UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO E PRODUÇÃO ANIMAL

EDUARDO CUELAR ORLANDI CASSIANO

**Nitrato de cálcio como mitigador da emissão de metano em
bovinos**

Pirassununga

2017

EDUARDO CUELAR ORLANDI CASSIANO

Nitrato de cálcio como mitigador da emissão de metano em bovinos

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

São Paulo
2017

Obs: A versão original se encontra 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 Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3540
FMVZ

Cassiano, Eduardo Cuelar Orlandi.
Nitrato de cálcio como mitigador da emissão de metano em bovinos. / Eduardo
Cuelar Orlandi Cassiano. -- 2017.
123 p.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues.

1. Biodigestor. 2. Dejetos. 3. Metano entérico. 4. Nitrato de cálcio. 5. Rúmen. I.
Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Nitrato de cálcio como mitigador da emissão de metano em bovinos", protocolada sob o CEUA nº 6652271113, sob a responsabilidade de **Paulo Henrique Mazza Rodrigues e equipe; Eduardo Cuelar Orlandi Cassiano** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 21/05/2014.

We certify that the proposal "Calcium Nitrate aiming at mitigation of methane emissions in cattle", utilizing 8 Bovines (8 females), protocol number CEUA 6652271113, under the responsibility of **Paulo Henrique Mazza Rodrigues and team; Eduardo Cuelar Orlandi Cassiano** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 05/21/2014.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **05/2014** a **09/2014**

Área: **Nutrição E Produção Animal**

Origem:

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **a**

N: **8**

Linhagem: **holandes e nelore**

Peso: **a**

Resumo: O presente projeto visa avaliar o uso de nitrato de cálcio na alimentação de ruminantes como estratégia nutricional visando a mitigação de CH₄ via fermentação entérica, determinada pela técnica ex-situ (micro-rúmen) de mensuração de metano (8 bovinos). Além do CH₄, serão mensuradas outras variáveis como AGCC, pH, N-NH₃, perda de energia relativa (PER), comportamento ingestivo e contagem total e diferencial de protozoários do conteúdo ruminal. Pretende-se também avaliar a produção de CH₄, N₂O e CO₂ nas fezes dos animais por meio de biodigestores já confeccionados para essa finalidade.

Local do experimento:

São Paulo, 25 de junho de 2017

Prof. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FICHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CASSIANO, Eduardo Cuelar Orlandi

Título: Nitrato de cálcio como mitigador da emissão de metano em bovinos

Tese de doutorado 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 Nutrição e Produção Animal.

Data: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe e meu pai que sempre me apoiaram e me ensinaram a crescer como ser humano e como profissional.

A minha irmã que sempre esteve ao meu lado, e a toda minha família que sempre me serviu de exemplo.

À minha prima Cássia, que sempre me apoiou e serviu de exemplo para que eu continuasse esse caminho,

Agradeço ao meu orientador Professor Paulo Henrique Mazza Rodrigues, que me apoiou e confiou em mim na transição entre o mestrado e o doutorado, me permitindo ter uma esta grande experiência de vida que foi o doutorado.

À Carolina não tenho palavras para dizer o quanto sou grato por toda a ajuda e ensinamento, é uma irmã mais velha, me colocando sempre no rumo certo desde meu início na pós-graduação.

Ao Professor Eduardo Harry Birgel e toda sua equipe pela sua colaboração e disponibilidade em ajudar com as coletas e análises séricas.

Gilmar e Júnior, muito obrigado por toda ajuda durante o experimento e cuidados aos animais e instalações. Sem esse cuidado com certeza essa jornada teria sido muito mais difícil durante os dias de coletas.

Meus agradecimentos também aos meus amigos de graduação que foram muito importantes na minha formação, tanto como pessoa como profissional.

Aos companheiros da república Manguaça.

Agradeço a todos os professores do Departamento de Nutrição Animal da FMVZ USP, por ter me aceitado no programa de pós graduação e contribuído para minha formação, o que eu aprendi com vocês carregarei pelo resto da vida e sou grato por isto, obrigado.

Agradeço também aos meus professores da graduação, na FMVZ/UNESP-Botucatu, que foram responsáveis pela minha formação.

Agradeço também a todos funcionários do VNP, ao secretário João Paulo que sempre foi muito prestativo, as meninas da limpeza que sempre deixavam o ambiente limpo e agradável para trabalhar.

Aos amigos da Pira Models (minha república), Xibungo e Perna, que além de morarem comigo foram companheiros de mestrado e doutorado, Caio, Komixão, Flavinho, Inútil, Jhonny, Gustavo, Larika, Vitinho, Carlos, Chico, Begônia, Fernando...

Aos amigos de pós, Ronaldão, Kadu Maria Fernanda, Garga, Vivi, Severino, Pri.Mel, Mossoró, Ceará, Rejane, Gaúcho, Dudu, Ju boiadeira, Nara, Bruna, Tarley, Gabi, Vanessa, Júlio, Milena, Gustavo, Ju Diniz, Adrielle, Sacudo...

Aos companheiros de laboratório, Diana, Ítalo, Robertinha, Ricardo, Maria Fernanda, Laura Lizbeth, Tainá, Ricardo.

Às estagiárias, Flávia, Renata, Mariana

Muito obrigado a todos. Sem vocês nada teria valido à pena.

A ciência será sempre uma busca, jamais uma descoberta.
É uma viagem, nunca uma chegada.
Karl Popper (1902-1994)

Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente
aceitável, eles são a abertura para achar as que estão certas.
Carl Sagan (1934-1996)

Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil e, no
entanto, é a coisa mais preciosa que temos.
Albert Einstein (1879-1955)

RESUMO

CASSIANO, E. C. O. **Nitrato de cálcio como mitigador da emissão de metano em bovinos**. 2017.123 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

Objetivou-se avaliar o uso de nitrato de cálcio (NC) na alimentação de ruminantes com vistas à mitigação da emissão de metano. Foram utilizadas quatro fêmeas de cada subespécie, *Bos taurus taurus* (Holandês) e *Bos taurus indicus* (Nelore), com peso médio inicial de 909,0 kg $\pm$ 72,0 e 387,0 kg $\pm$ 25,5, respectivamente, alimentadas com diferentes níveis de nitrato de cálcio na dieta (0%, 1%, 2% e 3%), sendo utilizado delineamento quadrado latino 4X4 replicado. O experimento teve duração de 4 períodos de 28 dias cada. Foram avaliados, a ingestão, excreção e digestibilidade de nutrientes, por meio de marcador externo dióxido de titânio, o comportamento ingestivo, com monitoramento visual por 24 horas, parâmetros sanguíneos, dinâmica ruminal, com esvaziamento total do rumen, contagem de protozoários, fermentação ruminal, pela técnica ex-situ, parâmetros urinários e balanço de nitrogênio, com coleta manual de urina tipo spot, e a biodigestão dos dejetos, por biodigestores do tipo batelada. Os taurinos apresentaram valores superiores para CMS, ingestão e digestibilidade de nutrientes e excreção de MS, PB, FDN, FDA, N, MO e EB, e inferiores para CMS em relação ao PV e PM. Os zebuínos apresentaram maiores taxas de ingestão, ruminação e mastigação de MS e FDN em min/kg, tendo valores inferiores para as mesmas taxas em kg/min. A genética e a dose de nitrato influenciaram as variáveis séricas, porém sem valores fora da normalidade. Quanto à dinâmica ruminal, os taurinos apresentaram valores absolutos superiores, e valores em relação ao PV e PM inferiores. Os zebuínos apresentaram maiores pH médio e mínimo e menos tempo de pH abaixo de 6,2, e maior contagem de protozoários. As concentrações de N-NH₃, volume e produção de CH₄ foram maiores para os zebuínos. Os taurinos apresentaram valores mais elevados para N microbiano (g/dia) e balanço de N retido (g/kg N ingerido), e menores valores para balanço de N nas fezes (g/kgN ingerido) e N microbiano (mg/kgPM.d⁻¹). O aumento no nível de NC na dieta aumentou a digestibilidade de EE e ENN, tempo médio ruminando e taxa de mastigação de MS e FDN (min/kg), e diminuiu o CMS em relação ao PV e PM e excreção de MS, EE, ENN, MO e EB. A taxa de ingestão de MS e FDN (kg/min), a concentração de creatinina na urina (mg/kgPV), o tempo total comendo e balanço de nitrogênio

amoniacal o rúmen sofreram efeito quadrático com a adição de NC na dieta. A porcentagem de FDN, PB e EE nos afluentes dos biodigestores sofreram influência da dose de nitrato na alimentação das vacas. Os biodigestores contendo os dejetos de taurinos tiveram os afluentes com maiores valores de FDN e FDA e menor teor de sólidos totais (ST), com menor volume de biogás e CH₄ e menor relação de CH₄/quantidade de fezes. Os taurinos apresentaram melhor aproveitamento do alimento, produzindo menos CH₄, com menor rendimento verdadeiro de produção de metano nos biodigestores. A adição de NC afetou o consumo, digestibilidade e utilização do nitrogênio porém, sem afetar a produção de CH₄ nem a eficiência dos biodigestores.

Palavras-chave: Biodigestor. Dejetos. Metano entérico. Nitrato de cálcio. Rúmen.

ABSTRACT

CASSIANO, E. C. O. **Calcium Nitrate aiming at mitigation of methane emissions in cattle**. 2017. 123 p. Thesis (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

The aim of the present study was evaluate the use of calcium nitrate in the feeding of ruminants to mitigate of methane. Four females cattle from each subspecies of cattle, *Bos taurus taurus* (Holstein) and *Bos taurus indicus* (Nelore), with initial average weight of 909,0 kg $\pm$ 72,0 e 387,0 kg $\pm$ 25,5, respectively, were used, and they were fed with distinct levels of calcium nitrate in the diet (0%, 1%, 2% e 3%) at four periods of 28 days each. Experimental design was composed by a replicated Latin square 4X4. Were avaluated: ingestion, excretion and digestibility of nutrients, by means of external marker titanium dioxide; the observation of behavior parameters during 24 hours; serum analysis; rumen content collection, aiming assessment of fermentation; protozoa count; ruminal fermentation by the ex-situ technique; manual urine collection for measurement of urinary compounds and nitrogen balance; and the anaerobic digestion of feces using batch digesters. Holsteins presented higher values for the DMI, ingestion and digestibility of the nutrients and excretion of DM, CP, NDF, ADF, N, OM e GE, and lower values for DMI at body weight (BW) and metabolic weight (MW) basis. Nelore cattle showed higher rates of ingestion, rumination and chewing of DM e NDF min/kg, having lower values for the same rates in kg/min. Serum variables were influenced by genetics and nitrate levels, but without values beyond normality. As rumen dynamics, Holsteins presented superior absolute values and inferior values when these parameters were calculated in BW and MW basis. The zebu cattle presented medium and minimum pH larger and less time pH below 6.2, having larger count for protozoa count. Nelore had higher concentrations for NH₃, CH₄ and production of CH₄. Holstein presented higher values for microbial N (g/day) and N retained balance (g/kg N ingested) and lower values for N balance in feces (g/kgN ingested) and microbial N (mg/kgMW.d⁻¹). The increase in the level of CN in the diet increased linearly the digestibility of EE and NNE, average time ruminating, chewing rate for DM and NDF (min/kg), and decreased the DMI in BW and MW basis and the excretion of DM, EE, NNE, OM and GE. The intake rate of DM and NDF kg/min, creatinine in urine (mg/kgBW), the total time eating and NH₃ balance showed quadratic effect by increasing the addition of CN in the diet. The levels of nitrate on animal feed

influenced the percentage of NDF, CP and EE in the batch digesters effluents. The bioreactors containing the taurine feces presented the highest values of NDF/ ADF effluent and lowest values for total solids (TS), lower volume of biogas and CH₄ and lower ratio of CH₄/amount of feces. Taurines presented better use of the feed, producing lesser CH₄, and lower ultimate methane yield at batch digesters. The CN levels affected the intake, digestibility and nitrogen metabolism, however without affecting the production of CH₄ or the batch digester efficiency.

Keywords: Batch digester. Calcium nitrate. Enteric methane. Manure. Rumen.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Interação entre dieta e genética sobre a relação de produção acético:propiónico.	84
Figura 2 - Planta baixa e vista lateral dos biodigestores bateladas.	102
Figura 3 - Abastecimento dos biodigestores e amostragem dos substratos.	103
Figura 4 - Aferição do deslocamento vertical do gasômetro.	104
Figura 5 - Coleta e amostragem do biogás.	105
Figura 6 – Efeito da interação entre nível de nitrato de cálcio e genética na porcentagem de FDN no afluente.	112
Figura 7 – Efeito da interação entre nível de nitrato de cálcio e genética na porcentagem de FDN no biofertilizante.	112
Figura 8 – Curva para a produção acumulada de gás metano em biodigestores abastecidos com dejetos de animais de dois grupos genéticos.	115
Figura 9 – Curva para a produção acumulada de gás metano em biodigestores abastecidos com dejetos de animais alimentados com diferentes doses de nitrato de cálcio.	115
Figura 10 – Curva para a produção acumulada de dióxido de carbono em biodigestores abastecidos com dejetos de animais de dois grupos genéticos.	116
Figura 11 – Curva para a produção acumulada de dióxido de carbono em biodigestores abastecidos com dejetos de animais alimentados com diferentes doses de nitrato de cálcio.	116
Figura 12 – Curva para a produção acumulada de óxido nitroso em biodigestores abastecidos com dejetos de animais de dois grupos genéticos.	117
Figura 13 – Curva para a produção acumulada de óxido nitroso em biodigestores abastecidos com dejetos de animais alimentados com diferentes doses de nitrato de cálcio.	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Proporções de ingredientes e composição bromatológica das dietas experimentais, expressas em porcentagem de matéria seca.	41
Tabela 2 - Efeito de diferentes níveis de nitrato de cálcio sobre a ingestão, excreção e digestibilidade da dieta em dois grupos de bovinos.	49
Tabela 3 - Comportamento ingestivo de fêmeas bovinas (taurino e zebuino) alimentadas com diferentes níveis de nitrato de cálcio.	50
Tabela 4 - Taxas de ingestão, ruminação e mastigação de fêmeas bovinas tratadas com diferentes níveis de nitrato de cálcio.	51
Tabela 5 - Efeito de diferentes níveis de nitrato de cálcio na dieta de fêmeas bovinas sobre parâmetros sanguíneos.	53
Tabela 6 - Proporções de ingredientes e composição bromatológica das dietas experimentais, expressas em porcentagem de matéria seca.	66
Tabela 7 - Efeito do aumento do nível de nitrato de cálcio na dieta de fêmeas bovinas (taurino e zebuino) sobre as variáveis de consumo de MS.	77
Tabela 8 - Efeito do aumento do nível de nitrato de cálcio na dieta de fêmeas bovinas sobre a dinâmica ruminal.	78
Tabela 9 - Efeito do nível de nitrato de cálcio sobre o pH ruminal de dois grupos de bovinos.	79
Tabela 10 - Efeito do aumento do nível de nitrato de cálcio na dieta de fêmeas taurinas e zebuínas sobre a contagem total e diferencial de protozoários ruminais.	80
Tabela 11 - Efeito de diferentes níveis de nitrato de cálcio na dieta de fêmeas bovinas sobre a concentração e balanço de N-NH ₃	80
Tabela 12 - Efeito da inclusão de diferentes níveis de nitrato de cálcio na dieta de fêmeas bovinas sobre as produções de ácidos graxos de cadeia curta, metano e perda de energia relativa do metano em relação aos AGCCs.	82
Tabela 13 - Efeito da adição de quatro níveis de nitrato de cálcio sobre a síntese de proteína microbiana em dois grupos genéticos de bovinos.	85
Tabela 14 - Efeito da adição de quatro níveis de nitrato de cálcio sobre o consumo, excreção e retenção de nitrogênio em dois grupos genéticos de bovinos.	86
Tabela 15 - Proporções de ingredientes e composição bromatológica das dietas experimentais, expressas em porcentagem de matéria seca.	101

Tabela 16 –Nutrientes no afluente, biofertilizante e efeciência de remoção em biodigestores abastecidos com fezes de dois grupos genéticos de bovinos alimentados com diferentes níveis de nitrato de cálcio. 111

Tabela 17 – Produção de biogás, metano, dióxido de carbono e óxido nitroso em biodigestores tipo batelada abastecidos com fezes de dois grupos genéticos de bovinos alimentados com diferentes níveis de nitrato de cálcio. 114

