiros do grupo CON apresentaram ingestão de MS, 23 % maior que as recomendações do NRC (2007), e de NDT, 4 % maior que o descrito pelo NRC (2007), superiores aos tratamentos com a mucuna ( $p < 0,05$ ).

A maior MSI do grupo CON parece estar associada à necessidade de suprimento de exigências proteica, pois o feno de aruana apresentou menor quantidade de PB, quando comparado ao feno de mucuna (Tabela 2.1). Os carneiros alimentados com a mucuna por sua vez, atingiram as exigências de PB com menor quantidade de MS ingerida. Em relação à digestibilidade dos alimentos testados, percebeu-se que a inclusão de mucuna na dieta reduziu todos os CDA apresentados, com exceção do CDAPB, que apresentou índices semelhantes de digestibilidade entre os grupos avaliados ( $p > 0,05$ ). Por outro lado, a mucuna proporcionou aumento de N-NH<sub>3</sub> nos animais dos grupos MP e MSP ( $p < 0,05$ ), que refletiu maior disponibilidade de proteína da mucuna com maior degradabilidade ruminal deste nutriente (Silva & Silva, 2013), quando comparada ao grupo CON, e não houve efeito do TC, pois os tratamentos com e sem PEG foram semelhantes.

A MSI é regulada pelo hipotálamo, a partir dos centros da fome (núcleo lateral) e da saciedade (núcleo ventro-medial) que recebem informações à respeito da aceitabilidade/rejeição ao alimento disponível, do nível de nutrientes absorvidos, teor de glicose e lipídeos no sangue, temperatura corporal, distensão rumino-reticular e teor de AGCC

presentes no rumem (Lana, 2007; Silva, 2011). O consumo em ruminantes é maior em forragens com menores teores de FDN, com maior degradabilidade das fibras (maior taxa de passagem) e é reduzido com a elevação dos teores de AGCC, onde o propionato exerce maior poder inibidor de consumo, quando comparado ao acetato e ao butirato (Silva, 2011).

Em relação aos teores de fibras, a mucuna apresentou valores próximos aos do aruana, em se tratando de FDN, e valores maiores em termos de FDA (Tabela 2.1), porém, como a MSI foi maior no grupo CON, a quantidade de FDN foi superior, mas a quantidade de FDA foi equivalente nos três grupos; nesse sentido um dos fatores que parece ter limitado o consumo de mucuna (grupos MP e MSP) foi a menor degradabilidade das fibras e nutrientes (Tabela 2.3) e conseqüente menor taxa de passagem. Outro fator que poderia influenciar a degradabilidade das fibras é a presença de TC, porém não houve diferenças entre os grupos MP e MSP; dessa maneira, a menor digestibilidade da mucuna no presente estudo parece estar associada ao alto teor de FDA e à baixa degradabilidade das fibras e nutrientes (Longo et al., 2012) e não à atividade biológica do TC em formar complexos com proteína (Abdalla et al., 2012).

Bhatta et al. (2012), analisando várias leguminosas taniníferas, observaram diferentes efeitos dos taninos, através da inclusão de PEG, na população de protozoários, concluindo que a resposta da população de protozoários ao uso de taninos de variadas origens como agente defaunador ou redutor na população de protozoários deve ser analisado com cuidado. No presente trabalho, o TC da mucuna não foi capaz de reduzir a população de protozoários, quando comparados os grupos MSP e CON ( $p > 0,05$ ), porém houve redução de 47 % na quantidade de protozoários associada à inclusão de PEG na dieta ( $p < 0,05$ ), quando comparados os grupos MP e CON.

A população de protozoários em todos os tratamentos ficou dentro do número normal ( $10^4 - 10^6$  protozoários/mL de conteúdo ruminal), perfazendo de 40 a 60 % da biomassa microbiana total, conforme descrito por Arcuri et al. (2011) e Newbold et al. (2015). O PEG, que em humanos é utilizado como laxante no tratamento da constipação intestinal infantil devido à sua excelente ação osmótica, à capacidade de se misturar a vários líquidos e a baixa absorção pelo organismo (Gomes et al., 2011), na nutrição de ruminantes tem por efeito a inativação dos taninos em decorrência da maior afinidade que os taninos apresentam a este composto quando comparado a proteínas (Makkar, 2003). Apesar de o PEG ser comumente utilizado em experimentos com tanino, Bhat et al. (2013) relataram perdas produtivas em

produção de leite, ganho de peso e lã na administração de PEG em níveis abaixo da faixa de 2-4 % de TC. Essa redução produtiva poderia ser efeito da ausência do benefício que o TC proporciona nesses índices e/ou a eventual redução da proteína microbiana, oriunda dos protozoários, a ser digerida.

A redução ocorrida na densidade populacional de protozoários no grupo MP pode estar pautada em três hipóteses, individualmente ou associadas: (1) possível efeito osmótico, em decorrência de ausência de TC suficientes para a formação de complexos com o PEG disponível; (2) redução de proteína disponível para ser degradada no rumem; e (3) acidificação proporcionada pela inativação do TC (adição de PEG). Dessa maneira percebe-se uma necessidade de mais estudos para se entender o efeito do PEG disponível sobre os protozoários no rumem.

## 6. CONCLUSÃO

No bioensaio *in vitro* os taninos condensados da mucuna-preta foram suficientes para reduzir a produção de gases totais (PGT), diminuir os níveis de nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>), e elevar o pH do líquido ruminal, protegendo a proteína da degradabilidade no rumen. Além disto não foram capazes de proporcionar efeito mitigador de metano e alterações na produção total e nos teores dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), ou seja, não interferiu no processo fermentativo dos carboidratos.

No experimento *in vivo* os teores elevados de PB e FDA da mucuna em relação ao da aruana foram determinantes na redução do consumo e na digestibilidade aparente dos nutrientes, não sendo observado efeito do TC desta leguminosa.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, A.L.; LOUVANDINI, H.; SALLAM, A.M.A.H.; et al. In vitro evaluation, in vivo quantification, and microbial diversity studies of nutritional strategies for reducing enteric methane production. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, p. 953-964, 2012.
- ANDRIGUETO, J.M.; PERLY, L.; MINARDI, I.; et al. **Nutrição animal**, v. 1 as bases e os fundamentos da nutrição animal. São Paulo: Nobel, 395 p., 2002.
- ANNISON, E.F.; LINDSAY, D.B.; NOLAN, J.V. Digestion and Metabolism. In: FREER, M.; DOVE, H. (Eds.) **Sheep Nutrition**, Canberra-AU: CSIRO Plant Industry, p. 95-118, 2002.
- ARAUJO, R.C.; PIRES, A.V.; MOURÃO, G.B.; et al. Use of blanks to determine in vitro net gas and methane production when using rumen fermentation modifiers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 166-167, p. 155-162, 2011.
- ARCHIMÈDE, H.; EUGÈNE, M.; MARIE MAGDELEINE, C.; et al. Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and legumes. **Animal Feed Science and Technology**, 166-167, p. 59-64, 2011.
- ARF, O.; DE SÁ, M. E.; BUZETTI, S. Incorporação de mucuna-preta e de restos culturais de milho antes da cultura do feijão (*phaseolus vulgaris* l.) de inverno. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 31, n. 8, p. 563-568, 1996.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis**. 18. ed. Arlington: AOAC International, 2011.

- BERENDS, H.; GERRITS, W.J.J.; FRANCE, J.; et al. Evaluation of the SF<sub>6</sub> tracer technique for estimating methane emission rates with reference to dairy cow using a mechanistic model. **Journal of Theoretical Biology**, 353, 2014, p. 1-8.
- BHAT, T.K.; KANNAN, A.; BIRBAL SINGH; et al. Value Addition of Feed and Fodder by Alleviating the Antinutritional Effects of Tannins. **Agricultural Research**, v. 2, n. 3, p. 189-206, 2013.
- BHATTA, R.; SARAVANAN, M.; BARUAH, L; et al. Nutrient content, in vitro ruminal fermentation characteristics and methane reduction potential of tropical tannin-containing leaves. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 2929-2935, 2012.
- BLÜMMEL, M.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. In vitro gas production: a technique revisited. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.77, n. 1-5, p. 24-34, 1997.
- BUENO, I.C.S.; CABRAL FILHO, S.L.S.; GOBBO, S.P.; et al. Influence of inoculum source in a gas production method. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123-124, p. 95-105, 2005.
- CAPPELLE, E.R.; VALADARES FILHO, S.C.; SILVA, J.F.C; et al. Estimativas do Valor Energético a partir de Características Químicas e Bromatológicas dos Alimentos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 6, p. 1837-1856, 2001.
- CEZAR, I.M.; QUEIROZ, H.P.; THIAGO, L.R.L.S.; et al. **Sistemas de produção de gado de corte no Brasil: uma descrição com ênfase no regime alimentar e no abate**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2005, 40p. (Documentos / Embrapa Gado de Corte, ISSN 1517-3747 ; 151)
- COTTLE, D.J.; NOLAN, J.V.; WIEDEMANN, S.G. Ruminant enteric methane mitigation: a review. **Animal Production Science**, 51, p. 491–514, 2011.
- DEHORITY, B. A.; DAMRON, W. S.; MCLAREN, J. B. Occurrence of the rumen ciliate *Oligoisotricha bubali* in domestic cattles (*Bos taurus*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1394-1397, 1983.

