UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO E PRODUÇÃO ANIMAL

FLAVIO PERNA JUNIOR

**TANINOS COMO ADITIVO ALIMENTAR PARA MITIGAÇÃO DAS
EMISSÕES DE METANO EM RUMINANTES**

CAMPUS FERNANDO COSTA

PIRASSUNUNGA

2018

FLAVIO PERNA JUNIOR

Taninos como aditivo alimentar para mitigação das emissões de metano em ruminantes

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues

De acordo: _____

Orientador

Pirassununga
2018

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3608
FMVZ

Perna Junior, Flavio
Taninos como aditivo alimentar para mitigação das emissões de metano em ruminantes / Flavio Perna Junior. – 2018.
115 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues.

1. Digestibilidade. 2. Comportamento. 3. Fermentação. 4. *in vivo*. 5. Biodigestão anaeróbia. I. Título.

São Paulo, 14 de agosto de 2014

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "AVALIAÇÃO DE TANINO COMO ADITIVO ALIMENTAR USADO COMO OPÇÃO PARA MITIGAÇÃO DO METANO ENTÉRICO E DAS FEZES EM RUMINANTES", protocolado sob o CEUA nº 3222290414, utilizando 8 Bovinos (8 fêmeas), sob a responsabilidade de Paulo Henrique Mazza Rodrigues, foi aprovado na reunião de 13/08/2014, e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "EVALUATION OF TANINO HOW FOOD ADDITIVE USED AS OPTION FOR MITIGATION OF ENTERIC METHANE AND FECES IN RUMINANTES", protocol number CEUA 3222290414, utilizing 8 Bovines (8 females), under the responsibility Paulo Henrique Mazza Rodrigues, was approved in the meeting of day 08/13/2014, and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: Flavio Perna Junior

Título: Taninos como aditivo alimentar para mitigação das emissões de metano em ruminantes

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: 15/03/2018

Banca Examinadora

Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues

Instituição: FMVZ/USP

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Ives Cláudio da Silva Bueno

Instituição: FZEA/USP

Julgamento: Aprovado

Profa. Dra. Giovana Tommaso

Instituição: FZEA/USP

Julgamento: Aprovado

Dra. Carolina Tobias Marino

Instituição: Embrapa – Gado de Corte

Julgamento: Aprovado

Dra. Patrícia Perondi Anchão Oliveira

Instituição: Embrapa – Pecuária Sudeste

Julgamento: Aprovado

Agradecimentos

Agradeço à minha família, amigos de pós-graduação, grupo de pesquisa, aos funcionários e a todos que participaram desta fase de minha vida. Agradecimento especial ao Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (VNP/FMVZ) por conceder a liberação para execução de meu Doutorado, ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues pelos ensinamentos e a minha noiva Beatriz Matos Abdulklech pela paciência e compreensão.

RESUMO

PERNA JUNIOR, Flavio. **Taninos como aditivo alimentar para mitigação das emissões de metano em ruminantes**. 2018. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

Embora algumas estratégias alimentares tenham sido propostas para diminuir a emissão de metano (CH_4) provenientes de ruminantes, poucas têm mostrado diminuição persistente, principalmente *in vivo*. O objetivo do presente estudo foi avaliar o uso de diferentes níveis de taninos como aditivo alimentar para ruminantes como mitigador das emissões de CH_4 ruminal e dos dejetos. Utilizou-se o delineamento experimental quadrado latino 4x4 duplicado (4 períodos de 28 dias cada), em arranjo fatorial 2x4, sendo testados dois grupos distintos de bovinos (taurinos ou zebuínos) e quatro níveis de inclusão de taninos (extrato comercial de *Acacia mearnsii*, contendo 82,3% de taninos totais - equivalente em ácido tânico e 32,3% de taninos condensados - equivalente em leucocianidina) na dieta (0; 0,5; 1,0 e 1,5% da MS da dieta). Para avaliar a produção de CH_4 dos dejetos utilizaram-se biodigestores anaeróbios experimentais do tipo batelada, em delineamento inteiramente casualizado. Os níveis utilizados do aditivo promoveram mudanças no comportamento de ruminação dos animais e apesar de causarem redução linear da digestibilidade dos nutrientes, mantiveram o equilíbrio entre a síntese e consumo de N-NH_3 ruminal, reduziram linearmente a síntese de proteína microbiana e a produção de CH_4 ruminal sem, contudo, reduzir a eficiência microbiana e a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), demonstrando que estes taninos interferem diretamente e indiretamente sobre as *archeas* metanogênicas. Através do modelo Broken-line encontrou-se o limiar de 0,72% de taninos na dieta como ponto de inflexão para iniciar a diminuição da produção de CH_4 ruminal. O processo de biodigestão dos dejetos não foi modificado pelo uso dos taninos, no entanto, as velocidades das produções de CH_4 e CO_2 foram influenciadas pela composição dos dejetos dos diferentes grupos de bovinos avaliados, sendo mais acentuada para os taurinos, podendo ser um fator positivo para redução do tempo de biodigestão. A utilização de extrato de *Acacia mearnsii* até níveis de 1,5% da MS da dieta demonstrou ser uma opção segura como aditivo alimentar para bovinos de grupos distintos, com potencial para mitigação de CH_4 ruminal sem afetar a eficiência de conversão nos processos de tratamento de resíduos, com potencial para minimização dos volumes de dejetos.

Palavras-chave: Bovinos. Digestibilidade. Comportamento. Fermentação. Biodigestão anaeróbia.

ABSTRACT

PERNA JUNIOR, Flavio. **Tannins as feed additive to mitigate methane emissions in ruminants**. 2018. 115 f. Thesis (Doctorate in Sciences) – College of Veterinary Medicine and Animal Science, University of Sao Paulo, Pirassununga, 2018.

Although some dietary strategies have been proposed to reduce the emission of methane (CH₄) from ruminants, few have shown persistent decline, mainly *in vivo*. The objective of the present study was to evaluate the use of different levels of tannins as feed additive for ruminants as a mitigator of ruminal CH₄ and waste emissions. A double 4x4 Latin square experimental design (4 periods of 28 days each) was used in a 2x4 factorial arrangement, with two different groups of cattle (taurine or zebu) and four levels of tannins inclusion (commercial extract of *Acacia mearnsii*, containing 82.3% of total tannins - tannic acid equivalent, 32.3% of condensed tannins - leucocianidine equivalent) in the diet (0, 0.5, 1.0 and 1.5% of dietary DM). To evaluate the CH₄ production of the wastes, anaerobic experimental batch biodigesters were used in a completely randomized design. The used additive levels promoted changes in rumination behavior of the animals and, although they caused linear reduction of nutrient digestibility, they maintained the balance between the synthesis and consumption of ruminal NH₃-N, linearly reduced protein microbial synthesis and the ruminal CH₄ production without, however, reducing the microbial efficiency and the short chain fatty acids production (SCFA), demonstrating that these tannins interfered directly and indirectly on the methanogenic *archeas*. Through the Broken-line model, the threshold of 0.72% of tannins in the diet was found as inflection point to initiate a decrease in ruminal CH₄ production. The biodigestion process of the waste was not modified by the tannins use, however, the velocities of CH₄ and CO₂ production were influenced by the composition of the different bovines group evaluated, being more accentuated for the taurine, which can be a positive factor to reduce biodigestion time. The use of *Acacia mearnsii* extract up to 1.5% dietary DM levels proved to be a safe option as a feed additive for cattle of different groups, with potential for rumen CH₄ mitigation without affecting conversion efficiency in waste treatment processes, with potential to minimize waste volumes.

Keywords: Bovines. Digestibility. Behavior. Fermentação. Anaerobic biodigestion.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1	Ambiente ruminal e fermentação microbiana.....	14
2.2	Metanogênese em ruminantes.....	15
2.3	Métodos para quantificação de metano.....	18
2.4	Taninos como aditivos na nutrição de ruminantes.....	21
2.5	Digestão anaeróbia dos dejetos.....	25
3	PARÂMETROS DIGESTIVOS E EFICIÊNCIA MICROBIANA DE GRUPOS DISTINTOS DE BOVINOS ALIMENTADOS COM TANINOS DE ACACIA MEARNSII	27
3.1	INTRODUÇÃO	28
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.2.1	Local e questão ética	29
3.2.2	Animais, instalações e alimentação.....	29
3.2.3	Delineamento experimental e tratamentos	31
3.2.4	Período experimental e amostragem	31
3.2.5	Consumo alimentar e digestibilidade aparente total da MS e frações.....	32
3.2.6	Comportamento ingestivo	33
3.2.7	Proteína microbiana ruminal e balanço de nitrogênio.....	34
3.2.8	Cinética ruminal	35
3.2.8.1	Dinâmica ruminal	36
3.2.8.2	Degradabilidade ruminal <i>in situ</i>	36
3.2.8.3	Taxa de passagem ruminal	37
3.2.9	Análise estatística.....	37
3.3	RESULTADOS.....	38
3.3.1	Consumo e comportamento ingestivo	38
3.3.2	Digestibilidade aparente total da MS e frações.....	40
3.3.3	Cinética ruminal	41
3.3.4	Proteína microbiana ruminal e balanço de nitrogênio.....	44
3.4	DISCUSSÃO	45
3.5	CONCLUSÃO.....	48
	REFERÊNCIAS.....	49

4	MUDANÇAS DA FERMENTAÇÃO RUMINAL E FRACIONAMENTO DA ENERGIA DE GRUPOS DISTINTOS DE BOVINOS ALIMENTADOS COM TANINOS DE ACACIA MEARNSSII	53
4.1	INTRODUÇÃO	54
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	55
4.2.1	Local e questão ética	55
4.2.2	Animais, instalações e alimentação	56
4.2.3	Delineamento experimental e tratamentos	56
4.2.4	Período experimental	57
4.2.5	Consumo de matéria seca	58
4.2.6	Esvaziamento ruminal	58
4.2.7	Mensuração contínua do pH ruminal	58
4.2.8	Contagem de protozoários ruminais	59
4.2.9	Produtos da fermentação ruminal	59
4.2.10	Partição de energia	63
4.2.11	Análise estatística	64
4.3	RESULTADOS	64
4.3.1	Consumo, pH e protozoários ruminais	64
4.3.2	Produtos da fermentação ruminal	69
4.3.3	Partição de energia	73
4.4	DISCUSSÃO	74
4.5	CONCLUSÃO	79
	REFERÊNCIAS	80
5	POTENCIAL DE GERAÇÃO DE ENERGIA RENOVÁVEL DURANTE A BIODIGESTÃO ANAERÓBIA DE DEJETOS DE GRUPOS DISTINTOS DE BOVINOS ALIMENTADOS COM TANINOS DE ACACIA MEARNSSI	85
5.1	INTRODUÇÃO	85
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	87
5.2.1	Local e questão ética	87
5.2.2	Animais, instalações, alimentação e coleta de fezes	87
5.2.3	Substratos, delineamento experimental e tratamentos	88
5.2.4	Mensuração de biogás, CH ₄ , CO ₂ e N ₂ O	89
5.2.5	Remoção de nutrientes	92
5.2.6	Análises laboratoriais	93
5.2.7	Análises estatísticas	93
5.3	RESULTADOS	94

5.3.1	Biodigestão e remoção de nutrientes	94
5.3.2	Produção de biogás.....	95
5.4	DISCUSSÃO	97
5.5	CONCLUSÃO.....	100
	REFERÊNCIAS.....	101
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	105
	REFERÊNCIAS.....	106

1 INTRODUÇÃO

Apesar de reconhecida importância da agropecuária na produção de alimentos e geração de renda, muito se discute sobre os seus impactos ambientais frente às mudanças climáticas. Tal crítica tem sido fundamentada nos baixos índices zootécnicos verificados em sistemas de exploração animal baseados em pastagens degradadas ou que se encontram abaixo do seu potencial de produção. A ineficiência desse modelo de exploração tem gerado maiores quantidades de gases de efeito estufa (GEE) por quilo de carne e/ou de leite produzidos (IPCC, 2007). Países onde a agricultura representa uma significativa parte da economia (Irlanda e Nova Zelândia) ou no desenvolvimento de países com grande rebanho de bovinos (Brasil e Índia), a produção animal de ruminantes pode ser um grande contribuidor na geração de GEE. A consequência do efeito estufa sobre a agropecuária, e o mundo como um todo, estão relacionadas à estabilidade climática, em que o aumento da concentração de GEE levaria a um aumento da temperatura da superfície terrestre.

Os ruminantes não só desempenham um papel importante no fornecimento de proteína de alta qualidade para a dieta humana, mas também são importantes como fonte de emissão de GEE. Metano (CH_4), dióxido de carbono (CO_2) e óxido nitroso (N_2O) são os principais GEE emitidos pela atividade pecuária, sendo que, dentre eles, destaca-se o CH_4 . Apesar de as concentrações de CH_4 e N_2O , na atmosfera, serem menores que a de CO_2 , estes gases são uma preocupação ambiental porque seus potenciais de aquecimento global são 25 e 298 (ambos com base em uma projeção de 100 anos) mais potentes que o CO_2 , respectivamente (IPCC, 2007).

Existe a preocupação da comunidade, para com a bovinocultura, não somente com a questão ambiental das emissões de metano entérico e das fezes, como também em relação à produtividade, pois, segundo Buddle et al. (2011), de 5% a 9% da energia bruta da dieta é perdida na forma de metano. À medida que um ruminante adulto pode produzir até 17 litros de metano por hora (RUSSEL, 2002) e que este gás não pode ser metabolizado pelo animal nem pela microbiota ruminal, a maior parte é removida do rúmen por expiração ou eructação (MOSS et al., 2000), sendo então liberada ao meio ambiente. Os agravantes gerados pelo metano têm induzido pesquisadores a procurar alternativas de reduzir suas emissões e perdas produtivas.

O CH_4 entérico representa 17% das emissões globais de CH_4 e 3,3% das emissões antropogênicas de GEE, sendo em grande parte derivado da produção de ruminantes; já o CH_4 dos dejetos, tanto da produção de ruminantes como de não ruminantes, contribui com 2% das

emissões globais de CH₄ e 0,4% das emissões antropogênicas de GEE (EPA, 2011). Estima-se que cerca de 39% dos GEE oriundos do sistema de produção animal, sejam de CH₄ entérico, produzido principalmente no processo fermentativo ruminal (GERBER et al., 2013).

A emissão entérica de CH₄ é um processo natural e intrínseco aos ruminantes. A contribuição da bovinocultura referente às emissões de GEE irá, provavelmente, continuar a aumentar devido ao crescimento inevitável do rebanho pecuário, impulsionado por um aumento da necessidade de produção de alimentos para alimentar a população mundial (THORNTON, 2010), que, segundo a ONU (2015), as projeções de seu relatório apontam que a população de 7,3 bilhões deverá alcançar os 8,5 bilhões em 2030, 9,7 bilhões em 2050 e 11,2 bilhões em 2100.

No contexto da bovinocultura, o Brasil ocupa posição de destaque no mundo, apresentando em 2016 um efetivo de 218,2 milhões de cabeças (IBGE, 2016). Dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (United States Department of Agriculture - USDA) apontam o Brasil como o detentor do segundo maior efetivo de bovinos do mundo, sendo responsável por 22,2% do rebanho mundial, atrás apenas da Índia. O país foi também o segundo maior produtor de carne bovina, responsável por 15,4% da produção global. Os Estados Unidos (maior produtor mundial), o Brasil e a União Europeia, juntos, representaram quase metade de toda a carne produzida no mundo em 2016 (IBGE, 2016). A produção brasileira de leite em 2016 foi de 33,62 bilhões de litros (IBGE, 2016). No Brasil, as emissões de CH₄ no setor agropecuário, no ano de 2012, são compostas principalmente pela fermentação entérica do gado de corte (75%), seguida da fermentação entérica do gado de leite (12%), sendo as contribuições restantes formadas pela fermentação entérica de outros animais, do manejo de dejetos animais, da queima de resíduos agrícolas e do cultivo do arroz (13%) (MCTI, 2014). Para Berchielli et al. (2012), o rebanho total do Brasil responde por aproximadamente 3,3% do CH₄ produzido mundialmente por atividades humanas, 11,3% do CH₄ entérico produzido no mundo e 2,6% da produção de CH₄ mundial a partir de dejetos.

Pesquisas sobre a mitigação de CH₄ produzido por ruminantes têm recebido bastante atenção (MARTIN et al., 2010). Estratégias nutricionais, como o uso de ionóforos, glicerol, taninos, saponinas, óleos essenciais, lipídios, nitrato de cálcio, vacinas, anticorpos policlonais, técnicas de manejo de pastagens, melhoramento genético e sistemas eficientes de produção, têm sido utilizadas para manipular a fermentação ruminal e reduzir a emissão do gás metano entérico (MOHAMMED et al., 2004; BERNDT, 2010). Embora algumas estratégias alimentares tenham sido propostas para diminuir a emissão de metano provenientes de ruminantes, poucas têm mostrado diminuição persistente, principalmente *in vivo*. Os

ionóforos, como a monensina e lasalosida, são aditivos muito utilizados na nutrição de ruminantes. No entanto, possuem características medicamentosas, selecionando microrganismos, modulando a fermentação ruminal e dificultando o crescimento ou eliminando algumas espécies. Em função disso, algumas linhas de pesquisa sugerem que o uso de tais aditivos pode ser prejudicial à saúde humana, pois deixariam resíduos e promoveriam a resistência de microrganismos patogênicos (GRAMINHA et al., 2007). Ao avaliarem outros aditivos, desta vez naturais e não medicamentosos, pesquisadores começaram a estudar a inclusão de taninos em dietas para ruminantes, que em função da dose utilizada, podem promover desde o aumento de proteína metabolizável da dieta até o controle de alguns microrganismos patogênicos do trato intestinal (PORDOMINGO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008). O alcance da mitigação da produção de CH₄ em ruminantes pelos taninos é bastante amplo, variando de 2 a 58% (PATRA; SAXENA, 2010; BODAS et al., 2012). A metanogênese foi reduzida quando do uso de plantas ricas em taninos, tanto *in vitro* (LONGO et al., 2007), quanto *in vivo* em vacas leiteiras (WOODWAR et al., 2004), em cabras (PUCHALA et al., 2005) e em ovelhas (CARULLA et al., 2005), apesar de não ter ocorrido o mesmo efeito em novilhas taurinas (BEAUCHEMIN et al., 2007).

No entanto, poucos estudos relacionam a eficiência alimentar zootécnica de bovinos oriundos de diferentes grupos genéticos à metanogênese. É sabido que há diferenças entre zebuínos e taurinos quanto ao aproveitamento dos nutrientes e desempenho zootécnico (LEDGER et al., 1970; FRISCH; VERCOE, 1977; VALADARES FILHO et al., 1985). De fato, novas equações de predição de variáveis zootécnicas foram propostas por Valadares Filho et al. (2006), ante o descompasso dos modelos americano e europeu quando aplicados ao rebanho bovino zebuíno brasileiro. Assim, torna-se cada vez mais importante o conhecimento sobre diferenças entre os processos fermentativos de bovinos oriundos de diferentes grupos genéticos, incluindo-se o perfil fermentativo e a metanogênese.

Diante deste contexto, tem-se como hipótese que com o aumento do nível de inclusão de taninos na dieta ocorra redução da produção de metano, redução da digestibilidade, no entanto, com melhora da eficiência microbiana e manutenção dos AGCC, não interferindo negativamente no rendimento energético animal. Portanto, o presente projeto tem como objetivo geral avaliar o uso de diferentes níveis de taninos de *Acacia mearnsii* na alimentação de dois grupos distintos de bovinos (*Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*) como estratégia nutricional, visando a mitigação de CH₄ via fermentação entérica com vistas à redução de perda energética em relação aos demais produtos da fermentação, determinada pela técnica *ex situ* (micro rúmen) de mensuração de metano; e como objetivo específico mensurar outras

variáveis como o consumo alimentar, comportamento ingestivo, protozoários, cinética e degradabilidade ruminal, digestibilidade e excreção de nutrientes, assim como a produção de GEE nas fezes dos animais por meio de digestores anaeróbios.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ambiente ruminal e fermentação microbiana

O processo digestivo das espécies ruminantes compreende uma das relações simbióticas, entre seres vivos, mais bem sucedidas na natureza. Nesta relação, o ruminante provê ambiente ótimo ao crescimento dos microrganismos com pH, umidade e substrato adequados ao crescimento dos mesmos. Os microrganismos, em contrapartida, produzem os AGCC e proteína microbiana que serão aproveitados pelo ruminante como fonte de energia e proteína, respectivamente (RUSSEL, 2002). O principal órgão digestório dos ruminantes, o rúmen, é considerado uma câmara de fermentação que apresenta condições ambientais adequadas, tais como temperatura entre 38-41°C, pH entre 5,5-7,2, umidade entre 85-90%, osmolaridade entre 260-340 mOsm e ambiente anaeróbio. Além disso, há presença constante de substratos para fermentação oriundos da alimentação, um padrão de motilidade ruminal que permite a mistura do conteúdo e remoção periódica dos subprodutos de fermentação não utilizados pela microbiota através de absorção pelo epitélio ruminal (CARVALHO et al., 2003).

A maior parte dos nutrientes do alimento, principalmente as fontes energéticas e proteicas, são transformadas em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), em massa microbiana e em gases, como CH₄, CO₂ e hidrogênio (H₂) (BAKER, 1999). Os AGCC podem ser considerados um resíduo da fermentação para os microrganismos, entretanto, para o ruminante, representam a principal fonte de energia. A energia presente nos AGCC representa em torno de 75 a 80% da energia originalmente presente nos carboidratos fermentados e contribuem em 50 a 70% da energia digestível do alimento (KOZLOSKI, 2002).

Os ruminantes possuem a capacidade para converter alimentos de baixa qualidade em proteína de alta qualidade (VARGA; KOLVER, 1997). O rúmen é considerado um ecossistema microbiano diverso e único, composto por quatro tipos de microrganismos ativos no seu interior: bactérias, protozoários, fungos e arqueas metanogênicas, sendo as bactérias constituintes de 60 a 90% da biomassa microbiana com cerca de 200 espécies (KOZLOSKI,

2002). As arqueas metanogênicas, responsáveis pela produção de CH₄, formam um grupo distinto de microrganismos, possuindo co-fatores (coenzima M, F₄₂₀, F₄₃₀) e lipídeos (ésteres de isopranyl glicerol) únicos (McALLISTER et al., 1996). A parede celular destes microrganismos é composta por pseudomureína, proteína, glicoproteína ou heteropolisacarídeos e a sequência de nucleotídeos indica uma evolução inicial distinta das bactérias (ISHINO et al., 1998). A fermentação anaeróbia do alimento, principalmente de tipo fibroso, é possível devido ao sinergismo existente entre a população microbiana, permitindo a degradação pela ação de complexos de enzimas, como a β -1-4 celulase, agindo sobre a parede celular das plantas. No entanto, a fermentação do alimento e conversão em carne ou leite pode ser pouco eficiente devido a fatores associados à digestibilidade das forrageiras (VARGA; KOLVER, 1997). Desta forma, o desenvolvimento dos microrganismos responsáveis pela fermentação depende de uma série de condições ambientais para realizarem suas funções a contento. Por exemplo, as bactérias fibrolíticas são prejudicadas em pH abaixo de 6, situação na qual bactérias produtoras de ácido láctico começam a agir (OWENS; GOETSCH, 1993). O potencial redox no rúmen está usualmente entre 250-450 mV, refletindo ausência de oxigênio e o excesso de potencial redutor (VAN SOEST, 1994). Em consequência dessa característica do ambiente ruminal, as opções metabólicas dos microrganismos tornam-se limitadas, sendo obrigados a trabalhar com este excesso de equivalentes redutores (NADH), utilizando-os em uma variedade de reações. Para dispor desses compostos, eles reduzem todos os compostos disponíveis, sendo o CO₂ reduzido a metano, sulfatos e nitratos a sulfetos e amônia, e ácidos graxos insaturados a saturados. Apesar desse excesso de compostos redutores, o crescimento microbiano permanece limitado pela disponibilidade de ATP (OWENS; GOETSCH, 1993).

A manipulação da fermentação ruminal pode ser realizada tanto pela variação do substrato oferecido, revestimento, processamento ou tratamento químico de proteínas, lipídios ou carboidratos (CHALUPA, 1975; FERGUSON, 1975; SCOTT; ASHES, 1993; HUNTINGTON, 1997), como também por ação de aditivos sobre a microbiota ruminal e suas atividades. Estes agentes químicos modulam determinadas vias metabólicas dos microrganismos ruminais, agindo como modificadores de fermentação (CHALUPA, 1977).

2.2 Metanogênese em ruminantes

O ecossistema ruminal é um dos locais mais ricos de desenvolvimento de microrganismos, habitado por inúmeras espécies de microrganismos, incluindo

aproximadamente 10^{11} bactérias/mL, 10^6 protozoários/mL, 10^3 fungos/mL e 10^9 arqueias metanogênicas/mL de conteúdo ruminal (CIESLAK et al., 2013). Somente cerca de 10% da população microbiana deste ecossistema têm sido identificadas e descritas (PERS-KAMCZYC et al., 2011), principalmente pela dificuldade em manter estas culturas *in vitro*. Como já de conhecimento, a população de metanogências é de grande importância para manter o bom funcionamento do ambiente ruminal, sendo junto com fungos e bactérias os primeiros colonizadores do rúmen.

A eructação de metano por bovinos começa aproximadamente quatro semanas após o nascimento, quando alimentos sólidos são retidos no sistema retículo-rúmen (ANDERSON et al., 1987). O ato da eructação previne condições fatais, como o timpanismo, distúrbio em que o animal não consegue expulsar os gases que se acumulam em seu rúmen, em virtude da fermentação dos substratos (VAN KRUININGEN, 1995). A metanogênese é prioritariamente uma respiração anaeróbia em que um composto de carbono (como o CO_2) funciona comoceptor de elétrons. Ela ocorre principalmente na ausência de sulfatos, nitratos, metais oxidados e, em especial, de oxigênio (o processo ocorre quando estes aceptores de elétrons, “mais favoráveis” que o composto de carbono, estão ausentes).

As metanogências pertencem ao domínio *Archaea* e são, portanto, evolutivamente distintos dos *Eukarya* (protozoários e fungos) e *Bacteria*. Pesquisas recentes sobre diferentes arqueias em ruminantes, realizadas através da técnica molecular PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) com amplificação e comparação da sequência do gene 16SrRNA, sugerem que a maioria delas são metanogências pertencentes a diferentes espécies do gênero *Methanobrevibacter*. Além disso, existem alguns grupos de arqueas que habitam o rúmen cuja fisiologia é desconhecida. Nestes incluem um grupo chamado Rumen Cluster C, que pode representar uma grande parte da comunidade arqueal. O grupo Rumen Cluster C compreende 16% do total de arqueias ruminais, mas pode chegar a mais de 80%. No entanto, ainda é necessário provar que elas são metanogências (JANSSEN; KIRS, 2008). Tipicamente, esta população metanogênica compreende menos de 3% da microbiota procariótica do rúmen. Em contraste com bactérias do rúmen, que é composto por centenas de espécies diferentes, a maioria das metanogências pertencem a apenas três principais gêneros, *Methanobrevibacter* (62%), *Methanomicrobium* (15%) e *Methanoplasmatales* (16%) (PAUL et al., 2012), enquanto o restante pertence a gêneros minoritários como *Methanimicrococcus*, *Methanosarcina* e *Methanobacterium* (SAINT-PIERREE; WRIGHT, 2013).

No rúmen, as arqueias metanogências, que são microrganismos anaeróbios estritos e principais responsáveis pela produção do metano, são encontradas intimamente associadas

com protozoários ciliados (FINLAY et al., 1994). Podem ser encontradas tanto aderidas na superfície celular dos protozoários, como na fase intracelular dos mesmos (USHIDA; JOUANY, 1996). Considerando que os protozoários ciliados têm um grande potencial de produção de hidrogênio no rúmen, essa associação indica uma relação simbiótica, em que as metanogênicas, por utilizarem o hidrogênio produzido pelos ciliados, favorecem a manutenção de um ambiente ruminal adequado ao desenvolvimento destes microrganismos (VAN SOEST, 1994).

A fonte de energia mais importante para a produção de metano no rúmen é o H_2 , embora o formato e, em menor escala, o metanol também são produzidos e utilizados por metanogênicas. Diferentes espécies metanogênicas utilizam H_2 para reduzir o CO_2 a CH_4 através de uma série de caminhos muito semelhantes contendo enzimas e co-fatores que não são encontrados em não-metanogênicas (THAUER et al., 2008). A atividade das metanogênicas em consumir o H_2 do rúmen reduz sua concentração para níveis baixos (cerca de 1 μM de H_2 dissolvido), permitindo que a fermentação do alimento prossiga mais rapidamente. Isto significa que o animal recebe uma maior quantidade de AGCC em menor tempo (WOLIN, 1979). Espera-se que altas concentrações de H_2 no rúmen retardem a atividade dos microrganismos que fermentam o alimento, diminuindo potencialmente a conversão para AGCC (McALLISTER; NEWBOLD, 2008), sendo que o desenvolvimento de microrganismos que produzem e utilizam H_2 resulta numa fermentação mais rápida (REES et al., 1995; MORVAN et al., 1996). Desta forma, a produção de CH_4 nada mais é do que uma forma de remoção de hidrogênio do rúmen, ambiente que, além de ser altamente reduzido, é também anaeróbio. Geralmente, à medida que a digestibilidade da dieta aumenta, a variabilidade na perda de CH_4 aumenta e esta depende basicamente de dois mecanismos: quantidade de carboidratos fermentados no rúmen e suprimento de H_2 disponíveis para produção de CH_4 (JOHNSON; JOHNSON, 1995).

A produção de acetato e butirato, predominante durante a fermentação de carboidratos fibrosos, resulta em liberação líquida de H_2 e favorece a metanogênese. Já a formação de propionato é uma via competitiva de utilização de H_2 no rúmen, reduzindo a disponibilidade de substrato para a metanogênese. Assim, a produção de CH_4 depende do balanço de H_2 no rúmen, sendo influenciada pelas taxas de produção de acetato e propionato (HEGARTY, 2001).

Nenhuma das bactérias ou protozoários que fermentam carboidratos (celulose, hemicelulose, pectina, amido e açúcares solúveis) produz CH_4 , porém os convertem principalmente em glicose-1-P, a qual é posteriormente convertida a ácido pirúvico, mediante

o ciclo de Embden-Meyerhof, e posteriormente até acetato e propionato, mediante a ação da enzima piruvato-liase (VAN SOEST, 1994). A energia metabólica utilizada pelos microrganismos é liberada mediante a fosforilação do substrato em duas reações. A primeira consiste na desidrogenação do gliceraldeído-3-P ligado a NAD^+ . Na segunda, as reações de piruvato-liase produzem Acetil-CoA, que é convertida em acetato mais ATP. Na primeira reação, os elétrons e prótons são transferidos ao NAD^+ , e na segunda, à ferredoxina ou compostos relacionados e posteriormente a prótons ou H^+ e CO_2 , o qual é ativamente convertido a CH_4 (CHURCH, 1998).

De acordo com a estequiometria de produção dos AGCC, percebe-se o efeito negativo do propionato sobre a metanogênese, devido à competição pelo mesmo substrato (MOSS et al., 2000), gerando uma relação expressa como: $\text{CH}_4 = 0,45 \times \text{Acetato} - 0,275 \times \text{Propionato} + 0,40 \times \text{Butirato}$. A produção de CH_4 no rúmen caracteriza uma ineficiência no processo digestivo dos ruminantes, por outro lado se faz necessária. O acúmulo de H^+ inibe os sistemas enzimáticos, principalmente os processos que envolvem a nicotinamida adenosina difosfato ($\text{NADH} + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{NAD}^+$) e a regulação do pH ruminal (McALLISTER; NEWBOLD, 2008). Portanto, qualquer estratégia de mitigação deve incluir uma via alternativa para a remoção de H^+ a partir do rúmen (JOBLIN, 1999), assim como possibilitar aumento rentável da produção de leite e/ou carne, como também promover redução persistente da emissão de metano entérico (GRAINGER et al., 2010).

2.3 Métodos para quantificação de metano

Uma vez que é possível a manipulação da fermentação ruminal, cabe aos nutricionistas desenvolverem métodos para avaliação da mesma. Como principal produto da fermentação não utilizado pelo ruminante, o CH_4 representa uma variável importante para avaliação da eficiência da fermentação ruminal. Sistemas confiáveis de predição de produção de CH_4 em uma série de diferentes situações (por exemplo, raça, estado fisiológico, tipo de dieta) podem ser utilizados para a formulação de dietas que propiciem perda mínima de energia por CH_4 (MILLS et al., 2001).

Sendo assim, a quantificação da produção de CH_4 é importante ferramenta ao nutricionista de ruminantes. Métodos para tal estão sendo estudados desde a década de 50, sendo as câmaras calorimétricas os primeiros sistemas descritos na literatura com esta finalidade (JOHNSON; JOHNSON, 1995). A utilização deste método foi de fundamental importância para se coletarem os primeiros dados de emissão de CH_4 por ruminantes, assim

como para se determinarem perdas por incremento calórico. Estas informações foram utilizadas para se estabelecerem equações que geraram as tabelas de exigências de energia líquida para gestação, ganho de peso e lactação (NRC, 2001). A principal vantagem do método calorimétrico é a acurácia; em contrapartida, é dispendioso e requer treinamento do animal para adequação às condições de restrição de movimento (JOHNSON; JOHNSON, 1995). Outros métodos semelhantes às câmaras calorimétricas foram estudados, como a headbox ou método do capuz (YOUNG et al., 1975; KELLY et al., 1994), em que apenas a cabeça do animal fica dentro de uma caixa completamente vedada. Coleta-se então todo ar expirado e eructado pelo animal e a emissão de CH_4 é quantificada. Máscaras, com princípio semelhante, também foram desenvolvidas (KLEIBER, 1958; LIANG et al., 1989). As vantagens destes dois métodos em comparação à câmara calorimétrica é principalmente o custo, porém podem subestimar a produção de CH_4 (LIANG et al., 1989).

Outro método que pode ser utilizado para quantificação da emissão de CH_4 em ruminantes vale-se de traçadores ou indicadores. Estes podem ser radioisótopos do CH_4 (MURRAY et al., 1976) ou gases inertes, como o hexafluoreto de enxofre, cuja utilização foi descrita pela primeira vez por Johnson et al. (1994). A grande vantagem da utilização dos métodos traçadores é que dispensam a contenção do animal, uma vez que são utilizados dispositivos denominados cangas (PRIMAVESI et al., 2004) ao redor do pescoço do animal, permitindo que o mesmo se alimente e se movimente normalmente. Em contrapartida, esta técnica mensura apenas o CH_4 eructado, não sendo possível quantificarem-se os AGCC, o que prejudica a compreensão do processo global da fermentação ruminal.