Sumário

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 EFEITO ESTUFA E A PECUÁRIA.....	22
2.2. EMISSÃO DE METANO ENTÉRICO.....	24
2.3. EFEITO DO NITRATO DE CÁLCIO SOBRE A FERMENTAÇÃO RUMINAL	26
2.4. METAHEMOGLOBINEMIA.....	28
2.5. METANO NOS DEJETOS	29
REFERÊNCIAS	31
3. CONSUMO DE NUTRIENTES, COMPORTAMENTO INGESTIVO E AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS SANGUÍNEOS DE BOVINOS ALIMENTADOS COM DIFERENTES NÍVEIS DE NITRATO DE CÁLCIO	37
3.1. INTRODUÇÃO.....	39
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	40
3.2.1. Período experimental.....	41
3.2.2. Análise bromatológica dos alimentos.....	42
3.2.3. Ingestão, excreção e digestibilidade dos nutrientes	42
3.2.4. Comportamento ingestivo	43
3.2.5. Coleta sanguínea	44
3.2.6. Avaliação do hemograma.....	45
3.2.7. Bioquímica sérica	45
3.2.8. Avaliação da hemogasometria.....	46
3.2.9. Análise estatística	46
3.3. RESULTADOS	47
3.3.1. Ingestão, excreção e digestibilidade de nutrientes.....	47
3.3.2. Comportamento ingestivo	50
3.3.3. Parâmetros sanguíneos.....	52
3.4. DISCUSSÃO.....	54

3.5. CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS.....	58
4. NITRATO DE CÁLCIO E SUA INFLUÊNCIA SOBRE A FERMENTAÇÃO RUMINAL DE BOVINOS	61
4.1 INTRODUÇÃO	63
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	65
4.2.1. Período experimental	66
4.2.2. Consumo de matéria seca	67
4.2.3. Dinâmica ruminal.....	67
4.2.4. Mensuração contínua do pH ruminal.....	68
4.2.5. Contagem total e diferencial de protozoários ruminais	69
4.2.6. Técnica ex-situ.....	69
4.2.7. Concentração de nitrogênio amoniacal.....	70
4.2.8. Quantificação entérica do gás metano	71
4.2.9. Quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta.....	71
4.2.10. Cálculo da produção de ácidos graxos de cadeia curta, metano e a perda de energia relativa (PER).....	72
4.2.11. Produção de proteína microbiana.....	74
4.2.12. Análise estatística	76
4.3. RESULTADOS	77
4.3.1. Consumo	77
4.3.2. Dinâmica ruminal.....	78
4.3.3. Mensuração contínua do pH.....	78
4.3.4. Contagem total e diferencial de protozoários ruminais	79
4.3.5. Concentração ruminal de nitrogênio amoniacal.....	80
4.3.6. Produção de ácidos graxos de cadeia curta, metano e perda de energia relativa de metano em relação aos AGCCs.....	81
4.3.6. Parâmetros urinários e balanço de nitrogênio.....	84

4.4. DISCUSSÃO.....	86
4.5. CONCLUSÃO	90
REFERÊNCIAS	91
5. BIODIGESTÃO DE DEJETOS DE BOVINOS ALIMENTADOS COM NITRATO DE CÁLCIO	96
5.1. INTRODUÇÃO.....	99
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	100
5.2.1. Quantificação da produção e amostragem do biogás	103
5.2.2. Composição do biogás.....	106
5.2.3. Quantificação da produção de metano, dióxido de carbono e óxido nitroso.....	106
5.2.4. Remoção de nutrientes.....	107
5.2.5. Características do biofertilizante	108
5.2.6. Curva de produção acumulada de gases.....	110
5.2.7. Análise estatística.....	110
5.3. RESULTADOS	110
5.3.1. Eficiência de remoção de nutrientes	111
5.3.2. Produção de gases	113
5.4. DISCUSSÃO.....	118
6.5. CONCLUSÕES.....	120
REFERÊNCIAS	121

1. INTRODUÇÃO

O crescimento da população mundial, e do seu poder aquisitivo, tem promovido aumento acentuado da demanda por alimentos de origem animal. As Nações Unidas (UN, 2007) estimam que a população do planeta atinja 9,3 bilhões em 2050. Até 2020, a demanda global por alimentos crescerá 20% (FAO, 2002) e o Brasil poderá atender cerca de 40% deste incremento. A maior exigência do mercado envolverá aspectos de qualidade nutricional, responsabilidade social, bem-estar animal e sustentabilidade ambiental. O desafio futuro para a produção de alimentos será compatibilizar a necessidade de incremento de produção, impulsionado pela maior demanda, associada à distribuição mais eficiente com menores desperdícios e à crescente preocupação com a preservação ambiental. O Brasil ocupa posição de destaque na produção pecuária, sendo o detentor do maior rebanho comercial do mundo, o maior exportador e o segundo maior produtor de carne bovina, sendo, portanto, um importante fornecedor de proteína animal para a população mundial.

Apesar da reconhecida importância da agropecuária na produção de alimentos e geração de renda, atualmente muito se discute sobre o impacto ambiental das atividades pecuárias e agrícolas, principalmente em relação às mudanças climáticas. O esforço feito pelas indústrias brasileiras é reconhecido internacionalmente. Restam, no entanto, muitos desafios para o setor, como a efetiva implantação do Código Florestal, a intensificação da pecuária e a redução do desmatamento na cadeia. Por isso, a pecuária vem sendo criticada, dentre outros motivos, por emitir quantidades significativas de gases de efeito estufa (GEE). 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 GEE por quilograma de carne e/ou de leite produzidos (IPCC, 2007).

Pensando nisso, e com o objetivo de desenvolver uma pecuária sustentável, evitando assim que a indústria brasileira adquira carne bovina procedente de áreas desmatadas na Amazônia, ou onde tenham sido constatadas irregularidades ambientais e sociais, a ABIEC (Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne) e o Ministério Público Federal assinaram um Acordo de Cooperação Técnica (BEEF POINT, 2015).

Os ruminantes não só desempenham um papel importante no fornecimento de proteína de alta qualidade, e essencial 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 metano. Apesar de as concentrações de metano e óxido nitroso na atmosfera serem menores que a de CO_2 , esses gases apresentam potencial de aquecimento 23 e 296 vezes maior em relação ao CO_2 , respectivamente (SNYDER; BRUULSEMA; JENSEN, 2008).

Segundo Beauchemin et al. (2008), o setor de ruminantes emite 35-40% de todo o metano produzido pelas atividades antrópicas, sendo que a fermentação entérica contribui com 94% do total dessas emissões e o restante produzido pela decomposição dos dejetos (FAO, 2013). No Brasil, o setor agropecuário foi responsável por 19% das emissões nacionais, em termos de CO_2 equivalentes (BERNDT, 2010).

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 a produtividade, pois, segundo Buddle et al. (2011), de 5% a 9% da energia bruta da dieta é perdida na forma de metano. O ruminante adulto pode produzir até 17 litros de metano por hora (RUSSELL, 2002) e este gás não pode ser metabolizado pelo animal nem pela microbiota ruminal. A maior parte é removida do rúmen por expiração ou eructação (MOSS; JOUANY; NEWBOLD, 2000), sendo então liberada ao meio ambiente. Os agravantes gerados pelo metano têm induzido pesquisadores a procurar alternativas para reduzir suas emissões e perdas produtivas.

Os bovinos podem ter a emissão de metano manipulada, uma vez que a produção deste gás é proveniente da fermentação ruminal e está relacionada à categoria animal, ao consumo de matéria seca, tipo de alimento e digestibilidade do mesmo. É possível reduzir a produção de metano pela modificação da fermentação ruminal, por meio da alteração do volumoso, do tipo e da quantidade de carboidrato incluído na dieta, pela manipulação da microbiota ruminal com aditivos alimentares e pela adição de lipídeos (BERCHIELLI; MESSANA; CANESIN, 2012). A estratégia de mitigação mais bem sucedida deve possibilitar aumento rentável da produção de leite e/ou carne, como também promover redução persistente da emissão de metano entérico e dos dejetos orgânicos das fezes (GRAINGERET al., 2010).

Conhecer não só os nutrientes demandados, como também a concentração destes na dieta, para determinada categoria animal obter o desempenho desejado compõem a base para a formulação de dietas e o planejamento do manejo nutricional do rebanho. Dietas capazes de atender corretamente às exigências nutricionais dos animais proporcionam o uso racional dos alimentos e, portanto, reduzem a excreção de nutrientes no meio ambiente, melhorando a lucratividade, competitividade e sustentabilidade da atividade.

Há escassez de estudos que relacionem a eficiência alimentar zootécnica de bovídeos 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; ROGERSON; FREEMAN, 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 zebuino brasileiro. Assim, torna-se cada vez mais importante o conhecimento sobre diferenças entre os processos fermentativos de bovídeos oriundos de diferentes grupos genéticos, incluindo o perfil fermentativo e a metanogênese.

A reação de redução de CO_2 à metano, no rúmen, desempenha importante função, pois age na remoção contínua de hidrogênio (H_2) resultante da fermentação da matéria orgânica. Dessa forma, a redução ou eliminação da metanogênese exige o estabelecimento de outra rota para evitar o acúmulo de H_2 no rúmen e seu adequado funcionamento (WEIMER, 1998). Uma alternativa para essa reação de redução é o fornecimento de nitrato, por este exercer ação deletéria sobre os microrganismos metanogênicos e alguns protozoários, além de consumir o H_2 livre no rumen.

A adição de nitrato de cálcio na alimentação de ruminantes possui potencial para diminuição das emissões ruminais de metano, devido ao nitrato ser um composto capaz de capturar hidrogênio e, portanto, reduzir a formação de metano (LENG; PRESTON, 2010). No entanto, a literatura ainda mostra carência de dados, principalmente testando diferentes níveis de nitrato de cálcio em experimentos com avaliação *in vivo* em relação aos produtos da fermentação ruminal (CH_4 e AGCC), assim como as diferenças no metabolismo das diferentes subespécies de bovídeos, levando à necessidade de mais pesquisas nesta área. Também existe carência de

informações sobre as emissões de CH₄ e CO₂ nos dejetos dos animais com essas dietas.

Sendo assim, objetiva-se avaliar os efeitos da adição de diferentes níveis de nitrato de cálcio na alimentação de dois grupos de bovinos (*Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*), como estratégia nutricional para reduzir a emissão de metano entérico pela técnica em pauta, assim como também quantificar a produção de CH₄, e CO₂ nos dejetos orgânicos (fezes) por meio da fermentação utilizando-se biodigestores.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EFEITO ESTUFA E A PECUÁRIA

O aumento dos gases de efeito estufa (GEE) na atmosfera tem sido apontado como uma das principais causas das mudanças climáticas, evidenciando que a emissão de gases oriundos das atividades humanas é responsável pelo aumento observado na temperatura terrestre nas últimas décadas, conforme o Painel Intergovernamental sobre Mudança do Clima (IPCC, 2007).

De acordo com a FAO (2010), dentre os gases de efeito estufa, grande parte das atenções estão voltadas para o CO₂ devido ao impacto ambiental, uma vez que as concentrações e as quantidades emitidas desse gás na atmosfera são extremamente elevadas quando comparadas a outros gases. O metano é o segundo gás de efeito estufa mais importante, pois, uma vez emitido, permanece na atmosfera entre 9 a 15 anos, sendo seu potencial de aquecimento global 25 vezes maior que o CO₂, fazendo com que este gás seja responsável por 15% do efeito estufa observado (ARAUJO, 2010).

As concentrações de CO₂ e CH₄ na atmosfera tem aumentado notadamente no mundo, desde 1750, devido resultado das atividades humanas. Os incrementos nas concentrações de CO₂ se dão, principalmente, ao uso de combustíveis fósseis e às mudanças no uso do solo, enquanto que os aumentos nas concentrações de CH₄ são, principalmente, provenientes da produção agropecuária (IPCC, 2007).

A queima de combustíveis fósseis é o maior contribuinte global de GEE, respondendo por mais de 60% de todas as emissões mundiais. Dentre outras atividades, a agropecuária é uma das que mais contribui com a emissão de GEE (BERNDT, 2010), principalmente por meio da produção de arroz e pecuária bovina.

A pecuária bovina é responsável por 14,5% das emissões antrópicas de gases de efeito estufa e, assim, por uma parcela significativa da mudança climática atual (GEBER et al., 2013). A bovinocultura emite diversos GEE, dentre os quais se destaca o metano emitido durante o processo de digestão entérica e através da decomposição dos dejetos. A emissão de metano entérico é responsável por 25% do total das emissões deste gás proveniente de atividades antrópicas, sendo que os dejetos contribuem com cerca de 8% (BOUNTURI; VAN DIJK, 2012).

O Brasil é o maior exportador de carne bovina, com 2 milhões de toneladas por ano (CONAB, 2014) e o segundo maior produtor de carne, com 9,6 milhões toneladas por ano (CONAB, 2014), sendo o sexto maior produtor de leite, com 32,3 bilhões de litros por ano (IBGE, 2013).

No Brasil, as emissões de metano entérico correspondem a 63,3% (54,1% gado de corte, 7,4% gado de leite e 1,9% de outras espécies) e a decomposição dos dejetos com 5,5% das emissões antrópicas desse gás (BRASIL, 2009). Para Berchielli et al. (2012), o rebanho total do Brasil responde por aproximadamente 3,3% do metano produzido mundialmente por atividades humanas, 11,3% do metano entérico produzido no mundo e 2,6% da produção de metano mundial a partir de dejetos (FAO, 2010).

A fermentação entérica é a maior fonte de emissões de gases de efeito estufa no ciclo de produção de carne bovina canadense, respondendo por 63% das emissões totais (BEAUCHEMIN et al., 2009).

Nos EUA, em 2010, as emissões diretas de GEE oriundos da produção de carne bovina corresponderam a 26,2% das emissões provenientes da agricultura ou 1,6% das emissões nacionais de GEE (EPA, 2011), sendo a emissão de metano proveniente da fermentação entérica responsável por 21% de metano de origem antropogênica emitido nos Estados Unidos (EPA, 2011).

As consequências do efeito estufa sobre a agropecuária, e no 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, com consequências na frequência e quantidade de chuvas. Dados compilados por Deconto (2008) indicam que aumentos de temperatura da ordem de 3°C (aumento médio previsto pelo IPCC até 2100) pode causar a perda de até 25% da capacidade de suporte das pastagens para bovinos de corte, o que equivale a um aumento de custo de produção de 20% a 45%, e que essa perda de área deve ocorrer, principalmente, por causa do aumento de 30 a 50 dias do período sazonal de seca nas áreas hoje aptas para pastagens.

A emissão entérica de metano é um processo natural e intrínseco aos ruminantes (PATRA, 2013). 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 (2012), está prevista a chegar a quase 7,6 bilhões até 2020.

2.2. EMISSÃO DE METANO ENTÉRICO

A fermentação dos componentes dietéticos pela microbiota ruminal resulta na formação, dentre outros, de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), usados pelo ruminante como fonte de energia, e produção de gases (CO_2 e CH_4), eliminados por meio da eructação e respiração (MARTIN; MORGAVI; MOREAU, 2010).

O processo de produção de metano no rúmen é conhecido por metanogênese, sendo derivado da atividade das arqueas metanogênicas, um grupo microbiano distinto, e bactérias possuindo cofatores (coenzima M, F420 e F430) e lipídios (ésteres de isopranil glicerol) únicos. As arqueas metanogênicas são extremamente importantes para o funcionamento do rúmen, apesar de responderem por pequena parte da biomassa microbiana ruminal (JANSSEN; KIRS, 2008).

Principais produtoras de metano, as arqueas são microrganismos anaeróbios estritos que ficam aderidas à superfície do alimento. 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 metanogênicas pertencem a apenas três principais gêneros: *Methanobrevibacter* (62%), *Methanomicrobium* (15%) e *Methanoplasmales* (16%) (PAUL et al., 2012). O restante pertence a gêneros minoritários como *Methanimicrococcus*, *Methanosarcina* e *Methanobacterium* (SAINT-PIERRE; WRIGHT, 2013).

A metanogênese, como processo aceptor de elétrons, remove continuamente o gás hidrogênio (H_2) do meio ruminal. Dessa forma, a formação de metano é essencial para o ótimo desempenho do ecossistema ruminal, evitando o acúmulo de H_2 no rúmen, o que poderia levar à inibição da atividade desidrogenase envolvida na reoxidação dos cofatores reduzidos. A remoção eficiente do H_2 do rúmen contribui para o aumento da taxa de fermentação, pela eliminação do seu efeito inibitório na degradação microbiana de materiais vegetais (WOLIN, 1979; MCALLISTER; NEWBOLD, 2008).

Nenhuma das bactérias ou protozoários que fermentam carboidratos (celulose, hemicelulose, pectina, amido e açúcares solúveis) produz metano, 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 metano (CHURCH, 1998). Um número muito restrito de substratos é utilizado para a metanogênese, sendo eles, H_2 e CO_2 , formato, acetato, metanol mono-, di- e trimetilamina, sendo que quase todas as metanogênicas utilizam H_2 e CO_2 (VALADARES FILHO; PINA, 2011).

A produção de metano no rúmen, apesar de caracterizar uma ineficiência no processo digestivo dos ruminantes, se faz necessária. O acúmulo de H^+ inibe os sistemas enzimáticos, principalmente os processos que envolvem a nicotinamida adenosina difosfato ($\text{NADH} + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{NAD}^+$) (MCALLISTER E NEWBOLD, 2008) e a regulação do pH ruminal. Portanto, qualquer estratégia de mitigação deve incluir uma via alternativa para a remoção de H^+ para fora 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).