- DELGADO, D.C.; GALINDO, J.; GONZÁLEZ, L.; et al. Potential of Tropical Plants to Exert Defaunating Effects on the Rumen and to Reduce Methane Production. In: N.E. Odongo, M. Garcia & G.J. Viljoen (Eds) **Sustainable Improvement of Animal Production and Health**. Rome: FAO, p. 49–54, 2010.
- FRANZOLIN, R.; DEHORITY, B.A. The role of pH on the survival of rumen protozoa in steers. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 2262-2267, 2010.
- FRUTOS, P.; HERVÁS, G.; GIRÁLDEZ, F. J.; et al. Review. Tannins and ruminant nutrition. **Spanish Journal of Agricultural Research**, 2 (2), p. 191-202, 2004.
- FURLAN, R.L.; MACARI, M.; FARIA FILHO, D.E. Anatomia e fisiologia do trato gastrointestinal. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G.O. (Eds.) **Nutrição de Ruminantes**, Jaboticabal: FUNEP, p. 1-27, 2011.
- GOMES, P.B.; MELO, M.C.B.; DUARTE, M.A.; et al. Polietilenoglicol na constipação intestinal crônica funcional em crianças. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 29, n. 2, p. 245-250, 2011.
- HRISTOV, A.N; OH, J.; FIRKINS, J.L.; et al. SPECIAL TOPICS—Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. **Journal of Animal Science**, v. 91, p. 5045-5069, 2013.
- JAYANEGARA, A.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Addition of Purified Tannin Sources and Polyethylene Glycol Treatment on Methane Emission and Rumen Fermentation *in vitro*. **Media Peternakan**. 38 (1), p. 57-63, 2015.
- JOHNSON, K.A.; JOHNSON, D.E. Methane Emissions from Cattle. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 2483-2492, 1995.
- LANA, R.P. **Nutrição e alimentação animal (mitos e realidades)**. Viçosa: UFV, 344 p., 2007.
- LIMA, Paulo de Mello Tavares. **Aspectos produtivos e emissão de metano em ovinos Santa Inês suplementados com a leguminosa *Macrotyloma axillare***. Piracicaba: Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo CENA-USP, 2016, 92p. Tese (Doutorado em Ciências) – CENA-USP, 2016.

- LIU, Y.; WHITMAN, W.B. Metabolic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of the Methanogenic Archaea. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 1125, p. 171–189, 2008.
- LONGO, C. Avaliação *in vitro* de leguminosas taniníferas tropicais para mitigação de metano entérico. Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- LONGO, C.; BUENO, I. C.; NOZELLA, E. F.; et al. The influence of head space and inoculum dilution on *in vitro* ruminal methane measurement. **International Congress Series**, v. 1293, p. 62-65, 2006.
- LONGO, C.; HUMMEL, J.; LIEBICH, J.; et al. Chemical characterization and *in vitro* biological activity of four tropical legumes, *Stylobium aterrimum* L., *Stylobium deeringianum*, *Leucaena leucocephala*, and *Mimosa caesalpiniaefolia*, as compared with a tropical grass, *Cynodon* spp. for the use in ruminant diets. **Czech Journal of Animal Science**, v. 57, n. 6, p. 225-264, 2012.
- LOUVANDINI, H., ABDALLA, A. L., McMANUS, C., et al. Plantas taniníferas na nutrição de ovinos. **Veterinária e Zootecnia**, 18(4 supl. 3), p. 176-181, 2011.
- MACKIE, R.I.; MCSWEENEY, C.S.; AMINOV, R.I. Rumen. In: **eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester**. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000404.pub2, p. 1-17, 2013.
- MAKKAR, H. P. S.; BLÜMMEL, M.; BECKER, K. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in *in vitro* techniques. **British Journal of Nutrition**, v. 73, n. 6, p. 897-913, 1995
- MAKKAR, H. P. S. **Quantification of tannins in tree foliage**. Vienna: FAO/IAEA, 2000.
- MAKKAR, H. P. S. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. **Small Ruminant Research**, n. 49, p. 241–256, 2003.
- MAURICIO, R.M.; MOULD, F.L.; DHANOA, M.S.; et al. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 79, p. 321-330, 1999.

- MCDONALD, P.; EDWARDS, R.A.; GREENHALGH, J.F.D.; et al. **Animal Nutrition**, Harlow, Pearson, 692 p, 2011.
- MOREIRA, G. D.; LIMA, P. M. T.; BORGES, B. O.; et al. Tropical tanniferous legumes used as an option to mitigate sheep enteric methane emission. **Tropical Animal Health and Production**, DOI 10.1007/s11250-012-0284-0, 2013.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrition requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids and world camelids**. Washington, DC, 2007.
- NEWBOLD, C.J.; DE LA FUENTE, G.; BELANCHE, A.; et al. The Role of Ciliate Protozoa in the Rumen. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 1313, p. 1-14, 2015.
- NOCEK, J. E.; HART, S. P.; POLAN, C. E. Rumen ammonia concentrations as influenced by storage time, freezing and thawing, acid preservative, and method of ammonia determination. **Journal of Dairy Science**, v. 70, n. 3, p. 601-607, 1987.
- PALMQUIST, D.; CONRAD, H. Origin of plasma fatty acids in lactating cows fed high grain or high fat diets. **Journal of Dairy Science**, v. 54, n. 7, p. 1025-1031, 1971.
- POLI, C.H.E.C.; OSÓRIO, J.C.S. Introdução e conceitos básicos. In: SELAIVE, A.B.; OSÓRIO, J.C.S. (Eds.) **Produção de Ovinos no Brasil**. São Paulo: Roca, 2014. p. 99-101.
- PRESTON, T.R. **Tropical animal feeding: a manual for research workers**. Rome: FAO, 126 p., 1995.
- RODRÍGUEZ, R. et al. Biological effect of tannins from different vegetal origin on microbial and fermentation traits in vitro. **Animal Production Science**, v. 54, n. 8, p. 1039-1046, 2014.
- RYMER, C.; HUNTINGTON, J.A.; WILLIAMS, B.A.; et al. In vitro cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. **Animal Feed Science and Technology**, v.123-124, p. 9-30, 2005.
- SANTOS, F.A.P.; PEDROSO, A.M. Metabolismo de proteínas. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G.O. (Eds.) **Nutrição de Ruminantes**, Jaboticabal: FUNEP, p. 265-297, 2011.

- SAVÓN, L.; SCULL, I.; ORTA, M. et al. Integral foliage meals of three tropical legumes for poultry feeding. Chemical composition, physical properties phytochemical screening. **Cuban Journal of Agricultural Science**, v. 41, n. 4, p. 339-341, 2007.
- SENO, M. S.; GOMES, L; CORTELAZZO, A. L. Caracterização do material de reserva em feijão-guandú, lablabe e mucuna. **Bragantia**, v. 55(1), p. 57-65, 1996.
- SILVA, J.F.C. Mecanismos reguladores de consumo. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G.O. (Eds.) **Nutrição de Ruminantes**, Jaboticabal: FUNEP, p. 61-82, 2011.
- SILVA, S.P.; SILVA, M.M.C. Fracionamento de carboidrato e proteína segundo o sistema CNCPS. **Veterinária Notícias**, Uberlândia: v. 19, n. 2, p.95-108, 2013.
- SILVA SOBRINHO, A.G. Nutrição e alimentação de ovinos. In: In: SELAIVE, A.B.; OSÓRIO, J.C.S. (Eds.) **Produção de Ovinos no Brasil**. São Paulo: Roca, 2014. p. 239-259.
- SOLTAN, Y.A.; MORSY, A.S.; SALLAM, S.M.A.; et al. Contribution of condensed tannins and mimosine to the methane mitigation caused by feeding *Leucaena leucocephala*. **Archives of Animal Nutrition**. Vol. 67, No. 3, p. 169–184, 2013.
- STORM, I.M.L.D.; HELLWING, A.L.F.; NIELSEN, N.I.; et al. Methods for Measuring and Estimating Methane Emission from Ruminants. **Animals**, v. 2, p.160-183, 2012.
- THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S.; et al. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 48, p. 185-197, 1994.
- WHITMORE, J.S. **Drought Management on Farmland**. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000, 363p.