O método *in vitro* é rápido e mais prático em relação aos métodos *in vivo*. Porém, como toda metodologia *in vitro*, é impossível mimetizar em um frasco a complexidade do rúmen. A própria dieta a qual o animal é submetido pode afetar os resultados (CHERNEY; SICILIANO; PELL, 1993). Adicionalmente, neste tipo de metodologia, é muito difícil determinar precisamente quais produtos resultaram da fermentação da fração solúvel dos alimentos no rúmen dos animais, assim como é problemática a simulação da taxa de passagem (GASTALDI, 2003).

Estudos relatam a utilização de um sistema de laser para a detecção de CH_4 em bovinos (CHAGUNDA et al., 2009), sendo que a técnica vem sendo mais aplicada em condições comerciais de produção. Este sistema realiza a detecção do CH_4 por medida de absorção de infravermelho de alta sensibilidade através do comprimento de ondas (ISEKI; MIYAJI, 2003), devido o CH_4 ter duas fortes bandas de absorção, ou grupos de linhas de absorção, centrada em 3,3 milímetros e 7,6 mm. O uso de sistemas de laser em bovinos é

relativamente recente e estudos iniciais a respeito demonstraram que sua utilização foi viável em vacas leiteiras e que os dados produzidos faziam sentido biológico em termos de consumo de alimentos, peso vivo e tipo de alimentação. No entanto, existem atualmente, poucos estudos sobre a utilização desta técnica (CHAGUNDA, 2013).

Uma nova técnica, denominada *ex situ*, vem sendo desenvolvida pelo grupo de pesquisa da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no Campus Pirassununga, SP. A técnica consiste em incubar em banho termostático amostras de conteúdo ruminal dentro de frascos tipo penicilina (micro-rúmen). Assim, são simuladas as condições ruminais por um período de 30 minutos e, após este período, é feito o bloqueio da fermentação por autoclavagem. A vantagem deste método é a possibilidade da mensuração dos produtos finais da fermentação ruminal (CH_4 e AGCC), sendo possível relacionar as perdas energéticas de produção de CH_4 em relação à energia total produzida. Outra vantagem desta técnica é que permite avaliar o perfil fermentativo do ruminante durante o dia, através de coletas de conteúdo ruminal em diferentes tempos de amostragem (RODRIGUES et al., 2012).

Os métodos usuais de quantificação de CH_4 , como a câmara calorimétrica e traçadores são bastante úteis para avaliação da produção total de CH_4 pelo ruminante, em um determinado intervalo de tempo. Contudo, entende-se que a informação gerada pela quantificação da emissão de CH_4 não é suficiente para a compreensão da eficiência do processo fermentativo. O processo fermentativo ruminal pode ser bloqueado pela simples diminuição de pH ou temperatura o que, provavelmente, acarretaria em diminuição da produção de CH_4 em virtude da alteração do meio, que se tornaria incompatível com a vida de determinados microrganismos. No entanto, o meio se tornaria inóspito também às bactérias celulolíticas, por exemplo, e provavelmente haveria queda na produção de AGCC também. Sendo assim, compreende-se que o estudo da quantificação de CH_4 como ferramenta para avaliar a eficiência do processo fermentativo ruminal deve ser realizado de forma relativa às variáveis de fermentação, como a produção de AGCC, face aos possíveis confundimentos que a análise isolada de CH_4 poderia gerar.

Na busca por uma abordagem mais abrangente sobre a fermentação ruminal, alguns autores reportaram a produção de CH_4 de maneira relativa à ingestão de energia bruta (BEAUCHEMIN; MCGINN, 2006), à ingestão de matéria seca (PUCHALA et al., 2005) ou à ingestão de energia digestível (MCGINN et al., 2004). Este tipo de estudo é indubitavelmente um avanço em relação à simples mensuração de CH_4 como meio de avaliação da eficiência de fermentação. Contudo, seria mais natural que a produção de CH_4 fosse quantificada

relativamente à alguma medida de fermentação ruminal, como por exemplo, a energia liberada nos processos fermentativos sob a forma de AGCC e gases, uma vez que as gerações destes produtos ocorrem concomitantemente no rúmen. Assim, entende-se que este tipo de medida relativa traria informações mais acuradas sobre um determinado momento da fermentação, sem se valer de outras variáveis que possuem variações naturais (por exemplo, consumo de matéria seca, consumo de matéria digestível), que poderiam influenciar os resultados e até gerar interpretações errôneas.

2.4 Taninos como aditivos na nutrição de ruminantes

Os taninos são um grupo de compostos secundários de plantas que são conhecidos e utilizados pelo homem há séculos, em atividades como o curtimento do couro, na produção de vinho e chá, na composição de resinas de colagem e recentemente na alimentação animal. São amplamente distribuídos por todo o reino vegetal, especialmente entre árvores, arbustos e leguminosas herbáceas (McLEOD, 1974; PEREVOLOTSKY, 1994). Apesar da ideia geral de que os taninos são encontrados somente em espécies de plantas provenientes de áreas tropicais ou do semi-árido (GINER-CHAVEZ, 1996; BALOGUN et al., 1998), eles são encontrados em outras regiões. Por exemplo, muitas espécies com quantidades apreciáveis de taninos podem crescer em ambientes de clima Atlântico ou do Mediterrâneo (FRUTOS et al., 2004).

Dentro das angiospermas, os taninos são mais comuns nas dicotiledôneas do que nas monocotiledôneas. Algumas famílias de dicotiledôneas ricas em taninos são as leguminosas, anacardiaceas, combretaceas, rhizoporaceas, mirtácea e polinaceae. São encontrados principalmente nos vacúolos das plantas onde não interferem no metabolismo da planta, somente após lesão e morte das plantas agem e têm metabolismo eficiente (NOZELLA, 2001). Algumas madeiras apresentam teor de polifenóis acima de 35% como o cerne do Quebracho (LONG, 1991), a casca de Acácia Negra e espécies provenientes de manguezal (LELIS; GONÇALVES, 2001). A maioria dos vegetais são portadores de taninos e podem ser encontrados nas raízes, no lenho, na casca, nas folhas, nos frutos, nas sementes e na seiva.

Pode-se dizer que os taninos são substâncias fenólicas heterogêneas de alto peso molecular com a capacidade para formar complexos reversíveis e irreversíveis com proteínas (principalmente), polissacarídeos (celulose, hemicelulose, pectina, etc.), alcaloides, ácidos nucleicos e minerais (McLEOD, 1974; MOLE; WATERMAN, 1987; MANGAN, 1988; MUELLER-HARVEY; McALLAN, 1992; VAN SOEST, 1994; SCHOFIELD et al., 2001).

Os taninos de diferentes espécies de plantas têm diferentes propriedades físicas e químicas (MANGAN, 1988), portanto, têm diversas propriedades biológicas (ZUCKER, 1983).

São classificados em taninos hidrolisáveis (TH) e condensados (TC), tendo ambos efeitos indesejáveis e desejáveis, dependendo da sua concentração, fonte e outros fatores como a espécie animal, o estado fisiológico do animal e a composição da dieta (MAKKAR, 2003). Os TH são constituídos por um núcleo de hidratos de carbono cujos grupos hidroxila estão esterificados com ácidos fenólicos (principalmente ácidos gálico e hexahidróxidifênico). Os taninos condensados (TC), ou proantocianidinas, são polímeros não-ramificados de unidades flavonoides (flavan-3-ol, flavan-3,4-diol) e geralmente têm peso molecular mais elevado que os TH (1000-20000 Da e 500-3000 Da, respectivamente) (McLEOD, 1974; MUELLER-HARVEY; McALLAN, 1992; MUELLER-HARVEY, 1999).

Existem numerosos artigos sobre a capacidade de taninos de reduzir a digestibilidade dos alimentos ingeridos (FRUTOS et al., 2004). Taninos exercem este efeito principalmente sobre as proteínas, mas afetam igualmente outros componentes dos alimentos em diferentes graus (KUMAR; SINGH, 1984). O seu principal efeito nas proteínas é baseado na capacidade em formar ligações de hidrogênio que são estáveis entre pH 3,5 e 8 (aproximadamente). Estes complexos estáveis no pH ruminal dissociam-se quando o pH cai abaixo de 3,5 (tal como no abomaso, pH 2,5-3) ou é maior que 8 (por exemplo, no duodeno, pH 8), o que explica muito sobre a atividade de taninos no aparelho digestivo (McLEOD, 1974; MUELLER-HARVEY; McALLAN, 1992).

A elevada afinidade dos taninos por proteínas é explicada pelo grande número de grupos fenólicos formados. Estes fornecem muitos pontos nos quais pode ocorrer a ligação com os grupos carbonila de peptídeos (McLEOD, 1974; HAGERMAN; BUTLER, 1991; LEINMULLER et al., 1991; HAGERMAN et al., 1992). A formação de tais complexos é específica, ambos em termos do tanino e da proteína envolvida, o grau de afinidade entre as moléculas participantes e as características químicas de cada (McLEOD, 1974; ZUCKER, 1983; MANGAN, 1988; HAGERMAN; BUTLER, 1991). No que diz respeito aos taninos, os fatores que favorecem a formação de complexos incluem o seu relativo alto peso molecular e sua grande flexibilidade estrutural (McLEOD, 1974; HAGERMAN; BUTLER, 1991; MUELLER-HARVEY; McALLAN, 1992). As proteínas que mostram a maior afinidade para os taninos são relativamente grandes e hidrofóbicas, seu arranjo é aberto, tem estrutura flexível e são ricas em prolina (KUMAR; SINGH, 1984; HAGERMAN; BUTLER, 1991; HAGERMAN et al., 1992; MUELLER-HARVEY; McALLAN, 1992).

Os complexos formados entre os taninos e proteínas ou outros compostos são geralmente instáveis, suas ligações continuamente se quebram e reconstituem. Kumar e Singh (1984) sugeriram que a formação dos complexos poderiam ocorrer através de quatro tipos de ligações: 1) ligações de hidrogênio (reversíveis e dependentes do pH) entre os radicais hidroxílico dos grupos fenólicos e o oxigênio dos grupos amida das ligações peptídicas de proteínas, 2) por interações hidrofóbicas (reversíveis e dependentes do pH) entre o anel aromático dos compostos fenólicos e as regiões hidrófobas da proteína, 3) por ligações iônicas (reversível) entre o íon fenólico e o sítio catiônico da proteína (exclusivo de TH) e 4) por ligação covalente (irreversível), através da oxidação dos polifenóis de quinonas e a sua subsequente condensação com grupos nucleofílicos da proteína. Durante muito tempo acreditou-se que a formação de complexos de tanino-proteína fosse devido principalmente às ligações de hidrogênio. No entanto, sabe-se que as interações hidrofóbicas são importantes.

A atividade anti-metanogênica tem sido estudada principalmente em extratos concentrados de plantas ricas em taninos condensados devido ao seu menor risco de toxicidade para o animal que os taninos hidrolizáveis (FIELD et al., 1989; BEAUCHEMIN et al., 2008). Woodward et al. (2001) e Tavendale et al. (2005) atribuem dois modos de ação dos taninos sobre a metanogênese: em primeiro lugar, afetando diretamente a atividade ou a população de metanogênicas, resultando em menor emissão de metano e, em segundo, indiretamente, pela redução de produção de hidrogênio pela redução de degradação do alimento. Recentemente, Jayanegara et al. (2012) também corroboraram com esta constatação através de uma meta-análise com a avaliação de 30 experimentos, compreendendo 171 tratamentos com dietas utilizando taninos, relatando o efeito direto dos taninos sobre as metanogênicas e o efeito indireto através de uma redução da degradação ruminal dos nutrientes. O efeito negativo sobre a digestão ruminal da fibra pode estar relacionado com um decréscimo no número de bactérias celulolíticas (McSWEENEY et al., 2001), formação de complexos de tanino-celulose, que são resistentes à digestão enzimática (MAKKAR et al., 1995) e/ou deficiência na adesão de microrganismos fibrolíticos ao substrato (BENTO et al., 2005), o que iria reduzir a disponibilidade de hidrogênio e diminuir a metanogênese (CARULLA et al., 2005). Além disso, os taninos são conhecidos por diminuir o número de protozoários ruminais (MAKKAR et al., 1995), sendo a diminuição na produção de metano uma consequência da redução da quantidade de protozoários. Mudanças na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) são, normalmente, esperadas devido à inibição da produção de metano quando se utiliza taninos condensados. Entretanto, Tiemann et al. (2008)

não observaram qualquer mudança nas proporções de AGCC ou na população de protozoários com a redução na produção de metano quando utilizaram leguminosas ricas em TC.

Em levantamento realizado por Goel e Makkar (2012), foram descritos 11 estudos *in vivo* avaliando o uso de taninos condensados e seu efeito na redução de metano. Para tanto, observaram que as concentrações utilizadas são muito variáveis e que existe efeito anti-metanogênico sem afetar a digestibilidade da matéria orgânica. Um grande atrativo ao uso de taninos se deve ao fato de terem o potencial de reduzir a degradação da proteína no rúmen, deixando-a disponível pós-rúmen com consequente redirecionamento da excreção de nitrogênio da urina para as fezes, além do aumento da eficiência da síntese de proteína microbiana (MAKKAR, 2003).

Pesquisas sobre o efeito de taninos nas populações de metanogênicas têm sido desenvolvidas utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, os resultados nem sempre são equivalentes (TAVENDALE et al., 2005; BHATTA et al.; 2009; CIESLAK et al., 2012). A mitigação da produção de metano utilizando-se taninos é bastante variável, podendo variar de 2 a 58% (PATRA; SAXENA, 2010; BODAS et al., 2012). Naumann et al. (2013) sugeriram que a concentração de TC utilizada pode não ser um preditor da redução da produção de metano devido sua atividade biológica. Para tanto, outros aspectos devem ser considerados: concentração de TC na foragem ou dieta consumida, reatividade (atividade biológica) do TC (BARRY; McNABB, 1999), assim como o metabolismo do animal. A reatividade pode depender de múltiplos fatores, incluindo a espécie da planta e os elementos inerentes à sua estrutura molecular, tamanho, peso, unidades formadoras de polímeros e suas frações (MUELLER-HARVEY, 2006; NAUMANN et al., 2013). Recentes pesquisas demonstram que a variabilidade de microrganismos ruminais, tanto quantitativa quanto qualitativamente, depende de muitos fatores, como: espécie animal, localização geográfica, alimentação e o uso de aditivos alimentares que afetam a fermentação ruminal (SZUMACHER-STRABEL et al., 2009; KUMAR et al., 2013).

De acordo com Grainger et al. (2009), a suplementação com taninos condensados não tem sido adequadamente testada em ruminantes, principalmente em vacas leiteiras. Para tanto utilizaram extrato de taninos condensados de *Acacia mearnsii* nas dosagens de 0,9 e 1,8% do CMS verificando uma queda na produção de metano e redirecionamento da excreção de nitrogênio da urina para as fezes, no entanto, afetando a produção de leite.

Assim como demonstrado em revisão de Cieslak et al. (2013), existem informações científicas limitadas sobre o uso de componentes de plantas, como os taninos, em experimentos *in vivo*, sendo que nem sempre os resultados em curto período de tempo

conseguidos *in vitro* representam a realidade a longo prazo, por exemplo, devido a possível ocorrência do efeito de adaptação microbiana ao aditivo. Staerfl et al. (2012), utilizando extrato de taninos de *Acacia mearnsii* para bovinos de corte, na dosagem de 3,0% do CMS, relataram que o uso do aditivo é eficaz por longos períodos para mitigar a formação de CH₄ entérico. Portanto, é de fundamental importância o estabelecimento de dosagens ótimas para garantir o real efeito destes componentes para que possam ser utilizados como aditivos para ruminantes.

2.5 Digestão anaeróbia dos dejetos

A digestão anaeróbia é um processo biológico natural através do qual a matéria orgânica é metabolizada na ausência de oxigênio, onde diferentes tipos de microrganismos interagem para promover a transformação de compostos orgânicos complexos em subprodutos como o biogás, composto principalmente por gás CH₄ e CO₂ (TOERIEN et al., 1969). A formação de CH₄ por fezes de gado em pastejo é muito baixa (JARVIS et al., 1995) e muitas vezes sua quantificação é negligenciada. No entanto, quando estocadas, as fezes podem representar de 7 a 27% da emissão total de CH₄ dos ruminantes (KULLING et al., 2002; HINDRICHSEN et al., 2006). Portanto, é globalmente visto como uma importante fonte de emissão de CH₄. Massé et al. (2011) relatam o potencial de contribuição das fazendas geradoras de biogás em reduzir a emissão de GEE e outros impactos ambientais relacionados às operações pecuárias e citam uma produção média de 0,25 L de biogás por g de Sólidos Voláteis (SV) para dejetos de gado. O dejetos bovino é um bom substrato para o desenvolvimento da digestão anaeróbia, por conterem carboidratos, proteínas e gordura (AHRING et al., 2001). No entanto, vários fatores podem alterar as características dos resíduos influenciando seu potencial para a produção de biogás, sendo a alimentação dos animais um importante fator (AMON et al., 2007; JARRET et al., 2011).

A digestão anaeróbia é definida como um processo sequencial que envolve as fases de hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (BATSTONE et al., 2002; MATA-ALVAREZ, 2003). Bactérias hidrolíticas, bactérias acidogênicas e arqueias metanogênicas interagem entre si, sendo que o produto metabólico de um grupo microbiano será o substrato necessário à atividade do grupo sucessivo (LEITE, 2015). Com o uso de digestores anaeróbios experimentais tipo batelada é possível controlar as condições no intuito de aperfeiçoar a atividade e as cinéticas dos diversos grupos microbianos que convertem o substrato orgânico complexo em biogás através da cadeia trófica anaeróbia.

As cinéticas das reações de crescimento dos microrganismos e das reações de oxirredução durante a conversão da matéria orgânica à CH_4 são fortemente influenciadas pela temperatura, sendo a manutenção da temperatura na faixa mesofílica (30°C a 35°C) e termofílica (50°C a 55°C) consideradas ótimas para o processo (METCALF; EDDY, 2014). A maioria dos microrganismos são mesofílicos, crescendo melhor em temperaturas que variam entre 20°C a 40°C; sendo assim, os processos convencionais de digestão anaeróbia ocorrem nessa faixa de temperatura e de acordo com Gavala et al. (2003), isso se deve principalmente, em função do menor consumo de energia e da maior estabilidade do processo.

A maioria dos processos anaeróbios tem operação otimizada em um pH próximo a neutralidade. A ocorrência de mudanças da neutralidade pode ser provocada pela introdução de substrato afluente ou pelo excesso de produção e acúmulo de ácidos ou álcalis resultantes da conversão da matéria orgânica, tais como os ácidos orgânicos voláteis ou a amônia, respectivamente (MALINA JR.; POHLAND, 1992). Segundo Chernicharo (1997), os microrganismos produtores de CH_4 tem um crescimento ótimo na faixa de pH entre 6,6 e 7,4, embora se possa conseguir estabilidade na formação de CH_4 numa faixa mais ampla de pH, entre 6,0 e 8,0. Valores de pH abaixo de 6,0 e acima de 8,3 devem ser evitados, visto que podem inibir completamente os microrganismos metanogênicos. O autor ressalta ainda que as bactérias produtoras de ácidos têm um crescimento ótimo na faixa de pH entre 5,0 e 6,0. O controle de pH objetiva principalmente a eliminação do risco de inibição dos microrganismos metanogênicos, seja pelos baixos valores associados aos ácidos orgânicos voláteis produzidos durante a digestão anaeróbia (YENIGUN; DEMIREL, 2013) ou pelas mudanças bruscas de pH (choques de pH), visto que a recuperação do equilíbrio do sistema está relacionada à gravidade do dano causado aos microrganismos (RAJESHWARI et al., 2000). No entanto, deve-se considerar que os diversos grupos microbianos envolvidos nestes processos apresentam características peculiares que requerem diferentes valores ideais de pH (CECCHI et al., 2005).

As concentrações de carbono e nitrogênio desempenham condição essencial na digestão anaeróbia (GERARDI, 2003). A valorização do biogás produzido nos processos de digestão anaeróbia (apresentando cerca de 65% de CH_4 , 35% de CO_2 e demais gases traços como H_2S , H_2 e N_2) é energeticamente eficiente e ecológico devido à baixa emissão de micropoluentes tóxicos (LEITE, 2015). Como alternativa, o biogás pode ser enriquecido (gas upgrading) e usado na rede de abastecimento de gás natural domiciliar ou como combustível veicular. O biogás resultante deve conter mais que 95% de CH_4 para satisfazer os requisitos de qualidade para diferentes usos (MAO et al., 2015).

3 PARÂMETROS DIGESTIVOS E EFICIÊNCIA MICROBIANA DE GRUPOS DISTINTOS DE BOVINOS ALIMENTADOS COM TANINOS DE *Acacia mearnsii*

Resumo: Os taninos estão sendo estudados devido ao seu potencial em modular a fermentação ruminal e melhorar a utilização de nutrientes em ruminantes. O objetivo do presente experimento foi avaliar o uso de diferentes níveis de um extrato de taninos de *Acacia mearnsii* sobre os parâmetros de digestão, cinética e comportamento ingestivo como estratégia nutricional na alimentação de dois grupos distintos de bovinos, visando melhorar a eficiência do uso de N e a síntese de proteína microbiana. O delineamento experimental utilizado foi composto por dois quadrados latinos 4x4 (4 períodos de 28 dias cada), em arranjo fatorial 2x4, sendo testados dois grupos distintos de bovinos (taurinos e zebuínos) e quatro níveis de inclusão de taninos (extrato comercial de *Acacia mearnsii*, contendo 82,3% de taninos totais - equivalente em ácido tânico e 32,3% de taninos condensados - equivalente em leucocianidina) na dieta (0; 0,5; 1,0 e 1,5% da MS da dieta). Utilizou-se uma dieta basal experimental, sendo as doses de taninos ajustadas diariamente em função do consumo de MS (CMS). Pode-se observar que os níveis de taninos utilizados não causaram redução de consumo de alimentos nem da taxa de passagem ruminal para ambos os grupos de animais avaliados, apesar de ocorrer redução linear ($P<0,05$) da taxa de degradação e desaparecimento ruminal. O aumento dos níveis de taninos promoveu o aumento linear da quantidade de eventos de ruminação ($P<0,05$). Apesar da redução linear da digestibilidade dos nutrientes e da síntese de nitrogênio microbiano ($P<0,05$), não houve alteração da retenção de N nem da eficiência microbiana ($P>0,05$). Níveis de taninos entre 0,5 e 1,0% do CMS demonstraram ser indicativos de início de mudanças do processo digestivos para os grupos de bovinos avaliados, portanto, uma opção segura como aditivo alimentar. Adicionalmente, sugere-se considerar a questão ambiental, pois o direcionamento do N da urina para as fezes pode promover redução da formação de óxido nitroso, um potente gás causador do efeito estufa.

Palavras chave: Aditivo alimentar. Proteína microbiana. Retenção. Nitrogênio. *in vivo*

3.1 INTRODUÇÃO

Como alternativa ao uso de medicamentos para manipulação da fermentação ruminal, pesquisadores tem intensificado o estudo de aditivos alimentares naturais para ruminantes. Alguns metabólitos secundários das plantas, como os taninos, têm sido amplamente avaliados quanto ao seu efeito antimicrobiano e seu potencial para modular a fermentação ruminal e melhorar a utilização de nutrientes em ruminantes (BENCHAAR et al., 2007). De acordo com Cieslak et al. (2013), existem informações científicas limitadas sobre o uso de componentes de plantas, em experimentos *in vivo*, sendo que nem sempre os resultados em curto período de tempo obtidos *in vitro* representam a realidade a longo prazo.

Os taninos são polifenóis com alto peso molecular (500 a 20.000 Da) e alta complexidade. Estes compostos são classificados como taninos condensados (TC) ou hidrolisáveis (TH) (FRUTOS et al., 2004) e são conhecidos por seus efeitos benéficos ou adversos na nutrição de ruminantes, dependendo da sua concentração, estrutura química, espécie animal, estado fisiológico e composição da dieta (MAKKAR, 2003a). Rivera-Méndez et al. (2017), ao trabalhar com novilhos holandeses confinados que receberam dietas contendo baixa quantidade de TH e/ou TC (0,6% da MS), não observaram diferenças quanto à fonte de taninos sobre o crescimento ou ingestão de MS, mas a inclusão de taninos ou a combinação deles melhorou o desempenho animal. Os efeitos dos TC podem ser amplificados pela adstringência ou pela presença de TH. De acordo com Ahmed et al. (2005), que compararam espécies de acácia, os TH não estão presentes na casca de *Acacia mearnsii* e sua adstringência ou a capacidade de ligação à proteína é maior do que em espécies forrageiras temperadas. Segundo Waghorn (2008) sua utilização em até 4% da MS não é prejudicial à produção animal. No entanto, Grainger et al. (2009) observaram redução no consumo alimentar usando apenas 0,9% do CMS para vacas leiteiras.

A bastante tempo é conhecido que existem diferenças entre gado zebuino (*Bos taurus indicus*) e taurino (*Bos taurus taurus*). Estudos comparativos, como de Phillips et al. (1960) e Hungate et al. (1960), demonstraram que zebuínos apresentam maior taxa de fermentação e menor tempo de retenção ruminal em dietas deficientes em nitrogênio. Hegarty (2004), em sua revisão sobre os diferentes genótipos e seu impacto sobre a função do trato digestivo de ruminantes, afirma que existem diferenças significativas na função digestiva entre espécies, raças e dentro de raças. Adicionalmente, a pressão de seleção genética para algumas características de produção parece ter trazido alterações associadas à função digestiva,

indicando uma ligação entre a função digestiva e a produtividade. Diante deste contexto, é possível que haja diferenças entre animais com aptidões diferentes para as respostas observadas ao uso dos taninos na dieta.

A hipótese do presente trabalho é que a adição de taninos na dieta melhore a sincronização do uso dos nutrientes, resultando em melhor eficiência microbiana, sendo a magnitude deste efeito influenciada pelas características dos animais, como genética, aptidão, peso e outros. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o uso de diferentes níveis de um extrato de taninos de *Acacia mearnsii* como estratégia nutricional na alimentação de dois grupos distintos de bovinos, visando melhorar a eficiência do uso de N e da síntese de proteína microbiana.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Local e questão ética

O manejo dos animais seguiu as diretrizes estabelecidas de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob o protocolo n° 3222290414. O estudo foi realizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Brasil, Campus Fernando Costa, Pirassununga.

3.2.2 Animais, instalações e alimentação

Foram utilizadas oito vacas secas, canuladas no rúmen, sendo quatro da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*), com peso vivo médio de 775 ($\pm$ 55) kg e quatro da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), com peso vivo médio de 434 ($\pm$ 47) kg. Optou-se pela escolha desses dois grupos bem distintos por serem expressivos representantes dos sistemas de produção de leite (taurinos) e de carne mundial (zebuínos), ou pelo menos no Brasil. Os animais foram mantidos em galpão coberto, em baias individuais com cama de areia, ventilação, cochos de cimento e bebedouros automáticos. Os alimentos foram oferecidos *ad libitum* (pelo menos 10% de sobras), duas vezes ao dia, às 8:00 e 16:00 h, na forma de ração completa com uma proporção de volumoso:concentrados de 50:50. Silagem de milho foi utilizada como volumoso e os concentrados foram constituídos por milho grão moído, farelo de soja, sal branco, suplemento mineral e aditivo alimentar, os quais foram misturados

respeitando os níveis de inclusão para cada tratamento (Tabela 1). A dieta basal foi formulada no programa Spartan Dairy Ration Evaluator/Balanacer, versão 3.0.3 e avaliada segundo o NRC (2001), de modo a atender as exigências dos dois grupos de animais.

Tabela 1. Proporções de ingredientes e composição bromatológica da dieta basal experimental.

Ingredientes e composição química	Dieta basal (%)	Sil. de milho	Concentrados
Silagem de milho	50,00	-	-
Milho grão moído	32,80	-	-
Farelo de soja	12,70	-	-
Sal comum	0,50	-	-
Mistura mineral ¹	2,00	-	-
Taninos ³	*	-	-
Caulin	**	-	-
Nutrientes			
MS ² , %	61,1	30,1	92,1
MM ² , % da MS	6,6	4,7	8,4
Amido, % da MS [†]	39,3	-	-
EE ² , % da MS	3,2	2,8	3,5
PB ² , % da MS	13,1	8,1	18,0
Proteína degradável no rúmen, % da PB [†]	65,1	69,0	61,2
Proteína não degradável no rúmen, % da PB [†]	34,9	31,0	38,8
FDN ² , % da MS	34,2	57,9	10,5
Carboidratos não fibrosos ² , % da MS	43,0	26,5	59,6
Energia líquida para lactação, Mcal/kg MS [†]	1,5	1,2	1,8
Nutrientes digestíveis totais, % da MS [†]	67,3	61,9	72,7
Ca ² , % da MS	0,63	0,29	0,96
P ² , % da MS	0,34	0,13	0,56

¹Mistura mineral, quantidade por kg de produto: 140 g de cálcio, 80 g de fósforo, 10 g de enxofre, 129 g de sódio, 80 mg de cobalto, 1.400 mg de cobre, 800 mg de flúor, 80 mg de iodo, 1.000 mg de manganês, 20 mg de selênio, 3.500 mg de zinco; ²Análise bromatológica; ³Extrato vegetal de *Acacia mearnsii* com 82,3% de taninos.

*Quantidade de Taninos totais adicionados para cada nível estudado: 0, 0,5 1,0 e 1,5% da MS.

** Quantidade de Caulin adicionado em substituição aos Taninos totais: 1,5, 1,0, 0,5, e 0% da MS.

[†]Value estimated by the Spartan Dairy Ration Evaluator/Balancer software, version 3.0.3.

Fonte: Perna Junior (2018)

Como as dietas com pouca fibra estão associadas a menores emissões de metano (Johnson; Johnson, 1995), optou-se pela utilização de dieta com 50% de forragem com a intenção de não reduzir a produção de metano entérico, o que ajudaria a não ocultar o efeito do aditivo utilizado. Amostras de alimentos de cada animal foram coletadas diariamente (7:00

h), durante os últimos 5 dias de cada período experimental, sendo congeladas a - 20°C para determinação da composição bromatológica.

3.2.3 Delineamento experimental e tratamentos

Utilizou-se dois quadrados latinos 4x4, em arranjo fatorial 2x4, sendo testados dois grupos genéticos distintos de bovinos (Taurinos ou Zebuínos) e quatro níveis de inclusão de taninos na dieta, totalizando 32 unidades experimentais. Uma dieta basal experimental foi suplementada com os seguintes níveis de taninos: 0%, sem taninos; 0,5% da MS; 1,0% da MS; 1,5% da MS; ajustados diariamente em função do consumo de MS (CMS) e misturados à dieta total antes de cada alimentação.

Foi utilizado como fonte de taninos um extrato comercial obtido de Acácia Negra - *Acacia mearnsii* (Seta Natur®, Rio Grande do Sul, Brasil). A concentração de fenóis totais (84,4% do extrato) foi determinada através do método de Folin-Ciocalteau (MAKKAR, 2003b) e os taninos totais (82,3% equivalente em ácido tânico) foram estimados pela diferença da concentração de fenóis totais antes e após tratamento com polivinilpolipirrolidona insolúvel (MAKKAR et al., 1993). A concentração de TC (32,3% equivalente em leucocianidina) foi determinada através do método HCl-butanol (MAKKAR, 2003b). Para evitar o efeito negativo dos taninos sobre o CMS, níveis de baixo a moderado foram utilizados neste estudo, uma vez que Grainger et al. (2009) observaram redução no consumo alimentar usando apenas 0,9% do CMS para vacas leiteiras.

3.2.4 Período experimental e amostragem

O experimento consistiu em quatro períodos experimentais de 28 dias, sendo cada um com 17 dias de adaptação à dieta experimental. No 17º dia realizou-se a avaliação de comportamento ingestivo; do 18º ao 22º dia foram avaliados o CMS, a ingestão de água, a digestibilidade, excreção dos nutrientes e a degradabilidade *in situ*; no 22º dia coletou-se urina para determinação da síntese de proteína microbiana ruminal e balanço de nitrogênio.

Para avaliar a dinâmica ruminal, o rúmen de cada animal foi esvaziado em dias alternados (25º e 26º dias), sendo antes (0 horas) e 3 horas após a alimentação matinal. Os animais foram pesados no primeiro e último dia de cada período experimental. O esquema das coletas está representado na Figura 1.

Figura 1 - Esquema dos dias de coleta para cada variável avaliada dentro de cada período experimental

Fonte: Perna Junior (2018).

3.2.5 Consumo alimentar e digestibilidade aparente total da MS e frações

Os cochos de alimentação foram examinados diariamente às 07:00 h. Se não houvesse sobra de alimentos, aumentava-se em 10% a quantidade oferecida. Se houvesse sobra de aproximadamente 10%, a quantidade oferecida era mantida e se a sobra fosse maior que 10%, reduzia-se a quantidade oferecida em 10%. Durante os últimos cinco dias de cada período, as sobras de alimentos de cada vaca foram recolhidas e pesadas para a quantificação exata da ingestão de alimentos. Também foi quantificada a ingestão diária de água com o uso de hidrômetros.