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 metano depende do balanço de H_2 no rúmen, sendo influenciada pelas taxas de produção de acetato e propionato (HEGARTY, 2001).

De acordo com a estequiometria de produção dos AGCCs, percebe-se o efeito negativo do propionato sobre a metanogênese, devido à competição pelo mesmo substrato (MOSS; JOUANY; NEWBOLD, 2000), gerando uma relação expressa como:

$$\text{CH}_4 = 0,45 \times \text{Acetato} - 0,275 \times \text{Propionato} + 0,40 \times \text{Butirato}.$$

2.3. EFEITO DO NITRATO DE CÁLCIO SOBRE A FERMENTAÇÃO RUMINAL

A contribuição da metanogênese ruminal para as emissões de gases de efeito estufa resultou em grandes esforços para desenvolver tecnologias e estratégias para reduzir a produção de metano entérico em bovinos (CROSSON; SHALLO; O'BRIEN, 2011). Embora seja possível a redução das emissões de metano sem diminuir a produção animal (GRAINGER; BEAUCHEMIN, 2011), muitas abordagens têm resultados inconsistentes, podendo comprometer o desempenho animal ou são insustentáveis.

O grande desafio no sistema produtivo de ruminantes é desenvolver dietas e sistemas de manejo que minimizem a produção de metano, a fim de possibilitar menores perdas energéticas e, conseqüentemente, melhorias da eficiência alimentar e produtividade animal (NARDONE et al., 2010).

Uma variedade de estratégias tem sido reconhecidas para a mitigação das emissões de metano entérico em ruminantes (GRAINGER; BEAUCHEMIN, 2011; MARTIN; MORGAVI; MOREAU, 2010; PATRA, 2012). McCallister e Newbold (2008) apontam três meios para reduzir as emissões de metano entérico: 1) inibição direta da metanogênese, com o redirecionamento do H^+ para produtos alternativos; 2) diminuição da produção de H^+ e 3) promoção de outros produtos que consumam H^+ .

Técnicas nutricionais, como o uso de ionóforos, glicerol, tanino, saponinas, óleos essenciais (óleos de canola, óleo de alho, linhaça, girassol, etc.), lipídios, 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, 2009). Embora algumas estratégias alimentares tenham sido propostas para diminuir a produção de metano provenientes de ruminantes, poucas têm mostrado diminuição persistente, principalmente *in vivo*.

O principal efeito dos aditivos é manipular a fermentação ruminal, aumentando a formação de propionato, diminuindo a formação de metano (LASCANO; CÁRDENAS, 2010). O ionóforo monensina sódica, por exemplo, é utilizado comercialmente na produção de ruminantes há pelo menos quatro décadas. Seu uso, dentre outros efeitos, melhora a eficiência alimentar, diminui a produção de CH_4 e minimiza os riscos de ocorrência de distúrbios metabólicos (RUSSELL, 1989).

Todavia, a legislação classifica os ionóforos como antibióticos, o que faz seu uso ser cada vez mais criticado pela sociedade consumidora.

Uma alternativa é o uso de nitratos na dieta, pois, de acordo com Leng e Preston (2010), a conversão de nitrato à amônia por microrganismos anaeróbios é altamente competitiva com a produção de metano pelo fato de consumir 8 elétrons no processo, traduzindo-se em um potente inibidor da metanogênese nos sistemas de digestão fermentativa. Assim, segundo Van Zijderveld et al. (2010), essa rota pode se tornar a principal fonte de escoamento de hidrogênio, de forma que cada mol de nitrato reduzido diminuiria a produção de um mol de metano, isso se houver nitrato suficiente no sistema fermentativo. A rota principal de conversão do nitrato à amônia passa por duas reações: na primeira o nitrato é reduzido a nitrito (reação 1) e, na segunda, o nitrito é reduzido à amônia (reação 2). Essas reações produzem mais energia do que a conversão de dióxido de carbono e água a metano, -598 kJ contra -131 kJ, respectivamente (LENG; PRESTON, 2010).

Van Zijderveld et al. (2011) afirmaram que a redução de nitratos por via anaeróbia é energeticamente mais favorável do que a redução de CO₂, além de que a presença de nitratos no rúmen redireciona H₂ da metanogênese para redução de nitratos, diminuindo assim a produção de metano. Este fato foi observado por Phommasack, Preston e Leng (2011), no qual os autores trabalharam com dietas à base de cana-de-açúcar e folhas de mandioca, frescas ou secas, comparando a inclusão de nitrato de cálcio (3,8% da MS) com a ureia (2% da MS) e observaram redução de 22% na produção de metano. Os mesmos autores concluíram que a redução de 22% na produção de metano consiste em uma expectativa de reduzir, aproximadamente, 14 milhões de toneladas de CH₄/ano e pode substituir o uso da ureia, uma vez que o nitrato funciona como fonte de nitrogênio. Silivong, Preston e Leng (2011) também observaram redução de 23% na produção de metano, quando compararam as inclusões dietéticas de 3,8% de nitrato de cálcio com a de 2% de ureia na matéria seca da dieta de caprinos. Já em vacas leiteiras alimentadas com dietas contendo 8,8% de nitrato de cálcio ou 3,5% de ureia (na MS do concentrado), Van Zijderveld et al. (2011) constataram redução persistente da emissão de metano.

2.4. METAHEMOGLOBINEMIA

O nitrito (NO_2) é sabidamente tóxico aos ruminantes desde 1895. Isso porque a redução do nitrato a nitrito ocorre em uma taxa maior do que a redução de nitrito a amônia, resultando em acúmulo desse intermediário no rúmen e, conseqüentemente, ele é absorvido pela corrente sanguínea (BRUNING-FANN; KANEENE, 1993). No sangue ele se liga à hemoglobina, promovendo a oxidação do ferro e formando a metahemoglobina, qual é incapaz de transportar oxigênio para os tecidos, impedindo assim as células de gerar energia através da cadeia respiratória (SANTOS, 2006). Essa reação é reversível e, segundo Prewitt e Merilan (1958), a metahemoglobina é gradualmente reduzida a hemoglobina, voltando à sua função normal. De acordo com Santos (2006), quando 40% a 60% da hemoglobina é convertida a metahemoglobina, o animal começa a apresentar sintomas clínicos de intoxicação por nitrato, como: dispneia, respiração forçada pela boca, fraqueza muscular, ataxia, cianose e até mesmo aborto causado pela anóxia. Já, quando mais de 75% da hemoglobina é convertida, há grande risco à vida, podendo ocorrer a morte pela anóxia celular.

Jainudeen et al. (1964) forneceram 0,7 g de nitrato/kg de peso corporal a vacas prenhes, dividido em duas aplicações diárias. Eles observaram que com o passar do tempo aumentou a concentração de metahemoglobina no sangue, chegando ao pico quatro horas após a alimentação. A curva inversa foi percorrida pela capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue. Nesta mesma publicação eles testaram o fornecimento a novilhas prenhes de 0; 0,4 e 0,7 g de nitrato/kg de peso corporal e encontraram valores médios de metahemoglobina de 4,6%; 25% e 44% da hemoglobina, respectivamente, sem detectar qualquer sinal clínico nessas novilhas.

Burrows et al. (1987), visando testar a influência da suplementação com milho (0; 1,6 e 3,2 kg/vaca/dia) sobre o metabolismo do nitrato (dose de 3 g de nitrato de sódio/kg de peso corporal), observaram que o fornecimento de 3,2 kg de milho favoreceu a metabolização do produto, pois verificaram redução da concentração de nitrito no rúmen e no sangue, e ainda uma menor formação de metahemoglobina. Burrows et al. (1987) constataram ainda que nos tratamentos com 0 e 1,6 kg de milho, muitas vezes as concentrações de metahemoglobina ultrapassaram 50%, oito horas após a administração do nitrato de sódio. Desta maneira, foi possível observar sinais clínicos quando a concentração de metahemoglobina foi superior a 60%. Quando isso

ocorreu, foi realizado o tratamento com azul de metileno, rapidamente, o que aliviou os sinais. Contudo, deve-se levar em consideração que em quatro das 12 observações de sinais clínicos de vacas recebendo 0 kg de milho foram necessárias administrações de azul de metileno, enquanto em apenas duas das oito observações de vacas que receberam 1,6 kg de milho foram necessários tratamentos com azul de metileno.

Uma forma de prevenir a intoxicação por nitrato seria o fornecimento de fontes de enxofre, que estimulariam o aparecimento de bactérias (*M. elsdenii*) que inibem a redução do nitrato a nitrito, diminuindo o risco de intoxicação nos animais. Além disso, essas bactérias tem a capacidade de reduzir o nitrito pelas rotas secundárias, aumentando a redução a amônia e diminuindo, ainda mais, o risco de uma possível intoxicação (PERDOK et al., 2011).

No trabalho de Van Zijderveld et al. (2010), a concentração máxima de metahemoglobina observada foi de 7% da hemoglobina, em uma inclusão de 3,4% de nitrato de cálcio na matéria seca equivalendo a uma dose de 1,6 g de nitrato/kg de peso corporal. A explicação dos autores para essa baixa concentração de metahemoglobina está no período de adaptação realizado e na forma de fornecimento. O aumento gradual da dose de nitrato no período de adaptação permite que os microrganismos do rúmen elevem a capacidade de reduzir o nitrato à amônia. Além disso, a forma de fornecimento parcelada evita picos de nitrito no rúmen, que por sua vez diminui a elevação da metahemoglobina no sangue.

2.5. METANO NOS DEJETOS

Apesar dos grandes avanços em genética e nutrição animal, parte dos alimentos ingeridos pelos bovinos não são totalmente aproveitados, sendo excretados em função da não digestão e/ou absorção. O alimento não aproveitado é eliminado na forma de fezes e urina, o que os torna o principal resíduo do sistema de produção de bovinos. As fezes são compostos orgânicos com macro e micronutrientes, com alto teor energético (CASTRILLON et al., 2002).

Uma vaca produtora de leite com mais de 24 meses de idade e produzindo diariamente 15 kg de leite produz, aproximadamente, 45 kg de fezes por dia. Já uma vaca de corte produz, aproximadamente, 28 kg de fezes por dia e, em média, ambas produzem no mínimo 13L de urina por dia (FUENTES YAGUE, 1992). Van Horn et al.

(1994) realizaram estimativa de 22.805 kg de fezes produzidas anualmente por vacas holandesas com 635 kg de peso corporal. Morse et al. (1992) estimaram que vacas leiteiras excretam por dia nos dejetos (fezes + urina) 54 g de P, 168 g de K, 119 g de Ca, 55 g de Na e 46 g de Mg.

Uma vez excretada, as fezes sofrem uma série de reações, dentre elas a decomposição através da fermentação (LI et al., 2012). Dejetos animais quando se decompõem, via anaeróbia, resultam em emissões de gases de efeito estufa, principalmente o metano (LIMA et al., 2006).

A maior parte da emissão de CH₄ a partir das fezes é produzida em condições anaeróbias, durante o armazenamento na forma líquida, principalmente em lagoas ou tanques (CHIANESE; ROTZ; RICHARD, 2009; PEREIRA et al., 2010). Alguns estudos demonstraram que quando as fezes são estocadas de forma anaerobia elas podem produzir de 7 a 27% das emissões totais de CH₄ relacionadas aos ruminantes (KREUZER; HINDRICHSEN, 2006).

A fermentação das fezes ocorre em duas etapas: rápido crescimento das bactérias acidogênicas, ativas à temperatura ótima de 30°C. Nessa etapa, há uma mistura intensa entre o substrato e a bactéria, produzindo ácidos graxos de cadeia curta, H⁺ e CO₂, e, então, arqueas metanogênicas produzem metano a partir dos ácidos graxos de cadeia curta produzidos na etapa anterior (MONTENY; BANNINK; CHADWICK, 2006).

Prado, Campos e Silva (2010) citaram que a composição global do biogás produzido a partir de fezes, bem como sua concentração de metano, varia com uma série de fatores, tais como: a composição química do dejetos, os nutrientes a serem usados pelos microrganismos, pH, acidez e alcalinidade.

Os dados resumidos por Chianese, Rotz e Richard (2009) indicam as emissões médias de CH₄ em lagoa coberta, lagoa descoberta e estrume empilhado de 6,5; 5,4 e 2,3 kg/m³ por ano, respectivamente, embora as taxas variem de acordo com a temperatura e o tempo de armazenamento. Rahman, Lin e Zhu (2012) relataram taxas de emissão de CH₄ provenientes das fezes de um bovino em confinamento de 38 g/cabeça/dia.

REFERÊNCIAS

- ARAUJO, A.C. **Diversidade molecular de arqueas em sedimentos de rios da amazônia e caracterização das metanogênicas cultivadas**. 2010. 124f Tese (doutorado em biotecnologia) Curso de Pós Graduação em Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- BEAUCHEMIN, K.A.; KREUZER, M.; O'MARA, F.; MCALLISTER, T.A. Nutritional management for enteric methane abatement: A review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Collingwood, v. 48, p. 21-27, 2008.
- BEAUCHEMIN, K.A.; MCGINN, S.M.; BENCHAAAR, C.; HOLTSHAUSEN, L. Crushed sun flower, flax, or canola seeds in lactating dairy cow diets: effects on methane production, rumen fermentation, and milk production. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p.2118–2127, 2009.
- BEEF POINT. ABIEC lança iniciativas para o futuro sustentável da cadeia da carne bovina. 2015. Disponível em <http://www.beefpoint.com.br/cadeia-produtiva/giro-do-boi/abiec-lanca-iniciativas-para-o-futuro-sustentavel-da-cadeia-da-carne-bovina/> Acesso em outubro de 2014.
- 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. Impacto da pecuária de corte brasileira sobre os gases do efeito estufa. In: SIMPOSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 7., 2010, Viçosa. **Anais**. Viçosa: DZO: UFV, 2010. p. 121-147. BRASIL. Ministério da Ciência e Tecnologia. Inventário brasileiro das emissões e remoções antrópicas de gases de efeito estufa: informações gerais e valores preliminares. Brasília, 2009.
- BONTURI, G.L.; VAN DIJK, M. Instalação de biodigestores em pequenas propriedades rurais: análise de vantagens socioambientais. **Revista Ciências do Ambiente**, v. 8, n. 2, p. 88-95, 2012.
- BRASIL. Ministério da Ciência e Tecnologia. **Inventário brasileiro das emissões e remoções antrópicas de gases de efeito estufa**: informações gerais e valores preliminares, Brasília, 2009.
- BRUNING-FANN, J. S.; AND KANEENE, J. B.. The effects of nitrate, nitrite, and N-nitroso compounds on animal health. **Veterinary and Human Toxicology**, United States, v. 35, p. 237-253, 1993.
- BUDDLE, B.M.; DENIS, M.; ATTWOOD, G.T.; ALTERMANN, E.; JANSSEN, P.H.; RONIMUS, R.S.; PINARES-PATIÑO, C.S.; MUETZEL, S.; NEIL WEDLOCK, D. Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pasture. **The Veterinary Journal**, United Kingdom, v.188, n.1, p.11-17, 2011.
- BURROWS, G.E.; HORN, G.W.; MCNEW, R.W.; CROY, L.I.; KEETON, R.D.; KYLE, J. The prophylactic effect of corn supplementation on experimental nitrate intoxication in cattle. **Journal of Animal Science**, v.64, p.1682-1689, 1987.

CASTRILLÓN L.; VÁZQUEZ, I.; MARAÑÓN, E.; SASTRE, H. Anaerobic thermophilic treatment of cattle manure in UASB reactors. **Waste management & Research**. v.20, n.4, p.350-360, 2002.

CHIANESE, D.S.; ROTZ, C.A.; RICHARD, T.L. Simulation of nitrous oxide emissions from dairy farms to assess greenhouse gas reduction to grassland. **Journal of Environmental Quality**, v.29, p.277-287, 2009.

CHURCH, D.C. **El Rumiante: fisiología digestiva y nutrición**. Ed. Acribia. Zaragoza. 630p, 1998.

CONAB. Indicadores da Agropecuária: Quadro de Suprimentos. 2014. Disponível em <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1470&t=2> Acesso em outubro de 2014.

CROSSON, O.; SHALLOO, L.; O'BRIEN, D. A review of whole farm system models for greenhouse gas emissions from beef and dairy cattle production systems. **Animal Feed Science Technology**. n.45, p.166–167, 2011.

DECONTO, J. G. (Coord.). Aquecimento global e a nova geografia da produção agrícola no Brasil, p. 84. São Paulo: Embrapa/Unicamp, 2008.

EPA - U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, CLIMATE CHANGE DIVISION. Greenhouse gas emissions reporting from the petroleum and natural gas industry. **Background Technical Support Document** - Petroleum and Natural Gas Industry. 2011.

FAO. **Food and Agriculture Organization**. 2010. Greenhouse gas emissions from the dairy sector: A life cycle assessment. FAO, Rome, Italy, 2010.

FAO. World agriculture: towards 2015/2030. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, Economic and Social Development Department, Rome, 97p. 2002.