**CAPÍTULO 3 – EMISSÃO DE METANO E PARÂMETROS FERMENTATIVOS  
RUMINAIS DE OVINOS SUPLEMENTADOS COM MUCUNA PRETA  
(*STIZOLOBIUM ATERRIMUM*)**

## 1. RESUMO

Objetivou-se com o presente estudo avaliar o comportamento fermentativo ruminal e o potencial em mitigar a produção de metano ( $\text{CH}_4$ ) entérico da leguminosa taninífera mucuna-preta (*Stizolobium aterrimum*) em ovinos Santa Inês. Utilizou-se dois métodos para avaliação da emissão de  $\text{CH}_4$ : as câmaras respirométricas (CR) e a técnica do hexafluoreto de enxofre ( $\text{SF}_6$ ). No método das CR 18 ovinos, machos castrados, com peso vivo (PV) médio de  $46,8 \pm 7,8$  kg, com, aproximadamente, 24 meses de idade, foram submetidos a 24 dias de período experimental (18 dias de adaptação e 6 de coleta), divididos em três grupos de tratamentos: dieta exclusiva de feno de capim-aruaana (*Panicum maximum* Jacq. cv. Aruana) (CON); e feno de capim-aruaana suplementado com feno de mucuna, com adição (MP) e sem adição de PEG (MSP). Pelo método do  $\text{SF}_6$ , 8 ovinos, machos, castrados, com cânula ruminal e PV médio de  $61,8 \pm 6,8$  kg, foram submetidos a 23 dias de adaptação e 10 de coleta, subdivididos em dois grupos, com alternância de tratamentos: dieta de feno de capim-aruaana suplementado com feno de mucuna, com adição (MP), e sem adição de PEG (MSP). Ao término das avaliações de  $\text{CH}_4$  foram coletadas amostras de conteúdo ruminal para análises do teor de nitrogênio amoniacal ( $\text{N-NH}_3$ ), ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), e contagem de protozoários. No método das CR, houve maior ingestão de matéria seca (MS), de matéria orgânica (MO) e de fibras em detergente neutro (FDN) no grupo MSP, quando comparado ao CON ( $p < 0,05$ ); a inclusão de mucuna (MP e MSP) proporcionou maior ingestão de proteína, maiores teores de  $\text{N-NH}_3$  e AGCC total e de propionato, e menor relação acetato:propionato, quando comparados ao CON ( $p < 0,05$ ); a inclusão de PEG proporcionou redução na contagem de protozoários ruminais. No método do  $\text{SF}_6$ , não houve diferenças entre os grupos MP e MSP em nenhum dos parâmetros analisados. Em ambos os métodos, não houve diferenças entre os tratamentos, nos parâmetros de emissão de  $\text{CH}_4$  analisados ( $p > 0,05$ ).

**Palavras-chave:** ácidos graxos de cadeia curta, câmaras respirométricas, hexafluoreto de enxofre (SF<sub>6</sub>), polietilenoglicol, protozoários, taninos.

## 2. ABSTRACT

### **METHANE EMISSION AND RUMINAL FERMENTATIVE PARAMETERS OF SHEEP SUPPLEMENTED WITH STIZOLOBIUM ATERRIMUM**

The objective of this study was to evaluate ruminal fermentation behavior and the potential to mitigate the enteric methane (CH<sub>4</sub>) production of legume *Stizolobium aterrimum* (SA) in Santa Inês sheep. For the analysis of the condensed tannins (TC) effects present in their composition, the tannin binder polymer polyethylene glycol (PEG) was used. Two methods were used to evaluate CH<sub>4</sub> emission: the respirometric chambers (CR) and the sulfur hexafluoride (SF<sub>6</sub>) technique. In the method of CR 18 lambs, castrated males, with a mean live weight of 46.8 ± 7.8 kg, with approximately 24 months old, were submitted to 24 days of experimental period (18 days of adaptation and 6 of collection), divided into 3 groups of treatments: exclusive diet of aruana grass hay (*Panicum maximum* Jacq. cv. Aruana) (CON); aruana grass hay supplemented with SA hay with PEG addition (MP) and without PEG addition (MSP). In SF<sub>6</sub> method, 8 male castrated sheep with ruminal cannula and mean PV of 61.8 ± 6.8 kg were submitted to 33 days of experimental period (23 of adaptation and 10 of collection), subdivided into two groups with treatments alternation: diet of aruana grass hay supplemented with SA hay, with PEG addition (MP), and without PEG addition (MSP). After the CH<sub>4</sub> evaluation in both methods, ruminal content samples were collected for analysis of ammoniacal nitrogen (N-NH<sub>3</sub>), short chain fatty acids (AGCC), and protozoal accounts. In the CR method, there was higher intake of dry matter (MS), organic matter (MO) and neutral detergent fiber (FDN) in the MSP group when compared to the CON (p < 0.05); The inclusion of SA (MP and MSP) provided a higher intake of crude protein (PB) and digestible PB, higher N-NH<sub>3</sub> levels, higher amount of total AGCC and propionate, and lower acetate: propionate ratio when compared to CON (p < 0.05). The inclusion of PEG provided a reduction in the ruminal protozoal account.

In the SF<sub>6</sub> method, there were no differences between the MP and MSP groups in any of the parameters analyzed. In both methods, there were no differences between treatments in the CH<sub>4</sub> emission parameters analyzed ( $p > 0.05$ ).

**Key words:** Polyethylene glycol. Protozoa. Respirometric Chambers. Short Chain Fatty Acids. Sulfur hexafluoride. Tannins.

### 3. INTRODUÇÃO

A área destinada ao cultivo de plantas forrageiras para atender a produção pecuária brasileira compreende pelo menos 51 % da área de produção agrícola nacional (IBGE, 2015) onde em sua maioria é destinado a produção de ruminantes, que totalizaram aproximadamente 240 milhões de cabeças entre bovinos, bubalinos, caprinos e ovinos, e representaram 38 % da carne produzida no país (FAO, 2017), além de leite e seus derivados, couro, pele e lã.

O manejo adequado da alimentação animal, através da utilização alimentos de melhor qualidade nutricional e maior digestibilidade, além de possibilitar a elevação dos índices produtivos, permite a redução de perdas energéticas durante o processo fermentativo, principalmente em decorrência da formação de gases, onde o metano (CH<sub>4</sub>) recebe importante destaque (Johnson & Johnson, 1995; Mackie et al., 2013).

Visando reduzir a utilização de grãos por ruminantes proporcionando aumento da disponibilidade de cereais para atendimento da demanda na alimentação humana, a melhora na forragem ofertada surge como uma alternativa viável, onde as leguminosas de clima tropical aparecem como opção de destacado potencial, devido a sua melhor qualidade nutricional e maior digestibilidade, quando comparadas às gramíneas tropicais que predominam como forrageiras utilizadas na produção de ruminantes (Hristov et al., 2013; Lima, 2016).

Além da qualidade bromatológica, que geralmente é superior à das gramíneas, as leguminosas tropicais apresentam maiores teores, e com maior frequência que gramíneas e leguminosas de clima temperado, taninos (Archimède et al., 2011). Os taninos são metabólitos secundários, quimicamente definidos como compostos polifenólicos, classificados em hidrolisáveis (TH) ou em condensados (TC) e, apesar do seu efeito antinutricional quando administrado em doses superiores a 40 g/kg de matéria seca ingerida (MSI), que pode levar a

toxicidade, vem mostrando efeitos positivos como anti-helmíntico, na elevação da produção de carne, leite e lã, e redução na emissão de CH<sub>4</sub> de origem entérica (Makkar, 2003; Frutos et al., 2004; Louvandini et al., 2011).

A leguminosa estolonífera mucuna-preta (*Stizolobium aterrimum*), muito utilizada na utilização como adubo verde, vem sendo testada na alimentação animal devido a sua qualidade nutricional, teor de taninos adequado à nutrição, associado a facilidade de manejo e elevada aceitabilidade por parte de ovinos e bovinos (Arf et al., 1996; Seno et al., 1996; Whitmore, 2000; Silva Sobrinho, 2014), e principalmente devido ao potencial mitigador apresentado por esta leguminosa (Delgado et al., 2010; Moreira et al., 2013).