A digestibilidade aparente total da MS e de suas frações (PB, EE, CNF, FDN, FDA e EB) foi determinada pelo método *in vivo* com o uso do marcador externo dióxido de titânio (TiO₂), segundo Titgemeyer et al. (2001). Para tal, do 13º ao 22º dia de oferecimento das dietas, foram administrados 15 gramas diárias de TiO₂, dividido em duas porções de 7,5 g/animal, via cânula ruminal, sendo os cinco primeiros dias para administração e os cinco últimos dias para administração e coleta de fezes manualmente via reto, duas vezes ao dia (8:00 e 16:00h). As amostras compostas foram armazenadas em freezer a -20°C até o momento da determinação da concentração de TiO₂, usando a metodologia descrita por Myers et al. (2004). Os coeficientes de digestibilidade aparente da MS (CDA_{MS}) e seus nutrientes (CDA_N) foram calculados com base no teor (%) de TiO₂ da dieta e das fezes, mediante a seguinte equação:

$$CDA_{MS} = 100 - \left(100 \times \left(\frac{\text{TiO}_2 \text{ (\%)} \text{ na dieta}}{\text{TiO}_2 \text{ (\%)} \text{ nas fezes}} \right) \right)$$

$$CDA_N = 100 - \left(100 \times \left(\frac{\text{TiO}_2 (\%) \text{ na dieta}}{\text{TiO}_2 (\%) \text{ nas fezes}} \right) \times \left(\frac{\text{N (\%) nas fezes}}{\text{N (\%) na dieta}} \right) \right)$$

A excreção fecal da MS e dos nutrientes foram calculadas de acordo com a equação:

$$\text{Excreção fecal (kg)} = \frac{(100 - CDA) \times \text{Consumo (kg)}}{100}$$

O conteúdo de MS dos alimentos e fezes foi determinado por secagem em estufa com ventilação e renovação de ar constante a 55°C durante 72 horas, segundo AOAC (1995). Após secas, as amostras foram moídas em moinho de facas, tipo willye, em peneiras de 1 mm e armazenadas em frascos devidamente fechados. Todas as análises foram corrigidas para o teor de MS analítica determinada a 105°C por 4 h em estufa. A matéria mineral (MM) foi obtida pela calcinação em forno mufla a 550°C durante 5 h, sendo a matéria orgânica (MO) calculada como a diferença entre 100 e a MM (AOAC, 1990). A proteína bruta (PB) foi determinada pelo teor de N total (N x 6,25) utilizando a técnica micro-Kjeldahl (método 920.87; AOAC, 1990). O extrato etéreo (EE) foi determinado com o equipamento ANKOM XT15 Extractor® (método Am 5-04; AOCS, 2005). A fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina foram determinadas pelo método descrito por Van Soest et al. (1991), sendo a FDN obtida com o uso de α -amilase termoestável. O cálcio (Ca) foi determinado por titulação (método 968.08, AOAC, 1995) e o fósforo (P) por colorimetria (método 965.17; AOAC, 1990). A energia bruta (EB) foi determinada pela oxidação completa das amostras em bomba calorimétrica adiabática (C5000 control, IKA®, Staufen, Alemanha). O teor de carboidratos não fibrosos (CNF) foi obtido pela subtração de 100, das quantidades expressas em porcentagem de MS de PB, EE, MM e FDN.

3.2.6 Comportamento ingestivo

O comportamento ingestivo foi avaliado durante 24 horas ininterruptas, com início às 8:00 h da manhã, através de monitoramento visual, no 17º dia de cada período experimental. Foram observados e avaliados a cada cinco minutos as seguintes atividades: comendo (C), bebendo (B), ruminando (R) e ócio (O), conforme metodologia descrita por Maekawa et al. (2002). As atividades foram anotadas a cada 5 min, sendo considerado que foram executadas durante todo esse intervalo. Um evento foi definido como pelo menos 5 min da atividade seguido de pelo menos 5 min sem a atividade. Para estimar o tempo gasto (eficiência) para

comer ou ruminar, por quilograma de MS ou FDN, foi utilizada a ingestão média para o período experimental. O tempo total de mastigação foi calculado como o tempo total gasto comendo e ruminando. A soma de todos os eventos C representa o número diário de eventos C (eventos/dia). Da mesma forma foi calculado o número diário de eventos R, O e B.

O tempo total C (min/dia) foi definido como a soma de todas as atividades C. O tempo médio C por evento (min/evento) foi obtido pelo tempo total C dividido pelo número de eventos C. Da mesma forma, foram obtidos os tempos totais e os tempos médios por evento de R, O e B. O tempo total de mastigação (min/dia) foi calculado pela soma do tempo total C e do tempo total R. O número diário de eventos de mastigação (eventos/dia) foi obtido pela soma do número de eventos C e o número de eventos R, enquanto que o tempo médio de mastigação por evento (min/evento) foi calculado pela razão entre tempo total mastigando e o número de eventos de mastigação.

3.2.7 Proteína microbiana ruminal e balanço de nitrogênio

Para o cálculo da produção de proteína microbiana foi realizada a determinação da concentração de creatinina na urina, de acordo com metodologia descrita por Valadares et al. (1999). Amostras de urina foram obtidas de todas as vacas no 22º dia de cada período experimental, a cada 6 horas, durante micção estimulada por massagem na vulva. Cada amostra de urina coletada foi filtrada e uma alíquota de 10 mL foi imediatamente diluída em 40 mL de ácido sulfúrico a 0,036 N para evitar destruição bacteriana dos derivados de purinas e precipitação do ácido úrico, sendo então armazenadas a -20°C, em um único frasco, formando uma única amostra composta de 24 horas. Posteriormente, realizou-se análises de creatinina, ácido úrico, alantoína e uréia.

As concentrações de creatinina foram determinadas por meio de reação enzimática cinética colorimétrica, através da reação com Picrato Alcalino em meio tamponado utilizando-se kit comercial (Bioclin® Ref K067), o ácido úrico por reação enzimática colorimétrica com Uricase e Peroxidase através de kit comercial (Bioclin® Ref K139), a uréia por reação enzimática colorimétrica com a utilização de kit comercial (Bioclin® Ref K047) e a alantoína por método colorimétrico, conforme técnica de Fujihara et al. (1987), descrita por Chen e Gomes (1992).

A excreção urinária diária de creatinina (EC) foi estimada em relação ao peso vivo (PV) em kg, a partir da equação: $EC \text{ (mg/kgPV.dia)} = 32,27 - 0,01093 \cdot PV$ ($R^2 = 0,70$) (CHIZZOTTI et al., 2004). O volume urinário total diário, em litros, foi estimado dividindo-

se as excreções urinárias diárias de creatinina pelos valores observados de concentração de creatinina na urina (mg/dL). Esse volume foi utilizado para calcular as excreções estimadas diárias de uréia, alantoína e ácido úrico de cada animal.

A excreção diária de derivados de purinas (DP) na urina foi calculada multiplicando-se o volume urinário diário pela concentração dos DP. As purinas microbianas absorvidas (Pabs, mmol/dia) foram calculadas a partir da excreção de DP (mmol/dia), por meio da equação: $DP = 0,85 * Pabs + 0,385 * PV^{0,75}$, em que 0,85 é a recuperação de purinas absorvidas como derivados urinários de purinas e 0,385 $PV^{0,75}$, a contribuição endógena para a excreção de purinas (VERBIC et al., 1990).

O fluxo intestinal de compostos nitrogenados microbianos (Nmic, g de N/dia) foi calculado em relação às purinas microbianas absorvidas (Pabs, mmol/dia), utilizando-se a equação: $Nmic = (70 * Pabs) / (0,83 * 0,116 * 1000)$, em que 70 representa o conteúdo de N nas purinas (mg N/mmol), 0,83 a digestibilidade das purinas microbianas e 0,116 a relação N purina:N total dos microrganismos ruminais (CHEN; GOMES, 1992). A eficiência microbiana foi calculada pela relação entre a produção de proteína microbiana (g) e a quantidade de MO digestível no rúmen (kg).

O consumo de N foi determinado pela divisão do consumo de PB por 6,25, obtendo-se a quantidade em gramas de N consumida. O mesmo cálculo foi realizado com os valores de PB das fezes, obtendo-se a excreção total de N. A concentração de N uréico na urina foi obtida pela multiplicação da concentração de uréia por 0,466, correspondente ao teor de N na uréia. O N retido foi obtido pelo cálculo do N ingerido menos o N excretado (fezes + urina). O balanço de N, em %, foi obtido pela relação do N contido nas frações (fezes, urina ou retido) pelo N ingerido.

3.2.8 Cinética ruminal

O estudo da cinética ruminal foi realizado utilizando-se as técnicas de dinâmica ruminal, para determinação da taxa de desaparecimento ruminal da MS (Kt), e da degradabilidade ruminal *in situ*, para determinação da taxa de digestão ruminal da MS (Kd). A taxa de passagem ruminal da MS (Kp) foi calculada pela diferença entre a Kt e a Kd.

3.2.8.1 Dinâmica ruminal

A dinâmica ruminal foi avaliada pelo esvaziamento total do rúmen. A digesta ruminal foi removida manualmente através da cânula ruminal, de cada vaca, conforme descrito por Dado e Allen (1995). No 25º dia, o esvaziamento foi realizado às 11:00 h, ou seja, três horas após o fornecimento da dieta, quando o rúmen estava, teoricamente, repleto. O mesmo procedimento foi realizado no 26º dia às 8:00 h, imediatamente antes do fornecimento da dieta, quando o rúmen estava, teoricamente, com seu menor volume. Durante a retirada do conteúdo ruminal, as fases líquida e sólida foram separadas com auxílio de peneira de 2mm e balde, posteriormente foram pesadas, homogeneizadas e coletadas amostras de 1 kg de cada fase. Imediatamente depois, a digesta foi reconstituída e devolvida ao rúmen. A MS do conteúdo ruminal e a Kt foram calculadas com base no peso seco de cada amostra (55 °C durante 72 h). Quando o consumo é estável, a Kt do alimento ou de uma fração alimentar equivale à sua taxa de ingestão (ROBINSON et al., 1987), portanto a Kt foi estimada usando a fórmula:

$$Kt (\%/h) = 100 \times \left(\frac{CMS \text{ diário } (kg)}{MS \text{ do conteúdo ruminal } (kg)} \right) / 24$$

$$Kt (kg/h) = MS \text{ do conteúdo ruminal } (kg) \times \left(\frac{Kt (\%/h)}{100} \right)$$

3.2.8.2 Degradabilidade ruminal *in situ*

A técnica consiste em determinar o desaparecimento da MS dos alimentos e suas frações (proteína bruta, fibras, etc.), quando incubados em sacos de náilon no interior do rúmen por um determinado tempo, que pode variar de 0 a 96 horas, como proposto por Mehrez e Ørskov (1977), atendendo às recomendações descritas por Nocek (1988), utilizando-se bolsas de tecido náilon, com poros de 50 µm, nas dimensões de 10 x 20 cm. Para a incubação foi utilizada a dieta total experimental, pré-secas em estufa a 55°C, moídas em peneiras com crivos de 2 mm e colocadas em sacos de náilon na quantidade de, aproximadamente, 9,0 g de MS por saco. Os períodos de incubação corresponderam aos tempos de 0, 3, 6, 12, 24, 48 e 96 horas, entre o 18º e o 22º dia de cada período experimental, sendo os sacos colocados em tempos diferentes, para serem retirados todos ao mesmo tempo, promovendo, dessa forma, lavagem uniforme do material. Retirados do rúmen, os sacos foram imediatamente imersos em água fria e lavados, manualmente, em água corrente, até que esta

escorresse límpida. Posteriormente, foram secos em estufa de ventilação forçada de ar a 55°C por 72 horas. Logo depois, foram pesados para determinação da taxa de desaparecimento da MS no rúmen. As análises bromatológicas de PB foram avaliadas segundo a AOAC (1995) e de FDN segundo Van Soest et al. (1991).

Os dados de degradabilidade *in situ* da MS, da FDN e da PB foram obtidos pela diferença de peso encontrada entre as pesagens efetuadas antes e depois da incubação ruminal, e expressos em porcentagem. A degradabilidade potencial foi calculada de acordo com o modelo de Ørskov e McDonald (1979) com o auxílio do procedimento NLIN do SAS (versão 9.3), sendo: $p = a + b(1 - e^{-ct})$, em que p é a quantidade degradada no tempo “ t ”; a é fração solúvel sendo a interseção da curva no tempo zero; b é a fração potencialmente degradável; e c é a taxa horária de degradação da fração potencialmente degradável (b). Para a degradabilidade real (DR) foi utilizado o modelo: $DR = a + (bc)/(c + k)$, em que k é a taxa de passagem de partículas no rúmen (ØRSKOV et al., 1980). A degradabilidade real (DR) da FDN e da PB foi estimada levando-se em consideração a K_p da MS, obtida indiretamente pela fórmula: $K_p = K_t - K_d$.

3.2.8.3 Taxa de passagem ruminal

A taxa de passagem ou de trânsito refere-se ao fluxo de resíduos não digeridos através do trato digestório. O fluxo ruminal inclui, além da fibra indigestível, bactérias e outras frações não degradadas do alimento, sendo que a composição e o volume da dieta são variáveis externas que influenciam a digestão, a taxa de digestão e a reciclagem do conteúdo ruminal (VAN SOEST, 1994). A taxa de desaparecimento (K_t) equivale a somatória das taxas de passagem (K_p) e de digestão (K_d) (BOSH; BRUINING, 1995). Assim sendo, a K_p foi calculada pela diferença entre a K_t da massa sólida ruminal (obtida através da técnica de esvazimento ruminal) e a K_d da fração potencialmente degradável no rúmen (obtida pela técnica da degradabilidade ruminal *in situ*). Portanto, utilizou-se a seguinte equação: $K_p (\%/h) = K_t (\%/h) - K_d (\%/h)$.

3.2.9 Análise estatística

Os dados de consumo de MS, ingestão de água, comportamento ingestivo, digestibilidade *in vivo*, estimativa da produção de proteína microbiana no rúmen e cinética ruminal foram submetidos à análise de variância, que separou como causas de variação efeito de genética, efeito de nível, interação entre genética e nível, efeito de período e efeito de

animal dentro de genética. O efeito de nível foi avaliado pelo uso de polinômios ortogonais, separando-se os efeitos em linear, quadrática e desvio da quadrática. Os dados foram analisados utilizando-se o programa Statistical Analysis System (SAS 9.3, Institute Inc., 2013). Antes das análises propriamente ditas, os dados foram avaliados em relação à presença de informações discrepantes (“outliers”) e normalidade dos resíduos pelo teste Shapiro-Wilk. Quando a premissa de normalidade não foi atendida, recorreu-se à transformação dos dados. O modelo estatístico utilizado está descrito conforme a equação abaixo:

$$Y_{ijkl} = \mu + N_i + G_j + N_i * G_j + P_k + A_l(G_j) + e_{ijkl}$$

Onde: Y_{ijkl} = observação referente ao Nível (i) + Genética (j) + Nível (i)*Genética (j) + Período (k) + Animal (l) dentro de Genética (j) + erro aleatório associado a cada observação (e_{ijkl}); μ = Média geral; N_i = Efeito de Nível (efeito fixo); G_j = Efeito de Genética (efeito aleatório); $N_i * G_j$ = Interação entre Nível (i) e Genética (j); P_k = Efeito de Período (efeito aleatório); $A_l(G_j)$ = Efeito de Animal dentro de Genética (efeito aleatório); e_{ijkl} = Erro aleatório associado a cada observação.

Adotou-se nível de significância de 5%. Devido à diferença de porte dos dois grupos genéticos avaliados, as variáveis foram ajustadas em função do peso metabólico dos animais ($\text{kg PV}^{0,75}$) e, quando não possível ajuste, este foi utilizado como covariável.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Consumo e comportamento ingestivo

Não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) para o CMS e a ingestão de água, quando os dados foram corrigidos em função do peso metabólico (Tabela 2). Para a variável Número de Eventos (NE) Ruminando houve efeito linear crescente ($P < 0,05$) de acordo com o aumento do nível de taninos, independentemente da genética. Adicionalmente, houve diferença significativa entre as genéticas, onde os taurinos apresentaram maior NE Ruminando (17,4%) em comparação aos zebuínos. Já para a variável NE Mastigando houve diferença significativa entre as genéticas, sendo superior em 12,8% em taurinos quando comparado aos zebuínos. No entanto, para ambas variáveis não houve diferença quando se levou em consideração o tempo envolvido nestes eventos (Tabela 3).

Tabela 2. Consumo alimentar de dois grupos distintos de bovinos alimentados com diferentes níveis de inclusão de taninos de *Acacia mearnsii*

Consumo	Genética (G)		Nível (N)				EPM	Probabilidade		
	Taurino	Zebuino	0%	0,5%	1%	1,5%		G	N	G*N
MS, dia										
kg	16,06	9,20	12,88	12,82	12,52	12,30	0,72	0,0014	NS	NS
% do PV	1,92	1,97	1,96	1,95	1,96	1,91	0,036	NS	NS	NS
g/kg.PV ^{0.75}	103,3	91,31	98,33	97,86	97,68	95,43	2,22	0,0902	NS	NS
Água, dia										
L	58,50	24,00	42,50	40,25	40,75	41,50	3,79	0,0106	NS	NS
L/kg.MS	3,66	2,58	3,15	3,04	3,08	3,20	0,16	0,0624	NS	NS
% do PV	7,01	5,06	6,12	5,88	6,03	6,09	0,32	NS	NS	NS
mL/kg.PV ^{0.75}	376,4	236,0	311,8	298,8	305,2	309,0	19,03	0,0515	NS	NS

EPM: Erro padrão da média; G*N: Interação entre Genética e Nível.

Fonte: Perna Junior (2018).

Tabela 3. Comportamento ingestivo de dois grupos distintos de bovinos alimentados com diferentes níveis de inclusão de taninos de *Acacia mearnsii*

Variáveis	Genética (G)		Nível (N)				EPM	Probabilidade		
	Taurino	Zebuino	0%	0,5%	1%	1,5%		G	N	G*N
Ócio										
NE	20,48	18,75	19,38	19,25	20,00	19,75	0,41	NS	NS	NS
TTA (min)	690,3	686,8	691,3	691,9	683,1	688,1	11,8	NS	NS	NS
TTA (%)	47,94	47,70	48,00	48,05	47,44	47,79	0,82	NS	NS	NS
TME (min)	33,97	37,08	36,06	36,05	34,43	35,56	0,85	NS	NS	NS
Ruminando										
NE	17,25	14,25	14,88	15,13	17,00	16,00	0,43	0,0176	0,0336 ^L	NS
TTA (min)	491,9	497,2	481,3	488,8	501,3	506,9	11,0	NS	NS	NS
TTA (%)	34,16	34,53	33,42	33,94	34,81	35,20	0,77	NS	NS	NS
TME (min)	28,74	35,70	32,85	33,76	30,03	32,23	1,24	NS	NS	NS
Bebendo										
NE	5,00	3,56	4,38	4,00	4,25	4,50	4,28	NS	NS	NS
TTA (min)	27,19	19,06	24,38	22,50	23,13	22,50	23,1	NS	NS	NS
TTA (%)	1,89	1,32	1,69	1,56	1,61	1,56	1,60	NS	NS	NS
TME (min)	5,47	5,54	5,57	5,83	5,59	5,02	0,17	NS	NS	NS
Comendo										
NE	8,44	8,19	8,50	8,63	8,13	8,00	0,34	NS	NS	NS
TTA (min)	230,6	236,9	243,1	236,9	232,5	222,5	7,64	NS	NS	NS
TTA (%)	16,01	16,45	16,88	16,48	16,15	15,45	0,53	NS	NS	NS
TME (min)	27,89	29,90	28,87	27,93	28,87	29,90	1,04	NS	NS	NS
Mastigando										
NE	25,69	22,44	23,38	23,75	25,13	24,00	0,53	0,0291	NS	NS
TTA (min)	722,5	734,1	724,4	725,6	733,8	729,4	11,5	NS	NS	NS
TTA (%)	50,17	50,98	50,30	50,39	50,96	50,65	0,80	NS	NS	NS
TME (min)	28,33	33,12	31,46	31,01	29,33	31,10	0,85	0,0634	NS	NS
Relação R:C	2,27	2,15	2,08	2,10	2,25	2,41	0,10	NS	NS	NS

EPM: Erro padrão da média; G*N: Interação entre Genética e Nível; NE: Numero de eventos; TTA (min): Tempo total da atividade. TTA (%): Porcentagem de tempo total da atividade; TME (min): Tempo médio do evento; R:C: Relação Ruminando:Comendo.

Fonte: Perna Junior (2018).

Na Tabela 4, verifica-se que a eficiência de consumo e ruminação de MS ou FDN em relação ao peso metabólico (kg de PV^{0,75}) não apresentaram diferenças significativas (P>0,05).

Tabela 4. Eficiência de consumo e ruminação de dois grupos distintos de bovinos alimentados com diferentes níveis de inclusão de taninos de *Acacia mearnsii*

Variáveis	Genética (G)		Nível (N)				EPM	Probabilidade		
	Taurino	Zebuíno	0%	0,5%	1%	1,5%		G	N	G*N
Consumo										
MS, min/kg	15,15	25,20	21,41	19,20	20,29	19,79	1,38	0,0167	NS	NS
MS, min/(g/kg.PV ^{0,75})	2,30	2,50	2,54	2,28	2,42	2,37	0,11	NS	NS	NS
MS, kg/NE	2,05	1,17	1,57	1,57	1,60	1,72	0,13	0,0169	NS	NS
MS, (g/kg.PV ^{0,75})/NE	13,08	11,65	11,91	11,69	12,34	13,53	0,63	NS	NS	NS
FDN, min/kg	44,53	74,06	62,96	56,44	59,64	58,15	4,05	0,0167	NS	NS
FDN, min/(g/kg.PV ^{0,75})	6,77	7,35	7,46	6,71	7,11	6,96	0,32	NS	NS	NS
FDN, kg/NE	0,69	0,39	0,53	0,53	0,54	0,58	0,04	0,0170	NS	NS
FDN, (g/kg.PV ^{0,75})/NE	4,45	3,96	4,05	3,98	4,20	4,60	0,21	NS	NS	NS
Ruminação										
MS, min/kg	31,23	54,94	41,44	43,28	43,50	44,11	2,52	0,0002	NS	NS
MS, min/(g/kg.PV ^{0,75})	4,82	5,49	4,98	5,15	5,16	5,32	0,16	NS	NS	NS
MS, kg/NE	0,94	0,66	0,85	0,84	0,74	0,77	0,04	0,0241	NS	NS
MS, (g/kg.PV ^{0,75})/NE	6,03	6,58	6,67	6,66	5,84	6,06	0,20	NS	NS	NS
FDN, min/kg	91,8	161,5	121,9	127,2	127,8	129,6	7,40	0,0002	NS	NS
FDN, min/(g/kg.PV ^{0,75})	14,16	16,14	14,66	15,15	15,15	15,64	0,46	NS	NS	NS
FDN, kg/NE	0,32	0,22	0,29	0,28	0,25	0,26	0,009	0,0131	NS	NS
FDN, (g/kg.PV ^{0,75})/NE	2,05	2,24	2,27	2,26	1,99	2,06	0,07	NS	NS	NS

EPM: Erro padrão da média; G*N: Interação entre Genética e Nível; MS: matéria seca; FDN: fibra em detergente neutro; NE: número de eventos.

Fonte: Perna Junior (2018).

3.3.2 Digestibilidade aparente total da MS e frações

Houve efeito linear decrescente (P<0,05) para a digestibilidade *in vivo* de alguns nutrientes, chegando a apresentar redução para o nível mais alto de taninos, de 18,1% para PB, 20,5% para FDN, 22,0% para FDA e 11,8% para MO, bem como 11,3% para NDT (Tabela 5) quando comparado á dieta controle (sem inclusão de taninos). Com o aumento dos níveis de taninos houve aumento linear (P<0,05) da excreção de PB, FDN, FDA e de N.

Tabela 5. Digestibilidade aparente total e suas frações de dois grupos distintos de bovinos alimentados com diferentes níveis de inclusão de taninos de *Acacia mearnsii*

Variáveis	Genética (G)		Nível (N)				EPM	Probabilidade		
	Taurino	Zebuíno	0%	0,5%	1%	1,5%		G	N	G*N
Digestibilidade (%)										
MS	68,24	64,51	68,77	68,83	65,64	62,25	1,41	NS	0,0989	NS
PB	62,96	56,53	65,29	63,27	56,94	53,47	1,73	NS	0,0010 ^L	NS
FDN	59,45	58,83	64,39	63,74	57,24	51,18	1,98	NS	0,0003 ^L	0,0867
FDA	59,38	60,27	67,16	63,35	56,43	52,37	1,64	NS	<,0001 ^L	NS
EE	72,66	58,84	64,41	65,82	61,24	71,53	2,44	0,0525	0,0534	NS
CNF	82,52	78,33	81,76	81,91	80,96	77,09	1,17	NS	NS	NS
MO	71,03	67,67	72,65	72,24	68,42	64,09	1,45	NS	0,0038 ^L	NS
NDT	68,78	65,26	70,10	69,77	66,04	62,16	1,44	NS	0,0057 ^L	NS
Excreção (g/kg. PV ^{0.75})										
MS	32,93	32,49	30,75	30,54	33,30	36,25	1,48	NS	NS	NS
PB	4,59	5,29	4,46	4,71	5,49	5,90	0,22	NS	0,0049 ^L	NS
FDN	13,97	12,72	11,83	11,86	13,93	15,75	0,69	NS	0,0024 ^L	NS
FDA	9,72	8,82	7,66	8,54	9,99	10,89	0,40	NS	0,0006 ^L	NS
EE	1,00	1,06	1,05	0,99	1,11	0,99	0,09	NS	NS	NS
CNF	8,09	8,48	7,80	7,78	8,03	9,54	0,51	NS	NS	NS
MO	28,05	27,55	25,14	25,33	28,55	32,17	1,41	NS	NS	NS
N	0,80	0,85	0,71	0,76	0,88	0,94	0,04	NS	0,0049 ^L	NS

EPM: Erro padrão da média; G*N: Interação entre Genética e Nível.

Fonte: Perna Junior (2018).

3.3.3 Cinética ruminal

Os diferentes níveis de taninos, assim como os dois grupos de animais avaliados, não demonstraram variação significativa com relação às características das frações sólida e líquida do conteúdo ruminal, quando expressos em % do PV ou g/kg de PV^{0,75}, uma vez que a diferença entre os grupos em termos brutos era esperada, devido a diferença de porte dos animais (Tabela 6). A taxa de desaparecimento ruminal (kt), em %/h, foi reduzida linearmente ($P < 0,05$) com o aumento do nível de inclusão de taninos na dieta.

Tabela 6. Dinâmica ruminal de dois grupos distintos de bovinos alimentados com diferentes níveis de inclusão de taninos de *Acacia mearnsii*

Conteúdo Ruminal	Genética (G)		Nível (N)				EPM	Probabilidade		
	Taurino	Zebuino	0%	0,5%	1%	1,5%		G	N	G*N
MS, %	12,08	12,85	12,47	12,47	11,92	13,00	3,74	NS	NS	NS
Massa líquida										
kg	72,76	39,76	53,96	55,54	57,20	58,34	3,30	0,0006	NS	NS
% do PV	8,82	8,51	8,20	8,54	8,88	9,02	0,24	NS	NS	NS
g/kg PV ^{0,75}	472,3	395,3	411,8	427,9	443,9	451,5	13,5	0,0770	NS	NS
Massa sólida										
kg	10,09	5,86	7,67	7,89	7,77	8,56	0,52	0,0247	NS	NS
% do PV	1,21	1,25	1,17	1,22	1,21	1,33	0,40	NS	NS	NS
g/kg PV ^{0,75}	64,99	58,08	58,45	61,14	60,34	66,23	2,29	NS	NS	NS
Massa total										
kg	82,84	45,63	61,63	63,44	64,97	66,91	3,74	0,0010	NS	NS
% do PV	10,03	9,76	9,37	9,76	10,09	10,32	0,27	NS	NS	NS
g/kg PV ^{0,75}	537,3	453,3	470,3	489,1	504,3	517,7	14,9	0,0977	NS	NS
Tx desaparecimento (kt)										
kg/h	0,69	0,40	0,56	0,55	0,53	0,53	0,03	0,0014	NS	NS
(g/kg PV ^{0,75})/h	4,31	3,81	4,10	4,08	4,07	3,98	0,09	0,0904	NS	NS
%/h	6,83	6,90	7,43	7,00	6,64	6,37	0,20	NS	0,0066 ^L	NS

EPM: Erro padrão da média; G*N: Interação entre Genética e Nível; Kt: Taxa de desaparecimento da massa sólida no rúmen.

Fonte: Perna Junior (2018).

Para a degradabilidade da MS não houve diferença ($P < 0,05$) entre as genéticas avaliados nem efeito dos diferentes níveis de taninos. Já a degradabilidade real (DR) da FDN e da PB foram reduzidas linearmente ($P < 0,05$) com o aumento dos níveis de taninos (Tabela 7), assim como a degradabilidade potencial (DP) da PB, sendo observado efeito contrário para a fração não degradada (Ind) da PB.

Tabela 7. Degradabilidade *in situ* da MS, FDN e PB de dois grupos distintos de bovinos alimentados com diferentes níveis de inclusão de taninos de *Acacia mearnsii*

Variáveis	Genética (G)		Nível (N)				EPM	Probabilidade		
	Taurino	Zebuíno	0%	0,5%	1%	1,5%		G	N	G*N
MS										
a (%)	17,66	16,99	18,11	16,61	17,37	17,21	0,30	NS	NS	NS
b (%)	64,60	68,09	66,80	66,49	67,54	64,54	0,85	NS	NS	NS
c (h ⁻¹)	0,040	0,046	0,048	0,047	0,040	0,037	0,002	NS	0,0100 ^L	NS
DR (%)	52,96	57,53	59,60	56,34	53,60	51,43	2,07	NS	NS	NS
DP (%)	82,26	85,25	84,90	83,47	84,91	81,75	0,71	NS	NS	NS
Ind (%)	17,74	14,74	15,10	16,53	15,09	18,25	0,71	NS	NS	NS
FDN										
a (%)	7,56	8,64	9,53	8,02	7,32	7,53	0,66	NS	NS	NS
b (%)	65,50	68,58	68,55	68,26	66,08	65,26	1,47	NS	NS	NS
c (h ⁻¹)	0,029	0,032	0,037	0,031	0,029	0,024	0,003	NS	0,0604 ^L	NS
DR (%)	40,25	43,55	47,82	45,20	41,73	32,84	2,88	NS	0,0324 ^L	NS
DP (%)	74,08	77,88	78,61	77,62	76,62	71,09	1,27	NS	0,0671 ^L	NS
Ind (%)	25,91	22,12	21,39	22,38	23,38	28,91	1,27	NS	0,0671 ^L	NS
PB										
a (%)	5,36	3,88	3,81	4,14	4,30	6,24	0,53	0,0704	0,0415 ^L	NS
b (%)	80,79	84,55	89,95	82,95	80,18	78,50	1,49	0,0864	0,0068 ^L	NS
c (h ⁻¹)	0,030	0,035	0,039	0,036	0,031	0,023	0,002	NS	0,0454 ^L	NS
DR (%)	45,60	49,57	54,64	51,90	44,65	39,15	3,14	NS	0,0285 ^L	NS
DP (%)	86,07	88,66	92,85	88,11	84,48	84,04	1,42	NS	0,0206 ^L	NS
Ind (%)	13,93	11,33	7,15	11,89	15,52	15,97	1,42	NS	0,0206 ^L	NS

EPM: Erro padrão da média; G*N: Interação entre Genética e Nível; a: Interseção da curva no tempo zero, fração rapidamente solúvel; b: Fração potencialmente degradável (Fração degradada no tempo); c: Taxa de degradação da fração potencialmente degradável; DR: Degradabilidade Real; DP: Degradabilidade Potencial (a+b); Ind: Porção não degradada (100-DP).

Fonte: Perna Junior (2018).

Com relação à cinética ruminal, a Kt e a Kd foram reduzidas linearmente ($P < 0,05$) com o aumento dos níveis de taninos, no entanto a Kp não foi alterada para ambos os grupos genéticos de bovinos avaliados (Tabela 8).

Tabela 8. Cinética ruminal de dois grupos distintos de bovinos alimentados com diferentes níveis de inclusão de taninos de *Acacia mearnsii*

Variáveis	Genética (G)		Nível (N)				EPM	Probabilidade		
	Taurino	Zebuino	0%	0,5%	1%	1,5%		G	N	G*N
Kt (%/h)	6,83	6,90	7,43	7,00	6,64	6,37	0,20	NS	0,0066 ^L	NS
Kd (%/h)	4,04	4,57	4,80	4,65	3,99	3,76	0,20	NS	0,0100 ^L	NS
Kp (%/h)	2,83	2,42	2,89	2,36	2,66	2,58	0,27	NS	NS	NS

EPM: Erro padrão da média; G*N: Interação entre Grupo e Nível; Kt: Taxa de desaparecimento da massa sólida no rúmen; Kd: Taxa de degradação da fração potencialmente degradável no rúmen; Kp: Taxa de passagem de resíduos não digeridos através do trato digestório.

Fonte: Perna Junior (2018).

3.3.4 Proteína microbiana ruminal e balanço de nitrogênio

Não foi observada diferença ($P>0,05$) entre as genéticas, nem efeito do aditivo sobre a excreção de compostos urinários e a eficiência microbiana (Tabela 9). No entanto, houve redução linear ($P<0,05$) na síntese de N microbiano.

Tabela 9. Excreção de compostos urinários, síntese de nitrogênio microbiano e eficiência da síntese de proteína microbiana ruminal de dois grupos distintos de bovinos alimentados com diferentes níveis de inclusão de taninos de *Acacia mearnsii*

Variáveis, dia	Grupo (G)		Nível (N)				EPM	Probabilidade		
	Taurino	Zebuíno	0%	0,5%	1%	1,5%		G	N	G*N
Volume urinário										
L	14,7	10,7	14,3	10,6	12,2	13,2	0,72	0,0383	0,0532 ^Q	NS
L/kg PV ^{0.75}	0,095	0,105	0,110	0,088	0,096	0,104	0,0042	NS	NS	NS
Compostos urinários										
Uréia, mg/kg PV ^{0.75}	2,11	1,94	2,48	2,09	1,70	1,84	0,13	NS	0,0535	NS
Al, mmol/kg PV ^{0.75}	1,15	1,17	1,21	1,19	1,17	1,08	0,29	NS	NS	NS
AU, mmol/kg PV ^{0.75}	0,171	0,179	0,177	0,184	0,177	0,161	0,007	NS	NS	NS
DP, mmol/kg PV ^{0.75}	1,32	1,35	1,39	1,38	1,35	1,24	0,034	NS	NS	NS
Al (%) DP	87,09	86,91	87,30	86,64	86,88	87,19	0,39	NS	NS	NS
Síntese de Nmic										
mg/kg PV ^{0.75}	803	828	857	847	824	734	28,9	NS	0,0374 ^L	NS
Eficiência microbiana, kg PV ^{0.75}										
g Nmic/kg MO	15,9	16,9	18,4	15,7	16,1	15,8	0,84	NS	NS	NS

EPM: Erro padrão da média; G*N: Interação entre Grupo e Nível; Al: Alantoína; AU: Ácido Úrico; DP: Derivados de Purinas; Al (%) DP: Porcentagem de Alantoína dos Derivados de Purinas; Nmic: Nitrogênio microbiano.