FAO. Greenhouse gas emissions from ruminant supply chains, a global life cycle assessment. **Report**, Food and Agriculture Organization, 2013.

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

FUENTES YAGUE, J. L. Construcciones para la agricultura y la ganaderia. ed. 6, Madrid:Ediciones Mundi-Prensa, p.414, 1992.

GEBER, 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, 2013.

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.

GRAINGER, C.; BEAUCHEMIN, K.A. Can enteric methane emissions from ruminants be lowered without lowering their production? **Animal Feed Science Technology**, v.166, p.166–167, 2011.

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

IBGE. Produção da Pecuária Municipal, Rio de Janeiro, v. 40, p.1-71, 2012. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística** - IBGE 2013.

IPCC (INTERGOVERNMENTAL PANEL FOR CLIMA CHANGE). Climate change 2007: the physical science basis. Cambridge, p.80, 2007.

JAINUDEEN, M.R.; HANSEL, W.; DAVISON, K.L. Nitrate toxicity in dairy heifers. 2. Erythropoietic responses to nitrate ingestion during pregnancy. **Journal of Dairy Science**, v.47, p.1382-1387, 1964.

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

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

KREUZER, M.; HINDRISCHESEN, I.K. Methane mitigation in ruminants by dietary means. The role of their methane emission from manure. **International Congress Series**, v.1293, p.199-206, 2006.

LASCANO, C.E.; CÁRDENAS, E. Alternativas para mitigação de emissão de metano em sistemas de criação de animais domésticos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, vol. 39, p.175-182, 2010.

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**, v. 12, p.425-431, 1970.

LENG, R.A.; PRESTON, T.R. Further considerations of the potential of nitrate as a high affinity electron acceptor to lower enteric methane production in ruminants. **Livestock Research for Rural Development**, v.22, n.221, 2010.

LI, C.; SALAS, W.; ZHANG, R.H.; KRAUTER, C.; ROTZ, A.; MITLOEHNER, F. Manure-DNDC: a biogeochemical process model for quantifying greenhouse gas and ammonia emissions from livestock manure systems. **Nutrient Cycling Agroecosystems**, v. 93, p.163–200, 2012.

LIMA M.A.; PESSOA M.C.P.Y.; LIGO M.A.V.; NEVES M.C. Emissões de óxido nítrico provenientes de solos agrícolas. **Relatório de Referência, Primeiro Inventário Brasileiro de Emissões Antrópicas de Gases de Efeito Estufa**. Ministério da Ciência e Tecnologia, EMBRAPA, p.127. 2006.

MARTIN, C.; MORGAVI, D.P.; MOREAU, D. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. **Animal**, v. 4, p. 351–365, 2010.

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

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.

MONTENY, G.J.A.; BANNINK, D.; CHADWICK, A.R. Greenhouse gas abatement strategies for animal husbandry. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 112, p. 163-170, 2006.

MORSE, D.; HEAD, H.H.; WILCOX, C.J.; VAN HORN, H.H.; HISSEM, C.D.; HARRIS, B. Effects of concentration of dietary phosphorus on amount and route of excretion. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 3039-3048, 1992.

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

NARDONE, A.; RONCHI, B.; LACETERA, N.; RANIERI, M.S.; BERNABUCCI, U. Effects of climate changes on animal production and sustainability of livestock systems. **Livestock Science**, v. 130, p. 57-69, 2010.

ONU Brasil (2012). Além da Rio +20: Avançando rumo a um futuro sustentável. Disponível em: <http://www.ono.org.br/rio20/além-da-rio20-avanco-a-um-futuro-sustentavel>. Consultado em 05/12/2014.

PATRA, A.K. Enteric methane mitigation technologies for ruminant livestock: A synthesis of current research and future directions. **Environmental Monitor Assess** v. 184, p. 1929–1952, 2012.

PATRA, A.K.; YU, Z. Effects of coconut and fish oil on ruminal methanogenesis, fermentation, and abundance and diversity of microbial populations invitro. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 1782–1792, 2013.

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

PEREIRA, J.; FANGUEIRO, D.; CHADWICK, D. R.; MISSELBROOK, T.H.; COUTINHO, J.; TRINDADE, H. Effect off cattle slurry pre tratamet by separation and addition of nitrification inhibitors on gaseous emission and N dynamics: A laboratory study. **Chemosphere**, v. 79, p. 620-627, 2010.

PHOMMASACK, O.; PRESTON, T.R.; LENG, A. Effect of supplementation with urea or calcium nitrate and cassava leaf meal or fresh cassava leaf in an in vitro incubation using a basal substrate of sugar cane stalk. **Livestock Research for Rural Development**, v. 23, n. 23, 2011.

PRADO, M.A.C.; CAMPOS, C.M.M.; SILVA, J.F. Estudo da variação da concentração de metano no biogás produzido a partir das águas residuárias do café. **Ciência e agrotecnologia**, v. 34, p. 475-484, 2010.

PREWITT, R.D.; MERILAN, C.P. Effect of potassium nitrate intake on dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 41, p. 807-811, 1958.

PROVIMI HOLDING B. V. Hindrik Bene Perdok; Sander Martin van Zijderveld; Rob Bernard Anton Hulshof; David Deswysen; Walter Jan Jozef Gerrits; Jan Dijkstra. **Compositions for reducing gastro-intestinal methanogenesis in ruminants**. WO/2011/010921 A2, 23 de julho de 2010, 27 de janeiro de 2011.

Rahman S, Lin D, Zhu J (2012) Greenhouse Gas (GHG) Emissions from Mechanically Ventilated Deep Pit Swine Gestation Operation. **J Civil Environment Engg**, v. 2:104. doi:10.4172/2165-784X.1000104

RUSSEL, J.B.; STROBEL, H.J. Minireview. Effect of ionóforos on ruminal fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 1-6, 1989.

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

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

SANTOS, J.E.P. Distúrbios metabólicos. In: BERCHIELLI, T.T.; OLIVEIRA, S.G.; PIRES, A.V. **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 583, cap. 15, p. 423-492.

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

SNYDER, C.S.; BRUULSEMA, T.W.; JENSEN, T.L. Melhores práticas de manejo para minimizar emissões de gases de efeito estufa associadas ao uso de fertilizantes. **Informações Agrônomicas**, n. 121, p. 13-14, 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.

UN. (2007) World Population Prospects. The 2006, Revision. United Nations Department of Economic and Social Affairs/Population Division, New York, p. 96. 2007.

US-EPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Developing a Greenhouse Gas Inventory. 2012. Disponível em <http://epa.gov/statelocalclimate/local/activities/ghg-inventory.html#one>. Acessado em 5/12/2014.

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.; MAGALHÃES, K.A.; ROCHA JR., V.R. et al. Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos. 2.ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Zootecnia, p. 329, 2006.

VALADARES FILHO, S. C; PINA, D. S.. Fermentação ruminal. In BERCHIELLI, T.T; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de Ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, p.161-191, 2011.

VAN HORN, H.H.; WILKIE, A C.; POWERS, W.J.; NORDSTEDT, R. A. Components of dairy manure management systems. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 2008-2030, 1994.

VAN SOEST, P. Nutritional ecology of the ruminant, 2. ed. Ithaca: **Cornell University Press**, p. 476, 1994.

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

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

WEIMER, P.J. Manipulating ruminal fermentation: a microbial ecological perspective. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 3114-3122, 1998.

WOLIN, M.J. The rumen fermentation: a model for microbial interactions in anaerobic ecosystems. **Advance Microbiology Ecology**, v. 3, p. 49-77, 1979.

3. CONSUMO DE NUTRIENTES, COMPORTAMENTO INGESTIVO E AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS SANGUÍNEOS DE BOVINOS ALIMENTADOS COM DIFERENTES NÍVEIS DE NITRATO DE CÁLCIO

RESUMO: Objetivou-se avaliar o efeito de diferentes doses de nitrato de cálcio na dieta de dois grupos de bovinos sobre o consumo de matéria seca, ingestão, excreção e digestibilidade dos nutrientes, comportamento ingestivo, bem como parâmetros sanguíneos e de hemogasometria. Para tal, quatro fêmeas taurinas e quatro zebuínas, canuladas no rúmen, com peso médio inicial de $909,0 \text{ kg} \pm 72,0$ e $387,0 \text{ kg} \pm 25,5$, respectivamente, foram submetidas a uma das quatro dietas experimentais, isoenergética e isonitrogenadas, que diferiram de acordo com os níveis de nitrato de cálcio: **0%**: dieta sem adição de nitrato de cálcio; **1%**: dieta com adição de 1% de nitrato de cálcio; **2%**: dieta com adição de 2% de nitrato de cálcio e **3%**: dieta com adição de 3% de nitrato de cálcio, todos com base na matéria seca da dieta. Os taurinos apresentaram valores superiores quanto a ingestão e digestibilidade de todos os nutrientes avaliados e excreção de MS, PB, FDN, FDA, N, MO e EB. Os zebuínos apresentaram maiores taxas de ingestão, ruminação e mastigação de MS e FDN em min/kg, tendo valores inferiores para as mesmas taxas em kg/min. Para os teores séricos os taurinos apresentaram os valores superiores de Beect, HCO_3 , TCO_2 , Na, Hb, VCM, HCM e TP-2, e inferiores para sO_2 , pO_2 , He, RDW, urea e PHOS. O aumento no nível de NC na dieta aumentou linearmente a digestibilidade de EE e ENN, tempo médio ruminando, taxa de mastigação de MS e FDN (min/kg) e creatinina sérica, e diminuiu linearmente a excreção de MS, EE, ENN, MO e EB. A taxa de ingestão de MS e FDN em kg/min, assim como as concentrações séricas de PHOS, o tempo total comendo, taxa de ingestão de MS e FDN em min/kg apresentaram efeito quadrático ao aumentar a adição de NC à dieta. A adição de nitrato afetou o comportamento alimentar aumentando a mastigação, sem influenciar a saúde dos animais. Os grupo taurino foi mais eficiente no uso dos alimentos.

Palavras-chave: Comportamento. Consumo de matéria seca. Digestibilidade. Hemograma. Nitrato de cálcio.

NUTRIENTS INTAKE, FEEDING BEHAVIOR AND EVALUATION OF BLOOD PARAMETERS OF CATTLE FED WITH DIFFERENTS LEVELS OF CALCIUM NITRATE

ABSTRACT: The aim of the present study was to evaluate the consumption of dry matter intake, excretion and nutrient digestilidade, ingestive feeding behavior, as well as blood and hemogasometria parameters of two groups of cattle. Thus, four Holsteins females and four Zebu, rumen cannulated, with initial average weight of 909,0 kg $\pm$ 72,0 and 387,0 kg $\pm$ 25,5, respectively. The cattle were subjected to one of four experimental isoenergetic and isonitrogenous diets, which differed according to the levels of calcium nitrate: **0%**: diet with no added calcium nitrate; **1%**: diet with addition of 1% calcium nitrate; **2%**: diet with the addition of 2% calcium nitrate and **3%**: diet with added 3% calcium nitrate, all those diets were based on diet dry matter. Holsteins presented higher values for ingestion and digestibility of all the nutrients assessed and excretion of DM, CP, NDF, ADF, N, OM and GE. Nellore cattle showed higher rates of ingestion, rumination and chewing of DM e NDF min/kg, and they had lower values for the same rates in kg/min. For serum concentrations, Holsteins showed the highest values for Beect, HCO₃, TCO₂, Na, Hb, VCM, HCM and TP-2, and lowest values for sO₂, pO₂, He, RDW, urea and PHOS. The increase of CN level in the diet increased linearly the digestibility of EE and NNE, average time ruminating, chew rate for DM and NDF (min/kg), and decreased linearly excretion of DM, EE, NNE, OM and GE. The intake rate of intake of DM and NDF kg/min, as well as the serum concentrations of PHOS and the total time eating, intake rate DM and NDF min/kg showed quadratic effect by increasing the addition of CN in the diet. The inclusion of nitrate affected the feeding behavior, increasing chew rate, without influencing the health of the animals. The taurine group was more efficient using the food.

Keywords: Behavior. Calcium nitrate. Digestibility. Dry matter intake.

3.1. INTRODUÇÃO

A pecuária bovina é responsável por 12-18% das emissões antrópicas de gases de efeito estufa (WESTHOEK et al., 2011) e, assim sendo, por uma parte significativa das mudanças climáticas atuais. A maior contribuição de GEE advém da metanogênese durante a fermentação do alimento no rúmen, ou seja, cerca de 37% do metano antrópico emitido globalmente.

A inclusão de nitrato de cálcio apresenta uma alternativa para a mitigação de uma parte desse metano entérico, diminuindo assim a perda energética pela via da metanogênese. Porém, são necessários estudos de sua ação sobre o consumo e digestibilidade das dietas oferecidas aos animais.

Sabe-se que a inclusão de nitrato na dieta de ruminantes está associado à redução da digestibilidade da fibra e, consequentemente, da matéria seca, pelo fato de o nitrato ter efeito tóxico sobre microrganismos celulolíticos (MARAIS et al., 1988). Porém, Nolan et al. (2010) não observaram alterações nas taxas de degradação da MS ou na digestibilidade em dietas com 4% de nitrato de potássio.

No rúmen, o nitrato é reduzido a nitrito e, em seguida, a amônia. Se o produto intermediário nitrito se acumular no rúmen, pode ser absorvido e causar uma síndrome tóxica chamada metemoglobinemia (LENG, 2008). O monitoramento dos parâmetros sanguíneos é importante ao passo que alterações nas concentrações e padrões podem indicar problemas na digestibilidade ou absorção de algum nutriente, assim como problemas da saúde ruminal.

Diante do exposto, a hipótese principal deste experimento é que altos níveis de nitrato reduza o consumo de matéria seca, bem como afete a digestibilidade da fibra e altere o comportamento ingestivo dos bovinos, sem prejudicar a saúde do mesmo.

Objetivou-se avaliar os efeitos causados pela inclusão de níveis crescentes de nitrato de cálcio sobre o consumo de matéria seca, ingestão, excreção e digestibilidade dos nutrientes, bem como estudar o comportamento ingestivo e alterações nas características sanguíneas, que poderiam ocorrer em bovinos em duas condições distintas, um grupo de vacas taurinas adultas com aptidão para leite, raça holandesa, e um grupo de novilhas zebuínas em crescimento com aptidão para carne, raça nelore.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso dos Animais da Universidade de São Paulo, protocolado sob o CEUA nº 6652271113 e realizado no Departamento de Nutrição e Produção Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, campus de Pirassununga, nas instalações do Estábulo Experimental e Laboratório de Nutrição Animal e Bromatologia.

Foram utilizadas oito vacas, não gestantes e não lactantes, sendo 4 holandesas e 4 nelores com peso vivo médio inicial de $909,0 \text{ kg} \pm 72$ e $387,0 \text{ kg} \pm 25,5$, respectivamente. Os animais foram mantidos em instalação coberta, provida de baias individuais com cochos de cimento, bebedouros automáticos comuns a cada dois animais e camas de areia, que proporcionam maior conforto e bem-estar aos mesmos.

Foi utilizado delineamento quadrado latino 4x4 replicado. As unidades experimentais foram os animais dentro de quadrado em cada período experimental. O experimento contou com 32 unidades experimentais referentes a dois quadrados, um com quatro holandesas e outro com quatro nelores e quatro períodos.

Os tratamentos diferiram de acordo com os níveis de nitrato de cálcio: **0%**: dieta sem adição de nitrato de cálcio; **1%**: dieta com adição de 1% de nitrato de cálcio; **2%**: dieta com adição de 2% de nitrato de cálcio e **3%**: dieta com adição de 3% de nitrato de cálcio, todos com base na matéria seca na dieta. Os diferentes núcleos, contendo a fonte de N, foram preparados previamente ao experimento, com a adição de ureia, calcário e caulim à medida que o nível de nitrato de cálcio fosse diminuindo dos 3%, mantendo assim todas as dietas isoenergéticas e isonitrogenadas, sendo adicionadas à dieta no momento da oferta aos animais. A adição do calcário permitiu a mesma concentração de cálcio nos 3 diferentes núcleos. Os níveis dos ingredientes no preparado foram calculados de forma a sempre apresentar os valores de 15,5% de nitrogênio e 19% de cálcio. As proporções dos diversos ingredientes da dieta e a composição bromatológica da mesma estão descritos a seguir.

Tabela 1 - Proporções de ingredientes e composição bromatológica das dietas experimentais, expressas em porcentagem de matéria seca.