Objetivando-se avaliar o comportamento fermentativo da inclusão de mucuna-preta na dieta de ovinos alimentados com feno de gramínea tropical e o seu potencial em mitigar a produção de CH<sub>4</sub>, bem como analisar os efeitos do TC presente em sua composição através da utilização do polímero aglutinador de taninos polietilenoglico (PEG), realizou-se dois experimentos *in vivo*, com os métodos das câmaras respirométricas (CR) e do gás traçador hexafluoreto de enxofre (SF<sub>6</sub>) para analisar a emissão de CH<sub>4</sub> em ovinos Santa Inês suplementados com mucuna-preta.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Local

Os locais de realização das análises *in vitro* e *in vivo*, de cultivo e enfeação da leguminosa utilizada, bem como a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-CENA/USP) se encontram descritos no tópico 4.1 *Local* do capítulo anterior.

### 4.2. Leguminosa Testada

O cultivo e o processo de enfeação da mucuna-preta, a descrição da análise bromatológica realizada e a composição nutricional (Tabela 2.1) dos fenos utilizados (mucuna e aruana) encontram-se descritos no tópico 4.2 *Leguminosa Testada* do capítulo anterior.

### 4.3. Técnica das câmaras respirométricas – CR

Foram utilizados 18 ovinos Santa Inês, machos, castrados, com PV médio de  $46,8 \pm 7,8$  kg, com, aproximadamente, 24 meses de idade. Os animais foram submetidos a 24 dias de período experimental, divididos em 18 dias de adaptação à dieta, onde os animais foram alocados em baias coletivas por 10 dias, 7 dias de adaptação às gaiolas individuais para experimento de metabolismo, 1 dia de adaptação às câmaras e 2 dias de coleta. Como só haviam 6 câmaras em funcionamento, formou-se 3 blocos com 2 animais de cada tratamento. Os animais foram divididos em três grupos: controle (CON), mucuna + PEG (MP) e mucuna (MSP).

A dieta fornecida ao grupo CON foi feno picado de *Panicum maximum* cv. Aruana disponibilizado *ad libitum*, calculada em 3 % de consumo de matéria seca (CMS) em relação ao PV e ofertado 2 vezes ao dia; a dieta do grupo MSP, também calculada em 3 % de CMS em relação ao PV, foi fornecida de forma a manter a relação 50 % de feno de mucuna-preta e 50 % de feno picado de *Panicum maximum* cv. Aruana, dessa maneira a quantidade de feno de aruana, ofertada no período vespertino, dependia do consumo de feno de mucuna, ofertado pela manhã; e MP mesma dieta do MSP, porém o feno da mucuna foi homogeneizado com 40 mL de solução de PEG, com concentração 0,5g de PEG/mL, perfazendo uma relação PEG:TC de 3:1. Os três grupos receberam água e sal mineral *ad libitum*.

Para a determinação da emissão de CH<sub>4</sub> pela técnica das câmaras respirométricas utilizou-se as CR de circuito aberto desenvolvidas no LANA-CENA/USP, conforme descrito por Abdalla et al. (2008), porém com a substituição das cortinas de polietileno por placas transparentes de acetato que facilitam o manejo nas câmaras. Para a coleta, cada animal permaneceu por dois dias consecutivos na CR; as amostras foram armazenadas em balões plásticos revestidos por filme em alumínio para posterior leitura em cromatógrafo a gás Shimadzu<sup>®</sup> GC-2010, através do detector por ionização de chama (FID).

#### 4.4. Técnica do hexafluoreto de enxofre – SF<sub>6</sub>

Foram utilizados 8 ovinos Santa Inês, machos, castrados, com cânula ruminal e peso vivo (PV) médio de  $61,8 \pm 6,8$  kg, do rebanho permanente do LANA/CENA. Os animais foram submetidos a 33 dias de período experimental, divididos em 22 dias de adaptação, onde os animais foram alocados em baias coletivas por 20 dias para adaptação à dieta, 2 dias de adaptação às gaiolas individuais para experimento de metabolismo, 5 dias de coleta do primeiro bloco, 7 dias de descanso das gaiolas, 1 dia de readaptação às gaiolas e 5 dias de coleta do segundo bloco. Os animais foram divididos em dois grupos com alternância de tratamentos (*switchback*<sup>3</sup>): mucuna + PEG (MP) e mucuna (MSP).

A dieta ofertada ao grupo MSP foi calculada em 3 % de CMS em relação ao PV, e foi fornecida de forma a manter a relação 50 % de feno de mucuna-preta e 50 % de feno picado de *Panicum maximum* cv. Aruana, dessa maneira a quantidade de feno de aruana,

---

<sup>3</sup> O modelo estatístico “*switchback*”, que não apresenta o mesmo número de tratamentos e de animais, é uma variação do modelo “quadrado latino” que apresenta o mesmo número de animais e de tratamentos (Templeman, 2004).

ofertada no período vespertino, dependia do consumo de feno de mucuna, ofertado pela manhã; a dieta ofertada ao grupo MP foi mesma dieta do grupo MSP, porém o feno da mucuna foi homogeneizado com 40 mL de solução de PEG, com concentração 0,5g de PEG/mL, perfazendo uma relação PEG:TC de 3:1. Ambos os grupos receberam água e sal mineral *ad libitum*.

Para determinação da emissão de CH<sub>4</sub> pela técnica do gás traçador SF<sub>6</sub> utilizou-se as adaptações realizadas por Primavesi et al. (2004) no método inicialmente descrito por Johnson et al. (1994). Diferentemente do descrito por Johnson et al. (1994) e Primavesi et al. (2004), as cangas utilizadas eram cilíndricas e de aço inoxidável e ficavam fixas ao dorso dos animais por meio de arreios. As cápsulas foram recuperadas após a coleta e calibradas novamente para a correção da emissão de SF<sub>6</sub>, conforme descrito por Boland et al. (2014). Ao longo do experimento, foram realizadas duas etapas (blocos) de 5 dias de coleta, totalizando 10 dias de coleta para 16 animais, conforme sugerido por Koolaard et al. (2014); as amostras foram analisadas em cromatógrafo a gás Shimadzu® GC-2010 equipado com detectores de captura de elétrons (ECD), para a leitura do SF<sub>6</sub>, e FID, para leitura do CH<sub>4</sub>.

#### **4.5. Parâmetros de Fermentação Ruminal**

No último dia do período de coleta no experimento de ambos os ensaios, após três horas do fornecimento da dieta, foram amostrados líquido ruminal de todos animais para análise da concentração de N-NH<sub>3</sub>, conforme Preston (1995), ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), de acordo com a metodologia adaptada de Palmquist & Conrad (1971) e contagem de protozoários, de acordo com Dehority et al. (1983). Para as análises de N-NH<sub>3</sub> e AGCC as amostras foram armazenadas em freezer a -20 °C, e para a contagem de protozoários, 2 mL de líquido ruminal foram diluídos em 4 mL de solução de verde de metila e formol salino (M.F.S.) e mantidas ao abrigo da luz em temperatura ambiente.

#### **4.6. Análise Estatística**

No experimento SF<sub>6</sub> foi utilizado o delineamento de cruzamento repetido *switchback*. Em ambos os experimentos, CR e SF<sub>6</sub>, os dados coletados foram submetidos à análise de variância por meio do procedimento MIXED do programa SAS®, onde as dietas foram consideradas os efeitos fixos e os animais os efeitos aleatórios. Em todas as análises as

médias foram comparadas pelo teste de Tukey e foi utilizada a versão 9.4 do SAS<sup>®</sup> (Analysis System Institute, Cary NC, USA) adotando-se o nível de significância de 5 %.

Para a quantificação de protozoário por mL de conteúdo ruminal, em ambos os experimentos, os dados foram submetidos ao teste Shapiro-Wilk de normalidade, através do procedimento UNIVARIATE, também do programa SAS<sup>®</sup> (versão descrita acima), antes da análise de variância.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Resultados

#### 5.1.1. Câmaras respirométricas – CR

No experimento de CR foram utilizados animais de PV equivalente ( $p > 0,05$ ) em todos os tratamentos. Nos parâmetros de consumo analisados, não se observaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) no consumo da mucuna (MP e MSP), na MS digestível ingerida (MSDI), na matéria orgânica (MO) digestível ingerida (MODI), nem na FDN digestível ingerida (DFDNI) entre os tratamentos avaliados. Entretanto houve diferença significativa na MSI, na MO ingerida (MOI) e na FDN ingerida (FDNI), sendo que os animais do grupo MSP consumiram quantidades maiores desses nutrientes do que os animais do grupo CON ( $p < 0,05$ ). Ainda no que diz respeito a consumo, os animais que receberam mucuna (grupos MP e MSP) ingeriram maiores quantidades de (PBI) e de PB digestível (DPBI) quando comparados aos animais do grupo CON. Em relação à emissão de  $\text{CH}_4$ , não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos utilizados na emissão diária ( $\text{CH}_4\text{D}$ ), na emissão de  $\text{CH}_4$  relativa a MSI ( $\text{CH}_4\text{MSI}$ ), na emissão de  $\text{CH}_4$  relativa à MSDI ( $\text{CH}_4\text{MSDI}$ ), na emissão de  $\text{CH}_4$  relativa à MODI ( $\text{CH}_4\text{MODI}$ ), nem na emissão de  $\text{CH}_4$  relativa à DFDNI ( $\text{CH}_4\text{DFDNI}$ ), (tabela 3.1).