Fonte: Perna Junior (2018).

Para a síntese de N microbiano (mg N/kg PV^{0,75}) foi utilizado o método de regressão linear com platô (Broken-line) que descreve o processo biológico em duas fases, uma fase crescente ou decrescente e outra fase de estabilidade (platô). Com o uso deste método assumiu-se uma equação linear de resposta ao incremento do nível de taninos a partir de um ponto em que o animal passou a apresentar resposta. O ponto entre a equação linear e o platô representa o nível ótimo do aditivo (Joint point), demonstrado pela equação: $Nmic = 1003,5 - 179,5 \times \text{Nível}$; Joint point no Nível = 0,85%; Platô no Nível = 851,6 mg/kg PV^{0,75}; $R^2 = 0,1344$; $P = 0,0374$. Portanto, pode-se determinar que níveis a partir de 0,85% de adição de taninos começam a reduzir a síntese de N microbiano.

A quantidade e o balanço de N excretado nas fezes aumentaram linearmente ($P<0,05$) com o aumento dos níveis de taninos. Efeito contrário foi encontrado para a quantidade e o balanço de excreção de N na urina, onde houve redução linear (Figura 2). No entanto, não houve aumento na retenção de N (Tabela 10).

Tabela 10. Balanço de nitrogênio de dois grupos distintos de bovinos alimentados com diferentes níveis de inclusão de taninos de *Acacia mearnsii*

Variáveis	Grupo (G)		Nível (N)				EPM	Probabilidade		
	Taurino	Zebuino	0%	0,5%	1%	1,5%		G	N	G*N
N ing., g/kg PV ^{0,75}	2,18	1,94	2,07	2,09	2,06	2,01	0,45	0,0974	NS	NS
N excretado, g/kg PV ^{0,75}										
Fezes	0,75	0,82	0,63	0,64	0,88	0,94	0,049	NS	0,0076 ^L	NS
Urina	0,98	0,92	1,15	0,97	0,84	0,82	0,063	NS	0,0285 ^L	NS
N retido, g/kg PV ^{0,75}	0,49	0,28	0,45	0,54	0,39	0,21	0,064	NS	NS	NS
N balanço, % do N ing										
Fezes	34,4	42,3	30,4	30,6	42,7	46,8	1,93	0,0723	0,0033 ^L	NS
Urina	44,9	47,4	55,6	46,4	40,8	40,8	2,76	NS	0,0468 ^L	NS
Retido	20,6	10,3	14,0	22,9	16,5	12,4	2,94	NS	NS	NS

EPM: Erro padrão da média; G*N: Interação entre Grupo e Nível; N ing.: N ingerido; N retido: N ingerido – N excretado (fezes + urina).

Fonte: Perna Junior (2018).

Figura 2 – Redirecionamento da excreção de N da urina para as fezes de bovinos, canulados no rúmen, alimentados com diferentes níveis de inclusão de taninos de *Acacia mearnsii*

Fonte: Perna Junior (2018).

3.4 DISCUSSÃO

Substâncias aleloquímicas, nas quais se enquadram os taninos, são capazes de gerar efeito negativo sobre processos bioquímicos essenciais, crescimento, sobrevivência ou comportamento seletivo dos animais (LAUNCHBAUGH, 1996). A adstringência ou a

capacidade de ligação à proteína dos TC de *Acacia mearnsii* é maior do que os TC em espécies forrageiras temperadas e segundo Waghorn (2008) doses de até 4% de TC na MS não prejudicam a produção animal. No entanto, Grainger et al. (2009), usando extrato de taninos de *A. mearnsii* nas doses de 0,9 e 1,8% para vacas Holandesas em lactação, relataram uma redução de 5,0 e 8,5% no CMS, respectivamente, e na produção de leite. Já Orlandi et al. (2015), usando extrato de taninos de *A. mearnsii* para novilhos Holandeses não encontraram redução de consumo com doses de 2,7%. A utilização de taninos em dosagens baixas pode ser interessante para a melhora da eficiência animal, assim como demonstrado por Rivera-Méndez et al. (2017). Estes autores, avaliando o desempenho de novilhos Holandeses alimentados com dietas contendo 0,6% de TH e/ou TC, não encontraram diferenças entre os tipos de taninos utilizados, mas a simples inclusão de taninos melhorou o desempenho animal quando comparado ao tratamento controle. Devido aos níveis utilizados (baixo a moderado), o presente experimento não apresentou redução no consumo de MS e água, fato este intencional na tentativa de escapar do efeito adstringente dos taninos, o qual poderia comprometer o desempenho animal.

Avaliando o comportamento ingestivo apresentado na Tabela 3, constatou-se que os taurinos apresentaram maior número de eventos de ruminação e mastigação, mas sem aumentar, no entanto, o tempo total ruminando ou mastigando. Este efeito pode ser considerado positivo uma vez que o processo de ruminação e/ou mastigação é associado à produção de saliva, o que auxilia na manutenção do pH ruminal. Adicionalmente, o aumento dos níveis de taninos promoveu efeito, independente dos grupos genéticos, de aumentar o número de eventos de ruminação, o que nitidamente se deve ao efeito adstringente dos TC de *A. mearnsii* (formação de compostos insolúveis), levando-nos a supor que essas mudanças de comportamento ingestivo são fatores que conduzem o animal a desenvolver a habilidade de se adaptar a esses tipos de compostos, através de alterações dos padrões de comportamento e/ou dos mecanismos metabólicos.

Os efeitos negativos dos taninos sobre a digestão ruminal da fibra pode estar relacionada com um decréscimo no número de bactérias celulolíticas (McSWEENEY et al., 2001), formação de complexos de tanino-celulose, que são resistentes à digestão enzimática (MAKKAR et al., 1995) e/ou deficiência na adesão de microrganismos fibrolíticos ao substrato (BENTO et al., 2005). Carulla et al. (2005) suplementando TC de *A. mearnsii* (2,5% do CMS) para ovinos, encontraram redução de 5,1 e 8,3% para a digestibilidade da FDN e FDA, respectivamente. Esses fatos foram constatados no presente experimento, com redução linear da digestibilidade aparente total da FDN e FDA (Tabela 5).

Apesar das variações encontradas sobre o comportamento ingestivo, a redução linear da digestibilidade da fração fibrosa e da PB, redução linear da degradabilidade da PB (provavelmente pela formação do complexo tanino-proteína), além das reduções lineares da taxa de desaparecimento e degradação ruminal, as doses de taninos utilizadas no presente estudo não foram capazes de promover alterações na taxa de passagem do alimento pelo rúmen (Tabela 8), ou seja, as doses de taninos promoveram um novo equilíbrio no metabolismo ruminal com uma maior permanência dos alimentos no rúmen, compensando a redução da digestão, sem contudo afetar o consumo alimentar e o fluxo da digesta pelo trato gastrointestinal. Mezzomo et al. (2011), utilizando 0,45% de taninos de quebracho (76% de TC da MS) também não observaram alteração na taxa de passagem de MS em bovinos com uma dieta composta por 13% de forragem e 87% de concentrados. Al-Kindi et al. 2017, ao alimentar até 4% de extrato de quebracho para cabras também não observaram alterações na cinética de passagem da digesta, mas reduziu a digestibilidade aparente da PB sem afetar a concentração de N fecal. Já Silanikove et al. (2001), avaliando os efeitos dos taninos das folhas de alfarroba (*Ceratonia siliqua* L., 0,7% TC da MS) sobre a cinética ruminal de cabras, relataram um atraso na passagem de material líquido e particulado devido à interação entre taninos e enzimas digestivas, bem como o revestimento epitelial, levando a um declínio na eficiência digestiva e na absorção de nutrientes digeridos. Nunez-Hernandez et al. 1991 alimentando ovelhas com até 50% de folhas de mogno da montanha (*Cercocarpus montanus* Raf., 11,2% TC da MS) reduziram o volume de líquido ruminal sem alterar a taxa de diluição do fluido, a taxa de fluxo externo e o tempo de renovação do líquido. As inconsistências nesses resultados demonstram o fato bem conhecido de que diferentes tipos de TC apresentam efeitos muito diferentes sobre a digestão de nutrientes, bem como a passagem de digesta (MAKKAR, 2003a; MUELLER-HARVEY, 2006).

A proteína microbiana sintetizada no rúmen constitui uma porção considerável do fluxo duodenal de nitrogênio aminoacídico nos ruminantes, podendo representar entre 40 e 90% dos aminoácidos que chegam ao intestino delgado (SNIFFEN; ROBINSON, 1987). Isto denota a importância do estudo dos mecanismos de síntese protéica microbiana e dos fatores a eles relacionados (NOCEK; RUSSEL, 1988). Um grande atrativo ao uso de taninos se deve ao fato de terem o potencial de reduzir a degradação da proteína no rúmen, deixando-a disponível após a passagem pelo rúmen, com consequente redirecionamento da excreção de N da urina para as fezes, além do aumento da síntese de proteína microbiana (MAKKAR, 2003a) com a sincronização do uso dos nutrientes. Entretanto, no presente estudo constatamos efeito contrário para a síntese microbiana, com redução linear a partir de 0,85% de inclusão de

taninos na dieta; possivelmente devido à redução da digestibilidade de vários nutrientes, principalmente com a redução linear da digestibilidade aparente total da MO (Tabela 5), o que levou a manutenção da eficiência microbiana em relação a MO degradada.

Os TC têm demonstrado diminuir os níveis de proteína solúvel e N-NH₃ ruminal (BARRY; MANLEY, 1986; McMAHON et al., 2000), promovendo maior retenção de N através da redução da excreção de ureia (EGAN; ULYATT 1980) e aumento da reciclagem de ureia para o rúmen (WAGHORN et al., 1994). No presente experimento, os taninos demonstraram tendência em reduzir linearmente a excreção de ureia na urina ($P = 0,0535$), sem, entretanto, modificar a eficiência microbiana (Tabela 9). A mudança de excreção de N da urina para as fezes é um efeito amplamente conhecido pela ação dos taninos (MAKKAR, 2003b; THEODORIDOU et al., 2010). Este fato foi confirmado no presente experimento (Figura 2), uma vez que houve redução linear da degradação da PB no rúmen, com consequente aumento da oferta de proteína não degradada no rúmen (PNDR) para o duodeno, levando a redução das perdas de N através da urina, no entanto sem causar aumento da retenção de N. Carulla et al. (2005), Grainger et al. (2009) e Orlandi et al. (2015), utilizando extrato de taninos de *A. mearnsii* também demonstraram este efeito. Além disso, esta mudança na excreção de N é considerada positiva do ponto de vista ambiental, pois o N das fezes é menos volátil em comparação ao N urinário (CASTILLO et al., 2001), resultando em menores emissões de amônia e óxido nitroso oriundo dos dejetos (DIJKSTRA et al., 2013).

3.5 CONCLUSÃO

A utilização de extrato de *Acácia mearnsii* até níveis de 1,5% da MS da dieta demonstrou ser uma opção segura como aditivo alimentar para bovinos de grupos genéticos distintos, pois apesar de causar redução linear da digestibilidade dos nutrientes e da síntese microbiana, não alterou a retenção de N nem a eficiência microbiana. O aumento dos níveis de taninos promoveu o aumento do número de eventos de ruminação, provavelmente pelo seu efeito adstringente, sem contudo afetar a taxa de passagem da digesta pelo rúmen. Em geral, níveis de taninos entre 0,5 e 1,0% do CMS demonstraram ser indicativos de início de mudanças para a maioria das características estudadas, cabendo uma avaliação mais criteriosa dos seus efeitos adversos em termos nutricionais sobre a produtividade animal. Adicionalmente, sugere-se considerar a questão ambiental, pois o direcionamento do N da urina para as fezes pode promover redução da formação de óxido nitroso, um potente gás causador do efeito estufa.

REFERÊNCIAS

- AHMED, M.; KHIRSTOVA, P.; ICHO, G. Comparative study of tannins of *Acacia nilotica* an indigenous tanning material in Sudan with *Acacia mearnsii*. **Suranaree Journal of Science and Technology**, v. 12, p. 259-265, 2005.
- AL-KINDI, A.; SCHIBORRA, A.; BUERKERT, A.; SCHLECHT, E. Effects of quebracho tannin extract and activated charcoal on nutrient digestibility, digesta passage and faeces composition in goats. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 101, p. 576–588, 2017. doi:10.1111/jpn.12461
- AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15 ed., Washington, DC, USA, 1990.
- AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16 ed., Virginia, USA, 1995.
- AOCS. AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY. **Official method Am 5-04, Rapid determination of oil/fat utilizing high temperature solvent extraction**. 5 ed., The American Oil Chemists Society, Urbana, IL, USA, 2005.
- BARRY, T. N.; MANLEY, T. R. Interrelationships between the concentrations of total condensed tannin, free condensed tannin and lignin in Lotus sp. and other possible consequences in ruminants nutrition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 37, p. 248-254, 1986.
- BENCHAAAR, C.; WANG, Y.; CHAVES, A. V.; McALLISTER, T. A.; BEAUCHEMIN, K. A. **Use of plant extracts in ruminant nutrition**. In: ACHARYA, S. N.; THOMAS, J. E. (Ed.). *Advanced in Medicinal Plant Research*, Research Signpost, Kerala, India. 2007. p. 465–489.
- BENTO, B. H. L.; ACAMOVIC, T.; MAKKAR, H. P. S. The influence of tannin, pectin, and polyethylene glycol on attachment of ¹⁵N–labelled rumen microorganisms to cellulose, **Animal Feed Science and Technology**, v. 122, p. 41–57, 2005.
- BOSCH, M. W.; BRUINING, M. Passage rate and total clearance rate from the rumen of cows fed on grass silages differing in cell-wall content. **British Journal of Nutrition**, v. 73, p. 41–49, 1995.
- CARULLA, J. E.; KREUZER, M.; MACHMÜLLER, A.; HESS, H. D. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 56, n. 9, p. 961–970, 2005.
- CASTILLO, A. R.; KEBREAB, E.; BEEVER, D. E.; BARBI, J. H.; SUTTON, J. D.; KIRBY, H. C.; FRANCE, J. The effect of protein supplementation on nitrogen utilization in lactating dairy cows fed grass silage diets. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 247–253, 2001.
- CHEN, X. B.; GOMES, M. J. **Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives - an overview of technical details**. International Feed Research Unit: Aberdeen, United Kingdom, 1992. 21p. (Occasional Publication).
- CHIZZOTTI, M. L.; VALADARES FILHO, S. C.; VALADARES, R. F. D. et al. Excreção de creatinina em novilhas e novilhas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41, 2004, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande, 2004. (CD-ROM).
- CIESLAK, A.; SZUMACHER-STRABEL, M.; STOCHMAL, A.; OLESZEK, W. Plant components with specific activities against rumen methanogens. **Animal**, v.7, s. 2, p. 253-265, 2013.

- DADO, R. G.; ALLEN, M. S. Intake limitations, feeding behaviour, and rumen function of cows challenged with rumen fill from dietary fiber or inert bulk. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 118–133, 1995.
- DIJKSTRA, J.; OENEMA, O.; VAN GROENIGEN, J. W.; SPEK, J. W.; VAN VUUREN, A. M.; BANNINK, A. Diet effects on urine composition of cattle and N₂O emissions. **Animal**, v. 7, p. 292–302, 2013.
- EGAN, A. R.; ULYATT, M. J. Quantitative digestion of fresh herbage by sheep. 6. Utilisation of nitrogen in five herbages. **Journal Agricultural Science**, v. 94, p. 47–56, 1980.
- FRUTOS, P.; HERVÁS, G.; GIRÁLDEZ, F. J.; MANTECÓN, A. R. Review. Tannins and ruminant nutrition. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 2, n. 2, p. 191–202, 2004
- GRAINGER, C.; CLARKE, T.; AULDIST, M. J.; BEAUCHEMIN, K. A.; MCGINN, S. M.; WAGHORN, G. C.; ECKARD, R. J. Potencial use of *Acacia mearnsii* condensed tannins to reduce methane emissions and nitrogen excretion from grazing dairy cows. **Canadian Journal Animal Science**, v. 89, p. 241–251, 2009.
- HEGARTY, R. S. Genotype differences and their impact on digestive tract function of ruminants: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 44, p. 459–467, 2004.
- HUNGATE, R. E.; PHILLIPS, G. D.; HUNGATE, D. P.; MCGREGOR, A. A comparison of the rumen fermentation in European and zebu cattle. **Journal Agricultural Science**, v. 54, p. 196–201, 1960.
- JOHNSON, K. A.; JOHNSON, D. E. Methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 8, p. 2483–2492, 1995.
- LAUNCHBAUCH, K. L. **Biochemical aspects of grazing behaviour**. In: HODGSON, J.; ILLIUS, A. W. (Ed). The ecology and management of grazing systems. Wallingford: Cabi Publishing, 1996. p. 159–184.
- MAEKAWA, M.; BEAUCHEMIN, K. A.; CHRISTENSEN, D. A. Effect of concentrate level and feeding management on chewing activities, saliva production, and ruminal pH of lactating dairy cows. **Journal Dairy Science**, Savoy, v. 85, n. 5, p. 1165–1175, 2002.
- MAKKAR, H. P. S.; BLÜMMEL, M.; BOROWY, N. K.; BECKER, K. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. **Journal of Food Science and Technology**, v. 61, p. 161–165, 1993.
- MAKKAR, H. P. S.; BLÜMMEL, M.; BECKER, K. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycol and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in *in vitro* techniques. **British Journal of Nutrition**, n. 73, p. 897–913, 1995.
- 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, 2003a.
- MAKKAR, H. P. S. **Quantification of tannins in tree and shrub foliage: a laboratory manual**. Springer, Netherlands, 2003b
- McMAHON, L. R.; McALLISTER, T. A.; BERG, B. P.; MAJAK, W.; ACHARYA, S. N.; POPP, J. D.; COULMAN, B. E.; WANG, Y.; CHENG, K. J. A review of the effects of forage condensed tannins on ruminal fermentation and bloat in grazing cattle. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 80, p. 469–485, 2000.

- MEZZOMO, R.; PAULINO, P. V. R.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S. C.; PAULINO, M. F.; MONNERAT, J. P. I. S.; DUARTE, M. S.; SILVA, L. H. P.; MOURA, L. S. Influence of condensed tannin on intake, digestibility, and efficiency of protein utilization in beef steers fed high concentrate diet. **Livestock Science**, v. 141, p. 1–11, 2011.
- MEHREZ, A. Z.; ØRSKOV, E. R. A study of the artificial bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. **Journal of Agricultural Science**, v. 88, n.3, p. 645-650, 1977.
- McSWEENEY, C. S.; PALMER, B.; McNEILL, D. M.; KRAUSE, D. O. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, p. 83-93, 2001.
- MUELLER-HARVEY, I. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. 86, p. 2010-2037, 2006.
- MYERS, W. D.; LUDDEN, P. A.; NAYIGIHUGU, V.; HESS, B. W. Technical Note: A procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 179-183, 2004.
- NOCEK, J. E. In situ and other methods to estimate ruminal digestion and energy digestibility: A review. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 8, p. 2051-2069, 1988.
- NUNEZ-HERNANDEZ, G.; WALLACE, J. D.; HOLECHEK, J. L.; GALYEAN, M. L.; CARDENAS, M. Condensed tannins and nutrient utilization by lambs and goats fed low-quality diets. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 1167–1177, 1991.
- NOCEK, J. E., RUSSELL, J. B. Proteins and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 8, p. 2070-2107, 1988.
- NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7.ed. Washington D.C. National Academies Press, USA, 2001. 381 p.
- ORLANDI, T.; KOZLOSKI, G. V.; ALVES, T. P.; MESQUITA, F. R.; ÁVILA, S. C. Digestibility, ruminal fermentation and duodenal flux of amino acids in steers fed grass forage plus concentrate containing increasing levels of *Acacia mearnsii* tannin extract. **Animal Feed Science and Technology**, v. 210, p. 37–45, 2015.
- ØRSKOV, E. R.; McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agricultural Science**, v.92, p.499-503, 1979.
- ØRSKOV, E. R.; HOVELL, F. D. Deb; MOULD, F. Uso de la tecnica de la bolsa de nylon para la evaluacion de los alimentos. **Producción Animal Tropical**, n.5, p.213, 1980.
- PHILLIPS, G. D.; HUNGATE, R. E.; MCGREGOR, A.; HUNGATE, D. P. Experiments on rumen retention time, fermentation rate and dry-matter digestibility in zebu and European-type cattle on a grass hay ration. **Journal of Agricultural Science**, v. 54, P. 417-420, 1960.
- RIVERA-MÉNDEZ, C.; PLASCENCIA, A.; TORRENTERA, N.; ZINN, R. A. Effect of level and source of supplemental tannin on growth performance of steers during the late finishing phase. **Journal of Applied Animal Research**, v. 45, n. 1, p. 199-203, 2017. doi: 10.1080/09712119.2016.1141776

- ROBINSON, P. H.; TAMMINGA, S.; VAN VUUREN, A. M. Influence of declining level of feed intake and varying the proportion of starch in the concentrate on rumen ingesta quantity, composition and kinetics of ingesta turnover in dairy cows. **Livestock Production Science**, v. 17, p. 37–62, 1987.
- SAS. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS/STAT-User's guide**. 9.3. Cary, NC, USA: SAS Inst, Inc, 2013.
- SILANIKOVE, N.; GILBOA, N.; NITSAN, Z. Technical note: effect of polyethylene glycol on rumen volume and retention time of liquid and particulate matter along the digestive tract in goats fed tannin-rich carob leaves (*Ceratonia siliqua*). **Small Ruminant Research**, v. 40, p. 95–99, 2001.
- SNIFFEN, C. J.; ROBINSON, P. H. Microbial growth and flow as influenced by dietary manipulations. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 425–441, 1987.
- THEODORIDOU, K.; AUFRÈRE, J.; ANDUEZA, D.; POURRAT, J.; Le MORVAN, A.; STRINGANO, E.; MUELLER-HARVEY, I.; BAUMONT, R. Effects of condensed tannins in fresh sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on *in vivo* and *in situ* digestion in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v. 160, p. 23–38, 2010.
- TITGEMEYER, E. C.; ARMENDARIZ, C. K.; BINDEL, D. J.; GREENWOOD, R. H.; LOEST, C. A. Evaluation of titanium dioxide as a digestibility marker for cattle. **Journal of Animal Science**, v. 79, n.4, p. 1059–1063, 2001.
- VALADARES, R. F. D.; BRODERICK, G. A.; VALADARES FILHO, S. C.; CLAYTON, M. K. Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2686–2696, 1999.
- VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2^a.ed. Cornell University Press, Ithaca, NY, USA, 1994. 476 p.
- VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3583, 1991.
- VERBIC, J.; CHEN, X. B.; MACLEOD, N. A. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. **Journal of Agricultural Science**, v. 114, n.3, p. 243–248, 1990.
- WAGHORN, G. C.; SHELTON, I. D.; McNABB, W. C.; McCUTHEON, S. N. Effects of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on its nutritive value for sheep. 2. Nitrogenous aspects. **Journal of Agricultural Science**, v. 123, p. 109–119, 1994.
- WAGHORN, G. C. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production—progress and challenges. **Animal Feed Science and Technology**, v. 147, p. 116–139, 2008.
- WANG, L. A.; GOONEWARDENE, Z. The use of MIXED models in the analysis of animal experiments with repeated measures data. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 84, p. 1–11, 2004.

4 MUDANÇAS DA FERMENTAÇÃO RUMINAL E FRACIONAMENTO DA ENERGIA DE GRUPOS DISTINTOS DE BOVINOS ALIMENTADOS COM TANINOS DE *Acacia mearnsii*

Resumo: A utilização de taninos como aditivo alimentar para ruminantes vem sendo estudada devido ao seu potencial em modular a fermentação ruminal e melhorar a utilização de nutrientes. O objetivo do presente experimento foi avaliar o uso de diferentes níveis de um extrato de taninos de *Acacia mearnsii* sobre os parâmetros da fermentação ruminal e o fracionamento da energia como estratégia nutricional na alimentação de dois grupos distintos de bovinos, visando a mitigação de CH₄ ruminal como forma de redução de perda energética. O delineamento experimental utilizado foi composto por dois quadrados latinos 4x4 (4 períodos de 28 dias cada), em arranjo fatorial 2x4, sendo testados dois grupos distintos de bovinos (taurinos e zebuínos) e quatro níveis de inclusão de taninos (extrato comercial de *Acacia mearnsii*, contendo 82,3% de taninos totais - equivalente em ácido tânico e 32,3% de taninos condensados - equivalente em leucocianidina) na dieta (0; 0,5; 1,0 e 1,5% da MS da dieta). Utilizou-se uma dieta basal experimental sendo as doses de taninos ajustadas diariamente em função do consumo de MS (CMS). A utilização do aditivo até 1,5% da MS da dieta promoveu redução do pH ruminal em taurinos, reduziu a quantidade de protozoários *entodiniomorphos* em zebuínos, manteve o equilíbrio entre a síntese e consumo de N-NH₃ ruminal e reduziu a produção de CH₄ entérico sem reduzir a produção de AGCC. Entretanto, não houve melhora na eficiência energética dos produtos da fermentação ruminal. Todos estes fatos são de grande relevância, demonstrando que os taninos interferem diretamente sobre as *archeas* metanogênicas, contribuindo para a redução das emissões de CH₄ e consequentemente de GEE. Já com relação ao particionamento da energia, os taninos provocaram redução da energia liberada no intestino e aumento da energia liberada nas fezes. Portanto, o uso deste aditivo em dosagens de 0,72 a 1,5% se mostrou uma interessante opção para a modulação da fermentação ruminal de distintos grupos de bovinos.

Palavras chave: Aditivo alimentar. Energia. Metano. Protozoários. *in vivo*

4.1 INTRODUÇÃO

Pesquisas sobre a mitigação de CH₄ produzido por ruminantes têm recebido bastante atenção. Estratégias nutricionais, como o uso de ionóforos, glicerol, taninos, saponinas, óleos funcionais, lipídeos, nitrato de cálcio, vacinas, anticorpos policlonais, técnicas de manejo de pastagens, melhoramento genético e sistemas eficientes de produção, têm sido utilizadas para manipular a fermentação ruminal e reduzir a emissão do CH₄ entérico (MOHAMMED et al., 2004; BERNDT, 2010). Embora algumas estratégias alimentares tenham sido propostas para diminuir a emissão de CH₄ provenientes de ruminantes, poucas têm mostrado diminuição persistente, principalmente *in vivo*.

Como alternativa ao uso de medicamentos para manipulação da fermentação ruminal pesquisadores tem intensificado o estudo de aditivos alimentares naturais para ruminantes, como os taninos (MAKKAR et al., 1995; WOODWARD et al., 2001; CARULLA et al., 2005; PERNA JUNIOR et al., 2017). Os taninos estão presentes em muitas espécies de plantas e são substâncias fenólicas heterogêneas de alto peso molecular com a capacidade para formar complexos reversíveis e irreversíveis com proteínas (principalmente), polissacárideos (celulose, hemicelulose, pectina, etc.), alcaloides, ácidos nucleicos e minerais (McLEOD, 1974; MUELLER-HARVEY; McALLAN, 1992; SCHOFIELD et al., 2001), sendo classificados em taninos hidrolisáveis (TH) e condensados (TC), tendo ambos efeitos indesejáveis e desejáveis, dependendo da sua concentração, fonte e outros fatores como a espécie animal, o estado fisiológico do animal e a composição da dieta (MAKKAR, 2003a).

O alcance da mitigação da produção de CH₄ pelos taninos é bastante amplo, variando de 2 a 58% em comparação aos grupos controles testados (PATRA; SAXENA, 2010; BODAS et al., 2012). De acordo com Goel e Makkar (2012) a suplementação com taninos pode reduzir a produção de CH₄ ruminal, no entanto, Jayanegara et al. (2012) demonstraram através de uma meta-análise que os efeitos da suplementação de baixos níveis de taninos sobre o CH₄ ruminal eram inconsistentes, com maior mitigação observada em dietas à base de forragem (WOODWARD et al., 2004; PUCHALA et al., 2005; MIN et al., 2006). Rivera-Méndez et al. (2017), trabalhando com novilhos holandeses confinados que receberam dietas contendo baixa quantidade de extrato de TH e/ou TC (0,6% de MS) não apresentaram diferenças na fonte de taninos sobre o crescimento e ingestão de MS, mas a inclusão de taninos ou a sua combinação melhorou o desempenho animal em comparação ao tratamento controle.

Assim como demonstrado em revisão de Cieslak et al. (2013), existem informações científicas limitadas sobre o uso de componentes de plantas, como os taninos, em experimentos *in vivo*, sendo que nem sempre os resultados em curto período de tempo conseguidos *in vitro* representam a realidade a longo prazo, por exemplo, devido a possível ocorrência do efeito de adaptação microbiana ao aditivo. Staerfl et al. (2012), utilizando extrato de taninos de *Acacia mearnsii* para bovinos de corte, na dosagem de 3,0% do CMS, relataram que o uso do aditivo é eficaz por longos períodos para mitigar a formação de CH₄ entérico. Sabe-se que existem diferenças entre zebuínos e taurinos quanto ao aproveitamento dos nutrientes e desempenho zootécnico (LEDGER et al., 1970; FRISCH; VERCOE, 1977; VALADARES FILHO et al.; 1985), no entanto, poucos estudos relacionam a eficiência alimentar à metanogênese de bovinos oriundos de diferentes grupos. Assim, torna-se cada vez mais importante o estabelecimento de dosagens ótimas para garantir o real efeito destes componentes em processos fermentativos. Diante deste contexto, é possível que haja diferenças entre animais com aptidões diferentes (leite ou carne) para as respostas observadas ao uso dos taninos na dieta.

A hipótese do presente trabalho é que a adição de taninos na dieta reduza a produção de CH₄, melhorando o aproveitamento energético animal, sendo a magnitude deste efeito influenciada pelas características dos animais, como genética, aptidão, peso e outros. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o uso de diferentes níveis de um extrato de taninos de *Acacia mearnsii* como estratégia nutricional na alimentação de dois grupos distintos de bovinos, visando a mitigação de CH₄ ruminal com vistas a redução de perda energética.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Local e questão ética

O manejo dos animais seguiu as diretrizes estabelecidas de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob o protocolo nº 3222290414. O estudo foi realizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Brasil, Campus Fernando Costa, Pirassununga.

4.2.2 Animais, instalações e alimentação

Foram utilizadas oito vacas secas, canuladas no rúmen, sendo quatro da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*), com peso vivo médio de 775 ($\pm$ 55) kg e quatro da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), com peso vivo médio de 434 ($\pm$ 47) kg. Optou-se pela escolha desses dois grupos bem distintos por serem expressivos representantes dos sistemas de produção de leite (taurinos) e de carne mundial (zebuínos), ou pelo menos no Brasil. Os animais foram mantidos em galpão coberto, em baias individuais com cama de areia, ventilação, cochos de cimento e bebedouros automáticos. Os alimentos foram oferecidos *ad libitum* (pelo menos 10% de sobras), duas vezes ao dia, às 8:00 e 16:00 h, na forma de ração completa com uma proporção de volumoso:concentrados de 50:50. Silagem de milho foi utilizada como volumoso e os concentrados foram constituídos por milho grão moído, farelo de soja, sal branco, suplemento mineral e aditivo alimentar, os quais foram misturados respeitando os níveis de inclusão para cada tratamento (Tabela 1). A dieta basal foi formulada no programa Spartan Dairy Ration Evaluator/Balanacer, versão 3.0.3 e avaliada segundo o NRC (2001), de modo a atender as exigências dos dois grupos de animais.

Como as dietas com pouca fibra estão associadas a menores emissões de CH₄ (JOHNSON; JOHNSON, 1995), optou-se pela utilização de dieta com 50% de forragem com a intenção de não reduzir a produção de CH₄ entérico, o que ajudaria a não ocultar o efeito do aditivo utilizado. Amostras de alimentos de cada animal foram coletadas diariamente (7:00 h), durante os últimos 5 dias de cada período experimental, sendo congeladas a - 20°C para determinação da composição bromatológica.

4.2.3 Delineamento experimental e tratamentos

Utilizou-se dois quadrados latinos 4x4, em arranjo fatorial 2x4, sendo testados dois grupos genéticos distintos de bovinos (Taurinos ou Zebuínos) e quatro níveis de inclusão de taninos na dieta, totalizando 32 unidades experimentais. Uma dieta basal experimental foi suplementada com os seguintes níveis de taninos: 0%, sem taninos; 0,5% da MS; 1,0% da MS; 1,5% da MS; ajustados diariamente em função do consumo de MS (CMS) e misturados à dieta total antes de cada alimentação.

Foi utilizado como fonte de taninos um extrato comercial obtido de Acácia Negra - *Acacia mearnsii* (Seta Natur®, Rio Grande do Sul, Brasil). A concentração de fenóis totais (84,4% do extrato) foi determinada através do método de Folin-Ciocalteu (MAKKAR,

4.2.5 Consumo de matéria seca

O consumo de matéria seca (CMS) foi avaliado do 18° ao 22° dia de cada período experimental, após o período de adaptação dos animais à dieta, sendo calculado pela diferença entre a quantidade de alimento fornecida em um dia e a sobra de alimento, coletada e pesada na manhã seguinte ao oferecimento, multiplicada pela porcentagem de MS do alimento. Concomitantemente foi contabilizada a ingestão de água, por meio de hidrômetros instaladas em cada bebedouro, e foram realizadas coletas de fezes, manualmente via reto, duas vezes ao dia (8 e 16h), formando uma amostra composta para cada animal, sendo armazenadas a -20°C para determinação da energia bruta (EB). As amostras após secas em estufa com ventilação e renovação de ar constante a 55°C durante 72 horas (AOAC, 1995), foram moídas em moinho de facas, tipo willye, em peneiras de 1 mm e armazenadas em frascos devidamente fechados. A EB foi determinada pela oxidação completa das amostras em bomba calorimétrica adiabática (C5000 control, IKA®, Staufen, Alemanha).

4.2.6 Esvaziamento ruminal

Para determinação da massa ruminal toda a digesta foi removida manualmente através da cânula ruminal, de cada vaca, conforme descrito por Dado e Allen (1995). No 25° dia, o esvaziamento foi realizado às 11 h, ou seja, três horas após o fornecimento da dieta, quando o rúmen estava, teoricamente, repleto. O mesmo procedimento foi feito no 26° dia às 8 h, imediatamente antes do fornecimento da dieta, quando o rúmen estava, teoricamente, com seu menor volume. Durante a retirada do conteúdo ruminal, as fases líquida e sólida foram separadas com auxílio de peneira de 2mm e balde, pesadas, homogeneizadas e coletadas amostras de 1 kg de cada fase. Imediatamente depois, a digesta foi reconstituída e devolvida ao rúmen. A MS do conteúdo ruminal foi calculada com base no peso seco de cada amostra (55 ° C durante 72 h).