Ingredientes (%)	Dietas			
	0%	1%	2%	3%
Silagem de milho	50,00	50,00	50,00	50,00
Milho grão moído	38,73	38,73	38,73	38,73
Farelo de soja	5,87	5,87	5,87	5,87
Sal comum	0,42	0,42	0,42	0,42
Enxofre – flor	0,19	0,19	0,19	0,19
Suplemento mineral ¹	1,79	1,79	1,79	1,79
Nitrato de cálcio	0	1,00	2,00	3,00
Ureia	1,03	0,69	0,35	0
Calcário	1,48	0,99	0,49	0
Caulim	0,49	0,32	0,16	0
Composição bromatológica ²				
Matéria seca (%)	62,45	62,45	62,45	62,45
MM (%MS)	5,51	5,51	5,51	5,51
PB (%MS)	12,80	12,80	12,80	12,80
EB (Mcal/kg)	4398,11	4398,11	4398,11	4398,11
FDN (%MS)	40,06	40,06	40,06	40,06
FDA (%MS)	24,93	24,93	24,93	24,93
Lignina (%MS)	3,70	3,70	3,70	3,70
EE (%MS)	4,38	4,38	4,38	4,38
P (%MS)	0,42	0,42	0,42	0,42
Ca (%MS)	1,88	1,88	1,88	1,88
S (ppm)	30,00	30,00	30,00	30,00

¹Suplemento mineral e vitamínico, quantidade por kg de produto: 200 g de cálcio, 60 g de fósforo, 20 g de enxofre, 20 g de magnésio, 70 g de sódio, 15 mg de cobalto, 700 mg de cobre, 700 mg de ferro, 40 mg de iodo, 1.600 mg de manganês, 19 mg de selênio, 2.500 mg de zinco, 200.000 UI de vitamina A, 50.000 UI de vitamina D3, 1.500 UI de vitamina E; ²Valores estimados de acordo com análise bromatológica dos alimentos.

Os alimentos foram oferecidos duas vezes ao dia, às 08:00 e 16:00 h, na forma de ração completa, *ad libitum* com garantia de sobras entre 5 a 10% do ofertado.

3.2.1. Período experimental

O experimento teve duração de 112 dias e foi dividido em quatro períodos. Cada período teve a duração de 28 dias, sendo 17 dias de adaptação às respectivas dietas e os dez últimos dias destinados à coleta de dados.

3.2.2. Análise bromatológica dos alimentos

Do 18º ao 23º dia experimental de cada período, foram amostrados os alimentos utilizados nas dietas. Inicialmente foi verificado o teor de matéria seca (MS), determinado pela secagem em estufa, com ventilação e renovação de ar constante, a 60°C durante 48 horas, segundo AOAC (1995). Após secas, as amostras foram moídas em moinho willye tipo facas em peneiras de 1 mm e armazenadas em potes de vidro. A partir daí foram realizadas análises de composição bromatológica.

A matéria mineral (MM) foi obtida pela calcinação em forno mufla a 600°C durante 3 horas (AOAC, 1995). Pela diferença entre o valor da MS e da MM estimou-se o teor de matéria orgânica (MO) da amostra (CAMPOS; NUSSIO; NUSSIO et al., 2004). O teor de proteína bruta (PB) foi determinada pelo método de quantificação de nitrogênio DUMAS, e para a conversão da proteína bruta foi utilizado o fator de correção 6,25. O teor de extrato etéreo (EE) foi determinado com a utilização de equipamento ANKON (ANKOM XT15 Extractor), de acordo com as especificações do fabricante. A energia bruta (EB) foi determinada pela oxidação completa das amostras em bomba calorimétrica adiabática. O extrato não nitrogenado (ENN) foi obtido com a seguinte fórmula:

$$\%ENN = 100 - (\%PB + \%FDN + \%EE + \%MM)$$

O fósforo foi determinado por redução do complexo fósforo-molibdato, com ácido ascórbico, e as leituras foram tomadas em colorímetro segundo AOAC (1995).

Os teores de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina foram determinados pelo método do Filter Bag Technique da Ankom® (FBT) obtidos pelo método convencional de Van Soest, Robertson e Lewis (1991). A determinação do teor de lignina foi feita a partir da FDA, seguida de lavagem em solução de ácido sulfúrico a 72%.

3.2.3. Ingestão, excreção e digestibilidade dos nutrientes

A ingestão dos nutrientes foi calculada em relação ao peso metabólico, de acordo com a concentração dos nutrientes na dieta, multiplicada pelo consumo médio de matéria seca.

A digestibilidade aparente total da matéria seca da dieta e suas frações (PB, EE, ENN, FDN e FDA, MO e EB) foram determinadas por meio do marcador de dióxido de titânio (TiO_2), segundo Pezzato et al. (2002). Para tal, do 14º ao 23º dia de oferecimento das dietas foram administrados 15 gramas diárias do marcador de dióxido de titânio, dividido em duas vezes por dia, via cânula ruminal, sendo os cinco primeiros dias para adaptação e os cinco últimos dias para administração e coleta de fezes, coletadas manualmente via reto e duas vezes ao dia. As amostras de fezes coletadas foram armazenadas em freezer. A partir das fezes armazenadas, foi retirada uma alíquota de 200g para determinação da concentração de dióxido de titânio, segundo Pezzato et al. (2002). A digestibilidade do alimento foi calculada utilizando as seguintes equações (SILVA; LEÃO, 1979):

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

$$\text{Digestibilidade de nutrientes (\%)} = 100 - 100 \times \left(\frac{\text{TiO}_2 \text{ na dieta}}{\text{TiO}_2 \text{ nas fezes}} \times \frac{\text{Nutriente nas fezes}}{\text{Nutriente na dieta}} \right)$$

3.2.4. Comportamento ingestivo

O comportamento ingestivo foi avaliado, em cada período experimental, por meio do monitoramento visual, no qual foram observadas as atividades de alimentação, ruminação e ócio dos animais durante 24 horas (MAEWAKA et al., 2002), com início e término às 8h da manhã do 17º e 18º dia experimental em cada um dos períodos. As atividades foram anotadas a cada 5 minutos, onde um evento foi definido como, no mínimo, 5 minutos de atividade seguido por, no mínimo, 5 minutos da mesma atividade. A soma de todos os eventos comendo representa o número diário de eventos comendo (eventos/dia). Da mesma forma, é calculado o número diário de eventos ruminando e ócio.

O tempo total comendo (min/dia) foi definido como a soma de todos os eventos comendo. O tempo médio comendo por evento (min/evento) foi obtido pelo tempo total comendo dividido pelo número de eventos comendo. Da mesma forma foram obtidos os tempos totais de ruminação e ócio e os tempos médios de ruminação e ócio por evento. O tempo total de mastigação (min/dia) foi calculado pela soma do tempo total

comendo e do tempo total ruminando. O número diário de eventos de mastigação (eventos/dia) foi obtido pela soma do número de eventos comendo e o número de eventos ruminando, 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.

A taxa de ingestão (kg/evento) foi determinada como sendo a razão entre o consumo de MS e o número de eventos comendo. A taxa de ingestão de FDN (kg/evento) foi determinada como sendo a razão entre o consumo de FDN e o número de eventos comendo. A taxa de ingestão de MS ou FDN (min/kg) foram determinadas pela razão entre tempo total comendo pelas quantidades médias de MS ou FDN ingeridas. A taxa de ingestão da MS ou FDN (kg/min) foram calculadas pela razão entre as quantidades médias de MS ou FDN ingeridas pelo tempo total comendo. Os mesmos cálculos seguem para as taxas de ruminação da MS ou FDN, bem como mastigação da MS ou do FDN (min/kg).

3.2.5. Coleta sanguínea

As amostras de sangue foram colhidas no 22º dia por punção da veia jugular externa, com agulha descartável 25x28 mm, em três tubos plásticos preparados para a colheita de sangue a vácuo (Sistema Vacutainer). O tubo contendo 7,2 mg de EDTA-K2 como anticoagulante (tubo de tampa roxa) e com vácuo suficiente para aspirar 4 mL de sangue era destinado à determinação do hemograma. O tubo sem anticoagulante e com gel ativador de coágulo era destinado à obtenção do soro para as análises bioquímicas. O tubo com 6 mg de fluoreto de sódio (agente antiglicolítico) e EDTA como anticoagulante foi destinado à obtenção do plasma e da concentração de glicose.

O sangue, após a colheita feita no 22º dia, era mantido sob refrigeração até o momento da realização dos exames, sempre concluídos antes de decorridas oito horas de conservação.

No laboratório de Análises Clínicas Veterinárias da USP de Pirassununga, os tubos com fluoreto de sódio e os tubos com gel ativador de coágulo foram centrifugados (Centrifuga Excelsa II, modelo 206 BL) durante 20 minutos à 2500 rpm para a formação do coágulo ou sedimentação dos elementos figurados do sangue. A seguir, o soro e o plasma foram pipetados em micro tubos, tipo Eppendorf, e as

amostras embaladas e conservadas em freezer a menos 20°C até a realização das determinações.

3.2.6. Avaliação do hemograma

A determinação do número de hemácias (He), do hematócrito (Ht), dosagem de hemoglobina (Hb) e número total de leucócitos o volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram realizadas no contador automatizado BC-2800 Vet Mindray®. Esse equipamento utiliza o método de impedância para mensuração das hemácias e leucócitos e os métodos colorimétricos para determinação da hemoglobina.

Com o sangue “in natura” foram distendidos dois esfregaços sanguíneos destinados à contagem diferencial de leucócitos. Esses esfregaços, após secarem, foram corados utilizando-se o corante de Rosenfeld.

Os esfregaços eram contra-corados com corante de Rosenfeld e analisado no microscópio óptico em aumento de 1000X, contando-se 1000 hemácias e dentre essas as que foram corados fragmentos de RNA, os reticulócitos. O resultado foi expresso em número absoluto de reticulócitos (FERNANDEZ; GRINDEM, 2000).

3.2.7. Bioquímica sérica

A determinação dos teores séricos de proteína total foi feita pelo método do biureto, de acordo com a técnica preconizada por Gornall, Bardawill e David (1949) e modificada por Strufaldi (1987), com leitura da coloração da reação utilizando comprimento de onda de 550 nm em Analisador Bioquímico Automático da marca Randox Daytona® - Randox Laboratories, Reino Unido, utilizando-se kit comercial da marca Randox® referência TP4001.

A determinação dos teores séricos de albumina foi feita pelo método do verde de bromocresol em analisador bioquímico automático da marca Randox Daytona® - Randox Laboratories, Reino Unido, utilizando-se kit comercial da marca Randox® referência AB3800, de acordo com a técnica preconizada por Doumas, Biggs e Watson (1971), sendo a leitura da coloração da reação realizada pelo comprimento de onda de 630 nm.

A atividade enzimática sérica da aspartato-aminotransferase e gama glutamiltransferase, assim como os teores séricos de ureia, foram determinadas segundo metodologia cinética otimizada em conformidade com o European Committee for Clinical Laboratory Standards (ECCLS), em Analisador Bioquímico Automático da marca RX Daytona® - Randox Laboratories, Reino Unido, utilizando kit comercial da marca Randox® referência AS3804 (aspartato-aminotransferase), GT3814 (gama glutamiltransferase) e UR3825 (ureia).

O teor sérico de lactato foi obtido por determinação enzimática correlacionando a ação catalítica da lactato oxidase, que é diretamente proporcional à quantidade de lactato na amostra. A leitura por espectrofotometria, utilizando comprimento de onda igual a 340 nm, foi realizada pelo analisador bioquímico automático da marca RX Daytona® - Randox Laboratories, Reino Unido, utilizando kit comercial da marca Randox® referência LC3980. Os resultados foram expressos em mg/dL.

3.2.8. Avaliação da hemogasometria

O sangue para a gasometria foi colhido no 22º dia, em seringas específicas heparinizadas com cálcio (Ca) balanceado da marca Monovette® Sarstedt.

O sangue era rapidamente analisado no local utilizando hemogasômetro portátil i-STAT 1® (empresa Abbott) e cartuchos i-STAT® EG7+, que consistem de um chip biossensor eletroquímico que realiza determinações à 37°C para pH, pCO₂ (pressão parcial de dióxido de carbono em mmHg), pO₂ (pressão de oxigênio em mmHg), Na (sódio em mMol/L), K (potássio em mMol/L), iCa (cálcio ionizado em mMol/L) e hematócrito. A partir dessas determinações o sistema calcula valores para o HCO₃ (bicarbonato em mMol/L), o TCO₂ (dióxido de carbono total em mmHg), BE_{ect} (excesso ou déficit de bases no sangue em mMol/L), sO₂ (saturação de oxigênio em %) e hemoglobina (g/dL). O pH, pCO₂ e pO₂ são convertidos para a temperatura do animal.

3.2.9. Análise estatística

Os dados foram analisados pelo programa Statistical Analysis System (SAS, versão 9.3, 2010). Antes das análises propriamente ditas, os dados foram analisados em relação à presença de informações discrepantes (“outliers”), a normalidade dos

resíduos pelo teste Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias pelo teste Levene. Quando a premissa de normalidade não foi atendida, a transformação logarítmica ou pela raiz quadrada foi necessária.

Os dados foram analisados utilizando o PROC MIXED para modelos mistos. Os dados foram submetidos à análise de variância e o modelo incluiu o efeito de nível de nitrato e de genética como fatores fixos e os efeitos de animal dentro de genética e período como fatores aleatórios. Os efeitos de nitrato foram avaliados pela regressão polinomial. O modelo estatístico utilizado está descrito conforme a equação abaixo:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + P_j + Q_k + A_l(Q_k) + E_{ijkl}$$

Onde:

Y_{ijkl} = observação referente ao nível de nitrato (i) + período (j) + genética (k) + animal (l) dentro de genética (k);

μ = Média geral;

T_i = Efeito de nível nitrato (efeito fixo);

P_j = Efeito de período (efeito aleatório);

Q_k = Efeito de genética (efeito fixo);

$A_l(Q_k)$ = Efeito de animal dentro de genética (efeito aleatório);

E_{ijkl} = Erro aleatório associado a cada observação.

Para os dados de digestibilidade, foi utilizado o peso metabólico como covariável.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Ingestão, excreção e digestibilidade de nutrientes

O efeito de grupo genético foi significativo sobre todos os parâmetros apresentados na Tabela 2, sendo a excreção de extrato etéreo e de extrativo não nitrogenado os únicos a não sofrerem efeito de genética.

Para os parâmetros de excreção o aumento do nível de nitrato de cálcio diminuiu linearmente a excreção de MS, EE, ENN, MO e EB.

Já para os parâmetros de digestibilidade, o aumento do nível de nitrato aumentou a digestibilidade do EE e ENN.

Não houve efeito de interação entre genética e nível de nitrato de cálcio adicionado à dieta sobre nenhum parâmetro de ingestão, excreção e digestibilidade estudados.

Tabela 2 - Efeito de diferentes níveis de nitrato de cálcio sobre a ingestão, excreção e digestibilidade da dieta em dois grupos de bovinos.

Variável	Genética		Nitrato				EPM	Probabilidade		
	Tauri	Zebu	0%	1%	2%	3%		Gen	Nitrato	G*N
Ingestão, kg/d/kgPM										
MS	77,99	92,07	88,37	85,26	83,99	82,49	2,0343	0,0130	0,0338 ^L	NS
PB	9,97	11,79	11,33	10,90	10,74	10,55	0,2525	0,0124	0,0304 ^L	NS
EE	3,43	4,05	3,87	3,76	3,70	3,63	0,1217	0,0128	0,0399 ^L	NS
FDN	31,24	36,86	35,45	34,10	33,63	33,00	0,7820	0,0135	0,0319 ^L	NS
FDA	19,42	22,91	22,07	21,20	20,88	20,51	0,4743	0,0139	0,0290 ^L	NS
ENN	28,72	33,91	32,47	31,44	30,93	30,40	0,8155	0,0125	0,0370 ^L	NS
MO	71,06	83,71	80,45	77,65	76,42	75,01	1,8707	0,0143	0,0321 ^L	NS
EB(Mcal)	333,16	393,27	377,41	364,22	358,79	352,44	8,8065	0,0129	0,0340 ^L	NS
Excreção, kg/d/kgPM										
MS	28,20	44,21	39,59	35,81	35,02	34,39	1,8508	0,0008	0,0221 ^L	NS
PB	3,391	6,154	5,349	4,847	4,978	4,947	0,2590	0,0007	NS	NS
EE	0,597	1,145	1,065	0,988	0,738	0,691	0,0683	<,0001	<,0001 ^L	NS
FDN	14,80	21,85	19,21	17,26	18,65	18,18	0,9105	0,0054	NS	NS
FDA	10,19	15,64	13,82	12,11	13,03	12,71	0,6868	0,0031	NS	NS
ENN	4,477	8,969	8,303	7,648	5,454	5,486	0,5415	0,0006	<,0001 ^L	NS
N	0,625	0,985	0,856	0,775	0,796	0,791	0,0414	0,0007	NS	NS
MO	23,78	38,11	33,93	30,74	29,82	29,31	1,6514	0,0009	0,0152 ^L	NS
EB(Mcal)	117,58	189,01	168,32	159,28	148,69	142,88	8,2747	0,0006	0,0254 ^L	NS
Digestibilidade, %										
MS	62,49	52,63	55,84	58,76	58,90	58,73	1,455	0,0262	NS	NS
PB	61,67	47,04	52,95	56,08	54,49	53,91	1,695	0,0077	NS	NS
EE	83,66	70,99	72,75	73,99	80,97	81,60	1,467	<,0001	0,0002 ^L	NS
FDN	52,94	40,65	45,97	50,21	45,31	45,70	1,902	NS	NS	NS
FDA	43,88	35,76	39,74	43,96	38,10	37,46	2,350	NS	NS	NS
ENN	83,92	74,29	75,02	76,39	82,83	82,18	1,403	0,0095	0,0007 ^L	NS
MO	66,00	55,30	58,53	61,20	61,56	61,30	1,455	0,0332	NS	NS
EB(Mcal)	62,95	54,05	56,75	58,75	59,06	59,43	1,537	0,0494	NS	NS
NDT	67,59	57,33	60,28	62,77	63,49	63,31	1,356	0,0230	NS	NS

Tauri: Taurino; Zebu: Zebuino; EPM: Erro Padrão da Média; Gen: Genética; Nitrato: Nível de nitrato de cálcio; G*N: interação entre genética e nível de nitrato; NS: Não significativo; MS: Matéria seca; PB: Proteína Bruta; EE: Extrato etéreo; FDN: Fibra em detergente neutro; FDA: Fibra em detergente ácido; ENN: Extrativo não nitrogenado; N: Nitrogênio; MO: Matéria orgânica; EB: Energia bruta; NDT: Nutrientes digestíveis totais.