Tabela 3.1 – Peso vivo, consumo e de emissão de metano (CH<sub>4</sub>) aferidos em câmaras respirométricas com ovinos alimentados exclusivamente com feno de capim-aruaana (CON) e suplementados com mucuna-preta com (MP) ou sem (MSP) a adição de polietilenoglicol (PEG) em sua composição.

Variáveis	Tratamentos			EPM <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>
	CON	MP	MSP		
Peso vivo (kg)	51,57	46,47	46,57	2,94	n.s.
<b>Consumo (I)</b>					
Matéria seca (MSI) – (kg/dia)	0,89 <sup>B</sup>	0,95 <sup>AB</sup>	1,04 <sup>A</sup>	0,07	0,0071
Mucuna-preta (g/kg MSI)	–	659	682	28,31	n.s.
Matéria orgânica (MOI) – (kg/dia)	0,85 <sup>B</sup>	0,90 <sup>AB</sup>	0,99 <sup>A</sup>	0,07	0,0073
Fibra em detergente neutro (FDNI) – (kg/dia)	0,65 <sup>B</sup>	0,69 <sup>AB</sup>	0,76 <sup>A</sup>	0,05	0,0073
Proteína bruta (PBI) – (kg/dia)	0,081 <sup>B</sup>	0,124 <sup>A</sup>	0,138 <sup>A</sup>	0,01	< 0,0001
MS digestível (MSDI) – (kg/dia)	0,55	0,49	0,54	0,05	n.s.
MO digestível (MODI) – (kg/dia)	0,58	0,51	0,49	0,05	n.s.
FDN digestível (DFDNI) – (kg/dia)	0,42	0,35	0,35	0,03	n.s.
PB digestível (DPBI) – (kg/dia)	0,04 <sup>B</sup>	0,06 <sup>A</sup>	0,06 <sup>A</sup>	0,01	< 0,0001
<b>Emissão de CH<sub>4</sub></b>					
CH <sub>4</sub> D	10,60	12,61	14,39	1,44	n.s.
CH <sub>4</sub> MSI	12,00	14,79	14,33	1,83	n.s.
CH <sub>4</sub> MSDI	19,33	34,31	27,40	5,17	n.s.
CH <sub>4</sub> MODI	18,69	27,99	31,08	3,64	n.s.
CH <sub>4</sub> DFDNI	25,58	42,36	42,56	4,89	n.s.

CH<sub>4</sub>D – emissão de metano (CH<sub>4</sub>) em g/dia; CH<sub>4</sub>MSI – emissão de CH<sub>4</sub> em g/kg MSI; CH<sub>4</sub>MSDI – emissão de CH<sub>4</sub> em g/kg MSDI; CH<sub>4</sub>MODI – emissão de CH<sub>4</sub> em g/kg MODI; CH<sub>4</sub>DFDNI – emissão de CH<sub>4</sub> em g/kg DFDNI.

<sup>1</sup> – Erro padrão da média

<sup>2</sup> – Valores expressos: (p<0,05) significativo; (p>0,05) não significativo (n.s.)

Em relação aos parâmetros de fermentação ruminal dos animais utilizados nas CR, a inclusão de mucuna na dieta (grupos MP e MSP) proporcionou maior quantidade de N-NH<sub>3</sub>, AGCC total produzida e propionato no conteúdo ruminal desses animais, quando comparados ao grupo CON (p < 0,05). Por sua vez o grupo CON apresentou maior teor de isovalerato, quando comparado aos grupos MP e MSP (p < 0,05). A quantidade de protozoários do grupo CON foi superior à contagem do grupo MP (p < 0,05), mas semelhante ao MSP. O teor de isobutirato do grupo CON foi superior aos teores encontrados no grupo MP (p = 0,0829) e no MSP (p < 0,05). Os teores de valerato dos grupos CON e MP foram superiores ao teor encontrado no grupo MSP (p = 0,0559). A relação acetato:propionato do grupo CON foi maior quando comparada aos grupos MP (p < 0,05) e MSP (p = 0,0650) (tabela 3.2).

Tabela 3.2 – Parâmetros ruminiais de ovinos alimentados exclusivamente com feno de capim-aruaana (CON) e suplementados com mucuna-preta com (MP) ou sem (MSP) adição de polietilenoglicol (PEG) em sua composição.

Variáveis	Tratamentos			EPM <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>
	CON	MP	MSP		
N-NH <sub>3</sub> (mg/100 mL)	10,37 <sup>B</sup>	18,53 <sup>A</sup>	17,85 <sup>A</sup>	2,21	0,0141
Protozoários (x10 <sup>5</sup> /mL)	11,20 <sup>A</sup>	5,95 <sup>B</sup>	8,55 <sup>AB</sup>	0,50	0,0019
<b>AGCC</b>					
Total (mmol/L)	57,77 <sup>B</sup>	85,91 <sup>A</sup>	87,75 <sup>A</sup>	7,74	0,0100
Acetato (%)	78,80	78,45	79,62	0,99	n.s.
Propionato (%)	12,24 <sup>B</sup>	13,83 <sup>A</sup>	13,85 <sup>A</sup>	0,50	0,0211
Butirato (%)	5,22	5,56	5,11	0,70	n.s.
Isobutirato (%)	1,03 <sup>A</sup>	0,56 <sup>AB</sup>	0,27 <sup>B</sup>	0,19	0,0064 <sup>(3)</sup>
Valerato (%)	0,52 <sup>A</sup>	0,44 <sup>AB</sup>	0,36 <sup>B</sup>	0,06	0,0559
Isovalerato (%)	2,19 <sup>A</sup>	1,13 <sup>B</sup>	0,79 <sup>B</sup>	0,35	0,0279
Acetato:Propionato	6,45 <sup>A</sup>	5,71 <sup>B</sup>	5,76 <sup>AB</sup>	0,27	0,0477 <sup>(4)</sup>

N-NH<sub>3</sub> – nitrogênio amoniacal; AGCC – ácidos graxos de cadeia curta

<sup>1</sup> – Erro padrão da média

<sup>2</sup> – Valores expressos: (p < 0,05) significativo; (0,05 < p < 0,10) tendência; (p > 0,10) não significativo (n.s.)

<sup>3</sup> – O teor de isobutirato do grupo MP, quando comparada ao grupo CON, foi inferior (p = 0,0829)

<sup>4</sup> – A relação Acet:Prop do grupo MSP, quando comparada ao grupo CON, foi inferior (p = 0,0650)

### 5.1.2. Hexafluoreto de enxofre – SF<sub>6</sub>

Na análise de SF<sub>6</sub> foram utilizados animais com PV semelhantes. Para as variáveis de consumo e emissão de metano entérico não houve diferença entre tratamentos (p > 0,05) (tabela 3.3).

Tabela 3.3 – Peso vivo, consumo de matéria seca (MSI) e emissão de metano (CH<sub>4</sub>) aferida pelo método do gás traçador SF<sub>6</sub> em ovinos, suplementados com mucuna-preta com (MP) ou sem (MSP) adição de polietilenoglicol (PEG) em sua composição.

Variáveis	Tratamentos		EPM <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>
	MP	MSP		
Peso vivo (kg)	59,82	60,32	0,45	n.s.
MSI (kg/dia)	0,91	0,84	0,12	n.s.
Consumo de mucuna-preta (g/kg MSI)	533,5	527,1	23,33	n.s.
Consumo de proteína bruta (kg/dia)	0,112	0,103	0,015	n.s.
<b>Emissão de CH<sub>4</sub></b>				
CH <sub>4</sub> D	21,51	20,08	3,51	n.s.
CH <sub>4</sub> MSI	24,36	25,54	2,51	n.s.

CH<sub>4</sub>D – emissão de metano (CH<sub>4</sub>) em g/dia; CH<sub>4</sub>MSI – emissão de CH<sub>4</sub> em g/kg MSI.