4.2.7 Mensuração contínua do pH ruminal

O pH ruminal foi mensurado continuamente no 23° dia de cada período experimental durante 24 h usando um data logger (modelo T7-1 LRCpH, Dascor®, Escondido, CA, EUA) (PENNER et al., 2006). O sistema é composto por uma probe de pH protegida por uma capsula e por um eletrôdo protegido por uma estrutura vazada, permitindo que o líquido ruminal percola-se livremente, mas impedia que o eletrôdo entrasse em contato com o epitélio

ruminal. Pesos foram anexados a cada probe para garantir que elas permanecessem no saco ventral do rúmen. O data logger foi programado para mensurar e registrar o pH ruminal a cada 10 minutos durante o período de medição. Cada eletrôdo foi calibrado usando soluções padrão de pH 4,0 e 7,0 no início e no final de cada sessão. Os dados de pH foram registrados como pH máximo, médio, mínimo, área da curva e a duração do tempo em que o pH esteve abaixo de 6,2, 6,0 e 5,8. O pH 5,8 indica o limiar de casos de acidose ruminal sub-aguda (PENNER et al., 2007), o pH 6,0 e 6,2 são limiares indicativos de condições ruminiais saudáveis (PENNER; BEAUCHEMIN, 2010). A área abaixo da curva foi calculada multiplicando-se o valor absoluto dos desvios em pH pelo tempo (min) gasto abaixo do limiar estabelecido para cada medida, e então dividido por 60, sendo expresso como unidade de pH $\times$ hora, de acordo com Moya et al. (2011).

4.2.8 Contagem de protozoários ruminiais

Para a contagem total e diferencial dos protozoários o conteúdo ruminal foi coletado manualmente, de três pontos distintos deste órgão, sendo 10 mL deste material armazenados em frasco contendo 20 mL de formaldeído a 18,5%. As coletas foram realizadas no 23º de cada período experimental nos tempos antes (0), 3, 6, 9 e 12 horas após alimentação matinal. Posteriormente 1 mL de cada amostra foi corada com 2 gotas de verde brilhante a 2%, deixando repousar por 4 horas. Em seguida, foram adicionados 9 mL de glicerol a 30% e homogeneizado, tornando a alíquota diluída 30 vezes. Com o auxílio de uma pipeta, a câmara de contagem foi preenchida com a amostra diluída, que, acoplada ao microscópio, 100 campos óticos foram contados através do retículo, com aumento de 100x. Os protozoários ruminiais ciliados foram divididos em duas subclasses: *Holotricha* (gênero *Isotricha*, *Dasytricha*, e subfamília *Diplodiniinae*) e *Entodiniomorpha* (*Entodinium*), sendo estes identificados e contados usando uma câmara de contagem Neubauer Enhanced Bright-Line (Hausser Scientific Partnership®, Horsham, PA, EUA) por microscopia óptica (Olympus CH-2®, Japão), conforme Dehority (1993).

4.2.9 Produtos da fermentação ruminal

As produções de AGCC, CH₄ e N-NH₃ foram determinadas através da técnica *ex situ* de fermentação ruminal (RODRIGUES et al., 2012; PERNA JUNIOR et al., 2017). O princípio da técnica consiste em deixar as amostras de conteúdo de rúmen dentro de frascos (micro-rúmen) incubadas em banho termostático (39°C), simulando as condições prevalentes

do rúmen (presença de microrganismos, ambiente anaeróbio, temperatura de 39 °C, saliva, pH fisiológico do rúmen).

Amostras de conteúdo ruminal foram coletadas no 23º dia de cada período experimental através da cânula ruminal às 0, 3, 6, 9 e 12 h após a alimentação matinal (8:00h). Neste dia os animais foram alimentados somente no período da manhã, sendo alimentados novamente após a última coleta. Aproximadamente 300 mL de líquido ruminal (com o uso de uma bomba de vácuo motorizada) e 300 g de conteúdo sólido (com o uso da mão) foram coletados, em cada tempo de amostragem, de três pontos diferentes do rúmen (porção cranial, medial e caudal do saco dorsal). As duas frações foram misturadas e homogeneizadas na proporção de 66% de fase líquida e 33% de fase sólida.

Para cada tempo, foram preparados quatro frascos (frascos de vidro transparente 49x89x20 mm, Frascolex, São Paulo, Brasil); dois frascos (representando 2 repetições) foram utilizados para incubação e outros dois (também representando 2 repetições) foram utilizados como brancos. As frações misturadas e homogeneizadas do rúmen (30 mL) foram pressionadas através de um funil em cada frasco de 50 mL de capacidade. Após, os frascos foram vedados com rolhas de borracha e selados com lacres de alumínio. Então foram lavados com CO₂ por meio de agulhas para entrada e saída, a fim de garantir um ambiente anaeróbio. Após 30 minutos de incubação para os frascos incubados e imediatamente após o enchimento dos frascos brancos, as fermentações foram inativadas sob pressão e temperatura durante 15 minutos (Figura 4).

As medições do volume total de CH₄ produzido nos frascos incubados e não incubados (branco) foram feitas com um transdutor de pressão (Datalogger Universal AG5000, Gênese SM®, Barueri, SP, Brasil) conectado a uma seringa com agulha. O volume de gás foi obtido tomando a soma entre o volume obtido no transdutor mais o espaço do head space. A determinação da concentração de CH₄ foi realizada por cromatografia gasosa (Trace 1300, Thermo Fisher Scientific®, Rodano, Milão, Itália), injetando-se 0,5 mL de gás de cada frasco em um ambiente com temperatura controlada (25 °C), de acordo com Kaminski et al. (2003).

O volume de líquido dentro dos frascos incubados e não incubados foi calculado como a diferença entre o peso dos frascos com amostras, após a secagem em estufa a 105°C com circulação forçada de ar durante 24h, e o peso antes da estufa. O teor de sólidos dos frascos foi obtido pela diferença de peso entre o frasco contendo a amostra após a secagem em estufa e o peso do frasco vazio (antes do enchimento com amostra de conteúdo ruminal). Para as análises de AGCC (acetato, propionato e butirato) uma fração do conteúdo ruminal de cada

frasco foi centrifugado a $2.000 \times g$ durante 20 min. Em seguida, foi retirada uma alíquota de 2,0 mL do sobrenadante e adicionados 0,4 mL de ácido fórmico, sendo congelados a -20°C para posterior análise, de acordo com Erwin et al. (1961). Os AGCC foram mensurados por cromatografia gasosa (Focus GC, Thermo Scientific®, Rodano, Milão, Itália) usando uma coluna de vidro com 1,22 m de comprimento e 0,63 cm de diâmetro, embalada com 80/120 Carbowax B-DA /4% (Supelco, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA).

Figura 4 – Representação diagramática da técnica de fermentação ruminal *ex situ*

Fonte: Perna Junior et al. (2017)

As quantificações das produções de CH_4 e AGCC foram obtidas subtraindo-se a produção nos frascos incubados dos frascos não incubados, através das seguintes fórmulas:

$$\text{Prod. CH}_4 = (\text{Conc. CH}_4 \times \text{Vol. Total Gás})_{T_{30}} - (\text{Conc. CH}_4 \times \text{Vol. Total Gás})_{T_0}$$

Onde: Prod. CH_4 = Produção de CH_4 no momento entre a injeção do conteúdo ruminal no frasco e a inativação; Conc. CH_4 = Concentração de CH_4 (mmol/mL); Vol. Total Gás = Volume total de gás obtido pela somatória do volume determinado pelo transdutor de pressão

e do head space (mL); T_{30} = Tempo de incubação de 30 min; T_0 = Tempo de incubação de 0 min (frasco branco).

$$\text{Prod. AGCC} = (\text{Conc. AGCC} \times \text{Vol. Total Liq.})_{T_{30}} - (\text{Conc. AGCC} \times \text{Vol. Total Liq.})_{T_0}$$

Onde: Prod. AGCC = Produção de AGCC no momento entre a injeção do conteúdo ruminal no frasco e a inativação; Conc. AGCC = Concentração de AGCC (mmol/mL); Vol. Total Liq.: Volume total de líquido do frasco obtido pela diferença de peso antes e depois da secagem em estufa (mL); T_{30} = Tempo de incubação de 30 min; T_0 = Tempo de incubação de 0 min (frasco branco).

Posteriormente, as produções de CH_4 e AGCCs foram expressas com base no conteúdo sólido incubado nos frascos (gramas ou quilogramas).

Após a quantificação dos produtos da fermentação (CH_4 e AGCC), cada produto foi multiplicado pelo seu calor de combustão, a fim de se expressar a produção de CH_4 em porcentagem da energia oriunda da fermentação produzida. Assim, a perda de energia relativa (PER) foi a razão entre a energia contida no CH_4 produzido e a somatória da energia contida em todos os produtos da fermentação quantificados (CH_4 e AGCC), expressa em porcentagem. Para isso, valores químicos teóricos do calor de combustão foram utilizados, assumindo que o acetato, o propionato, o butirato, o CH_4 e o CO_2 apresentam 3,49, 4,98, 5,96, 13,16 e 0,0 kcal por grama ou 209,40, 368,52, 524,48, 210,56 e 0,0 kcal por mol, respectivamente. A PER foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula (RODRIGUES et al., 2012):

$$\text{PER (\%)} = \frac{\epsilon_{\text{CH}_4}}{\epsilon_{\text{CH}_4} + \epsilon_{\text{C}_2} + \epsilon_{\text{C}_3} + \epsilon_{\text{C}_4}}$$

Onde: PER = Perda Relativa de Energia (%); ϵ_{CH_4} = energia do metano (kcal/g ou kcal/mol); ϵ_{C_2} = energia do acetato (kcal/g ou kcal/mol); ϵ_{C_3} = energia do propionato (kcal/g ou kcal/mol); ϵ_{C_4} = energia do butirato (kcal/g ou kcal/mol).

Para a determinação das concentrações de N-NH_3 , foram retirados 2,0 mL da amostra centrifugada de cada frasco e adicionado 1 mL de solução H_2SO_4 1N, posteriormente os tubos foram congelados a -20°C até o momento das análises por colorimetria, de acordo com o

método descrito por Kulasek (1972) e adaptado por Foldager (1977). O balanço foi obtido pela diferença da concentração de N-NH₃ do frasco incubado por 30 min do frasco não incubado (branco). Com este procedimento é possível avaliar se o equilíbrio da produção de amônia no rúmen é positivo ou negativo. Para uma melhor compreensão e interpretação os dados de balanço foram estimados por hora, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Balanço de N-NH}_3 \text{ (mg/dL.h)} = (\text{Conc. 30 min (mg/dL)} - \text{Conc. 0 min (mg/dL)}) \times 2$$

Onde: Conc. 30 min = Concentração de N-NH₃ dos frascos incubados por 30 min;
Conc. 0 min = Concentração de N-NH₃ dos frascos incubados por 0 min (branco).

4.2.10 Partição de energia

O consumo diário de energia bruta (CEB) foi calculado pela multiplicação do CMS (kg) e da EB da dieta (Mcal/kg). Para calcular a liberação de energia de acetato, propionato, butirato e CH₄ no rúmen (Mcal/ani.d), as produções desses metabólitos (g/kg.d) foram multiplicadas pelo seu calor de combustão (Mcal/g) e, em seguida, multiplicado pela quantidade de massa sólida ruminal (kg), respectivamente.

A liberação de energia no rúmen, quando expressa em % do CEB ou % de energia digestível (ED), foi obtida dividindo-se a liberação de acetato, propionato, butirato e CH₄ (Mcal/ani.d) pelo CEB ou pela ED e, em seguida, multiplicando por 100.

A liberação de CH₄ no ceco e no cólon (CC) foi considerada como 5% da liberação total de CH₄. De acordo com Dini et al. (2012), o CH₄ entérico é produzido principalmente no rúmen (95%) e, em menor quantidade (5%), no intestino grosso. Portanto, a liberação de energia no intestino foi calculada de acordo com a equação:

$$\text{ELI} = \text{CEB} - (\varepsilon\text{C}_2 + \varepsilon\text{C}_3 + \varepsilon\text{C}_4 + \text{EB fezes} + \text{CC CH}_4)$$

Onde: ELI: energia liberada no intestino (Mcal/ani.d); CEB: consume de energia bruta (Mcal/ani.d); εC_2 : energia do acetato (Mcal/ani.d); εC_3 : energia do propionato (Mcal/ani.d); εC_4 : energia do butirato (Mcal/ani.d); EB fezes: energia liberada nas fezes (Mcal/ani.d); CC CH₄: metano liberado no ceco e cólon (Mcal/ani.d).

4.2.11 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando-se o programa Statistical Analysis System (SAS 9.3, Institute Inc., 2013). Antes das análises propriamente ditas, os dados foram avaliados em relação à presença de informações discrepantes (“outliers”) e normalidade dos resíduos pelo teste Shapiro-Wilk. Quando a premissa de normalidade não foi atendida, recorreu-se à transformação dos dados. Os dados de consumo de MS, pH e partição de energia foram submetidos à análise de variância, que separou como causas de variação efeito de nível, efeito de genética, interação entre genética e nível, efeito de período e efeito de animal dentro de genética. Para as variáveis de produção de CH₄, AGCC, concentração de N-NH₃ e contagem total e diferencial de protozoários ruminais foi adicionado ao modelo o fator medidas repetidas no tempo, referente às diferentes horas de amostragem (0, 3, 6, 9 e 12), sendo analisadas com o uso do procedimento de modelos mistos (Proc Mixed). A análise por tempo somente foi realizada quando as interações entre tempo e nível foram significativas. O efeito de nível foi avaliado pelo uso de polinômios ortogonais, separando-se os efeitos em linear, quadrática e desvio da quadrática. O modelo estatístico utilizado está descrito conforme a equação abaixo:

$$Y_{ijkl} = \mu + N_i + G_j + N_i * G_j + P_k + A_l(G_j) + e_{ijkl}$$

Onde: Y_{ijkl} = observação referente ao Nível (i) + Genética (j) + Nível (i)*Genética (j) + Período (k) + Animal (l) dentro de Genética (j) + erro aleatório associado a cada observação (e_{ijkl}); μ = Média geral.

Para as análises, dentre as 15 diferentes estruturas de covariância testadas, a que melhor se ajustou ao modelo estatístico foi escolhida com base no menor valor do critério de informação Akaike corrigido (AICC) (WANG; GOONEWARDENE, 2004). Adotou-se nível de significância de 5%. Devido à diferença de porte das duas raças avaliadas, as variáveis foram ajustadas em função do peso metabólico dos animais ($\text{kg PV}^{0.75}$) e, quando não possível ajuste, este foi utilizado como covariável.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Consumo, pH e protozoários ruminais

O consumo de MS e de água não apresentaram diferença significativa para os diferentes níveis do aditivo, nem para os grupos genéticos avaliados (Tabela 11). A Figura 5 demonstra a variação do pH ao longo de 24 horas, onde as setas indicam o momento do

oferecimento da alimentação. Houve efeito significativo da interação (G*N) para a maioria das variáveis de pH analisadas (Tabela 11), demonstrando que ocorrem alterações destes parâmetros em função dos níveis de taninos para cada genética, deste modo, optou-se pela demonstração gráfica (Figura 6) destas interações para as seguintes variáveis: pH médio, Tempo de pH abaixo de 6,0 em min/dia e Área de pH abaixo de 6 em h.pH/dia, ambas com efeito de desvio da quadrática para os taurinos e ausência de efeito para os zebuínos (curva representada pela média).

Tabela 11. pH ruminal de dois grupos distintos de bovinos alimentados com diferentes níveis de inclusão de taninos de *Acacia mearnsii*

Variáveis	Genética (G)		Nível (N)				EPM	Probabilidade		
	Taruino	Zebuíno	0%	0,5%	1%	1,5%		G	N	G*N
Consumo										
MS, g/kg.PV ^{0.75}	103,3	91,31	98,33	97,86	97,68	95,43	2,22	0,0902	NS	NS
Água, mL/kg.PV ^{0.75}	376,4	236,0	311,8	298,8	305,2	309,0	19,03	0,0515	NS	NS
pH dia										
mínimo	5,61	5,95	5,87	5,96	5,75	5,55	0,071	0,0927	0,0101 ^L	0,0899
Médio	6,15	6,50	6,42	6,47	6,27	6,15	0,056	0,0400	0,0002 ^L	0,0135
máximo	6,65	6,88	6,83	6,86	6,72	6,64	0,040	0,0337	0,0011 ^L	0,0147
Tempo de pH, min/d										
< 5,8	242,6	4,7	56,8	34,6	187,2	213,9	40,1	0,0788	0,0133 ^L	0,0878
< 6,0	511,9	73,0	219,7	117,2	322,8	510,3	66,3	0,0155	0,0356 ^Q	0,0129
< 6,2	819,5	183,6	421,9	287,7	546,8	749,8	80,8	0,0058	0,0149 ^Q	0,0167
Área, h.(pH/d)										
< 5,8	0,89	0,18	0,07	0,06	0,58	1,42	0,24	NS	0,0788	0,0810
< 6,0	1,91	0,08	0,50	0,32	1,44	1,71	0,30	0,0612	0,0068 ^L	0,0494
< 6,2	4,10	0,38	1,55	0,99	2,87	3,57	0,51	0,0314	0,0397 ^{DQ}	0,0028

EPM: Erro padrão da média; G*N: Interação entre Genética e Nível.

Fonte: Perna Junior (2018).

Figura 5. Comportamento do pH ruminal médio para os diferentes níveis de taninos como aditivo alimentar, independentemente dos grupos de bovinos avaliados. As setas indicam o momento da alimentação.

Figura 6. Gráficos da variável pH médio (a), Tempo de pH abaixo de 6 em min/dia (b) e Área de pH abaixo de 6 em h.pH/dia (c), demonstrando a interação entre a utilização de níveis de taninos como aditivo alimentar e grupos distintos de bovinos (taurinos e zebuínos).

b)

c)

Fonte: Perna Junior (2018).

Na Tabela 12, apresentam-se os valores médios da contagem total e diferencial de protozoários. Para a população de *Dasytricha* foi observado efeito significativo para as diferentes genéticas, tanto por mL como em porcentagem, com aumentos de 100,8% e 132,9%, respectivamente, quando comparado zebuino ao taurino. Efeito similar foi apresentado para o gênero *Isotricha*, quando observados em porcentagem, sendo que os zebuínos apresentaram aumento de 169,2% em relação aos taurinos. Efeito contrário e significativo foi observado para o gênero *Entodinium*, quando apresentados em porcentagem, sendo estes 1,57% maiores nos taurinos que zebuínos.

Tabela 12. Contagem total e diferencial de protozoários ruminais de dois grupos distintos de bovinos alimentados com diferentes níveis de inclusão de taninos de *Acacia mearnsii*

Variáveis	Genética (G)		Nível (N)				EPM	Probabilidade		
	Taurino	Zebuino	0%	0,5%	1%	1,5%		G	N	G*N
Protozoário(x10 ³ /mL)										
<i>Dasytricha.</i>	6,52	13,09	13,41	8,33	7,89	7,35	0,70	0,0012	NS	NS
<i>Diplodiniinae</i>	4,69	4,06	5,91	4,39	4,02	3,39	0,39	NS	NS	NS
<i>Entodinium.</i>	482,4	470,2	532,4	465,6	454,7	455,3	13,8	NS	NS	0,0441
<i>Isotricha</i>	0,68	1,42	1,41	1,03	0,57	0,96	0,14	NS	NS	NS
Total	494,3	488,7	553,1	479,4	466,7	467,0	13,9	NS	NS	0,0408
Protozoário (%)										
<i>Dasytricha</i>	1,46	3,40	2,73	1,82	2,09	2,38	0,21	0,0247	NS	NS
<i>Diplodiniinae</i>	1,11	0,72	1,07	0,93	0,93	0,85	0,08	NS	NS	NS
<i>Entodinium</i>	97,3	95,8	95,9	97,0	96,8	96,9	0,22	0,0223	NS	NS
<i>Isotricha</i>	0,13	0,35	0,25	0,21	0,13	0,31	0,03	0,0379	NS	NS

EPM: Erro padrão da média; G*N: Interação entre Genética e Nível.

Fonte: Perna Junior (2018).

A Figura 7 demonstra a interação entre níveis de adição de taninos e grupos genéticos para a contagem total de protozoários (x10³/mL). Observou-se que ocorre um decréscimo linear na contagem total de protozoários para zebuino em função do aumento dos níveis de taninos, enquanto para taurino não houve variação. Interação semelhante foi encontrada para o gênero *Entodinium*, devido ser o gênero mais representativo na contagem total.

Figura 7. Interação entre níveis de inclusão de taninos e grupos distintos de bovinos para a contagem total de protozoários (x10³/mL).

Fonte: Perna Junior (2018).

4.3.2 Produtos da fermentação ruminal

As concentrações de N-NH₃ ruminal (Tabela 13) nos momentos antes da incubação (0 min), 30 min após a incubação e o balanço entre a concentração nos momentos 0 e 30 min apresentaram efeito entre os diferentes tempos de amostragem ($P < 0,05$), independentemente do nível e da genética (Figura 8). Na Tabela 13, optou-se por apresentar os efeitos principais de Genética, Nível e Tempo, já que as interações não apresentaram diferenças significativas.

Tabela 13. Concentração e balanço de N-NH₃ ruminal de dois grupos distintos de bovinos alimentadas com diferentes níveis de inclusão de taninos de *Acacia mearnsii*

Variáveis	Genética (G)		Nível (N)				EPM	Probabilidade		
	Taurino	Zebuino	0%	0,5%	1%	1,5%		G	N	Tempo
Concentração										
0 min (mg/dL)	11,9	12,7	13,0	12,5	11,2	12,5	0,33	NS	NS	<,0001
30 min (mg/dL)	12,3	13,4	13,7	13,1	11,6	12,9	0,36	NS	NS	<,0001
Bal (mg/dL.h)	0,92	1,41	1,70	1,13	0,84	1,01	0,20	NS	NS	<,0001

EPM: Erro padrão da média; G: Genética; N: Nível; Bal: Balanço por hora entre a concentração nos momentos 0 e 30 min.

Fonte: Perna Junior (2018).

Figura 8. Efeito do tempo sobre a concentração e balanço de N-NH₃ ruminal de dois grupos distintos de bovinos, alimentadas com diferentes níveis de taninos de *A. mearnsii*.

Fonte: Perna Junior (2018).

A utilização da nova técnica *ex situ* (micro-rúmen) gera um grande número de informações para as produções de AGCC e de CH₄, além de uma nova variável, a perda de energia relativa (PER) de CH₄ em relação aos demais produtos da fermentação ruminal (AGCC e CH₄). Devido à originalidade da técnica, há escassez de informações sobre a produção destes parâmetros.

Na Tabela 14, optou-se por apresentar os efeitos principais de Genética, Nível e Tempo, já que as interações não apresentaram diferenças significativas. O potencial fermentativo dos zebuínos foi nitidamente superior aos dos taurinos, produzindo mais acetato (17,1%), AGCC total (20,2%) e CH₄ (18%) por unidade de MS de conteúdo ruminal. Os resultados de produção dos diferentes AGCC e do CH₄, independentemente das doses de taninos utilizadas, apresentaram variação ($P < 0,05$) para os diferentes tempos de coletas após a alimentação matinal (Figura 9).

Para a produção de CH₄ (g/kg.d) foi utilizado o método de regressão linear com platô (Broken-line) que descreve o processo biológico em duas fases, uma fase crescente ou decrescente e outra fase de estabilidade (platô). Com o uso deste método, assumiu-se uma equação linear de resposta ao incremento do nível de taninos a partir de um ponto em que o animal passou a apresentar resposta. O ponto entre a equação linear e o platô representa o nível ótimo do aditivo (Joint point), demonstrado pela equação: $CH_4 = 32,47 - 8,75 \times \text{Nível}$; Joint point no Nível = 0,72%; Platô no Nível = 26,18 g/kg dia; $R^2 = 0,1344$; $P = 0,0003$. Portanto, pode-se determinar o ponto exato em que a adição de taninos começou a reduzir a produção de CH₄ (Figura 10), sendo que para a dose mais elevada de taninos houve redução de 25,8% na produção de CH₄. A Figura 11 demonstra a produção dos AGCC (acético, propiônico e butírico), do CH₄ e da PER em relação ao tratamento controle (considerado como 100%), para os diferentes níveis utilizados.

Tabela 14. Produção de AGCC, CH₄ e PER de dois grupos distintos de bovinos alimentados com diferentes níveis de inclusão de taninos de *Acacia mearnsii*

Variável	Genética (G)		Nível (N)				EPM	Probabilidade		
	Taurino	Zebuíno	0%	0,5%	1,0%	1,5%		G	N	Tempo
Acético										
0 min (mmol/L)	70,07	69,81	69,82	70,66	69,91	69,36	0,5766	NS	NS	<,0001
30 min (mmol/L)	74,73	75,40	75,22	75,68	75,12	74,26	0,6430	NS	NS	<,0001
Diferença (mmol/L)	4,67	5,72	5,65	5,02	5,21	4,90	0,2052	0,0086	NS	0,0104
Produção (mol/kg.d)	3,31	3,88	3,91	3,43	3,74	3,30	0,1409	0,0444	NS	0,0350
Produção (g/kg.d)	198,7	232,6	234,6	205,5	224,3	198,2	8,4558	0,0444	NS	0,0350
EB (kcal/kg.d)	693,3	811,9	818,7	717,2	782,7	691,8	29,510	0,0444	NS	0,0350
Propiônico										
0 min (mmol/L)	20,82	19,41	19,41	19,22	20,13	21,71	0,3628	NS	NS	<,0001
30 min (mmol/L)	22,56	21,33	21,29	21,03	21,99	23,52	0,3967	NS	NS	<,0001
Diferença (mmol/L)	1,74	1,93	1,88	1,80	1,87	1,78	0,0697	NS	NS	0,0019
Produção (mol/kg.d)	1,22	1,31	1,28	1,23	1,33	1,21	0,0460	NS	NS	0,0003
Produção (g/kg.d)	90,42	96,63	94,92	90,76	98,60	89,81	3,4038	NS	NS	0,0003
EB (kcal/kg.d)	450,3	481,2	472,7	452,0	491,1	447,3	16,951	NS	NS	0,0003
Butírico										
0 min (mmol/L)	13,89	11,99	11,72	12,50	13,41	14,15	0,2227	0,0064	0,0637	<,0001
30 min (mmol/L)	15,22	13,97	13,23	14,30	15,13	15,73	0,2928	NS	NS	<,0001
Diferença (mmol/L)	1,32	1,98	1,51	1,79	1,71	1,59	0,1683	0,0777	NS	0,0003
Produção (mol/kg.d)	0,95	1,35	1,03	1,21	1,24	1,10	0,1158	NS	NS	0,0008
Produção (g/kg.d)	83,35	118,4	90,85	106,8	108,9	96,91	10,190	NS	NS	0,0008
EB (kcal/kg.d)	498,8	705,8	541,5	636,5	649,6	581,6	60,676	NS	NS	0,0031
AGCC total										
0 min (mmol/L)	104,8	101,1	100,7	102,4	103,4	105,2	1,0344	NS	NS	<,0001
30 min (mmol/L)	112,5	110,7	109,7	111,0	112,2	113,5	1,1469	NS	NS	<,0001
Diferença (mmol/L)	7,73	9,63	9,04	8,62	8,79	8,27	0,3974	0,0082	NS	0,0016
Produção (mol/kg.d)	5,48	6,53	6,22	5,87	6,31	5,62	0,2528	0,0369	NS	0,0032
Produção (g/kg.d)	372,4	447,7	420,4	403,1	431,9	384,9	18,175	0,0386	NS	0,0032
EB (kcal/kg.d)	1642,4	1998,9	1832,9	1805,7	1923,3	1720,7	88,484	0,0238	NS	0,0032
Acético:Propiônico	2,77	3,03	3,06	2,87	2,95	2,72	0,0665	NS	NS	0,0679
Metano										
0 min (mmol/fr)	0,017	0,022	0,022	0,022	0,019	0,018	0,0004	0,0077	<,0001 ^L	NS
30 min (mmol/fr)	0,066	0,085	0,083	0,083	0,073	0,063	0,0015	0,0081	0,0251 ^Q	<,0001
Diferença (mmol/fr)	0,041	0,062	0,062	0,061	0,053	0,045	0,0013	0,0107	<,0001 ^L	<,0001
Produção (mol/kg.d)	1,37	1,61	1,63	1,64	1,48	1,21	0,0381	0,0804	0,0003 ^L	<,0001
Produção (g/kg.d)	21,87	25,79	26,06	26,31	23,72	19,35	0,6091	0,0803	0,0003 ^L	<,0001
EB (kcal/kg.d)	287,9	339,4	343,0	346,3	312,2	254,6	8,0162	0,0803	0,0003 ^L	<,0001
PER (%)	16,61	16,32	17,04	17,25	16,45	15,17	0,3727	NS	NS	NS

EPM: Erro padrão da média; EB: Energia Bruta, AGCC total: Total de ácidos graxos de cadeia curta; PER: Perda de energia relativa do metano em relação aos demais produtos da fermentação ruminal.

Fonte: Perna Junior (2018).

Figura 9. Produção de AGCC e de CH₄, independente dos grupos de bovinos avaliados (taurinos e zebuínos), em diferentes tempos após a alimentação contendo taninos de *Acacia mearnsii* como aditivo alimentar.

Fonte: Perna Junior (2018).

Figura 10. Efeito da adição de quatro níveis de taninos de *A. mearnsii* sobre a produção de CH₄ ruminal em grupos distintos de bovinos, utilizando-se o modelo Broken-line para demonstração do platô.

Fonte: Perna Junior (2018).

Figura 11. Produção de AGCC (acético, propiônico e butírico), CH₄ e da PER para os diferentes níveis de taninos, em relação ao tratamento controle.

Fonte: Perna Junior (2018).

4.3.3 Partição de energia

A energia liberada no rúmen na forma de CH₄ em relação a EB e a ED consumida foi maior para o grupo carne ($P < 0,05$), apresentando aumento de 23,8% e 29,3%, respectivamente, quando comparada ao grupo leite. Os diferentes níveis de taninos promoveram, independentemente do grupo, redução linear ($P < 0,05$) para a energia liberada no intestino em kcal/kg PV^{0,75} e aumento linear ($P < 0,05$) para energia liberada nas fezes em relação à EB consumida (Tabela 15).

Tabela 15. Estimativa da energia liberada no trato gastrointestinal de dois grupos distintos de bovinos alimentados com diferentes níveis de inclusão de taninos de *Acacia mearnsii*

Variável, dia	Genética (G)		Nível (N)				EPM	Probabilidade		
	Taurino	Zebuino	0%	0,5%	1,0%	1,5%		G	N	G*N
Massa Ruminal, g/kg PV ^{0,75}	537,3	453,3	470,3	489,1	504,3	517,7	14,9	0,0977	NS	NS
CEB, kcal/kg PV ^{0,75}	456,3	406,2	434,2	438,2	431,3	421,3	9,08	0,0984	NS	NS
Energia liberada no rúmen										
Acético										
kcal/kg PV ^{0,75}	44,72	47,76	47,36	42,66	48,51	45,84	2,52	NS	NS	NS
EB, %	9,76	11,67	10,95	9,89	11,14	10,89	0,54	NS	NS	NS
ED, %	13,78	17,63	15,43	14,22	16,38	16,80	0,86	NS	NS	NS
Propiônico										
kcal/kg PV ^{0,75}	29,32	27,98	27,85	27,02	30,11	29,61	1,47	NS	NS	NS
EB, %	6,38	6,89	6,36	6,26	6,88	7,04	0,29	NS	NS	NS
ED, %	9,58	10,42	8,95	9,05	10,20	11,80	0,56	NS	NS	NS
Butírico										
kcal/kg PV ^{0,75}	32,31	42,29	31,06	38,08	40,80	39,25	4,07	NS	NS	NS
EB, %	7,04	10,35	7,23	8,84	9,42	9,29	0,96	0,0917	NS	NS
ED, %	10,39	15,59	10,20	12,59	14,14	15,04	1,47	0,0856	NS	NS
AGCC Total										
kcal/kg PV ^{0,75}	106,4	117,7	106,3	107,8	119,4	114,7	6,76	NS	NS	NS
EB, %	23,18	28,91	24,54	24,98	27,44	27,22	1,49	NS	NS	NS
ED, %	34,41	43,64	34,58	35,86	40,71	44,97	2,44	NS	NS	NS
Metano										
kcal/kg PV ^{0,75}	18,06	19,78	19,77	20,52	18,97	16,42	0,74	NS	NS	NS
EB, %	3,94	4,88	4,59	4,78	4,37	3,91	0,17	0,0183	NS	NS
ED, %	5,70	7,37	6,45	6,85	6,54	6,31	0,25	0,0127	NS	NS
Energia liberada no intestino										
kcal/kg PV ^{0,75}	188,4	138,1	183,2	173,7	164,5	131,5	9,94	0,0983	0,0086 ^L	NS
EB, %	42,59	32,49	42,10	41,20	35,34	31,53	2,18	0,0966	NS	NS
ED, %	59,88	48,99	58,98	57,29	52,75	48,72	2,60	NS	NS	NS
Energia liberada nas fezes										
kcal/kg PV ^{0,75}	137,9	136,7	124,9	125,2	140,6	158,7	6,88	NS	NS	NS
EB, %	30,28	33,72	28,77	29,04	32,86	37,34	1,51	NS	0,0036 ^L	NS

EPM: Erro padrão da média; G*N: Interação entre Genética e Nível; CEB: Consumo de energia bruta; EB: Energia Bruta, ED: Energia Digestível.

Fonte: Perna Junior (2018).