3.3.2. Comportamento ingestivo

Para as variáveis de comportamento ingestivo (Tabela 3) houve efeito genético apenas para o número de eventos de ruminação, onde os taurinos apresentaram maiores valores. O nível de nitrato de cálcio, adicionado à dieta, foi importante para o tempo total comendo, tanto em minutos como em porcentagem ao dia, sendo que ambos demonstraram efeito quadrático demonstrado na tabela a seguir.

Nenhuma das variáveis apresentou efeito significativo para a interação entre a genética e o nível de nitrato de cálcio adicionado à dieta.

Tabela 3 - Comportamento ingestivo de fêmeas bovinas (taurino e zebuino) alimentadas com diferentes níveis de nitrato de cálcio.

Variável	Genética		Nitrato				EPM	Probabilidade		
	Tauri	Zebu	0%	1%	2%	3%		Gen	Nitrato	N*G
Comendo										
N eventos	9,12	10,19	8,80	9,87	10,12	9,75	0,403	NS	NS	NS
TT (min)	200,9	255,3	211,9	226,9	248,1	225,6	8,850	NS	0,0094 ^Q	NS
TT (%)	13,91	17,68	14,67	15,71	17,18	15,62	0,613	NS	0,0095 ^Q	NS
TM (min)	22,76	25,66	24,35	23,52	25,17	23,80	0,916	NS	NS	NS
Ruminando										
N eventos	16,19	14,25	16,00	14,25	15,62	15,00	0,446	0,0302	NS	NS
TT (min)	378,7	440,3	426,9	385,6	423,1	402,5	14,348	NS	NS	NS
TT (%)	26,23	30,49	29,56	26,71	29,30	27,87	0,994	NS	NS	NS
TM (min)	23,32	31,20	27,01	27,58	27,33	27,33	1,051	0,0170	NS	NS
Ócio										
N eventos	22,56	20,56	22,37	22,50	20,75	20,62	0,554	NS	NS	NS
TT (min)	836,3	726,9	780,0	808,1	749,4	788,8	19,721	NS	NS	NS
TT (%)	57,91	50,34	54,02	55,96	51,90	54,62	1,366	NS	NS	NS
TM (min)	38,05	35,85	35,29	36,94	36,91	38,65	1,323	NS	NS	NS
Mastigando										
N eventos	25,31	24,44	24,87	24,12	25,75	24,75	0,551	NS	NS	NS
TT (min)	579,7	695,6	638,8	612,5	671,3	628,1	19,662	NS	NS	NS
TT (%)	40,14	48,17	44,23	42,42	46,48	43,50	1,362	NS	NS	NS
TM (min)	22,82	28,65	25,94	25,61	26,18	25,22	0,762	NS	NS	NS

Tauri: Taurino; Zebu: Zebuino; EPM: Erro Padrão da Média; Gen: Genética; Nitrato: Nível de nitrato de cálcio; G*N: interação entre genética e nível de nitrato; NS: Não significativo; N eventos: Número de eventos; TT: Tempo total; TM: Tempo médio.

O grupo genético exerceu influência sobre todas as características avaliadas, que não levaram em consideração o peso metabólico. O acréscimo de nitrato na dieta influenciou a ingestão e mastigação da MS e FDN.

Tabela 4 - Taxas de ingestão, ruminação e mastigação de fêmeas bovinas tratadas com diferentes níveis de nitrato de cálcio.

Variável	Genética		Nitrato				EPM	Probabilidade		
	Tauri	Zebu	0%	1%	2%	3%		Gen	Nitrato	N*G
Taxa de ingestão										
MS, min/kg	16,11	31,48	21,19	23,68	25,96	24,35	1,606	0,0030	0,0094 ^Q	NS
MS, min/(g/kg.PV ^{0,75})	2,62	2,79	2,42	2,631	2,98	2,77	0,099	NS	0,0366 ^Q	NS
MS, kg/ <i>n</i>	1,475	0,837	1,276	1,042	1,107	1,200	0,086	0,0175	NS	NS
MS, (g/kg.PV ^{0,75})/ <i>n</i>	9,24	9,40	10,35	8,85	8,82	9,25	0,479	NS	NS	NS
FDN, min/kg	40,20	78,57	52,75	59,24	64,64	60,91	4,000	0,0030	0,0056 ^Q	NS
FDN, min/(g/kg.PV ^{0,75})	6,53	6,96	6,03	6,58	7,42	6,94	0,243	NS	0,0254 ^Q	NS
FDN, kg/ <i>n</i>	0,591	0,335	0,511	0,418	0,442	0,482	0,034	0,0169	NS	NS
FDN, (g/kg.PV ^{0,75})/ <i>n</i>	3,70	3,76	4,14	3,55	3,52	3,71	0,190	NS	NS	NS
Taxa de ruminação										
MS, min/kg	30,02	53,93	41,49	40,15	43,83	42,44	2,463	0,0014	NS	NS
MS, min/(g/kg.PV ^{0,75})	4,84	4,80	4,88	4,48	5,04	4,89	0,135	NS	NS	NS
MS, kg/ <i>n</i>	0,793	0,582	0,674	0,743	0,663	0,670	0,027	0,0076	NS	NS
MS, (g/kg.PV ^{0,75})/ <i>n</i>	4,95	6,55	5,69	6,23	5,47	5,60	0,224	0,0086	NS	NS
FDN, min/kg	75,0	134,5	103,4	100,4	109,3	105,96	6,101	0,0014	NS	NS
FDN, min/(g/kg.PV ^{0,75})	12,09	11,97	12,15	11,19	12,56	12,208	0,327	NS	NS	NS
FDN, kg/ <i>n</i>	0,318	0,233	0,270	0,298	0,265	0,268	0,011	0,0081	NS	NS
FDN, (g/kg.PV ^{0,75})/ <i>n</i>	1,98	2,62	2,28	2,50	2,19	2,24	0,089	0,0094	NS	NS
Taxa de mastigação										
MS, min/kg	46,13	85,41	62,67	63,83	69,79	66,78	3,878	0,0005	0,0355 ^L	NS
MS, min/(g/kg.PV ^{0,75})	7,46	7,59	7,30	7,11	8,01	7,67	0,186	NS	0,0266 ^D	NS
MS, kg/ <i>n</i>	0,501	0,340	0,435	0,429	0,403	0,413	0,018	0,0050	NS	NS
MS, (g/kg.PV ^{0,75})/ <i>n</i>	3,13	3,81	3,63	3,62	3,30	3,34	0,113	NS	0,0354 ^L	NS
FDN, min/kg	115,2	213,1	156,1	159,6	173,9	166,87	9,623	0,0005	0,0221 ^L	NS
FDN, min/(g/kg.PV ^{0,75})	18,62	18,92	18,18	17,77	19,98	19,14	0,448	NS	0,0228 ^D	NS
FDN, kg/ <i>n</i>	0,20	0,14	0,17	0,17	0,16	0,17	0,007	0,0051	NS	NS
FDN, (g/kg.PV ^{0,75})/ <i>n</i>	1,25	1,53	1,45	1,45	1,32	1,34	0,045	NS	0,0338 ^L	NS

Tauri: Taurino; Zebu: Zebuino; EPM: Erro Padrão da Média; Gen: Genética; Nitrato: Nível de nitrato de cálcio; G*N: interação entre genética e nível de nitrato; NS: Não significativo; N eventos: Número de eventos; MS: Matéria seca; FDN: Fibra em detergente neutro; n: número de eventos.

3.3.3. Parâmetros sanguíneos

Tanto os valores de hemogasometria como de hemograma não sofreram interferência dos níveis de nitrato de cálcio. Os valores de excesso de base no fluido extracelular (BE_{ect}), concentração de bicarbonato no plasma (HCO₃), dióxido de carbono total (TCO₂), saturação de oxigênio no sangue (sO₂), pressão parcial de oxigênio (pO₂), sódio (Na), hematócrito (Hct) e concentração de hemoglobina (Hb) foram influenciados pelo grupo genético, sendo que os animais pertencentes ao grupo de taurinos apresentaram valores superiores para BE_{ect}, HCO₃, TCO₂, Na, Hct e Hb e inferiores para sO₂ e pO₂.

Os parâmetros de hemograma também foram modificados apenas pelo grupo genético, sendo que o grupo de zebuínos apresentaram valores superiores para He e RDW e o grupo de taurinos apresentaram maiores valores para Ht, VCM e HCM.

O aumento do nível de inclusão de nitrato de cálcio na dieta foi responsável pelo aumento linear nos valores de creatinina e fósforo (PHOS). Os valores de ureia, proteína total (TP-2) e PHOS foram afetados pelo grupo genético, com os zebuínos apresentando maiores valores para ureia e PHOS, e os taurinos para TP-2.

Tabela 5 - Efeito de diferentes níveis de nitrato de cálcio na dieta de fêmeas bovinas sobre parâmetros sanguíneos.

Variável	Genética		Nitrato				EPM	Probabilidade		
	Tauri	Zebu	0%	1%	2%	3%		Gen	Nitrato	N*G
Hemogasometria										
Beect	1,81	0,44	1,12	1,37	0,62	1,37	0,367	0,0457	NS	NS
HCO ₃	26,53	25,27	25,97	26,07	25,46	26,09	0,335	0,0292	NS	NS
TCO ₂	27,75	26,50	27,12	27,25	26,27	27,37	0,334	0,0401	NS	NS
sO ₂	50,19	63,44	58,12	55,62	55,25	58,25	1,745	0,0031	NS	NS
pH	7,39	7,37	7,38	7,38	7,38	7,39	0,004	NS	NS	NS
pCO ₂	44,44	44,13	44,76	44,59	43,97	43,81	0,487	NS	NS	NS
pO ₂	29,75	36,81	33,87	33,00	32,75	33,50	0,869	0,0018	NS	NS
Na	141,2	138,1	139,2	139,7	139,7	139,9	0,361	0,0004	NS	NS
K	4,01	3,94	3,91	4,07	3,97	3,94	0,053	NS	NS	NS
iCa	4,84	4,77	4,81	4,80	4,82	4,79	0,024	NS	NS	NS
Hemograma										
He	7,46	8,59	8,25	8,04	7,99	7,82	0,138	0,0044	NS	NS
Hb	13,55	11,89	13,26	12,57	12,66	12,39	0,233	0,0188	NS	NS
Ht	42,32	36,34	40,71	39,02	39,26	38,32	0,794	0,0183	NS	NS
VCM	56,72	42,42	49,99	48,96	49,54	49,80	1,349	0,0001	NS	NS
HCM	18,09	13,79	15,91	15,69	15,92	15,96	0,419	<,0001	NS	NS
CHCM	31,96	32,68	32,55	32,24	32,25	32,22	0,143	NS	NS	NS
RDW	18,04	21,46	19,81	19,39	19,71	20,09	0,381	0,0089	NS	NS
Bioquímico										
ureia	20,19	31,32	28,03	24,89	24,94	25,17	1,545	0,0297	NS	NS
crea	1,32	1,52	1,23	1,34	1,57	1,55	0,064	NS	0,0296 ^L	NS
ALB	3,26	3,25	3,27	3,25	3,24	3,26	0,034	NS	NS	NS
GGT	13,06	12,06	13,50	14,62	12,62	9,50	1,193	NS	NS	NS
AST	61,68	50,44	59,50	54,87	55,12	54,75	2,318	NS	NS	NS
lact	14,78	16,02	15,98	15,30	15,11	15,22	1,101	NS	NS	NS
CAL	8,59	8,47	8,58	8,49	8,41	8,62	0,074	NS	NS	NS
TP-2	8,25	6,16	7,12	7,21	7,28	7,20	0,205	<,0001	NS	NS
PHOS	5,88	7,65	7,36	6,26	6,63	6,84	0,214	0,0004	0,0075 ^Q	NS

Tauri: Taurino; Zebu: Zebuino; EPM: Erro Padrão da Média; Gen: Genética; Nitrato: Nível de nitrato de cálcio; G*N: interação entre genética e nível de nitrato; NS: Não significativo; NS: Não significativo; BEect: excesso de base no fluido extracelular (mEq/L); HCO₃: concentração de bicarbonato no plasma (mmol/L); TCO₂: dióxido de carbono total (mmHg); sO₂: saturação de oxigênio em %; pCO₂: pressão parcial de dióxido de carbono (mmHg); pO₂: pressão parcial de oxigênio (mmHg); Na: sódio (mEq/L); K: potássio (mEq/L); iCa: cálcio ionizado (mg/dL); He: contagem de hemácias (X10⁹/mm³); Hb: concentração de hemoglobina (g/dL); Ht: hematócrito (%); VCM: Volume corpuscular médio (μ³); HCM: hemoglobina corpuscular média (pg); CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média (%); RDW: grau de anisocitose das hemácias (%); Ureia: (mg/dL); Crea: creatinina (mg/dL); ALB: albumina (g/dL); GGT: atividade enzimática sérica da gama glutamiltransferase (U/L); AST: atividade enzimática sérica da aspartato-aminotransferase (U/L); Lact: concentração de lactato (mg/dL); CAL: cálcio (mg/dL); TP-2: concentração de proteína total (g/dL); PHOS: concentração de fósforo sérico (mg/dL).

3.4. DISCUSSÃO

O efeito na digestibilidade do FDN não foi observado no atual experimento. Newbold et al. (2014) observaram queda no consumo de novilhas nelores quando o teor de nitrato na dieta foi elevado até 2,4%, atribuindo a queda no consumo a dietas com um nível maior de FDN, já que o nitrato de cálcio tem um efeito negativo na digestibilidade de FDN. No presente experimento, a adição de nitrato de cálcio diminuiu o consumo. Lee et al. (2015) observaram tendência na queda de consumo de novilhas quando suplementadas com 3% de nitrato de cálcio. Lichtenwalner, Fontenot e Tucker (1973) atribuem a diminuição no consumo à baixa palatabilidade do nitrato de cálcio. Guyader et al. (2015) relatam ingestão de matéria seca de 12,3 kg/d para vacas de 656 kg de peso vivo médio, alimentadas com 3 % de nitrato de cálcio, sem diferença para os outros tratamentos.

Em estudo, Hulshof et al. (2012), substituíram ureia por nitrato, em dietas isonitrogenadas, (22g/kg de MS) em animais Nelore x Guzerá e observaram diminuição da ingestão de matéria seca. Velazco, Cottle e Hegarty (2014) observaram maior número de refeições diárias (14,69) com menor ingestão (0,77kg MS/refeição), quando adicionaram 2,57% de nitrato de cálcio na dieta de bovinos da raça Angus. No presente experimento o nitrato também afetou a taxa de ingestão, sendo que os animais gastaram mais tempo para ingerir 1kg de MS na dose de 2 % de NC (25,96 min/kgMS e 2,98 min/(gMS/kgPV^{0,75})) e menos tempo na dose de 0% de NC (21,19 min/kgMS e 2,42 min/(gMS/kgPV^{0,75})).

Segundo Lee et al. (2015), poucos são os estudos sobre o efeito da suplementação de nitrato de cálcio sobre a digestibilidade dos nutrientes da dieta, sendo que grande parte desses estudos não reportaram efeito algum. Como Guyader et al. (2015), que suplementaram 3% de nitrato de cálcio na alimentação de vacas com dieta de relação 50:50 de concentrado:volumoso (utilizando feno como volumoso) e não reportaram efeito algum na digestibilidade de MS, PB, MO, FDN e FDA. Resultado que corrobora com o presente experimento.

Por outro lado, Lee et al. (2015) observaram aumento linear na digestibilidade de MS em bovinos alimentados com doses crescentes de nitrato encapsulado, atribuindo à isso um possível aumento na população de bactérias amilolíticas como a *S. ruminantium* que têm sua população aumentada com a adição de nitrato na dieta.