<sup>1</sup> – Erro padrão da média.

<sup>2</sup> – Valores expressos: (p<0,05) significativo; (p>0,05) não significativo (n.s.).

Em nenhuma das variáveis ruminais analisadas no experimento da técnica do SF<sub>6</sub>, foi observada diferença entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ). A quantidade de protozoários/ mL de líquido ruminal nos ovinos do grupo MSP foi maior ( $p = 0,0925$ ), quando comparada aos ovinos do grupo MP (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 – Quantidade de protozoários e ácidos graxos de cadeia curta em ovinos alimentados com feno de capim-aruaana e suplementados com mucuna-preta com (MP) ou sem adição (MSP) de polietilenoglicol (PEG) em sua composição.

Variáveis	Tratamentos		EPM <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>
	MP	MSP		
Protozoários (x10 <sup>5</sup> /mL)	10,03	11,87	0,42	0,0925
Ácidos graxos de cadeia curta				
Total (mmol/L)	91,57	88,04	3,48	n.s.
Acetato (%)	77,54	76,88	0,77	n.s.
Propionato (%)	14,82	14,78	0,48	n.s.
Butirato (%)	6,33	6,71	0,37	n.s.
Isobutirato (%)	0,19	0,26	0,08	n.s.
Valerato (%)	0,39	0,45	0,03	n.s.
Isovalerato (%)	0,72	0,90	0,11	n.s.
Acetato:Propionato	5,29	5,24	0,22	n.s.

<sup>1</sup> – Erro padrão da média

<sup>2</sup> – Valores expressos: ( $p < 0,05$ ) significativo; ( $0,05 < p < 0,10$ ) tendência; ( $p > 0,10$ ) não significativo (n.s.)

## 5.2. Discussão

### 5.2.1. Mucuna-preta

Apesar de leguminosas normalmente possuírem valores mais elevados de taninos e melhor digestibilidade do que gramíneas tropicais (Archimède et al., 2011; Boval & Dixon, 2012; Hristov et al., 2013) a mucuna-preta utilizada neste experimento apresentou baixos teores de CFT (24,68 g /kg MS), TT (15,31 g /kg de MS) e de TC (5,67 g /kg de MS) quando comparada aos valores médios encontrados na literatura pesquisada de 47,00, 40,75 e 25,80 g/kg MS de CFT, TT e TC, respectivamente (Longo, 2007; Savón et al., 2007; Delgado et al., 2010; Abdalla et al., 2012; Longo et al., 2012; Moreira et al., 2013) e 2.1.

Os conteúdos de FDN (729,25 g/kg MS) e FDA (559,25 g/kg MS) também foram acima dos valores médios para a mucuna (FDN 619,33 g/kg MS e FDA 439,33 g/kg de MS), segundo a literatura consultada (Nascimento & Silva, 2004; La O et al., 2006; Longo, 2007; Savón et al., 2007; Delgado et al., 2010; Abdalla et al., 2012; Longo et al., 2012; Moreira et al.,

2013). Os elevados teores de FDN e FDA se devem à maior ou menor variação no vegetal decorrentes da parte colhida, época do ano e tempo de cultivo da mucuna. Quando comparados aos valores encontrados por Nascimento & Silva (2004) (FDN 714 g/kg MS e FDA 555 g/kg MS) e por Moreira et al. (2013) (FDN 822 g/kg MS e FDA 645 g/kg MS), que também utilizaram a parte aérea integral da mucuna, foram próximos; quando comparados aos teores determinados por autores que utilizaram apenas folhas, pecíolos e galhos jovens os teores foram superiores aos encontrados por Abdalla et al. (2012) (FDN 496 g/kg MS) e por Delgado et al. (2010) (FDN 463 g/kg de MS e FDA 292 g/kg MS).

Os teores de TT e de TC da mucuna foram muito aquém dos valores de 50 g/kg de MS considerados como antinutricionais na nutrição animal (Makkar, 2003; Seresinhe & Pahirana, 2003) descartando a possibilidade de os taninos da mucuna virem a interferir negativamente em características de saúde e desempenho animal. Seresinhe & Pathirana (2003) e Louvandini et al. (2011) consideraram que os efeitos benéficos dos taninos se apresentariam em situações em que o conteúdo estivesse entre a faixa de 20 a 40 g de tanino/kg MS, porém Montossi et al. (1996), comparando animais com e sem a utilização de PEG, obtiveram ganho em peso 23 % superior em cordeiros alimentados com a gramínea *Holcus lanatus*, com 4,2 g de TC/kg MS, em sua composição (Montossi et al., 1996; Frutos et al., 2004), sugerindo uma possível melhora também no processo fermentativo ruminal e uma eventual redução na emissão de CH<sub>4</sub>, mesmo com teores de TT e TC abaixo da faixa considerada benéfica, porém isso não foi observado no presente estudo (Tabelas 3.1 e 3.3).

O feno de aruana utilizado apresentou teores próximos aos descritos por Valadares Filho et al. (2016) para feno de capim-aruana, com 887,5 g de MS/kg de matéria natural (MN), 776,8 g de FDN/kg de MS, 556,2 g de FDA/kg MS e 75,1 g de PB/kg de MS. No presente estudo, a composição nutricional da leguminosa (mucuna-preta) e da gramínea (capim-aruana) utilizadas foram semelhantes (Tabela 2.1), com exceção dos teores de PB e FDA, que foram maiores na leguminosa, e dos CFT, TT e TC, que apesar de presentes apenas na mucuna, foram abaixo do usualmente encontrado (Abdalla et al., 2012; Longo et al., 2012; Moreira et al., 2013), impossibilitando a mitigação de CH<sub>4</sub>.

### 5.2.2. Câmaras respirométricas – CR

O consumo apresentado pelos animais nos tratamentos CON, MP e MSP foi o esperado de acordo com as exigências nutricionais descritas pelo NRC (2007), que estima o consumo de 0,77 a 1,05 kg de MS e de 0,059 a 0,079 de kg de PB para ovinos adultos que pesem entre 40 e 60 kg de PV, respectivamente, porém o consumo do grupo MSP foi 17 % superior ao do grupo CON ( $p < 0,05$ ), elevando a ingestão de MO e FDN, consequentemente. A ingestão de proteína nos grupos MP e MSP foi aproximadamente superior em 62 % de PB e em 50 % de proteína digestível (PD) quando comparados ao grupo CON, devido aos maiores teores apresentados pela mucuna de PB e PD, quando comparado ao aruana.

Como o teor de TC apresentado pela mucuna também não foi suficiente para interferir negativamente no consumo dos animais, e como pode ser observado os animais recebendo mucuna (MP e MSP) apresentaram consumo aproximadamente 12 % maior do que os animais que receberam apenas aruana (CON), o teor de AGCC total produzido também foi maior (Tabelas 3.1 e 3.2). Como o teor de fibras apresentado para mucuna, foi próximo ao obtido para o feno de aruana, a ingestão de fibras também foi maior, acompanhando o consumo, nos grupos MP e MSP, gerando uma elevada produção de acetato, assim como no grupo CON. Essa maior ingestão de fibras e, por conseguinte, maior produção de acetato é um dos fatores que faz com que se eleve a produção de  $\text{CH}_4$  durante o processo fermentativo (Hristov et al., 2013; Na et al., 2013).

Outro fator que influenciaria a mitigação de  $\text{CH}_4$  entérico é a elevação do teor de propionato no conteúdo ruminal e consequente redução na relação acetato:propionato (Hristov et al., 2013). Apesar deste processo ter ocorrido devido a maior ingestão de PB (PBI) dos grupos MP e MSP quando comparada ao grupo CON ( $p < 0,05$ ), tanto no teor de propionato, quanto na relação acetato:propionato, melhorando assim o padrão fermentativo da digesta contendo mucuna, quando comparada à digesta composta por feno de aruana, essas alterações não foram suficientes para modificar o perfil nos teores de acetato 65-70 % e de propionato 15-20 % normalmente encontrados na literatura (McDonald et al., 2010; Mackie et al., 2013), o que pode não ter contribuído em uma possível redução na emissão de  $\text{CH}_4$ .

Isso também pode ter ocorrido pelo fato de se ter utilizado fenos, onde os teores de carboidratos solúveis se encontram reduzidos e os de carboidratos estruturais elevados, reduzindo assim o aporte energético disponível na dieta (Hirstov et al., 2013; Lima, 2016).