4.4 DISCUSSÃO

A manutenção do pH ruminal é uma das mais importantes variáveis ruminais que envolve a degradação da fibra. O pH 5,8 indica o limiar de casos de acidose ruminal sub-aguda (PENNER et al., 2007), o pH 6,0 e 6,2 são limiares indicativos de condições ruminais saudáveis (PENNER; BEAUCHEMIN, 2010), favorecendo uma boa produção microbiana,

principalmente pela atividade das bactérias celulolíticas. Como demonstrado na Figura 6, à medida que aumentou-se o nível de taninos na dieta os zebuínos foram capazes de manter o pH ruminal, já os taurinos demonstraram-se mais susceptíveis aos efeitos dos taninos, sofrendo variações no pH ruminal, principalmente, em doses de taninos maiores que 0,5%, no entanto, sem atingir de forma expressiva limiares críticos de pH 5,8. Tal fato pode ter ocorrido pela formação de complexos tanino-proteína no rúmen com diminuição da desaminação proteica, resultando na diminuição da degradabilidade dos nutrientes, alterando o papel da amônia como tamponante ruminal. Adicionalmente, os zebuínos produziram mais CH₄ (Tabela 19), ou seja, provavelmente captaram mais hidrogênio disponível no rúmen, favorecendo a estabilidade do pH ruminal. Já Carulla et al. (2005) e Orlandi et al. (2015), utilizando taninos de *A. mearnsii* não encontraram variação no pH ruminal, para ovinos e bovinos, respectivamente.

A dieta é um dos fatores que interferem na contagem total e diferencial das distintas espécies de protozoários ruminais, sendo que mudanças na dieta estabelecem períodos de transição na população microbiana ruminal, com alterações nas proporções entre as distintas espécies para dar um novo equilíbrio (WILLIAMS, 1986). Os protozoários ruminais ciliados da subclasse *holotricha* utilizam principalmente carboidratos solúveis, já os *entodiniomorphos* ingerem e fermentam materiais fibrosos (VAN SOEST, 1994; WILLIAMS, 1986). Os efeitos dos taninos sobre a contagem de protozoários ruminais são variáveis, pois dependem da sua origem e concentração (MAKKAR, 2003a), existindo evidências de redução do número de protozoários com a presença de taninos (YÁÑEZ RUIZ et al., 2004; CARULLA et al., 2005) e que *holotrichas* parecem ser mais susceptíveis que *entodiniomorphos* (MAKKAR et al., 1995). Para os zebuínos, supostamente por serem mais eficientes na fermentação ruminal que taurinos, esperava-se que a proporção de *entodiniomorphos* fosse maior e a de *holotricha* (*Dasytricha* e *Isotricha*) menor quando comparados aos taurinos, no entanto, o efeito foi contrário. Belanche et al. (2015), testando o efeito de inoculação de *holotricha* em ovinos, sugere que estes protozoários têm maior impacto na metanogênese ruminal do que os *entodiniomorphos*, fato que se assemelha aos nossos resultados, já que os zebuínos produziram mais CH₄. Com relação aos efeitos dos taninos, Carulla et al. (2005), ao utilizar TC de *A. mearnsii* (2,5% do CMS) para ovelhas, encontraram que a adição de taninos reduziu a contagem de *holotrichas* sem afetar a contagem de *entodiniomorphos*. Já Benchaar et al. (2008), ao suplementar vacas holandesas com extrato de quebracho com 70% de TC (0,64% do CMS) não obtiveram efeito sobre a quantificação de protozoários ciliados ruminais. No presente experimento, os níveis de taninos influenciaram apenas os *entodiniomorphos*,

reduzindo linearmente em zebuínos e mantendo-se em taurinos (Tabela 12). O pH ruminal também é um dos fatores que podem interferir na população microbiana, afetando os protozoários quando ocorre sua queda (CHURCH, 1993). No presente experimento o gênero *Entodinium* pareceu ser tolerante às variações de pH, já que não houve uma variação abrupta, apesar de os taurinos apresentarem queda do pH ruminal com o aumento de taninos na dieta (Figura 6).

Os microrganismos ruminais podem utilizar os peptídeos e os aminoácidos, resultantes da hidrólise das proteínas dietéticas, ou a amônia, para síntese de proteína microbiana. A absorção através da parede ruminal é a rota principal para a amônia que não foi assimilada pelos microrganismos, sendo removida da circulação pelo fígado, onde entra no ciclo da ureia (LOBLEY et al., 1995). Quando a taxa de síntese de amônia supera a sua utilização pelos microrganismos, observa-se elevação da concentração de amônia no rúmen, com consequente aumento da excreção de ureia e incremento do custo energético de sua produção, resultando, dessa forma, em perda de proteína (RUSSEL et al., 1992). Em vista disso, há crescente interesse em minimizar perdas de compostos nitrogenados e aumentar a eficiência do manejo dietético.

Os TC têm demonstrado diminuir os níveis de proteína solúvel e N-NH₃ ruminal (BARRY; MANLEY, 1986; McMAHON et al., 2000), promovendo uma maior retenção de N através da redução da excreção de ureia (EGAN; ULYATT, 1980) e aumento da reciclagem de ureia para o rúmen (WAGHORN et al., 1994). Segundo Reed (1995), em sua revisão, os TC podem 1) aumentar a eficiência de reciclagem do N para o rúmen, diminuindo a concentração de N-NH₃ ruminal e promovendo influxo de ureia dentro do rúmen e 2) aumentar o conteúdo de glicoproteína de saliva e estimular a produção de saliva, o que poderia, por sua vez, aumentar a reciclagem de N para o rúmen. Rira et al. (2015), ao utilizar diferentes plantas ricas em TC para ovinos, relataram falta de efeito dos TC sobre o N-NH₃ ruminal, atribuindo tal efeito à quantidade de TC na dieta, que pôde ter influenciado a reciclagem de N, e/ou o consumo de MS resultando em uma maior concentração de N-NH₃ ruminal. De acordo com NRC (1989), para maximização da digestão ruminal de MS é necessária uma concentração mínima de 5 mg/dL de N-NH₃ no fluído ruminal, já Leng (1990) sugeriu que, para regiões tropicais, a concentração de N-NH₃ deve ser superior a 10 mg/dL. Os valores observados no presente estudo indicam que as condições foram favoráveis para a produção de proteínas microbianas (Tabela 13). O efeito de taninos na proteção da degradação da proteína ruminal pode ser benéfica, o que é refletido em maior eficiência de síntese de proteína microbiana (MAKKAR, 2003a) e também com diminuições no fluxo de

nitrogênio da amônia para o intestino (SLIWINSKI et al., 2002). A redução da taxa de digestão alimentar pelos taninos podem otimizar o tempo de liberação de nutrientes (nitrogênio e fonte de energia), maximizando a produção de proteínas por microrganismos; no entanto, McSweeney et al. (2001), demonstraram que em dietas com quantidades maiores de taninos o fluxo de proteína digestível no intestino delgado pode ser compensado por um aumento nas perdas endógenas de proteína devido à interação entre os TC dissociados e as proteínas estruturais da mucosa intestinal. A concentração ruminal de N-NH_3 é o resultado de diferenças entre produção e desaparecimento. Com a metodologia apresentada no presente experimento é possível avaliar as direções no metabolismo de N-NH_3 durante os tempos de amostragem. Na Figura 8 podemos ver o equilíbrio do N-NH_3 sobre os tempos de amostragem, demonstrando que as rotas de produção foram predominantes em relação às rotas que consomem N-NH_3 ; no entanto, ao redor de 3 horas após a refeição, o valor do saldo diminuiu, o que indicou que as rotas de consumo (especialmente para o crescimento microbiano) foram equivalentes às rotas de produção (especialmente para a degradação da proteína). Diferente de Carulla et al. (2005), que observaram redução de 9% na concentração de N-NH_3 , não observamos diferenças para os diferentes níveis de taninos e nem entre os grupos avaliados, demonstrando que houve equilíbrio entre a síntese e consumo do N-NH_3 ruminal.

Jayanegara et al. (2012) demonstraram através de uma meta-análise que os efeitos da suplementação de baixos níveis de taninos sobre o CH_4 ruminal eram inconsistentes, com maior mitigação do CH_4 ruminal observado em dietas à base de forragem (WOODWARD et al., 2004; PUCHALA et al., 2005; MIN et al., 2006). Alves et al. (2017), ao suplementar vacas em produção, com aproximadamente 0,7% do CMS de extrato de *A. mearnsii*, obtiveram redução de 32% na produção de CH_4 , sem afetar o desempenho produtivo; já Grainger et al. (2009), ao suplementar vacas em produção, com 0,9 e 1,8% de TC, encontraram redução de 14 e 29%, respectivamente, no entanto com redução da produção de leite. Carulla et al. (2005), ao utilizar doses moderadas de TC (2,5% do CMS) para ovelhas, reportaram 13% de redução de CH_4 e Woodward et al. (2004) reportaram 13% de redução para vacas alimentadas com *L. Corniculatus* contendo 2,6% de TC. No presente experimento, com o uso do modelo broken-line, pode-se determinar que os efeitos de redução da produção de CH_4 iniciaram-se quando utilizou-se níveis acima de 0,72%, independentemente dos grupos genéticos avaliados (Figura 10). Fato também demonstrado por Perna Junior et al. (2017), que ao utilizar apenas 0,6% de extrato de taninos de *A. mearnsii* para vacas holandesas não observaram diminuição da produção de CH_4 . Assim, no presente experimento

os níveis de 1,0 e 1,5% de taninos na dieta diminuíram linearmente ($P < 0,05$) a produção de CH_4 em 8,9 e 25,7%, respectivamente. Apesar de o aditivo promover modificações significativas na produção de CH_4 o mesmo não foi capaz de reduzir a PER (perda de energia de CH_4 em relação aos produtos da fermentação), provavelmente devido, apesar de não significativa, à redução numérica dos demais produtos da fermentação (Tabela 14). Assim como Tevandale et al. (2005), sugerimos que houve inibição da metanogênese pelo efeito bacteriostático e bactericida dos TC, já que a produção de CH_4 foi reduzida sem, no entanto, afetar a produção dos AGCC.

Carulla et al. (2005), utilizando TC de *A. mearnsii* (2,5% do CMS) para ovelhas, não encontraram diferença significativa para a concentração total de AGCC, mas observaram redução na proporção molar de acetato, na relação acetato:propionato e aumento na proporção de propionato. Beauchemin et al. (2008), utilizando extrato de taninos de quebracho, encontraram efeitos semelhantes com aumento na proporção de ácido propiônico comparado ao acético, resultando em menor produção de CH_4 . No presente experimento não foram observadas diferenças para a produção dos diferentes AGCC, no entanto, observamos que o pico de produção de AGCC e CH_4 ocorreu cerca de 9 após a alimentação, com favorecimento da produção de ácido butírico, sendo que esta rota favorece a liberação de H_2 circulante e sua consequente utilização para a produção de CH_4 . Fato este que causa-nos surpresa, já que esperávamos um pico de produção de AGCC e CH_4 cerca 3 a 4 horas após a alimentação. Provavelmente isto ocorreu devido à redução da digestibilidade dos alimentos causada pelos taninos, levando a uma sincronização mais lenta do processo digestivo. O potencial fermentativo dos zebuínos foi nitidamente superior aos taurinos, como observado na Tabela 14. Com relação ao uso de taninos não houve prejuízos à produção de AGCC, afetando apenas a produção de CH_4 , fato este de grande relevância, demonstrando que o uso de doses baixas de taninos interferiu diretamente sobre as *archeas* metanogênicas, contribuindo para a redução das emissões de GEE.

Devido à originalidade da técnica *ex situ*, tornando possível calcular a produção diária dos produtos da fermentação ruminal (AGCC e CH_4), foi possível estimar a energia liberada ao longo do trato gastrointestinal. Dados, que pelo nosso conhecimento, não estão disponíveis na literatura e podem ser de grande valia para os nutricionistas. Os taninos promoveram alterações no particionamento da energia com redução linear da energia liberada no intestino ($\text{kcal/kg PV}^{0,75}$) e aumento linear da energia liberada nas fezes, provavelmente devido a redução da digestibilidade pela formação de complexos com os componentes da dieta, principalmente as proteínas. Existe a preocupação da comunidade, para com a bovinocultura,

não somente com a questão ambiental das emissões de CH₄ entérico e das fezes, como também em relação à produtividade, pois, segundo Buddle et al. (2011), de 5% a 9% da EB da dieta é perdida na forma de CH₄, valores condizentes aos encontrados no presente estudo. Independentemente do uso de taninos os zebuínos produziram mais CH₄ que os taurinos, possivelmente por serem mais eficientes na fermentação ruminal, disponibilizando mais H₂ circulante para a atuação das *archeas* metanogênicas.

4.5 CONCLUSÃO

A utilização de extrato de *Acacia mearnsii* até 1,5% da MS da dieta promoveu alterações no pH ruminal dos taurinos, manteve o equilíbrio entre a síntese e consumo de N-NH₃ ruminal, reduziu a produção de CH₄ entérico sem reduzir a produção de AGCC. Entretanto, não houve melhora na eficiência energética dos produtos da fermentação ruminal. Todos estes fatos são de grande relevância, demonstrando que os taninos podem ter interferido diretamente sobre as *archeas* metanogênicas, contribuindo para a redução das emissões de CH₄ e consequentemente de GEE. Independentemente do aditivo utilizado zebuínos apresentaram maior eficiência fermentativa em relação aos taurinos, produzindo mais AGCC e consequentemente CH₄ ruminal. Já com relação ao particionamento da energia, os taninos provocaram redução da energia liberada no intestino e aumento da energia liberada nas fezes. Portanto, o uso deste aditivo em dosagens de 0,72 a 1,5% se mostrou como uma interessante opção para a modulação da fermentação ruminal de distintos grupos de bovinos.

REFERÊNCIAS

- AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of Analysis**. 16 ed. Virginia, USA, 1995. 1051 p.
- ALVES, T. P.; DALL-ORSOLETTA, A. C.; RIBEIRO-FILHO, H. M. N. The effects of supplementing *Acacia mearnsii* tannin extract on dairy cow dry matter intake, milk production, and methane emission in a tropical pasture. **Tropical Animal Health Production**, 2017. doi: 10.1007/s11250-017-1374-9
- BARRY, T. N.; MANLEY, T. R. Interrelationships between the concentrations of total condensed tannin, free condensed tannin and lignin in *Lotus* sp. and other possible consequences in ruminants nutrition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 37, p. 248-254, 1986.
- BEAUCHEMIN, K. A.; KREUZER, M.; O'MARA, F.; MCALLISTER, T. A. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, 48, 21–27, 2008.
- BELANCHE, A.; de la FUENTE, G.; NEWBOLD, C. J. Effect of progressive inoculation of fauna-free sheep with holotrich protozoa and total-fauna on rumen fermentation, microbial diversity and methane emissions. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 91, n. 3, 2015. doi: 10.1093/femsec/fiu026
- BENCHAAAR, C.; McALLISTER, T. A.; CHOUINARD, P. Y. Digestion, ruminal fermentation, ciliate protozoal populations, and milk production from dairy cows fed cinnamaldehyde, quebracho condensed tannin, or *Yucca schidigera* saponin extract. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 4765–4777, 2008. doi: 10.3168/jds.2008-1338
- BERNDT, A. Estratégias nutricionais para redução de metano. In: IV CONGRESSO LATINO AMERICANO DE NUTRIÇÃO ANIMAL - CLANA, 2010, Estância de São Pedro, SP. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2010. p. 295-306.
- BODAS, R. N.; PRIETO, N. R.; GARCÍA-GONZÁLEZ, R. S.; ANDRÉS, S.; GIRÁLDEZ, F. J.; LÓPEZ, S. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. **Animal Feed Science and Technology**, n. 176, p. 78–93, 2012.
- BUDDLE, B. M.; DENIS, M.; ATTWOOD, G. T.; ALTERMANN, E.; JANSSEN, P. H.; RONIMUS, R. S.; PINARES-PATÍÑO, C. S.; MUETZEL, S.; NEIL WEDLOCK, D. Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pasture. **The Veterinary Journal**, v.188, n.1, p.11-17, 2011.
- CARULLA, J. E.; KREUZER, M.; MACHMÜLLER, A.; HESS, H. D. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 56, n. 9, p. 961–970, 2005.
- CHURCH, D. C. **The ruminant animal: digestive physiology and nutrition**. New Jersey, 1993. 564p.
- CIESLAK, A.; SZUMACHER-STRABEL, M.; STOCHMAL, A.; OLESZEK, W. Plant components with specific activities against rumen methanogens. **Animal**, v. 7:s2, p. 253-265, 2013. doi: 10.1017/S1751731113000852
- DADO, R. G.; ALLEN, M. S. Intake limitations, feeding behaviour, and rumen function of cows challenged with rumen fill from dietary fiber or inert bulk. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 118–133, 1995.

DEHORITY, B. A. **Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliate protozoa**. Florida: CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1993. 96 p.

EGAN, A. R.; ULYATT, M. J. Quantitative digestion of fresh herbage by sheep. 6. Utilisation of nitrogen in five herbages. **Journal Agricultural Science**, v. 94, p. 47-56, 1980.

ERWIN, E. S.; MARCO, G. J.; EMERY, E. M. Volatile fatty acids analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, v.44, n.9, p. 1768-1771, 1961.

FOLDAGER, J. **Protein requirement and non protein nitrogen for high producing cow in early lactation**. 1977. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Michigan State University, East Lasing, MI, USA, 1977.

FRISCH, J. E.; VERCOE, J. E. Food intake, eating rate, weight gains, metabolic rate and efficiency of feed utilization in *Bos taurus* and *Bos indicus* crossbred cattle. **Animal Production**, v. 24, n. 1, p. 343-358, 1977.

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

GRAINGER, C.; CLARKE, T.; AULDIST, M. J.; BEAUCHEMIN, K. A.; MCGINN, S. M.; WAGHORN, G. C.; ECKARD, R. J. Potencial use of *Acacia mearnsii* condensed tannins to reduce methane emissions and nitrogen excretion from grazing dairy cows. **Canadian Jornal Animal Science**, v. 89, p. 241-251, 2009.

HUNGATE, R. E. **The rumen and its microbes**. Academic, New York, USA, 1966, 533 p.

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

JOHNSON, K. A.; JOHNSON, D. E. Methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 8, p. 2483-2492, 1995.

KAMINSKI, M.; KARTANOWICS, R.; JASTRZEBSKI, D.; KAMINSKI, M. M. Determination of carbon monoxide, methane and carbon dioxide in refinery hydrogen gases and air by gas chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 989, p. 277-283, 2003.

KULASEK, G. A. A micromethod for determination of urea in plasma, whole blood and blood cells using urease and phenol reagent. **Polskie Archiwum Weterynaryjne**, v.15, n.4, p.801-810, 1972.

LEDGER, H. P.; ROGERSON, A.; FREEMAN, G. H. Further studies on the voluntary food intake of *Bos indicus* and *Bos taurus* and crossbred cattle. **Animal Production**, n. 12, p. 425-431, 1970.

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

LOBLEY, G. E.; CONNELL, A.; LOMAX, M. A.; BROWN, D. S.; MILNE, E.; CALDER, A. G.; FARNINGHAM, D. A. H. The effect of nitrogen and protein supplementation on feed intake, growth and digestive function of steers with different *Bos taurus* genotypes when fed a low quality grass hay. **British Journal of Nutrition**, v.73, p.667-685, 1995.

MAKKAR, H. P. S.; BLÜMMEL, M.; BOROWY, N. K.; BECKER, K. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. **Journal of Food Science and Technology**, v. 61, p. 161-165, 1993.

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

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, 2003a.

MAKKAR, H. P. S. **Quantification of tannins in tree and shrub foliage: a laboratory manual**. Springer, Netherlands, 2003b

McLEOD, M. N. Plant tannins - Their role in forage quality. **Nutrition Abstracts and Reviews**, v. 44, 803-812, 1974.

McMAHON, L. R.; McALLISTER, T. A.; BERG, B. P.; MAJAK, W.; ACHARYA, S. N.; POPP, J. D.; COULMAN, B. E.; WANG, Y.; CHENG, K. J. A review of the effects of forage condensed tannins on ruminal fermentation and bloat in grazing cattle. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 80, p. 469–485, 2000.

McSWEENEY, C. S.; PALMER, B.; McNEILL, D. M.; KRAUSE, D.O. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, p. 83-93, 2001.

MIN, B.; PINCHAK, W.; ANDERSON, R.; FULFORD, J.; PUCHALA, R. Effects of condensed tannins supplementation level on weight gain and *in vitro* and *in vivo* bloat precursors in steers grazing winter wheat. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 9, p. 2546-2554, 2006.

MOHAMMED, N.; ONODERA, R.; ITABASHI, H.; LILA, Z. A. Effects of ionophores, vitamin B6 and distiller's grains on *in vitro* tryptophan biosynthesis from indolepyruvic acid, and production of other related compounds by ruminal bacteria and protozoa. **Animal Feed Science and Technology**, v. 116, p. 301-311, 2004.

MOYA, D.; MAZZENGA, A.; HOLTSHAUSEN, L.; COZZI, G.; GONZÁLEZ, L.A.; CALSAMIGLIA, S.; GIBB, D.G.; McALLISTER, T.A.; BEAUCHEMIN, K.A.; SCHWARTZKOPF-GENSWEIN, K. Feeding behavior and ruminal acidosis in beef cattle offered a total mixed ration or dietary components separately. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 520-530, 2011.

MUELLER-HARVEY, I.; McALLAN, A. B. Tannins. Their biochemistry and nutritional properties. In: MORRISON, I. M. (Ed.). **Advances in plant cell biochemistry and biotechnology**, v.1. JAI Press Ltd., London, UK, 1992, p. 151-217.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 6.ed. Washington D.C. National Academies Press, USA, 1989.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7.ed. Washington D.C. National Academies Press, USA, 2001. 381 p.

ORLANDI, T.; KOZLOSKI, G. V.; ALVES, T. P.; MESQUITA, F. R.; ÁVILA, S. C. Digestibility, ruminal fermentation and duodenal flux of amino acids in steers fed grass forage plus concentrate containing increasing levels of *Acacia mearnsii* tannin extract. **Animal Feed Science and Technology**, v. 210, p. 37–45, 2015.

PATRA, A. K.; SAXENA, J. A. New perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. **Phytochemistry**, n. 71, p. 1198–1222, 2010.

- PERNA JUNIOR, F.; CASSIANO, E. C. O.; MARTINS, M. F.; ROMERO, L. A.; ZAPATA, D. C. V.; PINEDO, L. A.; MARINO, C. T.; RODRIGUES, P. H. M. Effect of tannins-rich extract from *Acacia mearnsii* or monensin as feed additives on ruminal fermentation efficiency in cattle. **Livestock Science**, n. 203, p. 21–29, 2017.
- PENNER, G. B.; BEAUCHEMIN, K. A. Variation among cows in their susceptibility to acidosis: challenge or opportunity? **Advanced Dairy Science and Technology**, n. 22, p. 173–187, 2010.
- PENNER, G. B.; BEAUCHEMIN, K. A.; MUTSVANGWA, T. An evaluation of the accuracy and precision of a stand-alone submersible continuous ruminal pH measurement system. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 2132–2140, 2006.
- PENNER, G. B.; BEAUCHEMIN, K. A.; MUTSVANGWA, T. Severity of ruminal acidosis in primiparous Holstein cows during the periparturient period. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 365–375, 2007.
- PUCHALA, R.; MIN, B. R.; GOETSCH, A. L.; SAHLU, T. The effect of a condensed tannin-containing forage on methane emission by goats. **Journal of Animal Science**, v. 83, n. 1, p. 182–186, 2005.
- REED, J. D. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 1516–1528, 1995.
- RIRA, M.; MORGAVI, D. P.; ARCHIMÈDE, H.; MARIE-MAGDELEINE, C.; POPOVA, M.; BOUSSEBOUA, H.; DOREAU, M. Potential of tannin-rich plants for modulating ruminal microbes and ruminal fermentation in sheep. **Journal of Animal Science**, v. 93, p. 334–347, 2015.
- RIVERA-MÉNDEZ, C.; PLASCENCIA, A.; TORRENTERA, N.; ZINN, R. A. Effect of level and source of supplemental tannin on growth performance of steers during the late finishing phase. **Journal of Applied Animal Research**, v. 45, n. 1, p. 199–203, 2017. doi: 10.1080/09712119.2016.1141776
- RODRIGUES, P. H. M.; PINEDO, L. A.; SOLORIZANO, L. A. R.; PERNA JUNIOR, F.; MARTINS, M. F.; CASTRO, A. L.; GODOY, G. L. A.; MARINO, C. T. Descrição da metodologia *ex-situ* de estudo da fermentação ruminal (micro-rúmen) com vistas à mensuração da produção de metano. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 49, 2012, Brasília. **Anais...** Brasília – DF, 2012.
- RUSSELL, J. B.; O’CONNOR, J. D.; FOX, D. J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 425–441, 1992.
- SAS. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS/STAT-User’s guide. 9.3**. Cary, NC, USA: SAS Inst, Inc, 2013.
- SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, p. 21–40, 2001.
- SLIWINSKI, B. J.; SOLIVA, C. R.; MACHMULLER, K. M. Efficacy of plant extracts rich in secondary constituents to modify rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 101, p. 101–114, 2002.
- STAERFL, S. M.; ZEITZ, J. O.; KREUZER, M.; SOLIVA, C. R. Methane conversion rate of bulls fattened on grass or maize silage as compared with the IPCC default values, and the long-term methane mitigation efficiency of adding acacia tannin, garlic, maca and lupine. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 148, p. 111–120, 2012.

TAVENDALE, M. H.; MEAGHER, L. P.; PACHECO, D.; WALKER, N.; ATTWOOD, G. T.; SIVAKUMARAN, S. Methane production from *in vitro* rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. **Animal Feed Science and Technology**, p. 123–124, 403–419, 2005.

VALADARES FILHO, S. C.; COELHO DA SILVA, J. F.; LEÃO, M. I.; GONÇALVES, C. A..C.; GARCIA, J. A. Óxido crômico e lignina na determinação dos fluxos de matéria seca abomasal, ileal e fecal em bovinos e bubalinos. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.14, n.5, p. 565-574, 1985.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2^a.ed. Cornell University Press, Ithaca, NY, USA, 1994. 476 p.

WAGHORN, G. C.; SHELTON, I. D.; McNABB, W. C.; McCUTHEON, S. N. Effects of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on its nutritive value for sheep. 2. Nitrogenous aspects. **Journal of Agricultural Science**, v. 123, p. 109–119, 1994.

WANG, Z.; GOONEWARDENE, L. A. The use of MIXED models in the analysis of animal experiments with repeated measures data. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 84, p. 1–11, 2004.

WILLIAMS, A. G. Rumen holotricha ciliate protozoa. **Microbiological Reviews**, v. 50, n. 1, p. 25-49, 1986.

WOODWARD, S. L.; WAGHORN, G. C.; ULYATT, M. J.; LASSEY, K. R. Early indication that feeding *lotus* will reduce methane emission from ruminants. **Proceedings of New Zealand Society of Animal Production**, n. 61, p. 23–26, 2001.

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

YÁÑEZ RUIZ, D. R.; MOUMEN, A.; MARTÍN GARCÍA, A. I.; MOLINA ALCAIDE, E. Ruminant fermentation and degradation patterns, protozoa population, and urinary purine derivatives excretion in goats and wethers fed diets based on two-stage olive cake: effect of PEG supply. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 2023–2032, 2004.

5 POTENCIAL DE GERAÇÃO DE ENERGIA RENOVÁVEL DURANTE A BIODIGESTÃO ANAERÓBIA DE DEJETOS DE GRUPOS DISTINTOS DE BOVINOS ALIMENTADOS COM TANINOS DE *Acacia mearnsii*

Resumo: A biodigestão anaeróbia representa uma alternativa para o tratamento de resíduos, pois além de permitir a redução do potencial poluidor dos dejetos, promove a geração do biogás. O objetivo do presente estudo foi avaliar as produções de CO₂, CH₄ e N₂O durante a biodigestão anaeróbia de dejetos de dois grupos distintos de bovinos alimentados com diferentes níveis de taninos de *Acacia mearnsii*. Foram utilizados biodigestores experimentais tipo batelada, alocados dentro de câmara climática (30 a 35°C). Estes foram organizados em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2x4, sendo testados os dejetos de dois grupos distintos de bovinos (taurinos e zebuínos) que receberam quatro níveis de inclusão de taninos na dieta (0, 0,5, 1,0 e 1,5% da MS da dieta), ou seja, 8 tratamentos com 4 repetições, totalizando 32 unidades experimentais. A utilização de extrato de *Acacia mearnsii* até 1,5% da MS da dieta de bovinos não promoveu alterações na eficiência de remoção dos nutrientes dos dejetos, nem na produção de biogás e seus compostos (CH₄, CO₂ e N₂O). As velocidades da produção de CH₄ e CO₂ foram mais acentuadas para os taurinos, podendo ser um fator positivo para redução do Tempo de Residência. Portanto, os taninos podem ser utilizados como aditivos para manipulação da fermentação ruminal, sem apresentar efeitos compensatórios indesejáveis quanto à emissão de gases pelas fezes.

Palavras chave: Biogás. Dejeto. Gás carbônico. Metano. Óxido nitroso.

5.1 INTRODUÇÃO

As atividades agrícolas contribuem com 52% e 84% das emissões antropogênicas de CH₄, N₂O, respectivamente, em todo o mundo (EPA, 2006). A maioria dessas emissões são provenientes de fermentação entérica e solos cultivados. No entanto, as contribuições do manejo do dejeto bovino também são importantes e deverão aumentar (EPA, 2006). As emissões de CH₄ e N₂O são uma preocupação ambiental porque seus potenciais de aquecimento global são 25 e 298 (ambos com base em uma projeção de 100 anos) mais potentes que o CO₂, respectivamente (IPCC, 2007). A formação de CH₄ em fezes de gado em pastejo é muito baixa (JARVIS et al., 1995) e muitas vezes sua quantificação é negligenciada.

No entanto, quando estocadas, as fezes podem representar de 7 a 27% da emissão total de CH₄ por ruminantes (KULLING et al., 2002; HINDRICHSEN et al., 2006).

O dejetos bovino é um bom substrato para o desenvolvimento da biodigestão anaeróbia, por conterem carboidratos, proteínas e gordura (AHRING et al., 2001). No entanto, vários fatores podem alterar as características dos resíduos influenciando seu potencial para a produção de biogás, sendo a alimentação dos animais um importante fator (AMON et al., 2007; JARRET et al., 2011). Como alternativa ao uso de medicamentos para manipulação da fermentação ruminal, pesquisadores tem intensificado o estudo de aditivos alimentares naturais para ruminantes, como os taninos (MAKKAR et al., 1995; WOODWARD et al., 2001; CARULLA et al., 2005; PERNA JUNIOR et al., 2017). Estes compostos são classificados em taninos hidrolisáveis (TH) e condensados (TC), tendo ambos efeitos dependentes da sua concentração, fonte e outros fatores como a espécie animal, o estado fisiológico do animal e a composição da dieta (MAKKAR, 2003a). De acordo com Hao et al. (2011), os TC em dietas de ruminantes reduzem a degradação do N ruminal, mas existem poucas pesquisas sobre como esses compostos fenólicos alteram a decomposição dos dejetos. Adicionalmente, Hegarty (2004), em sua revisão sobre os diferentes genótipos e seu impacto sobre a função do trato digestivo de ruminantes, afirma que existem diferenças significativas na função digestiva entre espécies, raças e dentro de raças. Deste modo, há necessidade de investigar como o uso de taninos na dieta de bovinos com aptidões diferentes influenciam a composição dos dejetos e a produção de biogás durante sua biodigestão anaeróbia.

Portanto, espera-se que a adição de taninos na dieta de bovinos aumente o teor de N dos dejetos e resulte em maiores emissões de CH₄, por potencializar o processo de biodigestão anaeróbia, impedindo assim a formação de N₂O associadas a este tipo de substrato quando estocados em condições naturais. O objetivo do presente estudo foi avaliar os dejetos de dois grupos distintos de bovinos alimentados com diferentes níveis de taninos de *Acacia mearnsii* sobre as produções de CO₂, CH₄ e N₂O durante a biodigestão anaeróbia como alternativa para o tratamento dos dejetos e produção de biogás.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Local e questão ética

O manejo dos animais seguiu as diretrizes estabelecidas de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob o protocolo nº 3222290414. O estudo foi realizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Brasil, Campus Fernando Costa, Pirassununga.

5.2.2 Animais, instalações, alimentação e coleta de fezes

Foram utilizadas oito vacas secas, canuladas no rúmen, sendo quatro da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*), com peso vivo médio de 775 ($\pm$ 55) kg e quatro da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), com peso vivo médio de 434 ($\pm$ 47) kg. Optou-se pela escolha desses dois grupos bem distintos por serem expressivos representantes dos sistemas de produção de leite (taurinos) e de carne mundial (zebuínos), ou pelo menos no Brasil. Os animais foram mantidos em galpão coberto, em baias individuais com cama de areia, ventilação, cochos de cimento e bebedouros automáticos. Os alimentos foram oferecidos *ad libitum* (pelo menos 5-10% de sobras), duas vezes ao dia, às 8:00 e 16:00 h, na forma de ração completa com uma proporção de volumoso:concentrados de 50:50. Silagem de milho foi utilizada como volumoso e os concentrados foram constituídos por milho grão moído, farelo de soja, sal branco, suplemento mineral e aditivo alimentar, os quais foram misturados respeitando os níveis de inclusão para cada tratamento (Tabela 1). A dieta basal foi formulada no programa Spartan Dairy Ration Evaluator/Balanacer, versão 3.0.3 e avaliada segundo o NRC (2001), de modo a atender as exigências dos dois grupos de animais, sendo suplementadas com os seguintes níveis de taninos: 0%, sem taninos; 0,5% da MS; 1,0% da MS; 1,5% da MS; ajustados diariamente em função do consumo de MS (CMS) e misturados à dieta total antes de cada alimentação.

Foi utilizado como fonte de taninos um extrato comercial obtido de Acácia Negra - *Acacia mearnsii* (Seta Natur®, Rio Grande do Sul, Brasil). A concentração de fenóis totais (84,4% do extrato) foi determinada através do método de Folin-Ciocalteu (MAKKAR, 2003b) e os taninos totais (82,3% equivalente em ácido tânico) foram estimados pela diferença da concentração de fenóis totais antes e após tratamento com

polivinilpolipirrolidona insolúvel (MAKKAR et al., 1993). A concentração de TC (32,3% equivalente em leucocianidina) foi determinada através do método HCl-butanol (MAKKAR, 2003b). Para evitar o efeito negativo dos taninos sobre o CMS, níveis de baixo a moderado foram utilizados neste estudo, uma vez que Grainger et al. (2009) observaram redução no consumo alimentar usando apenas 0,9% na MS da dieta de vacas leiteiras.