A menor excreção de EB ao se aumentar o nível de nitrato pode ser devido a menor excreção de EE e ENN, componentes bastante energéticos da dieta. Esta menor excreção de EE e ENN, por sua vez, pode ser explicada pelo aumento da digestibilidade destes compostos com a adição do nitrato, a qual pode estar ligada à população de *Selenomonas ruminantium* que, segundo Asanuma, Yokoyama e Hino (2014), é uma bactéria utilizadora de amido, um dos componentes do ENN, que tem sua população aumentada em dietas com nitrato.

O grupo genético influenciou a digestibilidade como um todo. Sampaio, Vieira e Brito (2000) testando 3 fontes de proteína (farelo de algodão, levedura e ureia) em novilhos holandeses, verificaram coeficiente de digestibilidade de 50,4, 46,4 e 60,9%, respectivamente, valores próximos aos encontrados neste experimento, com grupo taurino apresentando 61,67 e zebuino apresentando 47,04% de digestibilidade da PB. Outros valores encontrados por Sampaio, Vieira e Brito (2000), nos animais alimentados com ureia, já citado, se assemelham com os dados de digestibilidade do grupo de taurinos para MS, EE, MO e EB, com os zebuínos apresentando valores similares aos animais alimentados com farelo de algodão, para a digestibilidade de EE e EB.

Velazco, Cottle e Hegarty (2014) observaram maior número de refeições diárias, porém com menor ingestão por refeição quando forneceram dietas com mais de 2% de nitrato de cálcio para taurinos. Entretanto, o que vimos foi aumento no tempo total comendo (% e min) para os dois grupos genéticos ao acrescentar nitrato até 2% e, então, uma diminuição com o nível de 3% sem alteração no número de eventos. Yang et al. (2009) observaram valor de 23,45% para tempo total ruminando em bovinos confinados, valor ligeiramente inferior ao encontrado no presente experimento. Esse maior tempo ruminando pode ser referente a um maior estímulo à ruminação pela menor degradabilidade ruminal das fibras. Ainda, os animais taurinos apresentaram maior número de eventos ruminando, porém com tempo médio menor, o que resultou em tempo total sem diferença entre os grupos genéticos.

O aumento no nível de nitrato de cálcio na dieta fez com que os animais aumentassem o tempo total comendo, porém quando o nível de nitrato chegou a 3% o tempo total comendo diminuiu. Resultado semelhante ocorreu com a taxa de ingestão, com os animais demorando mais para ingerir 1 kg de MS e FDN.

A taxa de mastigação (min/kg) de MS e FDN aumentou ao passo que o nível de nitrato de cálcio aumentou na dieta.

Os animais zebuínos apresentaram maiores valores para taxas de ingestão, ruminação e mastigação de MS e FDN em min/kg e menores valores para os demais parâmetros, ou seja, os animais zebuínos mastigaram mais tempo por kg de alimento ingerido.

O uso de nitrato na alimentação de ruminantes requer cuidados quanto aos cuidados à saúde do animal como à sua administração, que deve ter a inclusão gradual (GUYADER et al., 2015). Não foi detectado efeito clínico de intoxicação por nitrato durante o experimento. Além da inclusão gradual do nitrato à dieta, a adição de enxofre elementar teve o objetivo de prevenir este tipo de ocorrência, pois, segundo Perdok et al. (2011), o enxofre estimula aparecimento de *M. Elsdenii*, que age inibindo a redução do nitrato a nitrito.

Em estudo El-Zaiat et al. (2014) encontraram um aumento na concentração de hemácias ao incluir 4,51% de nitrato de cálcio protegido na dieta de ovinos, o que segundo o autor seria um mecanismo de resposta aos efeitos negativos do nitrito sobre a capacidade de transporte de oxigênio do sangue.

Sabe-se que há correlação positiva entre ingestão de N e concentração de ureia no plasma (PRESTON; SCHNAKENBERG; PFANDER, 1965). Segundo Broderick (1995), a concentração elevada de ureia plasmática está relacionada à utilização ineficiente da proteína bruta da dieta. Entretanto, não foi relatada ainda uma concentração plasmática de ureia a partir da qual se pudesse afirmar que estaria havendo perda de proteína, utilização ineficiente de N ou condição nutricional inadequada.

Houve um aumento linear no nível de creatinina ao se aumentar a proporção de nitrato. Porém, segundo Kaneko, Harvey e Bruss (1997), seus níveis sanguíneos são pouco afetados pela alimentação, sendo seus valores preconizados entre 1 e 2 mg/dL. A creatinina pode ser utilizada para constatar aumento na ureia por causas pré-renais como, por exemplo, alimentação (WILLARD; TVEDTEN; TURNWALD, 1993). Apesar de os valores de creatinina estarem em sua normalidade, houve um pequeno aumento, podendo ser resultante dos teores de nitrato de cálcio.

O fósforo sérico é utilizado para avaliar o balanço energético em animais, já que seu aumento no sangue é devido a sua menor participação no metabolismo energético (SAUBERLICH; SKALA; DOWDY, 1981). Sua alteração, devido ao incremento de nitrato na dieta, pode ser graças ao aumento de digestibilidade do EE e ENN, ingredientes energéticos da dieta.

3.5. CONCLUSÃO

A adição de nitrato afetou o comportamento alimentar, fazendo com que os animais levassem mais tempo para ingerir a mesma quantidade de alimento. Os animais do grupo taurino foi mais eficiente na utilização do alimento. A adição do nitrato não afetou função hepática ou renal dos animais, não sendo apresentando perigo à integridade dos animais.

REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS- AOAC. **Official methods of analyses**. 16th ed. Virginia, USA: AOAC, 1995.

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

BRODERICK, G. A. Desirable characteristics of forage legumes for improving protein utilization in ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 2760–2773, 1995.

CAMPOS, F. P.; NUSSIO, C. M. B.; NUSSIO, L. G. Métodos de análise de alimentos. FEALQ, 2004. 135 p.

DOUMAS, B.T.; BIGGS, H.G.; WATSON, W. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. **Clinica Chimica Acta**, v.31, p. 87-96, 1971.

EL-ZAIAT, H. M.; ARAUJO, R. C.; SOLTAN, Y. A.; MORSY, A. S.; LOUVANDINI, H.; PIRES, A. V.; PATINO, H. O.; CORREA, P. S.; ABDALLA, A. L. Encapsulate nitrate and cashew nut shell liquid on blood and rumen constituents, methane emission, and growth performance of lambs. **Journal of Animal Science**, v. 92, p. 2214–2224, 2014. Doi:10.2527/jas2013-7084.

FERNANDEZ, F.R.; GRINDEM, C.B. Reticulocyte response. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. Schalm's veterinary hematology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, cap.19, p.110-116, 2000.

GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of biuret reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 177, p. 751-766, 1949.

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

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. (Eds.) Clinical biochemistry of domestic animals. 5th ed. New York: Academic Press, 1997.

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

LENG, R. A. The potential of feeding nitrate to reduce enteric methane production in ruminants. **A Report to the Department of Climate Change**. Commonwealth Government of Australia. Canberra. Australia. 2008. 82p.
<http://www.penambulbooks.com>

LENG, R.A.; PRESTON, T.R. Further considerations of the potential of nitrate as a high affinity electron acceptor to lower enteric methane production in ruminants. **Livestock Research for Rural Development**, v.22, n.221, 2010.

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

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

NEWBOLD, J. R.; VAN ZIJDERVELD, S. M.; HULSHOF, R. B. A.; FOKKINK, W. B.; LENG, R. A.; TERCENIO, P.; POWERS, W. J.; VAN ADRICHEM, P. S. J.; PATON, N. D.; PERDOK, H. B. The effect of incremental levels of dietary nitrate on methane emissions in Holstein steers and performance in Nelore bulls. **Journal of Animal Science**, v. 92, p. 5032–5040, 2014. Doi:10.2527/jas2014-7677.

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

PEZZATO, L.E.; MIRANDA, E.C.; PINTO, L.G.Q.; FURUYA, W.M.; BARROS, M.M.; ROSA, G.J.M.; LANNA, E.A.T. Avaliação de dois métodos de determinação do coeficiente de digestibilidade aparente com a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 4, p. 965-971, 2002.

PROVIMI HOLDING B. V. Hindrik Bene Perdok; Sander Martin van Zijderveld; Rob Bernard Anton Hulshof; David Deswysen; Walter Jan Jozef Gerrits; Jan Dijkstra. **Compositions for reducing gastro-intestinal methanogenesis in ruminants**. WO/2011/010921 A2, 23 de julho de 2010, 27 de janeiro de 2011.

RODRIGUEZ, N.M. Valor nutritivo do farelo de arroz para ruminantes. I - Digestibilidade aparente. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 24, 1987, Brasília. Anais... Brasília: SBZ, 1987, p.105.

SAMPAIO, A.A.M.; VIEIRA, P.F.; BRITO, R.M. Digestão total e parcial de nutrientes em bovinos alimentados com rações contendo levedura, ureia ou farelo de algodão. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.2, p.589-597, 2000.

SAUBERLICH, H.E., SKALA, J.H., DOWDY, R.P. **Laboratory tests for the assessment of nutritional status**. CRC Press, Inc. Boca Raton, FL, USA, 1981.

SILVA, J.F.C., LEÃO, M.I. **Fundamentos de nutrição dos ruminantes**. Piracicaba: Livroceres.,1979. 380 p.

STRUFALDI, B. **Prática de bioquímica clínica**. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 1987.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A.S. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991.

VELAZCO, J. I.; COTTLE, D. J.; HEGARTY, R. S. Methane emissions and feeding behavior of feedlot cattle supplemented with nitrate or urea. **Animal Production Science**, Melbourne, v. 54, p. 1737-1740, 2014.

WESTHOEK, H.; ROOD, T.; VAN DEN BERG, M.; JANSE, J.; NIJDAM, D.; REUDINK, M. The protein puzzle. **PBL Netherlands Environmental Assessment Agency**, The Hague (2011).

WILLARD, M.D., TVEDTEN, H., TURNWALD, G.H. **Diagnóstico Clínico-Patológico Práctico en los Animales Pequeños**. Buenos Aires: Intermédica Ed. 1993

4. NITRATO DE CÁLCIO E SUA INFLUÊNCIA SOBRE A FERMENTAÇÃO RUMINAL DE BOVINOS

RESUMO: Objetivou-se avaliar o efeito mitigatório na emissão de metano entérico, parâmetros fermentativos ruminais e a produção de proteína microbiana, bem como sua eficiência, ocasionados pela inclusão de nitrato de cálcio à dieta de bovinos. Para tal, oito fêmeas bovinas, quatro holandesas e quatro nelores, canuladas no rúmen e com peso médio inicial de $909,0 \text{ kg} \pm 72,0$ e $387,0 \text{ kg} \pm 25,5$, respectivamente, foram submetidas aos seguintes tratamentos: **0%**: dieta sem adição de nitrato de cálcio; **1%**: dieta com adição de 1% de nitrato de cálcio; **2%**: dieta com adição de 2% de nitrato de cálcio e **3%**: dieta com adição de 3% de nitrato de cálcio, todos com base na matéria seca da dieta. Foi utilizado um quadrado latino 4X4 replicado. Os taurinos apresentaram valores superiores quanto ao CMS e inferiores para CMS em relação ao PV e PM. A dinâmica ruminal foi influenciada apenas pela genética dos animais, sendo que, os taurinos apresentaram o rúmen com maior massa sólida, massa líquida e massa total e menores massas sólida, líquida e total em relação ao PV. Os taurinos apresentaram maior taxa de desaparecimento de sólidos em kilos por dia. Os zebuínos apresentaram maiores pH médio e mínimo e menos tempo de pH abaixo de 6,2, tendo também maiores contagem de *Diplodinium*, *Entodinium*, *Isotricha* e total de protozoários. Os zebuínos apresentaram valores superiores para a concentração de nitrogênio amoniacal. O volume de ácido acético aumentou linearmente com a adição de nitrato de cálcio. O maior e menor volume de metano ocorreu com o nível de 2 e 3% de nitrato de cálcio, respectivamente. Os animais zebuínos foram responsáveis pela maior produção de metano. Para as variáveis avaliadas na urina, os taurinos apresentaram valores mais elevados para N microbiano (g/dia) e balanço de N retido (g/kg N ingerido), enquanto os zebuínos apresentaram maiores valores de N microbiano (mg/kgPV) e balanço de N nas fezes (g/kgN ingerido). O grupo genético foi mais importante para a modulação da fermentação ruminal que a adição de nitrato de cálcio.

Palavras-chave: Dinâmica ruminal. Metano entérico. Nitrato de cálcio. Nitrogênio. Proteína microbiana. Protozoários.

CALCIUM NITRATE INFLUENCE ON RUMINAN FERMENTATIVE PARAMETERS

ABSTRACT: The objective was to evaluate the mitigation effect on methane enteric, rumen fermentation parameters and microbial protein production, as well as its efficiency by the inclusion of calcium nitrate in the diet. To this end, eight bovine females, being four Holsteins and four Zebu, rumen cannulated and with initial average weights of 909,0 kg $\pm$ 72,0 and 387,0 kg $\pm$ 25,5, respectively, and they were subjected to the following treatments: **0%**: diet with no calcium nitrate; **1%**: diet with addition of 1% calcium nitrate; **2%**: diet with the addition of 2% calcium nitrate and **3%**: diet with added 3% calcium nitrate, all based on diet dry matter. Experimental design was represented by a replicated latin square 4 x 4. Holsteins presented higher values for the DMI and lower for DMI as a % of body weight and metabolic weight. The different levels of calcium nitrate did not influence any of the dynamic characteristics of rumen dynamics. Holsteins had greater values for solid mass, total and net mass of rumen and disappearance rate, showing lower values when these parameters were calculated in relation to the body weight. The zebu cattle presented greater values for medium and minimum pH and less time within pH was below 6.2, showing larger count for Diplodinium, Entodinium, Isotricha and total protozoa. The zebu cattle presented higher values for the concentration of ammonia nitrogen. The acetic acid volume increased linearly with the addition of calcium nitrate. The higher and lower volume of methane occurred with 2 and 3% of calcium nitrate, respectively. Zebu cattle were responsible for the greatest production of methane. For the variables evaluated in the urine, Holsteins presented higher values for microbial N (g/day) and balance of N (g/kg ingested N), while zebu presented greater values of microbial N (mg/kgBW) and balance of N in feces (g/kg ingested N). The genetic group was more important for the modulation of ruminal fermentation than the addition of calcium nitrate.

Keywords: Calcium nitrate. Enteric methane. Microbial protein. Nitrogen. Protozoa. Rumen dynamics.

4.1 INTRODUÇÃO

As estratégias de alimentação para mitigação de metano são uma prioridade para melhorar a produtividade animal e a sustentabilidade ambiental (CAPPER; BAUMAN, 2013). Estratégias alimentares com elevado potencial de mitigação de metano e melhoras na eficiência da fermentação ruminal, utilizando a manipulação dietética, tem sido extensivamente estudadas na última década (ECKARD; GRAINER; KLEIN, 2010; SHIBATA; TERADA, 2010; CAPPER; BAUMAN, 2013). Da mesma forma, modernas técnicas de nutrição animal buscam melhorar a eficiência na síntese de proteína microbiana por apresentar um perfil de aminoácidos essenciais de alta qualidade e relativamente constante, que supre a maioria dos aminoácidos no intestino delgado (NRC, 2001).

Embora muitas estratégias alimentares tenham sido propostas para diminuir a produção de metano provenientes de ruminantes (MARTIN et al., 2010), poucas têm mostrado uma diminuição persistente *in vivo*. A persistência na redução da emissão de metano é uma exigência absoluta em qualquer estratégia dietética para ser bem sucedida em diminuir as emissões de gases do efeito estufa provenientes de ruminantes (VAN ZIJDERVELD et al., 2011).

De acordo com Leng e Preston (2010), a conversão de nitrato à amônia por organismos anaeróbicos é altamente competitiva com a produção de metano, pelo fato de consumir oito elétrons no processo, traduzindo-se em um potente inibidor da metanogênese nos sistemas de digestão fermentativa. Assim, segundo Van Zijderveld et al. (2010), essa rota pode se tornar a principal fonte de escoamento de hidrogênio, de forma que cada mol de nitrato reduzido diminuiria a produção de um mol de metano. Outra vantagem do fornecimento de nitratos e sulfatos ao animal é o consumo de hidrogênio no processo de redução da amônia por bactérias, por exemplo a *Desulfovibrio spp.* e a *Bacillus benzoovorans* (KLIEVE, 2009), diminuindo a disponibilidade de hidrogênio para a metanogênese.