Leguminosas, devido ao seu maior conteúdo de carboidratos não estruturais e baixo teor de fibras, associadas a presença de taninos em sua composição, podem reduzir a perda de energia pela formação de  $\text{CH}_4$  (Archimède et al., 2011; Goel & Makkar, 2012; Hristov et al., 2013), porém no presente estudo apesar de o teor de FDN da mucuna ter sido próximo ao do aruana, o teor de FDA foi maior na mucuna, reduzindo assim sua digestibilidade, conforme visto nas tabelas 2.1 e 2.3 do capítulo anterior.

A elevação do teor de  $\text{N-NH}_3$  ( $p < 0,05$ ) no presente estudo também foi decorrente da maior PBI dos grupos MP e MSP em relação ao grupo CON e do maior teor de  $\text{N-NH}_3$  apresentado pelas dietas com mucuna, conforme discutido no item **Digestibilidade aparente** do capítulo anterior. O teor de  $\text{N-NH}_3$  funciona como indicador da atividade biológica do TC que forma complexos estáveis com a proteína em pH ruminal (Bhat et al., 2013), porém quando se compara os grupos MP e MSP isso não pode ser observado ( $p > 0,05$ ) em decorrência, provavelmente, do teor de taninos ter ficado abaixo da faixa considerada benéfica e não ter gerado efeitos que pudessem ser verificados nas variáveis avaliadas.

Não se observou diferença significativa na emissão de  $\text{CH}_4$  em decorrência utilização da mucuna, assim como a inclusão da leguminosa na dieta dos animais não foi suficiente para reduzir a população de protozoários ( $p > 0,05$ ), quando comparados os grupos MSP e CON do experimento CR (Tabela 3.2). Porém a inclusão de PEG proporcionou um decréscimo de 47 % na densidade populacional de protozoários ( $p < 0,05$ ), quando comparados os grupos CON e MP, conforme discutido no tópico **Digestibilidade aparente** do capítulo anterior.

Assim como no presente estudo, não foi possível perceber mitigação na emissão de  $\text{CH}_4$  associada à densidade da população de protozoários, confirmando as afirmações de Hristov et al. (2013) e Newbold et al. (2015) a respeito da grande variabilidade encontrada nos resultados de emissão de  $\text{CH}_4$  associados a defaunação ou a modificação na densidade populacional de protozoários.

### 5.2.3. Hexafluoreto de enxofre – $\text{SF}_6$

O consumo apresentado pelos animais nos tratamentos MP e MSP também foi o esperado de acordo com as exigências nutricionais descritas pelo NRC (2007), conforme relatado no tópico anterior. Não houve diferenças nos parâmetros de consumo entre os grupos

que receberam e os que não receberam PEG, demonstrando através da inativação dos taninos que a quantidade e a qualidade do TC presentes na mucuna não foram suficientes para inibir o consumo da leguminosa.

Em relação a emissão de CH<sub>4</sub>, o teor e a qualidade do TC, que tem maior propensão na redução do CH<sub>4</sub> entérico de forma indireta, através da redução no processo fermentativo das fibras (Goel & Makkar, 2012; Hristov et al., 2013). O TC presente na mucuna não foi suficiente para reduzir a emissão de CH<sub>4</sub>, quando comparados os grupos MSP e MP ( $p > 0,05$ ). Comparando as emissões obtidas pelos métodos da CR e do SF<sub>6</sub>, a variação nos valores obtidos, que pode ocorrer mesmo dentro dos mesmo método, pode estar relacionada às diferenças metodológicas, conforme relatado por Goel & Makkar (2012) e Hammond et al. (2016), porém a resposta ao TC como mitigador na emissão de CH<sub>4</sub> em ambas as metodologias foi semelhante.

Analisando-se os valores obtidos para quantidade total e os teores de AGCC foi possível perceber que apenas a presença de TC na mucuna, na quantidade apresentada, não foi suficiente para alterar o perfil de AGCC nem elevar o teor de propionato, conforme discutido no tópico anterior. Essa relação se torna mais nítida quando se compara os resultados do experimento SF<sub>6</sub>, onde se obteve teores semelhantes de PBI e de propionato entre MP e MSP, com o experimento CR, que apresentou maiores valores de PBI e propionato, e menores de relação acetato:propionato para os grupos MP e MSP, quando comparados ao CON. Esse fato vem corroborar com a informação de que alimentos com melhor composição nutricional elevam o teor de propionato no conteúdo ruminal (Teixeira, 2001; Lana, 2007; Hirstov et al., 2013).

Em relação a densidade populacional de protozoários ruminais, assim como o ocorrido no experimento CR, não foi possível perceber ação inibitória do TC nos protozoários, porém houve atuação do PEG em reduzir a densidade populacional de protozoários ( $p = 0,0925$ ), conforme discutido no tópico anterior e no tópico **Digestibilidade aparente** do capítulo anterior. Assim como o já relatado, não houve diferença na emissão de CH<sub>4</sub> relacionada com a população de protozoários ruminais.

## 6. CONCLUSÃO

A inclusão do feno da leguminosa mucuna-preta na dieta de ovinos, quando comparados aos animais que receberam exclusivamente o feno da gramínea capim-aruaana, proporcionou melhores parâmetros fermentativos, observando-se: maior ingestão de PB e de PD, maior teor de N-NH<sub>3</sub>, maior produção de AGCC e de propionato, e menores relações acetato:propionato, porém não se observaram diferenças nos parâmetros de emissão de CH<sub>4</sub>.

A população de protozoários não foi afetada pelos taninos da mucuna, porém a inclusão de PEG reduziu significativamente a quantidade de protozoários por mL de conteúdo ruminal; entretanto a redução observada também não produziu efeitos significativos na redução dos parâmetros de emissão de CH<sub>4</sub>.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, A.L.; BUENO, I.C.S.; PEÇANHA, M.R.S.R.; et al. In vivo methane determination in a small chamber system. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, East Melbourne, v. 48, 2008. Presented at 3rd Greenhouse Gases and Animal Agriculture Conference, 2008.
- ABDALLA, A.L.; LOUVANDINI, H.; SALLAM, A.M.A.H.; et al. In vitro evaluation, in vivo quantification, and microbial diversity studies of nutritional strategies for reducing enteric methane production. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, p. 953-964, 2012.
- ARCHIMÈDE, H.; EUGÈNE, M.; MARIE MAGDELEINE, C.; et al. Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and legumes. **Animal Feed Science and Technology**, 166-167, p. 59-64, 2011.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis**. 18. ed. Arlington: AOAC International, 2011.
- BHAT, T.K.; KANNAN, A.; BIRBAL SINGH; et al. Value Addition of Feed and Fodder by Alleviating the Antinutritional Effects of Tannins. **Agricultural Research**, v. 2, n. 3, p. 189-206, 2013.
- BOLAND, T.; WAGHORN, G.C.; MOATE, P.J.; et al. Special considerations for ruminally-cannulated animals. In: BERNDT, A.; BOLAND, T.M.; DEIGTHON, M.H.; et al. (Eds.) **Guidelines for use of sulphur hexafluoride (SF6) tracer technique to measure enteric methane emissions from ruminants**. Ministry for Primary Industries, New Zealand, p. 75-80, 2014.

- BORGES, A. L.; TRINDADE, A. V.; SOUZA, L. S.; et al. **Cultivo Orgânico de Fruteiras Tropicais – Manejo do Solo e da Cultura**. Cruz das Almas, BA: EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa em Mandioca e Fruticultura – CNPMF, Circular Técnica nº. 64 de 2003.
- BOVAL, M.; DIXON, R.M. The importance of grasslands for animal production and other functions: a review on management and methodological progress in the tropics. **Animal**, v. 6, n. 5, p. 748-762, 2012.
- BUENO, J. R.; SAKAI, R. H.; NEGRINI, A. C. et al. Caracterização química e produtividade de biomassa de quatro espécies de mucuna. Resumos do V CBA – Manejo de Agroecossistemas Sustentáveis. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, n. 2, p. 901-904, 2007.
- DEHORITY, B. A.; DAMRON, W. S.; MCLAREN, J. B. Occurrence of the rumen ciliate *Oligoisotricha bubali* in domestic cattles (*Bos taurus*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1394-1397, 1983.
- DELGADO, D.C.; GALINDO, J.; GONZÁLEZ, L.; et al. Potential of Tropical Plants to Exert Defaunating Effects on the Rumen and to Reduce Methane Production. In: N.E. Odongo, M. Garcia & G.J. Viljoen (Eds) **Sustainable Improvement of Animal Production and Health**. Rome: FAO, p. 49–54, 2010.
- FRUTOS, P.; HERVÁS, G.; GIRÁLDEZ, F. J.; et al. Review. Tannins and ruminant nutrition. **Spanish Journal of Agricultural Research**, 2 (2), p. 191-202, 2004.
- GOEL, G.; MAKKAR, H. Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, n. 4, p. 729-739, 2012.
- HAMMOND, K.J.; CROMPTON, L.A.; BANNINK, A.; et al. Review of current in vivo measurement techniques for quantifying enteric methane emission from ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v. 219, p. 13-30, 2016.
- HRISTOV, A.N; OH, J.; FIRKINS, J.L.; et al. SPECIAL TOPICS—Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 11, p. 5045-5069, 2013.