Para a alimentação e coleta de fezes os animais foram alocados em delineamento quadrado latino 4x4 duplicado, em arranjo fatorial 2x4, sendo testados dois grupos distintos de animais (Leite e Carne) e quatro níveis de inclusão de taninos na dieta. Cada período experimental contou com 22 dias, sendo os primeiros 17 dias para adaptação à dieta e os últimos 5 dias para coleta de fezes, as quais foram coletadas manualmente via reto, às 8:00 e 16:00h, congeladas a -20°C formando uma única amostra composta por animal, em cada período. Amostras de urina foram obtidas de todas as vacas no 22º dia de cada período experimental, a cada 6 horas, durante micção estimulada por massagem na vulva, sendo então armazenadas a -20°C, em um único frasco, formando uma única amostra composta de 24 horas.

5.2.3 Substratos, delineamento experimental e tratamentos

As amostras compostas de fezes e urina foram diluídas em água, adotando-se o teor de sólidos totais (ST) de 6%, já que Lucas Junior et al. (1993) encontraram melhor produção de biogás em biodigestores tipo batelada quando o teor de ST do substrato foi menor que 8%. Foram preparados 3 kg de substrato, dos quais 2 kg foram utilizados para abastecimento dos biodigestores e 1 kg para realização das análises de caracterização dos substratos. Para a mistura de fezes e urina utilizou-se uma relação teórica dos dejetos de 75:25, respectivamente. A composição do substrato seguiu a seguinte proporção: 37,5% de dejetos, 10% de inóculo e 52,5% de água. Utilizou-se como inóculo o lodo de lagoa de tratamento de dejetos com as seguintes características: pH = 6,2; ST = 4,61%; SV/ST = 60,30%. Os biodigestores foram organizados em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo 2x4, sendo testados dois grupos genéticos distintos de bovinos (Taurino e Zebuino) e quatro níveis de inclusão de taninos na dieta (0, 0,5, 1,0 e 1,5% da MS), totalizando 32 unidades experimentais, sendo 8 tratamentos representados pelas fezes dos animais que receberam os diferentes níveis de taninos de *Acacia mearnsii* na dieta e o grupo genético, totalizando 4 repetições por tratamento. A biodigestão anaeróbia foi desenvolvida em condições mesofílicas (30 a 35°C),

ideais para a cinética de digestão (METCALF; EDDY, 2014), alocando-se os digestores dentro de uma câmara climática com sistema de aquecimento por resistência elétrica e controlador digital de temperatura. Os tratamentos e respectiva caracterização dos substratos estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Características dos substratos de biodigestores anaeróbios tipo batelada abastecidos com dejetos de grupos distintos de bovinos alimentados com diferentes níveis taninos de *Acacia mearnsii*

Nutrientes	Grupo (G)		Nível (N)			
	Taurino	Zebuino	0%	0,5%	1%	1,5%
ST, g/kg	45,5	49,3	49,3	47,6	47,5	45,2
SV, g/kg	36,8	39,4	38,6	37,7	38,5	37,7
N, g/kg ST	40,1	37,7	35,7	37,7	40,4	41,9
FDN, g/kg ST	558,2	474,2	465,8	496,1	525,0	577,8
FDA, g/kg ST	368,2	346,3	301,4	356,8	373,5	397,2

ST: Sólidos totais; SV: Sólidos voláteis; N: Nitrogênio; FDN: Fibra em detergente neutro; FDA: Fibra em detergente ácido.

Fonte: Perna Junior (2018).

5.2.4 Mensuração de biogás, CH₄, CO₂ e N₂O

Para avaliar o potencial de produção de gases dos dejetos foram utilizados biodigestores anaeróbios tipo batelada de bancada (Figura 12), constituídos, basicamente, por três cilindros retos de PVC com diâmetros de 15; 10 e 7,5 cm, com capacidade média de 2 litros de substrato em fermentação cada. Os cilindros de 15 e 7,5 cm encontravam-se inseridos um no interior do outro, de tal forma que o espaço existente entre a parede externa do cilindro interior e a parede interna do cilindro exterior comportava um volume de água (“selo de água”), atingindo profundidade de 60 cm. O cilindro de diâmetro intermediário possuía uma das extremidades vedadas, conservando-se apenas um registro para descarga do biogás, e estava emborcado no selo de água, para propiciar condições anaeróbias e armazenar o gás produzido.

Figura 12. Ilustração de biodigestor anaeróbio tipo batelada de bancada

Fonte: Perna Junior (2018).

Após abastecidos, os biodigestores foram acondicionados em uma câmara climática com temperatura controlada entre 30 e 35°C, garantindo que o teste de biodigestão anaeróbia ocorresse em condições mesofílicas. A temperatura ambiente foi monitorada por meio de termômetro digital (em °C), antes de cada leitura do biogás.

A frequência da medição do biogás foi realizada seguindo a capacidade do gasômetro. Após cada leitura, os gasômetros foram zerados utilizando-se o registro de descarga do biogás. O volume de biogás foi calculado pela multiplicação do deslocamento vertical do gasômetro pela área da seção transversal interna dos gasômetros, sendo corrigido para as condições de 1 atm e 20°C de acordo com a metodologia descrita por Lucas Junior (1994), onde, pelo fator de compressibilidade, o biogás apresenta comportamento próximo ao ideal. Para a correção do volume de biogás, foi utilizada a expressão resultante da combinação das leis de Boyle e Gay-Lussac:

$$\frac{V_0 P_0}{T_0} = \frac{V_1 P_1}{T_1}$$

Onde: V_0 = volume de biogás corrigido, m^3 ou L; P_0 = pressão corrigida do biogás, 10.322,27 mm de H_2O ; T_0 = temperatura corrigida do biogás, 293,15 K; V_1 = volume do gás no gasômetro; P_1 = pressão do biogás no instante da leitura, 10.344,11 mm de H_2O ; T_1 = temperatura do biogás, em K, no instante da leitura.

Considerando-se a pressão atmosférica média de Pirassununga igual a 10.273,11 mm de água e pressão conferida pelos gasômetros de 71 mm de água, obteve-se como resultado a seguinte expressão para correção do volume de biogás:

$$V_0 = \left(\frac{V_1}{T_1} \right) \times 293,7703$$

As amostragens de biogás foram realizadas sempre que o volume de biogás foi medido. As amostras foram coletadas usando uma seringa de 60 mL conectada ao registro de gás na parte superior do gasômetro. Antes da amostragem foi realizada a homogenização do biogás e a purga dos frascos de coleta (Frasco de 50 mL de vidro transparente 49×89×20 mm, Frascolex, São Paulo, Brasil) por duas vezes, sendo posteriormente injetados 50 mL de biogás para análise de sua composição. Após a amostragem de biogás os gasômetros foram esvaziados, permitindo assim novo acúmulo de gases. O teste foi encerrado quando cessou a produção de biogás, ou seja, não havia deslocamento do gasômetro.

As concentrações de CH_4 , CO_2 e N_2O foram determinadas por cromatografia gasosa (Trace 1300, Thermo Fisher Scientific®, Rodano, Milão, Itália), em ambiente com temperatura controlada (25°C), de acordo com Kaminski et al. (2003). As amostras de biogás foram diluídas em frascos de vidro com volume conhecido, 16,78 vezes em ar atmosférico. Manualmente, com auxílio de uma seringa, foram injetados 6 mL da amostra diluída no injetor do cromatógrafo (split/splitless), dos quais 4 mL foram utilizados para lavagem do sistema de injeção e 2 mL utilizados para análise, sendo 1 mL para o sistema com detector de ionização de chama (FID), responsável pela mensuração de CO_2 e CH_4 e 1 mL para o sistema com detector de captura de elétrons (ECD), responsável pela quantificação do N_2O . O cromatógrafo foi calibrado com 3,1% de CH_4 , 3,1% de CO_2 e 0,49% de N_2O , diluído em ar atmosférico. Foram utilizadas duas misturas gasosas como referência uma com 50% de CH_4 e 50% de CO_2 e outra com 10% N_2O em balanço com He (mol/mol). Utilizou-se hélio com fluxo de 30 mL/min como gás de arraste.

Os volumes de CH_4 , CO_2 e N_2O produzidos (m^3 ou L) foram calculados utilizando-se os dados de produção e composição do biogás de cada digestor, de acordo com a equação:

$$Vol = \frac{Vol_{BIOGÁS} * \% \text{ gás}}{100}$$

Onde: Vol = Volume (m³ ou L); Vol_{BIOGÁS} = Volume de biogás produzido (m³ ou L)
 % gás = Teor do gás de interesse no biogás (%).

O rendimento de CH₄, CO₂ e N₂O foram calculados dividindo-se a produção total de cada gás pela quantidade de SV adicionado ou reduzido (diferença entre SV adicionado e eliminado).

Para o estudo da cinética de produção do biogás e seus componentes foi utilizado o modelo matemático de Gompertz, sendo este modelo muito utilizado em estudos de crescimento e também de fermentação *in vitro*. Este modelo supõe que a taxa de produção de gases é proporcional à atividade microbiana, mas a proporcionalidade diminui com o tempo de incubação, o que pode ser interpretado como a perda de eficiência na taxa de fermentação (LAVRENCIC et al., 1997). A descrição matemática das curvas de produção de gases é uma valiosa informação que permite a análise dos dados, a comparação dos substratos e o desempenho da fermentação. A equação a seguir descreve o modelo utilizado:

$$y_t = A \exp [-B \exp (-kt)]$$

Onde: y_t: produção de gás (L/g SV adicionado) no tempo t (dia); A: assíntota do modelo, indica o valor de estabilização da produção (L/g SV adicionado) em relação ao tempo t; B: constante de integração, sem significado biológico; k: velocidade máxima de crescimento, função logarítmica do crescimento da produção (L/g SV adicionado) por unidade de tempo.

5.2.5 Remoção de nutrientes

Os substratos adicionados (abastecimento) e eliminados (saída) de cada biodigestor foram pesados e multiplicados pelo seu teor de MS, em porcentagem, para calcular o teor de MS em gramas. Os nutrientes adicionados e eliminados, expressos em g, foram calculados pela multiplicação entre o adicionado ou eliminado, expressos em grama de MS, sendo os nutrientes adicionados ou eliminados, expressos em porcentagem, divididos por 100 de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Nutriente (g)} = \frac{\text{Nutriente adicionado ou eliminado (\%)} \times \text{MS (g)}}{100}$$

As remoções de nutrientes, quando expresso em porcentagem, foram calculadas usando conteúdo de nutrientes adicionados e eliminados, expressas em gramas por quilograma de MS, de acordo com a equação:

$$\text{Nutriente removido (\%)} = \frac{\text{Nutriente adicionado (g)} - \text{Nutriente eliminado (g)}}{\text{Nutriente adicionado (g)}} \times 100$$

5.2.6 Análises laboratoriais

Amostras dos substratos antes e após digestão anaeróbia foram coletadas, sendo secas em estufa com ventilação e renovação de ar constante a 55°C durante 72 horas, segundo AOAC (1995). Após secas, as amostras foram moídas em moinho de facas, tipo willye, em peneiras de 1 mm e armazenadas em frascos devidamente fechados. A concentração de MS foi determinada a 105°C por 4h em estufa (método 930.15; AOAC, 1995). A matéria mineral (MM) foi obtida pela calcinação em forno mufla a 550°C durante 5h (AOAC, 1990). Os teores de sólidos totais (ST a 105°C = 100 – Umidade) e sólidos voláteis (SV = ST – MM) dos substratos foram determinados com adaptações à metodologia descrita em APHA (2005). O teor de N total foi determinado pela técnica micro-Kjeldahl (método 920.87; AOAC, 1990). A fibra em detergente neutro (FDN) e a fibra em detergente ácido (FDA) foram determinadas pelo método descrito por Van Soest et al. (1991), sendo a FDN obtida com o uso de α -amilase termoestável. O potencial hidrogeniônico (pH) foi medido por pHmetro portátil (Hanna Instruments®, HI 8424, Itália).

5.2.7 Análises estatísticas

Os dados foram analisados utilizando-se o programa Statistical Analysis System (SAS 9.3, Institute Inc., 2013, Cary, NC, EUA). Antes das análises propriamente ditas, os dados foram avaliados em relação à presença de informações discrepantes (“outliers”) e normalidade dos resíduos pelo teste Shapiro-Wilk. Quando a premissa de normalidade não foi atendida, recorreu-se à transformação dos dados. Os dados foram submetidos à análise de variância, que separou como causas de variação efeito de nível de taninos, grupo de animais e sua interação como efeitos fixos. O efeito de nível de taninos foi decomposto pelo uso de polinômios ortogonais, separando-se os efeitos em linear, quadrática e desvio da quadrática. Adotou-se nível de significância de 5%. O modelo estatístico utilizado está descrito conforme a equação abaixo:

$$Y_{ijkl} = \mu + N_i + G_j + N_i * G_j + e_{ijkl}$$

Onde: Y_{ijkl} = observação referente ao Nível (i) + Genética (j) + Nível (i)*Genética (j) + erro aleatório associado a cada observação (e_{ijkl}); μ = média geral.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Biodigestão e remoção de nutrientes

Os dejetos adicionados nos digestores, oriundos dos animais do grupo leite, apresentaram maior quantidade de FDN e FDA ($P < 0,05$) que os do grupo carne, sendo maiores em 10,77 e 8,13%, respectivamente. Adicionalmente, o aumento dos níveis de taninos na dieta promoveu aumento linear ($P < 0,05$) na quantidade de N, FDN e FDA dos dejetos adicionados (Tabela 17).

Tabela 17. Biodigestão e eficiência de remoção de nutrientes de biodigestores anaeróbios tipo batelada abastecidos com dejetos de grupos distintos de bovinos alimentados com diferentes níveis taninos de *Acacia mearnsii*

Variável	Grupo (G)		Nível (N)				EPM	Probabilidade		
	Taurino	Zebuíno	0%	0,5%	1,0%	1,5%		G	N	G*N
Nutrientes adicionados										
ST, g	91,09	98,52	98,55	95,17	94,97	92,52	2,05	0,0861	NS	NS
SV, g	73,63	77,77	77,15	75,44	76,95	75,27	1,58	NS	NS	NS
N, g	3,67	3,68	3,46	3,69	3,75	3,77	0,04	NS	0,0104 ^L	NS
FDN, g	49,89	45,04	45,36	46,15	49,41	50,93	0,83	0,0104	0,0036 ^L	NS
FDA, g	36,72	33,96	30,6	34,26	36,85	37,66	1,08	0,0764	0,0149 ^L	NS
Nutrientes eliminados										
ST, g	71,40	79,75	78,65	77,91	76,91	75,03	2,07	0,0031	NS	NS
SV, g	51,55	56,72	54,85	54,92	53,97	55,81	1,73	0,0058	NS	NS
N, g	2,29	2,48	2,24	2,33	2,42	2,74	0,06	0,0034	0,0005 ^L	NS
FDN, g	27,72	30,59	28,15	29,39	29,96	31,29	1,22	NS	NS	NS
FDA, g	24,74	26,95	24,19	27,10	28,64	29,47	0,90	0,0748	0,0315 ^L	NS
pH	7,16	7,27	7,28	7,24	7,20	7,15	0,02	0,0060	0,0140 ^L	NS
Eficiência de Remoção										
ST, %	21,62	19,05	20,19	18,14	19,02	18,90	0,95	NS	NS	NS
SV, %	29,99	27,07	28,90	27,20	29,86	25,85	1,06	NS	NS	NS
N, %	38,22	30,82	36,50	36,61	35,47	29,42	1,72	0,0293	NS	NS
FDN, %	44,44	32,08	37,94	36,32	39,36	38,56	2,73	0,0282	NS	NS
FDA, %	32,63	20,64	20,95	20,90	22,28	21,75	2,67	0,0031	NS	NS

EPM: Erro padrão da média; G*N: Interação entre Grupo e Nível; ST: Sólidos totais; SV: Sólidos voláteis; PB: Proteína bruta; FDN: Fibra em detergente neutro; FDA: Fibra em detergente ácido.

Fonte: Perna Junior (2018).

A quantidade de ST, SV e N eliminados, ou seja, que restaram após o processo de biodigestão anaeróbia, foram maiores ($P < 0,05$) em 11,69, 10,03 e 8,30%, para os animais do grupo carne comparado aos do grupo leite, respectivamente. O pH, após o processo de biodigestão, foi 1,54% maior para os dejetos do grupo carne comparado ao leite.

Adicionalmente, com o aumento dos níveis de taninos na dieta houve redução linear do pH dos dejetos biodegradados. O aumento dos níveis de taninos na dieta promoveu aumento linear ($P<0,05$) na quantidade de N e FDA eliminados. Os diferentes níveis de taninos na dieta não causaram diferenças significativas na eficiência de remoção dos nutrientes, no entanto, os animais do grupo leite apresentaram maior eficiência de remoção para a N, FDN e FDA comparado aos animais do grupo carne (Tabela 17).

5.3.2 Produção de biogás

Os dejetos dos animais do grupo leite apresentaram maior taxa de crescimento (k) para a produção de CH_4 ($P<0,05$) que os do grupo carne. Adicionalmente, apresentaram menor tempo para atingir o ponto de inflexão (t) (Figura 13). O ponto de inflexão (t) para a produção de CO_2 também foi menor ($P<0,05$) para os dejetos do grupo leite comparado ao carne (Figura 14). A proporção de CO_2 , em porcentagem, foi reduzida linearmente ($P<0,05$) com o aumento dos níveis de taninos na dieta (Tabela 18).

Figura 13. Produção de CH_4 , ajustado pelo modelo de Gompertz, em biodigestores tipo batelada abastecidos com dejetos de grupos distintos de bovinos alimentados com diferentes níveis taninos de *Acacia mearnsii*

Fonte: Perna Junior (2018).

Figura 14. Produção de CO₂, ajustado pelo modelo de Gompertz, em biodigestores tipo batelada abastecidos com dejetos de grupos distintos de bovinos alimentados com diferentes níveis taninos de *Acacia mearnsii*

Fonte: Perna Junior (2018).

Tabela 18. Produção de biogás, CH₄, CO₂ e N₂O em biodigestores tipo batelada abastecidos com dejetos de grupos distintos de bovinos alimentados com diferentes níveis taninos de *Acacia mearnsii*

Variável	Genética (G)		Nível (N)				EPM	Probabilidade		
	Taurino	Zebuino	0%	0,5%	1,0%	1,5%		G	N	G*N
Biogás, L	36,27	36,42	34,77	37,26	36,89	36,46	0,65	NS	NS	NS
CH ₄ , L	25,22	26,11	25,03	26,20	26,40	25,09	0,45	NS	NS	NS
CH ₄ , %	71,45	73,93	73,48	71,99	72,42	70,58	0,36	NS	NS	NS
CH ₄ /fezes, L/g	0,042	0,043	0,042	0,043	0,044	0,042	0,0007	NS	NS	NS
CH ₄ /SV adicionado										
A, L/g	0,393	0,432	0,419	0,445	0,385	0,403	0,02	NS	NS	NS
k, L/g.dia	0,039	0,026	0,026	0,031	0,031	0,035	0,003	0,0355	NS	NS
t, dia	39,28	61,35	51,02	47,87	44,51	57,86	5,49	0,0394	NS	NS
y, L/g	0,145	0,162	0,154	0,163	0,142	0,145	0,006	NS	NS	NS
CH ₄ /SV reduzido, L/g	1,11	1,26	1,24	1,07	1,18	1,23	0,051	NS	NS	NS
CO ₂ , L	11,00	10,87	9,99	11,05	11,58	11,11	0,21	NS	NS	NS
CO ₂ , %	28,54	28,15	27,09	28,06	29,28	28,92	0,21	NS	0,0035 ^L	NS
CO ₂ /fezes, L/g	0,018	0,018	0,017	0,018	0,019	0,018	0,0003	NS	NS	NS
CO ₂ /SV adicionado										
A, L/g	0,161	0,168	0,150	0,178	0,159	0,169	0,008	NS	NS	NS
k, L/g.dia	0,029	0,0216	0,019	0,034	0,029	0,019	0,003	NS	NS	NS
t, dia	36,82	64,45	53,99	52,47	47,96	48,12	5,76	0,0387	NS	NS
y, L/g	0,059	0,061	0,055	0,065	0,059	0,062	0,003	NS	NS	NS
CO ₂ /SV reduzido, L/g	0,479	0,523	0,488	0,442	0,518	0,557	0,020	NS	NS	NS
N ₂ O, mL	8,02	8,95	8,868	6,948	9,336	8,784	0,38	NS	NS	NS
N ₂ O, %	0,023	0,028	0,026	0,022	0,026	0,025	0,0013	0,0645	NS	NS
N ₂ O /fezes, mL/g	0,013	0,016	0,016	0,012	0,016	0,014	0,0007	NS	NS	NS
N ₂ O /SV adicionado										
A, mL/g	0,122	0,115	0,083	0,122	0,131	0,138	0,009	NS	NS	NS
k, mL/g.dia	0,035	0,024	0,020	0,031	0,035	0,031	0,003	NS	NS	NS
t, dia	40,29	57,31	43,76	47,35	47,63	56,47	5,24	NS	NS	0,0759
y, mL/g	0,046	0,042	0,03	0,046	0,048	0,050	0,003	NS	NS	NS
N ₂ O/SV reduzido, mL/g	0,362	0,496	0,461	0,391	0,428	0,437	0,030	NS	NS	NS

EPM: Erro padrão da média; G*N: Interação entre Genética e Nível; A: Produção assintótica (L/g de SV adicionado); k: constante de produção (L/g de SV adicionado por dia); t: tempo no ponto de inflexão (dia); y: produção no ponto de inflexão (L/g de SV adicionado).

Fonte: Perna Junior (2018).

5.4 DISCUSSÃO

O uso de biodigestores anaeróbios, em condições controladas de temperatura, foi uma estratégia do presente experimento no intuito de promover a máxima atividade dos diversos grupos microbianos que convertem o substrato orgânico complexo em biogás através da cadeia trófica anaeróbia, pois a grande maioria dos microrganismos anaeróbios se

desenvolvem melhor em temperaturas que variam entre 20°C e 40°C (GAVALA et al., 2003). Segundo Dohányos e Zábranská (2001), a eficiência de remoção da matéria orgânica (representada pelos SV) normalmente se situa entre 25-50% em reatores operados em temperaturas mesofílicas, estando de acordo aos valores de aproximadamente 30% encontrados no presente experimento.

Hegarty (2004), em sua revisão sobre os diferentes genótipos e seu impacto sobre a função do trato digestivo de ruminantes, afirma que existem diferenças significativas na função digestiva entre espécies, raças e dentro de raças. Adicionalmente, sabe-se que existem diferenças entre zebuínos e taurinos quanto ao aproveitamento dos nutrientes e desempenho zootécnico (LEDGER et al., 1970; FRISCH; VERCOE, 1977; VALADARES FILHO et al.; 1985). No presente experimento, observou-se que os zebuínos, representados pelo grupo carne, possivelmente tiveram um melhor aproveitamento dos nutrientes da dieta e por consequência a geração de dejetos com menor quantidade de nutrientes, o que justifica terem uma pior eficiência de remoção dos nutrientes no processo de digestão anaeróbia, quando comparado aos dejetos dos taurinos, representado pelos animais do grupo leite (Tabela 17).

Os taninos são conhecidos pela formação de complexos com os nutrientes da dieta, principalmente com as proteínas (KUMAR; SINGH, 1984), o que pode resultar em redução da digestibilidade dos nutrientes (FRUTOS et al., 2004) e consequente aumento da excreção destes nas fezes, como pode ser observado na presente pesquisa, com aumento das quantidades de N, FDN e FDA nos dejetos utilizados para abastecimento dos digestores anaeróbios experimentais (Tabela 17). No entanto, as doses de taninos utilizadas na dieta dos animais, na presente pesquisa, não foram suficientes para modificar a eficiência de remoção dos nutrientes.

A investigação do potencial de produção de CH₄ é um pré-requisito para prever melhor a emissão de CH₄ por biodigestão anaeróbia ou durante o armazenamento de fezes em condições anaeróbias (BLOOMBERG et al., 2011). A produtividade do CH₄, em termos de SV adicionado, é tida como o rendimento final do CH₄ (IPCC, 2006). Já a produtividade específica do CH₄, é medida em termos de SV reduzidos, correspondendo ao rendimento teórico do CH₄ (IPCC, 2006). O rendimento final do CH₄ será sempre menor do que o rendimento teórico porque uma fração do substrato é usada para sintetizar massa microbiana (FRANCO et al., 2007). Møller et al. (2004) relataram emissões de 0,4 L de CH₄ por grama de SV de dejetos bovinos, mantidos em sistemas de tratamento com lagoas anaeróbias, estando próximo a 0,34 L/g de SV adicionado, em média, encontrado no presente estudo. No entanto, deve-se considerar que o rendimento de CH₄ de dejetos de diferentes origens pode ser

altamente variável e é afetado por vários fatores, incluindo: espécie, raça, estágio de crescimento dos animais, alimento, quantidade e tipo de material de cama, bem como dos processos de degradação durante o pré-armazenamento (ANGELIDAKI; AHRING, 2000).

Diferente de nossa hipótese, os taninos não foram capazes de promover alterações na produção de CH_4 . Hao et al. (2011), utilizando a inclusão de 25g/kg da dieta de TC de *A. mearnsii* para bovinos confinados, também não encontraram aumento nas emissões de GEE (CO_2 , CH_4 e N_2O), quando realizada a compostagem dos dejetos como forma de tratamento dos resíduos. Um fato que pode ter contribuído à falta de alteração da produção de CH_4 , no presente experimento, pode ser devido aos níveis de inclusão de taninos na dieta dos animais, uma vez que estes níveis são considerados de baixo a moderado e foram intencionalmente utilizados para não causar efeito de redução de consumo alimentar pelos animais, devido ao conhecido efeito adstringente destes compostos (MAKKAR et al., 1995; GRAINGER et al., 2009). No entanto, os substratos dos diferentes grupos genéticos avaliados demonstraram que a taxa de crescimento da produção de CH_4 e CO_2 foram maiores para os dejetos dos taurinos (Tabela 18), fazendo com que o tempo necessário para atingir o ponto de inflexão da curva, ou seja, o potencial máximo de produção, ocorresse 22 (Figura 13) e 25 (Figura 14) dias antes que os dejetos dos zebuínos, respectivamente. Fato este de grande relevância, pois pode contribuir para redução do Tempo de Residência (TR), o qual indica o tempo em que a fração líquida dos resíduos permanece no digestor em contato com a biomassa (METCALF; EDDY, 2014), sendo o tempo necessário para atingir um determinado grau de tratamento dos dejetos dependente da taxa de metabolismo microbiano.

A concentração de oxigênio dissolvido é o parâmetro mais importante na emissão de N_2O , tanto na nitrificação quanto na desnitrificação. Na nitrificação, maximiza a produção de N_2O quando em baixas concentrações (KAMPSCHREUR et al., 2008) e na desnitrificação inibe a expressão da óxido nítrico redutase, que, por ter maior inibição pelo oxigênio que as demais enzimas envolvidas, faz com que o N_2O acumule no meio (TSUNEDA et al., 2005). A relação entre carbono e nitrogênio (C/N) também é um importante parâmetro de controle de produção de N_2O . Itokawa et al. (2001) realizaram experimentos com relações C/N de 2,4, 3,5 e 5,0 e observaram emissões de 24,4; 59,2 e 0%, respectivamente, de N_2O relativo ao nitrogênio removido. Em outro estudo, observou-se que em relações C/N entre 1,56 e 2,38 ocorreu redução de todo o NO_3^- , porém com significativa quantidade de N_2O presente na fração gasosa. Assim como esperado, no presente experimento a produção de N_2O não sofreu interferência pelo tipo de substrato nem pelos níveis de taninos, provavelmente por ocorrer em condições experimentais estritas de anaerobiose e devido à elevada relação C/N, pois de

acordo com Bernet et al. (1996) em relação C/N acima de 18, como facilmente encontrada em dejetos animais, observa-se completa desnitrificação, ou seja, sem presença de N₂O.

5.5 CONCLUSÃO

A biodigestão anaeróbia representa uma alternativa para o tratamento de resíduos, pois além de permitir a redução do potencial poluidor dos dejetos, promove a geração do biogás. A utilização de extrato de *Acacia mearnsii* até 1,5% da MS da dieta de bovinos não promoveu alterações na eficiência de remoção dos nutrientes, nem na produção de biogás e seus compostos (CH₄, CO₂ e N₂O). As taxas de produção de CH₄ e CO₂ foram influenciadas pela composição dos dejetos dos diferentes grupos de bovinos avaliados, sendo mais acentuada para os taurinos, podendo ser um fator positivo para redução do Tempo de Residência. Avaliando apenas o potencial de produção de biogás e por não ocorrer aumento da produção de GEE, este seria um fato positivo do ponto de vista ambiental, por outro lado, do ponto de vista de geração de energia, este seria sem relevância. Portanto, os taninos podem ser utilizados como aditivos para manipulação da fermentação ruminal, sem apresentar efeitos compensatórios indesejáveis quanto à emissão de gases pelas fezes.

REFERÊNCIAS

- AHRING, B. K.; IBRAHIM, A. A.; MLADENOVSKA. Effect of temperature increase from 55 to 65°C on performance and microbial population dynamics of an anaerobic reactor treating cattle manure. **Water Research**, v. 35, n. 10, p. 2246-2452, 2001.
- ANGELIDAKI, B. K.; AHRING, B. K. Methods for increasing the biogas potential from the recalcitrant organic matter contained in manure. **Water Science and Technology**, v. 41, n. 3, p. 189-194, 2000.
- AMON, T.; AMON, B., KRYVORUCHKO, V.; ZOLLITSCH, W.; MAYER, K.; GRUBER, L. Biogas production from maize and dairy cattle manure – Influence of biomass composition on the methane yield. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 118, p. 173–182, 2007.
- AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15 ed., Washington, DC, USA, 1990.
- AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of Analysis**. 16 ed. Virginia, USA, 1995.
- APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 22^a ed. Washington, DC, USA, Water Works Association, 2005. 1368p.
- BERNET, N.; DELGENES, N.; MOLETTA, R. Denitrification by anaerobic sludge in piggery wastewater. **Environmental Technology**, v. 17, n. 3, p. 293-300, 1996.
- BLOOMBERG, B. D.; HILTON, G. G.; HANGER, K. .; RICHARDS, C. J.; MORGAN, J. B.; VANOVERBEKE, D. L. Effects of vitamin E on colour stability and palatability of strip loin steaks from cattle fed distillers grains. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 3769-3782, 2011.
- CARULLA, J. E.; KREUZER, M.; MACHMÜLLER, A.; HESS, H. D. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 56, n. 9, p. 961–970, 2005.
- DOHÁNYOS, M.; ZÁBRANSKÁ, J. Anaerobic digestion. In: SPINOSA, L.; VESILIND, P.A. (Ed). **Sludge into biosolids**, IWA Publishing, United Kingdom, p. 223-241, 2001.
- EPA. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Global Anthropogenic Non-CO₂ Greenhouse Gas Emissions: 1990–2020**. Publication 430-R-06-003. EPA, Washington, DC, USA, 2006.
- FRANCO, A.; MOSQUERA-CORRAL, A.; CAMPOS, J. L.; ROCA, E. Learning to operate anaerobic bioreactors. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology**. Badajoz: Formatex, 2007. v. 2, p. 618-627.
- FRISCH, J. E.; VERCOE, J. E. Food intake, eating rate, weight gains, metabolic rate and efficiency of feed utilization in *Bos taurus* and *Bos indicus* crossbred cattle. **Animal Production**, v. 24, n. 1, p. 343-358, 1977.
- FRUTOS, P.; HERVÁS, G.; GIRÁLDEZ, F. J.; MANTECÓN, A. R. Review. Tannins and ruminant nutrition. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 2, n. 2, p. 191-202, 2004.

GAVALA, H. N.; YENAL, U.; SKIADAS, I. V.; WESTERMANN, P.; AHRING, B. K. Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of primary and secondary sludge: effect of pre-treatment at elevated temperature. **Water Research**, v. 37, n. 19, p. 4561-4572, 2003

GRAINGER, C.; CLARKE, T.; AULDIST, M. J.; BEAUCHEMIN, K. A.; MCGINN, S. M.; WAGHORN, G. C.; ECKARD, R. J. Potencial use of *Acacia mearnsii* condensed tannins to reduce methane emissions and nitrogen excretion from grazing dairy cows. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 89, p. 241-251, 2009.

HAO, X.; BENKE, M. B.; LI, C.; LARNEY, F. J.; BEAUCHEMIN, K. A.; McALLISTER, T. A. Nitrogen transformations and greenhouse gas emissions during composting of manure from cattle fed diets containing corn dried distillers grains with solubles and condensed tannins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 166, p. 539-549, 2011.

HINDRINCHSEN, I. K.; WETTSTEIN, H. R.; MACHMULLER, A.; KREUSER, M. Methane emission, nutrient degradation and nitrogen turnover in dairy cows and their slurry at different milk production scenarios with and without concentrate supplementation. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 113, n. 1/4, p. 150-161, 2006.

HEGARTY, R. S. Genotype differences and their impact on digestive tract function of ruminants: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 44, p. 459-467, 2004.

IPCC. INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. Emissions from livestock and manure management. In: **IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories, v. 4 Agriculture, forestry and land use**. Hayama: Institute for Global Environmental Strategies, 2006.

IPCC. INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. Climate change 2007: the physical science basis. In: **Working Group I to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. United Kingdom and New York: Cambridge University Press, Cambridge, 2007.

ITOKAWA, H.; HANAKI, K.; MATSUO, T. Nitrous oxide production in high-loading biological nitrogen removal process under low COD/N ratio condition. **Water Research**, v. 35, n. 3, p. 657-64, 2001.

JARRET, G.; CERISUELO, A. L.; PEU, P.; MARTINEZ, J.; DOURMAD, J. Impact of pigs diets with different fibre contents on the composition of excreta and their gaseous emissions and anaerobic digestion. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 160, p. 51-58, 2011. doi: 10.1016/j.agee.2011.05.029.

KAMINSKI, M.; KARTANOWICS, R.; JASTRZEBSKI, D.; KAMINSKI, M. M. Determination of carbon monoxide, methane and carbon dioxide in refinery hydrogen gases and air by gas chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 989, p. 277-283, 2003.

KAMPSCHREUR, M. J.; TAN, N. C.; KLEEREBEZEM, R.; PICIOREANU, C.; JETTEN, M. S.; VAN LOOSDRECHT, M. C. Effect of dynamic process conditions on nitrogen oxides emission from a nitrifying culture. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 2, p. 429-35, 2008.

KÜLLING, D. R.; DOHME, F.; MENZI, H.; SUTTER, F.; LISCHER, P.; KREUZER, M. Methane emissions of differently fed dairy cows and corresponding methane and nitrogen emissions from their manure during storage. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 79, p. 129 - 150, 2002.

KUMAR, R.; SINGH, M; Tannins: their adverse role in ruminant nutrition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 32, p. 447-453, 1984.

LAVRENCIC, A.; STEFANON, B.; SUSMEL, P. An evaluation of the Gompertz model in degradability studies of forage chemical components. **Animal Science**, v. 64, p. 423-431, 1997.

LEDGER, H. P.; ROGERSON, A.; FREEMAN, G. H. Further studies on the voluntary food intake of *Bos indicus* and *Bos taurus* and crossbred cattle. **Animal Production**, n. 12, p. 425-431, 1970.

LUCAS JUNIOR, J.; ORTOLANI, A.; BENINCASA, M.; IMADA, R. Y. Avaliação do uso de inóculo no desempenho de biodigestores abastecidos com dejetos de frangos de corte com cama de maravalha. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 22. 1993, Ilhéus. **Anais...** Ilhéus: SBEA/CEPLAC, v. 2, p. 915-930, 1993.

LUCAS JUNIOR, J. **Algumas considerações sobre o uso do estrume de suínos como substrato para três sistemas de biodigestores anaeróbios**. 1994. 137f. Tese (Livre Docência Construções Rurais) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1994.

MAKKAR, H. P. S.; BLÜMMEL, M.; BOROWY, N. K.; BECKER, K. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. **Journal of Food Science and Technology**, v. 61, p. 161-165, 1993.

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

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, 2003a.

MAKKAR, H. P. S. **Quantification of tannins in tree and shrub foliage: a laboratory manual**. Springer, Netherlands, 2003b.

METCALF, L.; EDDY, H. **Wastewater engineering: Treatment and resource recovery**. 5.ed. New York: McGraw-Hill, 2014, 2048 p.

MOOLER, H. B.; SOMMER, S. G.; AHRING, B. K. Methane productivity of manure, straw and solid fractions of manure. **Biomass Bioenergy**, v. 26, p. 485-495, 2004.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7.ed. Washington D.C. National Academies Press, USA, 2001. 381 p.

PERNA JUNIOR, F.; CASSIANO, E. C. O.; MARTINS, M. F.; ROMERO, L. A.; ZAPATA, D. C. V.; PINEDO, L. A.; MARINO, C. T.; RODRIGUES, P. H. M. Effect of tannins-rich extract from *Acacia mearnsii* or monensin as feed additives on ruminal fermentation efficiency in cattle. **Livestock Science**, n. 203, p. 21-29, 2017.

SAS. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **User's guide. 9.3**. Cary, NC, USA: SAS Inst, Inc, 2013.

TSUNEDA, S.; MIKAMI, M.; KIMOCHI, Y.; HIRATA, A. Effect of salinity on nitrous oxide emission in the biological nitrogen removal process for industrial wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, v. 119, n. 1-3, p. 93-108, 2005.

VALADARES FILHO, S. C.; COELHO DA SILVA, J. F.; LEÃO, M. I.; GONÇALVES, C. A. C.; GARCIA, J. A. Óxido crômico e lignina na determinação dos fluxos de matéria seca abomasal, ileal e fecal em bovinos e bubalinos. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.14, n.5, p. 565-574, 1985.

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

WANG, Z.; GOONEWARDENE, L. A. The use of MIXED models in the analysis of animal experiments with repeated measures data. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 84, p. 1–11, 2004.

WOODWARD, S. L.; WAGHORN, G. C.; ULYATT, M. J.; LASSEY, K. R. Early indication that feeding *lotus* will reduce methane emission from ruminants. **Proceedings of New Zealand Society of Animal Production**, n. 61, p. 23–26, 2001.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os taninos do extrato de *Acacia mearnsii* afetam bruscamente a digestibilidade da dieta, o que pode promover um potente efeito negativo sobre a fermentação ruminal. No entanto, a utilização destes taninos até níveis de 1,5% da MS da dieta não afetou o consumo alimentar, demonstrando ser uma opção segura como aditivo alimentar para bovinos de distintos grupos genéticos. Pode-se demonstrar que os limiares de 0,72 e 0,85% de taninos na dieta são pontos de inflexão para a redução linear da produção de CH₄ e N microbiano, respectivamente, ou seja, a partir deste níveis iniciam-se importantes alterações no metabolismo ruminal. Fatos estes de grande relevância, demonstrando que os taninos atuam, majoritariamente, de forma indireta sobre a produção de CH₄, mas podem ter atuado diretamente sobre as *archeas* metanogênicas, contribuindo para a redução das emissões de CH₄.

Independentemente do aditivo utilizado zebuínos apresentaram maior eficiência fermentativa em relação aos taurinos, produzindo mais AGCC e conseqüentemente mais CH₄ ruminal. No entanto, isso não indica que zebuínos sejam menos eficientes energeticamente ou mais poluidores ao meio ambiente, mas sim que estes parâmetros devem ser levados em consideração dentro de sistemas de produção que se enquadrem à aptidão animal em questão.

O tratamento dos dejetos destes animais, por digestão anaeróbia, demonstrou que os taninos de *A. mearnsii* e os dois grupos genéticos avaliados não são capazes de promover alterações na produção de biogás e seus compostos (CH₄, CO₂ e N₂O). Este seria um fato positivo do ponto de vista ambiental (sem aumento da produção de GEE), por outro lado, do ponto de vista de geração de energia, este seria sem relevância. Portanto, os taninos podem ser utilizados como aditivos para manipulação da fermentação ruminal, sem apresentar efeitos compensatórios indesejáveis quanto à emissão de gases pelas fezes.

Em geral, o uso de extrato de *Acácia mearnsii* até níveis de 1,5% da MS da dieta demonstrou ser uma opção segura como aditivo alimentar para bovinos de grupos genéticos distintos, sendo que níveis entre 0,5 e 1,0% da MS da dieta demonstram ser indicativos de início de mudanças para a maioria das características ingestivas e digestivas avaliadas neste estudo, cabendo uma avaliação criteriosa dos seus efeitos adversos, em termos nutricionais, sobre a produtividade animal.

REFERÊNCIAS

- AHRING, B. K.; IBRAHIM, A.; MLADENOVSKA, A. Effect of temperature increase from 55 to 65°C on performance and microbial population dynamics of an anaerobic reactor treating cattle manure. **Water Research**, v. 35, n. 10, p. 2246-2452, 2001.
- AMON, T.; AMON, B.; KRYVORUCHKO, V.; ZOLLITSCH, W.; MAYER, K.; GRUBER, L. Biogas production from maize and dairy cattle manure – Influence of biomass composition on the methane yield. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.118, p.173–182, 2007.
- ANDERSON, K. L.; NAGARAJA, T. G.; MORRILL, J. L.; AVERY, T. B.; GALITZER S. J.; BOYER, J. E. Ruminant microbial development in conventionally or early-weaned calves. **Journal of Animal Science**, v. 64, n. 4, p.1215-1226, 1987.
- BAKER, S. K. Rumen methanogens and inhibition of methanogenesis. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 50, n. 8, p.1293-1298, 1999.
- BALOGUN, R. O.; JONES, R. J.; HOLMES, J. H. G. Digestibility of some tropical browse species varying in tannin content. **Animal Feed Science and Technology**, v. 76, p. 77-88, 1998.
- BARRY, T. N.; McNABB, W. C. The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperature foreges fed to ruminants. **British Journal of Nutrition**, n. 81, 263-272, 1999.
- BATSTONE, D. J.; KELLER, J.; ANGELIDAKI, I.; KALYUZHNYI, S.; PAVLOSTATHIS, S.; ROZZI, A.; SANDERS, W.; SIEGRIST, H.; VAVILIN, V. The IWA Anaerobic Digestion Model No 1. **Water Science & Technology**, v. 45, n. 10, p. 65-73, 2002.
- BEAUCHEMIN, K. A.; MCGINN, S. M. Methane emissions from beef cattle: effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 6, p. 1489-1496, 2006.
- BEAUCHEMIN, K. A.; MCGINN, S. M.; MARTINEZ, T. F.; MCALLISTER, T. A. Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 8, p. 1990-1996, 2007.
- BEAUCHEMIN, K. A.; KREUZER, M.; O'MARA, F.; MCALLISTER, T. A. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, 48, 21–27, 2008.
- BENTO, B. H. L.; ACAMOVIC, T.; MAKKAR, H. P. S. The influence of tannin, pectin, and polyethylene glycol on attachment of ¹⁵N–labelled rumen microorganisms to cellulose, **Animal Feed Science and Technology**, v. 122, p. 41–57, 2005.
- BERCHIELLI, T. T.; MESSANA, J. D.; CANESIN, R. C. Produção de metano entérico em pastagens tropicais. **Revista Brasileira de Saúde Produção Animal**, v.13, n.4, p.954-968, 2012.
- BERNDT, A. Estratégias nutricionais para redução de metano. In: IV CONGRESSO LATINO AMERICANO DE NUTRIÇÃO ANIMAL - CLANA, 2010, Estância de São Pedro, SP. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2010. p. 295-306.
- BHATTA, R.; UYENO, Y.; TAJIMA, K.; TAKENAKA, A.; YABUMOTO, Y.; NONAKA, I.; ENISHI, O.; KURIHARA, M. Difference in the nature of tannins on in vitro ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. **Journal of Dairy Science**, n. 92, p. 5512–5522, 2009.

- BODAS, R. N.; PRIETO, N. R.; GARCÍA-GONZÁLEZ, R. S.; ANDRÉS, S.; GIRÁLDEZ, F. J.; LÓPEZ, S. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. **Animal Feed Science and Technology**, n. 176, p. 78–93, 2012.
- BUDDLE, B. M.; DENIS, M.; ATTWOOD, G. T.; ALTERMANN, E.; JANSSEN, P. H.; RONIMUS, R. S.; PINARES-PATÍÑO, C. S.; MUETZEL, S.; NEIL WEDLOCK, D. Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pasture. **The Veterinary Journal**, v.188, n.1, p.11-17, 2011.
- CARULLA, J. E.; KREUZER, M.; MACHMÜLLER, A.; HESS, H. D. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 56, n. 9, p. 961–970, 2005.
- CARVALHO, F. A. N.; BARBOSA, F. A.; MCDOWELL, L. R. **Nutrição de Bovinos a Pasto**. 2. ed. Belo Horizonte: Papelform, 2003. p. 428.
- CECCHI, F.; BATTISTONI, P.; PAVAN, P.; BOLZONELLA, D.; INNOCENTI, L. **Digestione anaeróbica dela frazione organica dei rifiuti solidi. Aspetti fondamentali, progettuali, gestionali, di impatto ambientale ed integrazione com la depurazione delle acque reflue**. APAT–Manuali e linee guida, n. 13, 2005.
- CHAGUNDA, M. G. G.; ROSS, D.; ROBERTS, D. J. On the use of a Laser Methane Detector in dairy cows. **Computers and Electrics in Agriculture**, v. 68, p. 157–160, 2009.
- CHAGUNDA, M. G. G. Opportunities and challenges in the use of the Laser Methane Detector to monitor enteric methane emissions from ruminants. In. The Animal Consortium 2013. **Animal**, v. 7, p. 394–400, 2013.
- CHALUPA, W. Manipulating rumen fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 46, n. 3, p. 585-599, 1977.
- CHALUPA, W. Rumen bypass and protection of proteins and amino acids. **Journal of Dairy Science**, v. 58, n. 8, p. 1198-1218, 1975.
- CHERNEY, D. J. R.; SICILIANO, J. J.; PELL, A. N. Technical note: forage “in vitro” dry matter digestibility as influenced by fiber source in the donor cow diet. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 1335-1338, 1993.
- CHERNICHARO, C. A. L. **Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias; Reatores Anaeróbios**. 2.ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais, 1997. 380 p.
- CHURCH, D.C. **El Rumiente: fisiologiadigestiva y nutrición**. Ed. Acribia. Zaragoza. 630p, 1998.
- CIESLAK, A.; ZMORA, P.; PERS-KAMCZYC, E.; SZUMACHER-STRABEL, M. Effects of tannins source (*Vaccinium vitis idaea* L.) on rumen microbial fermentation *in vivo*. **Animal Feed Sciences and Technology**, n. 176, p. 102–106, 2012.
- CIESLAK, A.; SZUMACHER-STRABEL, M.; STOCHMAL, A.; OLESZEK, W. Plant components with specific activities against rumen methanogens. **Animal**, v. 7:s2, p. 253-265, 2013. doi: 10.1017/S1751731113000852
- EPA. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. DRAFT: **Global Anthropogenic Non-CO₂ Greenhouse Gas Emissions: 1990–2030**. Publication 430-D-11-003. EPA, Washington, DC, USA, 2011.

FERGUSON, K. A. The protection of dietary proteins and aminoacids against microbial fermentation in the rumen. In: **Digestion and Metabolism in the ruminant**. MCDONALD, W.; WARNER, A. C. I. (Ed.). Armidale: University of New England Publish Unit, 1975. p. 448-464.

FIELD, J. A.; KORTEKAAS, S.; LETTINGA, G. The tannin theory of methanogenic toxicity. **Biological Wastes**, v. 29, p. 241–262, 1989.

FINLAY, B. J.; ESTEBAN, G.; CLARKE, K. J.; WILLIAMS, A. G.; EMBLEY, T. M.; HIRT, R. P. Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. **FEMS Microbiology Letters**, Delft, v. 117, p. 157-161, 1994.

FRISCH, J. E.; VERCOE, J. E. Food intake, eating rate, weight gains, metabolic rate and efficiency of feed utilization in *Bos taurus* and *Bos indicus* crossbred cattle. **Animal Production**, v. 24, n. 1, p. 343-358, 1977.

FRUTOS, P.; HERVÁS, G.; GIRÁLDEZ, F. J.; MANTECÓN, A. R. Review. Tannins and ruminant nutrition. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 2, n. 2, p. 191-202, 2004

GASTALDI, K. A. **Produção “in vitro” de metano, dióxido de carbono e oxigênio utilizando líquido ruminal de bovinos alimentados com diferentes rações**. 2003. 95 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, São Paulo, 2003.

GAVALA, H. N.; YENAL, U.; SKIADAS, I. V.; WESTERMANN, P.; AHRING, B. K. Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of primary and secondary sludge: effect of pre-treatment at elevated temperature. **Water Research**, v. 37, n. 19, p. 4561-4572, 2003

GERARDI, M. H. **The microbiology of anaerobic digesters**. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2003. 188 p.

GERBER, P. J.; STEINFELD, H.; HENDERSON, B.; MOTTET, A.; OPIO, C.; DIJKMAN, J.; FALCUCCI, A.; TEMPIO, G. Tackling climate change through livestock – A global assessment of emissions and mitigation opportunities. **Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)**, Rome, Italy, 2013.

GINER-CHÁVEZ, B. I. **Condensed tannins in tropical forages**. 1996. Doctoral Thesis. Cornell University, Ithaca, NY, USA, 1996.

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

GRAINGER, C.; WILLIAMS, R.; CLARKE, T.; WRIGHT, A. D. G.; ECKARD, J. Supplementation with whole cottonseed causes long-term reduction of methane emissions from lactating dairy cows offered a forage and cereal grain diet. **Journal Dairy Science**. n.93, p. 2612-2619, 2010.

GRAMINHA, C. V.; MARTINS, A. L. M.; FAIÃO, C. A.; BALSALOBRE, M. A. A. **Aditivos na produção de bovinos confinados**. 2007. Disponível em: <http://www.grupoapb.com.br/pdf/bovinos_confinados.pdf>. Acesso em: 19 mar. 2013.

HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. Tannins and Lignins. In: Rosenthal, G. A. and Berenbaum, M. R. (Ed.). **Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites, Vol. I: The Chemical Participants**. New York: Academic Press, 1991, p. 355-388.

HAGERMAN, A. E.; ROBBINS, C. T.; WEERASURIYA, Y.; WILSON, T. C.; McARTHUR, C. Tannin chemistry in relation to digestion. **Journal Range Manage**, n. 45, p. 57-62, 1992.

HEGARTY, R. Greenhouse gas emissions from the Australian livestock sector. What do we know, what can we do? **Canberra: NSW Agriculture Australian Greenhouse Office**, 2001. p. 35.

HINDRICHSEN, I. K.; WETTSTEIN, H. R.; MACHMÜLLER, A.; KREUZER, M. Methane emission, nutrient degradation and nitrogen turnover in dairy cows and their slurry at different milk production scenarios with and without concentrate supplementation. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 113, p. 150 -161, 2006.

HUNTINGTON, G. B. Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 3, p. 852-867, 1997.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção da Pecuária Municipal, Rio de Janeiro. **Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE**, v. 44, p.1-51, 2016.

IPCC. INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. Climate change 2007: the physical science basis. In: **Working Group I to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. United Kingdom and New York: Cambridge University Press, Cambridge, 2007.

ISEKI, T.; MIYAJI, M. A portable remote methane detector using a tunable diode laser. In: WORLD GAS CONGRESS, 22., 2003, Tokyo. **Proceedings...** Tokyo, Japan. 2003.

ISHINO, Y.; KOMORI, K.; CANN, I. K. O.; KOGA, Y. A novel DNA polymerase family found in Archaea. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 2232-2236, 1998.

JANSSEN, P. H.; KIRS, M. Structure of the archaeal community of the rumen. **Applied Environmental Microbiology**, v. 74, p. 3619-3625, 2008.

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

JARRET, G.; CERISUELO, A. L.; PEU, P.; MARTINEZ, J.; DOURMAD, J. Impact of pigs diets with different fibre contents on the composition of excreta and their gaseous emissions and anaerobic digestion. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 160, p. 51-58, 2011. doi: 10.1016/j.agee.2011.05.029.

JARVIS, S. C.; LOVELL, R. D.; PANAYIDES, R. Patterns of methane emission from excreta of grazing cattle. **Soil Biology and Biochemistry**, n. 27, p. 1581-1588, 1995.

JOBLIN, K. N. Ruminal acetogens and their potential to lower ruminant methane emissions. **Australian Journal of Agricultural Research**. v.50, p.1307-1313, 1999.

JOHNSON, K. A.; HUYLEY, M. T.; WESTBERG, H. H.; LAMB, B. K.; ZIMMERMAN, P. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a SF₆ 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, n. 8, p. 2483-2492, 1995.

KELLY, J. M.; KERRIGAN, B.; MILLIGAN, L. P.; MCBRIDE, B. W. Development of a mobile, open-circuit indirect calorimetry system. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 74, p. 65-71, 1994.

KLEIBER, M. A respiration apparatus for tracer trials with radiocarbon on cows, sows and sheep. In: SYMPOSIUM ON ENERGY METABOLISM: PRINCIPLES, METHODS AND GENERAL ASPECTS, 1., 1958, Copenhagen, Denmark. **Proceedings...**Copenhagen: Statens Hus Dyrbrugs Udvalg, 1958.

KOZLOSKI, G. B. **Bioquímica dos ruminantes**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2002. 139 p.

KÜLLING, D. R.; DOHME, F.; MENZI, H.; SUTTER, F.; LISCHER, P.; KREUZER, M. Methane emissions of differently fed dairy cows and corresponding methane and nitrogen emissions from their manure during storage. **Envinomental Monitoring and Assessment**, v. 79, p. 129 - 150, 2002.

KUMAR, R.; SINGH, M. Tannins: their adverse role in ruminant nutrition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 32, p. 447-453, 1984.

KUMAR, S.; DAGAR, S. S.; PUNIYA, A. K.; UPADHYAY, R. C. Changes in methane emission, rumen fermentation in response to diet and microbial interactions. **Research in Veterinary Science**, n. 94, p. 263-268, 2013.

LEDGER, H. P.; ROGERSON, A.; FREEMAN, G. H. Further studies on the voluntary food intake of *Bos indicus* and *Bos taurus* and crossbred cattle. **Animal Production**, n. 12, p. 425-431, 1970.

LEINMÜLLER, E.; STEINGASS, H.; MENKE, K. H. Tannins in ruminant feedstuffs. Biannual Collection of Recent German Contributions Concerning Development through **Animal Research**, n. 33, p. 9-62, 1991.

LEITE, W. R. M. **Digestão anaeróbia em temperaturas mesofílicas e termofílicas de lodo de ETE usando reatores de estágio único e dois estágios**. Tese de Doutorado. Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Florianópolis, Brasil, 2015.

LELIS, C. C. R.; GONÇALVES, A. C. Teores de taninos da casca da madeira de cinco leguminosas arbóreas. **Floresta e Ambiente**, v. 8, n.1, p.167-173, 2001.

LIANG, J. B.; TERADA, F.; HAMAGUCHI, I. Efficacy of using the face mask technique for the estimation of daily heat production of cattle. In: VAN DER HONING, Y.; CLOSE, W. H. (Ed.). **Energy metabolism of farm animals**. Netherlands: Pudoc, Wageningen, 1989.

LONG, R. Quebracho based polyphenols for use in wood panel adhesive system. **Holz als Roh-und Werkstoff**, v.49, p. 485-487, 1991.

LONGO, C. **Avaliação *in vitro* de leguminosas taniníferas, tropicais para mitigação de metano entérico**. 2007. 153 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear em Agricultura-CENA, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

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 glycol and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in *in vitro* techniques. **British Journal of Nutrition**, n. 73, p. 897-913, 1995.

- MALINA JR, J.; POHLAND, F. G. Design of anaerobic process for the treatment of industrial and municipal wastes. In: MALINA Jr., J.; POHLAND, F.G. (Eds). **Water quality management library**, 1992, v. 7, 213 p.
- MANGAN, J. L. Nutritional effects of tannins in animal feeds. **Nutrition Abstracts and Reviews**, n. 1, p. 209-231, 1988.
- MAO, C.; YONGZHONG, F.; WANG, X.; REN, G. Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 45, p. 540-555, 2015. doi: 10.1016/j.rser.2015.02.032.
- MARTIN, C.; MORGAVI, D. P.; DOREAU, M. Methane mitigation in ruminants: From microbe to the farm scale. **Animal**, n. 4, p. 351-365, 2010.
- MASSÉ, D. I.; TALBOT, G.; GILBERT, Y. On farm biogas production: a method to reduce GHG emissions and develop more sustainable livestock operations. **Animal Feed Science and Technology**, v.166-167, p. 436-445, 2011.
- MATA-ALVAREZ, J. Fundamentals of the anaerobic digestion process. In: MATA-ALVAREZ, J. (Ed.), **Biomethanization of the Organic Fraction of Municipal Solid Wastes**. IWA Publishing Press, Cornwall, UK, p. 1–20, 2003.
- McALLISTER, T. A.; OKINE, E. K.; MATHISON, G. W.; CHENG, K. J. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 76, p. 231-243, 1996.
- McALLISTER, T. A.; NEWBOLD, C. J. Redirecting rumen methane to reduce methanogenesis. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 48, p. 7-13, 2008.
- McGINN, S. M.; BEAUCHEMIN, K. A.; COATES, T.; COLOMBATTO, D. Methane emissions from beef cattle: effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 11, p. 3346-3356, 2004.
- McLEOD, M. N. Plant tannins - Their role in forage quality. **Nutrition Abstracts and Reviews**, v. 44, 803-812, 1974.
- McSWEENEY, C. S.; PALMER, B.; McNEILL, D. M.; KRAUSE, D. O. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, p. 83-93, 2001.
- METCALF, L.; EDDY, H. **Wastewater Engineering: Treatment and Resource Recovery**. 5.ed. New York: McGraw-Hill, 2014, 2048 p.
- MILLS, J. A.; DIJKSTRA, J.; BANNIK, A.; CAMMELL, S. B.; KEBREAB, E.; FRANCE, J. A mechanistic model of whole-tract digestion and methanogenesis in the lactating dairy caow: model development, evaluation and application. **Journal of Animal Science**, v. 79, n. 6, p. 1584-1597, 2001.
- MCTI. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO. **Estimativas anuais de emissões de gases de efeito estufa no Brasil**. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. 2ª Edição, 2014. Disponível em: www.mct.gov.br/upd_blob/0235/235580.pdf
- MOHAMMED, N.; ONODERA, R.; ITABASHI, H.; LILA, Z. A. Effects of ionophores, vitamin B6 and distiller's grains on in vitro tryptophan biosynthesis from indolepyruvic acid, and production of other related compounds by ruminal bacteria and protozoa. **Animal Feed Science and Technology**, v. 116, p. 301-311, 2004.

MOLE, S.; WATERMAN, P. G. Tannic acid and proteolytic enzymes: enzyme inhibition or substrate deprivation? **Phytochemistry**, v. 26, p. 99-102, 1987.

MORVAN, B.; RIEU-LESME, F.; FONTY, G.; GOUET, P. *In vitro* interactions between rumen H₂-producing cellulolytic microorganisms and H₂-utilizing acetogenic and sulfate-reducing bacteria. **Anaerobe**, v. 2, p. 175-180, 1996.

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

MUELLER-HARVEY, I.; McALLAN, A.B. Tannins. Their biochemistry and nutritional properties. In: MORRISON, I. M. (Ed.). **Advances in plant cell biochemistry and biotechnology**, v.1. JAI Press Ltd., London, UK, 1992, p. 151-217.

MUELLER-HARVEY, I. Tannins: their nature and biological significance. In: CAYGILL, J. C.; MUELLER-HARVEY, I. (Ed.). **Secondary plants products. Antinutritional and beneficial actions in animal feeding**. Nottingham Univ Press (UK), 1999. p. 17-70.

MUELLER-HARVEY, I. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. 86, p. 2010-2037, 2006.

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

NAUMANN, H. D.; MUIR, J. P.; LAMBERT, B. D.; TEDESCHI, L. O.; KOTHMANN, M. Condensed tannins in the ruminant environment: a perspective on biological activity. **Journal of Agricultural Sciences**, n. 1, p. 8-20, 2013.

NOZELLA, E. **Determinação de taninos em plantas com potencial forrageiro para ruminantes**. 2001. 72f. Dissertação (Mestrado) - ESALQ, USP, Piracicaba, 2001.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7.ed. Washington D.C. National Academies Press, USA, 2001. 381 p.

OLIVEIRA, S. G.; BERCHIELLI, T. T.; NATARELLI, B.; MALHEIROS, E. B. Valor alimentício e aspectos econômicos de dietas com variação no teor de tanino e nível protéico em bovinos de corte. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 55, n. 5, p. 467-475, 2008.

OWENS, F. N.; GOETSCH, A. L. Ruminal fermentation. In: CHURCH, D. C. (Ed.). **The Ruminant animal digestive physiology and nutrition**. 5. ed. New Jersey: Englewood, Cliffs, 1993. p. 145-171.

PATRA, A. K.; SAXENA, J. A. New perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. **Phytochemistry**, n. 71, p. 1198-1222, 2010.

PAUL, K.; NONOH, J. O.; MIKULSKI, L.; BRUNE, A. "Methanoplasmatales", thermoplasmatales-related *Archaea* in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens. **Applied Environmental Microbiology**, v. 78, p. 8245-8253, 2012.

PEREVOLOTSKY, A. Tannins in Mediterranean woodlands species: lack of response to browsing and thinning. **Oikos**, v. 71, p. 333-340, 1994.

PERS-KAMCZYC, E.; ZMORA, P.; CIESLAK, A.; SZUMACHER-STRABEL, M. Development of nucleic acid based techniques and possibilities of their application to rumen microbial ecology research. **Journal of Animal and Feed Sciences**, n. 20, p. 315-337, 2011.

PORDOMINGO, A. J.; VOLPI LAGRECA, G.; STEFANAZZI, I. N.; PORDOMINGO, A. B. Efecto de la inclusión de taninos versus monensina y de soja cruda en dietas basadas en grano entero, sin fibra larga en engorde de vaquillonas a corral. **Boletín de Divulgación Técnica, EEA Anguil**, n. 90, 2006.

PRIMAVESI, O.; FRIGHETTO, R. T. S.; PEDREIRA, M. S.; LIMA, M. A.; BERCHIELLI, T. T.; BARBOSA, P. F. Metano entérico de bovinos leiteiros em condições tropicais brasileiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 3, p. 277-283, 2004.

PUCHALA, R.; MIN, B. R.; GOETSCH, A. L.; SAHLU, T. The effect of a condensed tannin-containing forage on methane emission by goats. **Journal of Animal Science**, v. 83, n. 1, p. 182-186, 2005.

RAJESHWARI, K. V.; BALAKRISHNAN, M.; KANSAL, A.; LATA, K.; KISHORE, V. V. N. State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, n. 4, p. 135-156, 2000.

REES, E. M. R.; LLOYD, D.; WILLIAMS, A. G. The effects of co-cultivation with the acetogen *Acetitomaculum ruminis* on the fermentative metabolism of the rumen fungi *Neocallimastix patriciarum* and *Neocallimastix sp.* strain L2. **FEMS Microbiology Letters**, v. 133, p. 175-180, 1995.

RODRIGUES, P. H. M.; PINEDO, L. A.; SOLORZANO, L. A. R.; PERNA JUNIOR, F.; MARTINS, M. F.; CASTRO, A. L.; GODOY, G. L. A.; MARINO, C. T. Descrição da metodologia *ex-situ* de estudo da fermentação ruminal (micro-rúmen) com vistas à mensuração da produção de metano. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 49, 2012, Brasília. **Anais...** Brasília – DF, 2012.

RUSSELL, J.B. **Rumen Microbiology and its role in ruminant nutrition**. Ithaca: RUSSELL, J.B (Ed.), 2002, 119 p.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, p. 21-40, 2001.

SCOTT, T. W.; ASHES, J. R. Dietary lipids for ruminants: protection, utilization and effects on remodelling of skeletal muscle phospholipids. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 44, n. 3, p. 495-508, 1993.

STAERFL, S. M.; ZEITZ, J. O.; KREUZER, M.; SOLIVA, C. R. Methane conversion rate of bulls fattened on grass or maize silage as compared with the IPCC default values, and the long-term methane mitigation efficiency of adding acacia tannin, garlic, maca and lupine. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 148, p. 111-120, 2012.

SAINT-PIERRE, B.; WRIGHT, A. D. G. Diversity of gut methanogens in herbivorous animals. **Animal**, v.7, p. 49- 56, 2013.

SZUMACHER-STRABEL, M.; CIESLAK, A.; NOWAKOWSKA, A. Effect of oils rich in linoleic acid on *in vitro* rumen fermentation parameters of sheep, goats and dairy cows. **Journal of Animal and Feed Sciences**, n. 18, p. 440-452, 2009.

TAVENDALE, M. H.; MEAGHER, L. P.; PACHECO, D.; WALKER, N.; ATTWOOD, G. T.; SIVAKUMARAN, S. Methane production from *in vitro* rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. **Animal Feed Science and Technology**, p. 123-124, 403-419, 2005.

- THAUER, R. K.; KASTER, A. K.; SEEDORF, H.; BUCKEL, W.; HEDDERICH, R. Methanogenic *archaea*: ecologically relevant differences in energy conservation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 579–591, 2008.
- THORNTON, P. K.; JONES, P. G.; ERICKSEN, P.; CAHNLINOR, A. J. Agriculture and food systems in sub-Saharan Africa in a four-plus degree world. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 369, p.117–136, 2010.
- TIEMANN, T. T.; LASCANO, C. E.; WETTSTEIN, H. R.; MAYER, A. C.; KREUZER, M.; HESS, H. D. Effect of the tropical tannin-rich shrub legumes *Calliandra calothyrsus* and *Flemingia macrophylla* on methane emission and nitrogen and energy balance in growing lambs. **Animal**, n. 2, p. 790–799, 2008.
- TOERIEN, D. F.; HATTINGH, W. H. J. Anaerobic digestion I. the microbiology of anaerobic digestion. **Water Research**, v.3, p. 385-416, 1969.
- ONU. ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. Department of Economic and Social Affairs, Population Division. World Population Prospects: **The 2015 Revision, Key Findings and Advance Tables**. Working Paper, n. ESA/P/WP.241, 2015.
- USHIDA, K.; JOUANY, J. P. Methane production associated with rumen-ciliated protozoa and its effect on protozoan activity. **Letters Applied Microbiology**, v. 23, p. 129-132, 1996.
- VALADARES FILHO, S. C.; COELHO DA SILVA, J. F.; LEÃO, M. I.; GONÇALVES, C. A.C.; GARCIA, J. A. Óxido crômico e lignina na determinação dos fluxos de matéria seca abomasal, ileal e fecal em bovinos e bubalinos. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.14, n.5, p. 565-574, 1985.
- VALADARES FILHO, S. C.; PAULINO, P. V. R.; MAGALHÃES, K. A. **Exigências nutricionais de zebuínos e tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos**. 1.ed. Viçosa, MG: Suprema, 2006. 141p.
- VAN KRUININGEN, H. J. Gastrointestinal system. In: CARLTON, W.W.; MCGAVIN, M. D. **Thomson's special veterinary pathology**. 2ª ed. Philadelphia: Mosby, 1995. p. 1-80.
- VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2ª.ed. Cornell University Press, Ithaca, NY, USA, 1994. 476 p.
- VARGA, G. A.; KOLVER, E. S. Microbial and animal limitations to fiber digestion and utilization. **Journal of Nutrition**, v. 127, n. 5, p. 819-823, 1997.
- WOLIN, M. J. The rumen fermentation: a model for microbial interactions in anaerobic ecosystems. **Advance Microbiology Ecology**, v. 3, p. 49-77, 1979.
- WOODWARD, S. L.; WAGHORN, G. C.; ULYATT, M. J.; LASSEY, K. R. Early indication that feeding *lotus* will reduce methane emission from ruminants. **Proceedings of New Zealand Society of Animal Production**, n. 61, p. 23–26, 2001.
- WOODWARD, S. L.; WAGHORN, G. C.; LABOYRE, P. Condensed tannins in birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) reduce methane emissions from dairy cows. **Proceedings New Zealand Society of Animal Production**, v. 64, p. 160–164, 2004.
- YENIGÜN, O.; DEMIREL, B. Ammonia inhibition in anaerobic digestion: a review. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 5, p. 901-911, 2013.

YOUNG, B. A.; KERRIGAN, B.; CHRISTOPHERSON, R. J. A versatile respiratory pattern analyzer for studies of energy metabolism of livestock. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 55, p. 17-22, 1975.

ZUCKER, W.V. Tannins: does structure determine function? An ecological perspective. **American Naturalist**, n. 121, p. 335-365, 1983.