- JOHNSON, K.; HUYLEYER, M.; WESTBERG, H.; et al. Measurement of Methane Emissions from Ruminant Livestock Using a SF<sub>6</sub> Tracer Technique. **Environmental Science & Technology**, v. 28, p. 359-362, 1994.
- KOOLAARD, J.P.; LUO, D.; GRAINGER, C. Pre-experimental planning – how many animals are needed? In: BERNDT, A.; BOLAND, T.M.; DEIGHTON, M.H.; et al. (Eds.) **Guidelines for use of sulphur hexafluoride (SF<sub>6</sub>) tracer technique to measure enteric methane emissions from ruminants**. Ministry for Primary Industries, New Zealand, p. 22-26, 2014.
- LA O, O.; CHONGO, B.; DELGADO, D. et al. Chemical composition, protein fractionation and rumen digestion of mucuna (*Stizolobium aterrimum*) components. **Cuban Journal of Agricultural Science**, v. 40, n. 3, p. 287-291, 2006.
- LANA, R.P. **Nutrição e alimentação animal (mitos e realidades)**. Viçosa: UFV, 344 p., 2007.
- LIMA, Paulo de Mello Tavares. **Aspectos produtivos e emissão de metano em ovinos Santa Inês suplementados com a leguminosa *Macrotyloma axillare***. Piracicaba: Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo CENA-USP, 2016, 92p. Tese (Doutorado em Ciências) – CENA-USP, 2016.
- LONGO, C. Avaliação *in vitro* de leguminosas taniníferas tropicais para mitigação de metano entérico. Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- LONGO, C.; HUMMEL, J.; LIEBICH, J.; et al. Chemical characterization and in vitro biological activity of four tropical legumes, *Stizolobium aterrimum* L., *Stizolobium deeringianum*, *Leucaena leucocephala*, and *Mimosa caesalpiniaefolia*, as compared with a tropical grass, *Cynodon* spp. for the use in ruminant diets. **Czech Journal of Animal Science**, v. 57, n. 6, p. 225-264, 2012.
- LOUVANDINI, H., ABDALLA, A. L., McMANUS, C., et al. Plantas taniníferas na nutrição de ovinos. **Veterinária e Zootecnia**, 18(4 supl. 3), p. 176-181, 2011.
- MACKIE, R.I.; MCSWEENEY, C.S.; AMINOV, R.I. Rumen. In: **eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester**. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000404.pub2, p. 1-17, 2013.
- MAKKAR, H. P. S. **Quantification of tannins in tree foliage**. Vienna: FAO/IAEA, 2000.

- MAKKAR, H. P. S. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. **Small Ruminant Research**, n. 49, p. 241–256, 2003.
- MCDONALD, P.; EDWARDS, R.A.; GREENHALGH, J.F.D.; et al. **Animal Nutrition**, Harlow, Pearson, 692 p, 2011.
- MONTOSSI, F.; LIU, F.; HODGSON, J.; et al. Influence of low-level condensed tannins concentrations in temperate forages on sheep performance. In: **Proceedings of the XVII International Grassland Congress Session**. p. 1-2, 1997.
- MOREIRA, G. D.; LIMA, P. M. T.; BORGES, B. O.; et al. Tropical tanniniferous legumes used as an option to mitigate sheep enteric methane emission. **Tropical Animal Health and Production**, DOI 10.1007/s11250-012-0284-0, 2013.
- NA, R.; DONG, H.; ZHU, Z.; et al. Effects of Forage Type and Dietary Concentrate to Forage Ratio on Methane Emissions and Rumen Fermentation Characteristics of Dairy Cows in China. **American Society of Agricultural and Biological Engineers**. Vol. 56(3), 2013, p. 1115-1122.
- NASCIMENTO, J. T.; DA SILVA, I. F. Avaliação quantitativa e qualitativa da fitomassa de leguminosas para uso como cobertura de solo. **Ciência Rural**, v. 34, n. 3, p. 947-949, 2004.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrition requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids and world camelids**. Washington, DC, 2007.
- NEWBOLD, C.J.; DE LA FUENTE, G.; BELANCHE, A.; et al. The Role of Ciliate Protozoa in the Rumen. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 1313, p. 1-14, 2015.
- PALMQUIST, D.; CONRAD, H. Origin of plasma fatty acids in lactating cows fed high grain or high fat diets. **Journal of Dairy Science**, v. 54, n. 7, p. 1025-1031, 1971.
- PRESTON, T.R. **Tropical animal feeding: a manual for research workers**. Rome: FAO, 126 p., 1995.
- PRIMAVESI, O; FRIGHETTO, R. T. S.; PEDREIRA, M. A.; et al. **Técnica do gás traçador SF<sub>6</sub> para medição de campo do metano ruminal em bovinos: adaptações para o**

**Brasil.** São Carlos, SP: EMBRAPA, Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste – CPPSE, Documento 39 de 2004.

SAVÓN, L.; SCULL, I.; ORTA, M. et al. Integral foliage meals of three tropical legumes for poultry feeding. Chemical composition, physical properties phytochemical screening. **Cuban Journal of Agricultural Science**, v. 41, n. 4, p. 339-341, 2007.

SERESINHE, T.; PATHIRANA, K.K. [2003]. Forage tannins in ruminant nutrition. **Tropical Agricultural Research and Extension**. v. 6, 2003. Disponível em: <<http://dl.nsf.ac.lk/bitstream/handle/1/8168/TARE-6-29.pdf?sequence=2>> Acesso em: 27/04/2015.

TEIXEIRA, J.C. **Nutrição de Ruminantes**. Lavras: UFLA/FAEPE, 183 p., 2001.

TEMPLEMAN, R.J. Experimental design and statistical methods for classical and bioequivalence hypothesis testing with an application to dairy nutrition studies. **Journal of Animal Science**, n. 82 (E. Suppl.), p. E162-E172, 2004.

VALADARES FILHO, S.C., MACHADO, P.A.S., CHIZZOTTI, M.L. et al. CQBAL 3.0. Tabelas Brasileiras de Composição de Alimentos para Bovinos. Disponível em [www.ufv.br/cqbal](http://www.ufv.br/cqbal). Acesso em 10/01/2017.

## **CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## 1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados apresentados, nos experimentos descritos, e na literatura citada, ao longo do presente manuscrito é possível se confirmar o elevado potencial da mucuna-preta (*Stizolobium aterrimum*) como opção de suplemento forrageiro em sistemas de produção de ovinos. A mucuna foi capaz de melhorar o processo fermentativo ruminal, mantendo o pH ruminal próximo da neutralidade, elevando a produção total de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e de propionato, melhorando (diminuindo) a relação acetato:propionato, bem como aumentando a ingestão de proteína bruta e digestível. Assim a mucuna surge como potencial suplemento forrageiro proteico candidato a testes de desempenho animal.

A mucuna apresentou baixos teores de tanino e baixos índices de digestibilidade dos nutrientes presentes em sua composição, bem como elevado teor de fibras em detergente ácido (FDA) quando comparada com o feno de aruana e com os valores encontrados pela literatura para a própria mucuna, e, talvez por esses motivos, não foi capaz de mitigar a emissão de metano (CH<sub>4</sub>) entérico. Apesar disso, mesmo com piores índices de digestibilidade, quando comparado ao capim-aruana, a mucuna também não proporcionou elevação na produção de CH<sub>4</sub>. Dessa maneira, avaliações com a mucuna em diferentes períodos e formas de corte possibilitará uma melhor análise a respeito dos teores de taninos e de digestibilidade da referida leguminosa.

Os taninos da mucuna, na quantidade encontrada no presente estudo, não foram suficientes para reduzir a população de protozoários ruminais, porém, a utilização do polietilenoglicol (PEG) como agente aglutinador de taninos promoveu a redução da densidade populacional de protozoários, provavelmente devido à baixa quantidade de taninos disponíveis para formação de complexos e a elevada capacidade osmótica apresentada pelo PEG. Isso indica a necessidade de mais estudos utilizando o PEG também associado a baixas quantidades de tanino, com intuito de averiguar o real efeito da inclusão de PEG na dieta de ruminantes sobre a população de protozoários ruminais.