Embora seja primordial remover o excesso de hidrogênio do conteúdo ruminal, não é necessário que isso ocorra pelo processo de metanogênese. Há uma ampla gama de vias bioquímicas alternativas e, em algumas circunstâncias, estas podem ser competitivas com a produção de metano. Dentre as possibilidades, pode-se aumentar a inclusão de grãos na dieta que favorecem a propiogênese, pela proliferação de microrganismos que produzem propionato (consumidor de hidrogênio). Pode-se

também induzir a acetogênese redutora pela inserção no rúmen de bactérias que promovam o processo de redução de CO_2 e H_2 a acetato e água ($2\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O}$). De acordo com Beauchemin e Mcginn (2006), a introdução de precursores da propiogênese em dietas de ruminantes resulta em efeitos variáveis sobre a produção de metano. As tentativas de estabelecer bactérias que promovam a acetogênese redutora falharam por causa de uma menor afinidade ao H_2 em comparação com as metanogênicas. Nollet, Demeyer e Verstraete (1997) relatam que as bactérias metanogênicas possuem de 10 à 100 vezes mais afinidade pelo H_2 que as bactérias acetogênicas redutoras, sendo difícil de ocorrer essa reação no ambiente ruminal. Já a inclusão de nitrato, segundo Van Zijderveld et al. (2010), tem grande potencial para reduzir a produção de metano.

As disponibilidades ruminais de nitrogênio (N) e energia são os principais fatores que limitam o crescimento microbiano (CLARK; KLUSMEYER; CAMERON, 1992). A maioria dos microrganismos presentes no rúmen utiliza amônia como fonte de N para seu crescimento. Em dietas com ureia, ela é rapidamente hidrolisada pelas bactérias aderidas ao epitélio ruminal sendo a amônia resultante incorporada ao N bacteriano, sendo a disponibilidade de energia o principal fator que determina a taxa de assimilação desse N (HUNTINGTON; ARCHIBEQUE, 1999).

Russell et al. (1992) comprovaram que a produção excessiva de amônia e sua consequente absorção ruminal aumenta a excreção urinária de compostos nitrogenados. Nocek e Russell (1988) afirmaram que, se a taxa de degradação de proteína exceder a de fermentação de carboidratos, grande quantidade de compostos nitrogenados pode ser perdida na urina, como a ureia. Se a taxa de fermentação de carboidratos for maior que a degradação da proteína ocorre redução na produção e eficiência de proteína microbiana. A quantidade de ureia que é sintetizada no fígado é proporcional à concentração de amônia produzida no rúmen, sendo sua concentração sanguínea diretamente relacionada ao aporte proteico e à relação energia:proteína dietéticos (HARMEYER; MARTENS, 1980).

Seguindo a linha de pensamento de que a conversão de nitrato à amônia seja uma rota competitiva com a produção de metano podendo também melhorar a eficiência na síntese proteica, foram testados diferentes níveis de nitrato de cálcio na alimentação de bovinos em duas condições distintas, um grupo de vacas taurinas adultas com aptidão para leite, raça holandesa, e um grupo de novilhas zebuínas em crescimento com aptidão para carne, raça nelore.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi aprovado pela comissão de Ética no Uso dos Animais da Universidade de São Paulo, sob o protocolo nº 6652271113 e realizado no Departamento de Nutrição e Produção Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, campus de Pirassununga, nas instalações do Estábulo Experimental e Laboratório de Nutrição Animal e Bromatologia.

Para avaliar o consumo de matéria seca, dinâmica ruminal, pH ruminal, concentração ruminal de nitrogênio amoniacal, contagem de protozoários e as produções de ácidos graxos de cadeia curta e metano entérico, assim como a produção de proteína microbiana, foram utilizadas oito vacas não gestantes e não lactantes sendo, 4 holandesas e 4 nelores, com peso vivo médio inicial de $909,0 \text{ kg} \pm 72,0$ e $387,0 \text{ kg} \pm 25,5$, respectivamente. Os animais foram mantidos em instalação coberta provida de baias individuais com cochos de cimento e bebedouros automáticos comuns a cada dois animais e cama de areia, que proporcionam maior conforto e bem-estar aos mesmos.

Foi utilizado delineamento quadrado latino 4X4 replicado. As unidades experimentais foram os animais dentro de quadrado em cada período experimental. O experimento contou com 32 unidades experimentais referentes a oito animais, quatro períodos e dois quadrados contemporâneos com quatro animais em cada.

Os tratamentos foram diferenciados quanto aos níveis de nitrato de cálcio: **0%**: dieta sem adição de nitrato de cálcio; **1%**: dieta com adição de 1% de nitrato de cálcio; **2%**: dieta com adição de 2% de nitrato de cálcio e **3%**: dieta com adição de 3% de nitrato de cálcio, todos com base na matéria seca da dieta. Os diferentes níveis de nitrato foram preparados previamente ao experimento com a adição de ureia, calcário e caulim à medida que o nível de nitrato fosse diminuindo do 3% mantendo assim todas as dietas isoenergéticas, isonitrogenadas e com a mesma concentração de cálcio. Esse preparado foi adicionado à dieta no momento da oferta de alimento aos animais. Os níveis dos ingredientes no preparado foram calculados de forma a sempre apresentar os valores de 15,5% de nitrogênio e 19% de cálcio.

Tabela 6 - Proporções de ingredientes e composição bromatológica das dietas experimentais, expressas em porcentagem de matéria seca.

Ingredientes (%)	Dietas			
	0%	1%	2%	3%
Silagem de milho	50,00	50,00	50,00	50,00
Milho grão moído	38,73	38,73	38,73	38,73
Farelo de soja	5,87	5,87	5,87	5,87
Sal comum	0,42	0,42	0,42	0,42
Enxofre – flor	0,19	0,19	0,19	0,19
Suplemento mineral ¹	1,79	1,79	1,79	1,79
Nitrato de cálcio	0	1,00	2,00	3,00
Ureia	1,03	0,69	0,35	0
Calcário	1,48	0,99	0,49	0
Caulim	0,49	0,32	0,16	0
Composição bromatológica ²				
Matéria seca (%)	62,45	62,45	62,45	62,45
MM (%MS)	5,51	5,51	5,51	5,51
PB (%MS)	12,80	12,80	12,80	12,80
EB (Mcal/kg)	4398,11	4398,11	4398,11	4398,11
FDN (%MS)	40,06	40,06	40,06	40,06
FDA (%MS)	24,93	24,93	24,93	24,93
Lignina (%MS)	3,70	3,70	3,70	3,70
EE (%MS)	4,38	4,38	4,38	4,38
P (%MS)	0,42	0,42	0,42	0,42
Ca (%MS)	1,88	1,88	1,88	1,88
S (ppm)	30,00	30,00	30,00	30,00

0%: dieta sem adição de nitrato de cálcio; 1%: dieta com adição de 1% de nitrato de cálcio; 2%: dieta com adição de 2% de nitrato de cálcio e 3%: dieta com adição de 3% de nitrato de cálcio, todos com base na matéria seca na dieta. ¹Suplemento mineral e vitamínico, quantidade por kg de produto: 200 g de cálcio, 60 g de fósforo, 20 g de enxofre, 20 g de magnésio, 70 g de sódio, 15 mg de cobalto, 700 mg de cobre, 700 mg de ferro, 40 mg de iodo, 1.600 mg de manganês, 19 mg de selênio, 2.500 mg de zinco, 200.000 UI de vitamina A, 50.000 UI de vitamina D3, 1.500 UI de vitamina E; ²Valores estimados de acordo com análise bromatológica dos alimentos.

Os alimentos foram oferecidos duas vezes ao dia, às 08:00 e 16:00h, na forma de ração completa, sendo fornecidos de forma *ad libitum* com garantia de sobras entre 5 a 10% do ofertado.

4.2.1. Período experimental

O experimento teve duração de 120 dias, sendo dividido em quatro períodos. Cada período teve a duração de 28 dias, sendo 17 dias de adaptação às respectivas dietas. No 18º foi realizada a coleta de urina, no 25º a mensuração de pH ruminal e coleta de conteúdo ruminal e nos dias 27 e 28 o esvaziamento ruminal para a avaliação da dinâmica ruminal, com mais dois dias de descanso aos animais.

4.2.2. Consumo de matéria seca

O consumo de matéria seca (CMS) foi avaliado do 18º ao 23º dia experimental de cada período, pela diferença entre a quantidade de alimento ofertada e as sobras multiplicada pela porcentagem de matéria seca (MS) da dieta. Foi calculado o consumo de matéria seca em relação ao peso vivo e ao peso metabólico de acordo com as equações:

$$\text{CMSPV} = \frac{\text{CMS} \cdot 100}{\text{PV}}$$

$$\text{CMSPM} = \frac{\text{CMS}}{\text{PV}^{0,75}}$$

CMSPV: consumo de matéria seca em porcentagem do peso vivo (% PV)

CMSPM: consumo de matéria seca em relação ao peso metabólico (g/kg de $\text{PV}^{0,75}$).

4.2.3. Dinâmica ruminal

A dinâmica ruminal foi avaliada nos 27º e 28º dias experimentais de cada período. O conteúdo ruminal foi coletado em dois períodos, um considerado como o de maior enchimento ruminal (três horas após a alimentação, 27º dia) e outro de menor enchimento ruminal (antes da alimentação, 28º dia). O conteúdo sólido foi retirado manualmente, via cânula ruminal, e colocado em baldes plásticos. A separação de sólidos e líquidos foi efetuada pela filtragem da porção líquida através de uma peneira (5 mm de poros) segundo a metodologia adaptada de Dado e Allen (1995).

Os materiais sólido e líquido foram pesados separadamente. Uma alíquota de 5% da amostra sólida foi retirada e colocada em bandejas de alumínio previamente identificadas para mensuração do teor de MS do conteúdo, sendo o restante do conteúdo coletado recolocado no rúmen. A massa sólida total foi corrigida pelo teor de MS do conteúdo.

A partir da massa sólida, da massa líquida e do CMS foi possível calcular as variáveis de taxa de desaparecimento em %/h e kg/h através das equações 1 e 2, respectivamente:

$$TD = 100 * \left(\frac{CMS}{MST} \right) / 24 \quad \text{Equação 1}$$

TD: Taxa de desaparecimento (%/h);

CMS: Consumo de matéria seca em kg/d;

MST: massa sólida total em kg.

$$TD_{kg} = MST * \frac{TD}{100} \quad \text{Equação 2}$$

TDkg: Taxa de desaparecimento (kg/h);

MST: Massa sólida total no rúmen em kg;

TD: Taxa de desaparecimento (%/h).

4.2.4. Mensuração contínua do pH ruminal

O pH ruminal foi obtido pelo método de mensuração contínua através de um data logger. O sistema desenvolvido utiliza um data logger (modelo T7-1 LRCpH, Dascor, Escondido, CA), uma bateria alcalina de 9 volts e um cabo para conexão ao computador. Este material é abrigado em uma cápsula de PVC resistente à água. O eletrodo de pH (modelo S655CDHT, Dascor, Escondido, CA) é coberto por uma proteção de 38-mm de diâmetro com quatro furos de 25-mm, que são desenvolvidos para permitir a passagem de partículas e líquido enquanto protege o eletrodo de entrar em contato com o epitélio ruminal. Dois pesos de 900 g foram acoplados à estrutura de proteção do eletrodo a fim de manter a “probe” no saco ventral do rúmen. Antes de ser inserida ao rúmen, a “probe” foi conectada a um computador permitindo sua programação para diferentes intervalos de mensuração, bem como o descarregamento dos dados mensurados diretamente em uma planilha do Excel (Microsoft Office, 2007), imediatamente após sua remoção do rúmen.

A partir desse sistema de monitoramento, o pH ruminal foi mensurado por 24 h durante o 25º dia de cada período experimental em intervalos de 10 min. Por meio desta mensuração foram calculadas as variáveis: pH médio, pH mínimo, pH máximo, tempo em que o pH permaneceu abaixo de 5,8; 6,0 e 6,2 (em minutos) e área de pH

abaixo de 5,8; 6,0 e 6,2, segundo a fórmula apresentada por Moya et al. (2011). Antes e após a colocação das “probes” nos animais, as mesmas foram calibradas em soluções de pH 7,0 e 4,0. A calibração dos dados permitiu o cálculo de uma equação de regressão antes e após o teste para ajuste dos dados mensurados.

4.2.5. Contagem total e diferencial de protozoários ruminais

No 25º dia de cada período do experimento foi realizada a coleta de conteúdo ruminal nos tempos 0 (antes da alimentação), 3, 6, 9 e 12 horas após a alimentação. Uma amostra de 10 mL deste material foi armazenada em frascos contendo 20 mL de formaldeído 18,5% (v/v). Em 1 mL da mistura diluída com formol a 50% foram adicionadas duas gotas de verde brilhante a 2%, deixando repousar por 4 horas. Em seguida foram adicionados 9 mL de glicerol a 30% e homogeneizada, tornando a alíquota diluída 30 vezes.

Com o auxílio de uma pipeta, a câmara de contagem foi preenchida com 1 mL da amostra do material. As contagens diferenciais dos protozoários foram determinadas utilizando-se um retículo de 0,5 mm X 0,5 mm de área, com subdivisões de 25 quadrículos, acoplado à ocular de um microscópio (Olympus modelo CH2) e com câmara de contagem de “Sedgwick-Rafter” com medidas internas de 50 mm X 20 mm X 1 mm (capacidade 1 mL). Foram contados 100 campos ópticos através do retículo, com aumento de 100X, usando o fator de correção de 1,6 multiplicado pelo valor médio da contagem dos campos, conforme Dehority (1977). Os protozoários foram classificados nos gêneros *Isotricha*, *Dasytricha*, *Entodinium* e na subfamília *Diplodinae*, que incluem os gêneros *Diplodinium*, *Eudiplodinium*, *Ostracodinium* e *Polyplastron*.

4.2.6. Técnica ex-situ

O princípio dessa técnica consiste em deixar as amostras de conteúdo ruminal dentro de frascos do tipo penicilina (micro-rúmen) incubando-os em banho termostático, simulando as condições predominantes no rúmen dos animais, por um período de 30 minutos. Finalmente, após o bloqueio da fermentação, as mensurações dos produtos finais da fermentação ruminal (CH₄ e AGCC) são realizadas e as perdas energéticas do metano são expressas em relação aos demais produtos da

fermentação. 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 amostragens.

No 25º dia de cada período experimental foi realizada coleta de conteúdo ruminal 0, 3, 6, 9 e 12 horas após a alimentação matutina. Imediatamente após a coleta, 30 mL de conteúdo ruminal foi colocado dentro dos frascos tipo penicilina, previamente identificados e pesados, na proporção de 33,3% de fase sólida, coletada manualmente através da cânula, e 66,6% de fase líquida, coletada com auxílio de bomba de vácuo. As fases líquida e sólida foram retiradas de três pontos diferentes (porção frontal, mediana e caudal), visando uma melhor representação do rúmen. Após a alocação do conteúdo dentro dos frascos, eles foram lacrados com rolha de borracha e lacre de alumínio, com a ajuda de um alicate de recrave, e identificados com selos de segurança. Em seguida, foi realizada a substituição do ar atmosférico por dióxido de carbono (CO_2) através do processo de “lavagem” com CO_2 , cuja finalidade é a expulsão de todo ar atmosférico contido dentro do frasco, a fim de se evitar prejuízo à população microbiana anaeróbia.

Foram utilizados 4 frascos por animal, sendo dois denominados brancos (inativação imediata) e dois incubados (inativação após 30 minutos de incubação em banho termostático). Os frascos incubados, após a lavagem com CO_2 , foram levados a banho termostático onde permaneceram a 39°C por 30min. Ao final do processo fermentativo, os frascos foram inativados por autoclavagem (panela de pressão) sob pressão e temperatura por 15 minutos.

4.2.7. Concentração de nitrogênio amoniacal

No 25º dia de cada período experimental foi realizada coleta de líquido ruminal antes, 3, 6, 9 e 12 horas após a alimentação matutina para determinação da concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH_3). Dois mililitros foram colocados em tubos de ensaio contendo 1,0 mL de solução de ácido sulfúrico 1N e então armazenado em freezer. As análises foram realizadas por colorimetria, segundo método descrito por Kulasek (1972) e adaptado por Foldager (1977).

4.2.8. Quantificação entérica do gás metano

Para a realização da quantificação de metano, o Laboratório de Cromatografia foi climatizado em temperatura de 25°C, para que os frascos mantivessem tal temperatura sem oscilações. A leitura do volume do gás produzido pela amostra, proveniente da fermentação ruminal incubada em frascos de vidro (micro-rúmen), foi mensurada utilizando um transdutor (Datalogger universal - modelo logger AG5000) conectado a um leitor digital e a uma válvula de três saídas. Para a mensuração, a agulha acoplada à válvula foi introduzida através da tampa de borracha. Logo em seguida o volume foi mensurado, arrastando os gases acumulados na parte superior do frasco de penicilina, com o uso da seringa conectada na terceira saída do transdutor até chegar a uma leitura de pressão zero.

Posteriormente à mensuração do volume, 2,0 mL da amostra gasosa contida no frasco foi injetada no cromatógrafo a gás por meio de seringa especial para uso de amostras gasosas com capacidade para 1000 µL (Seringa do tipo Gas-Tight). O cromatógrafo a gás da marca Thermo Scientific, Modelo Trace 1310, utilizado é equipado com coluna de aço inoxidável de 3,5 m de comprimento e 1/8 de polegadas de diâmetro empacotada com a fase estacionária Porapak N[®] (Supelco[®]) e detetor de ionização de chama (FID) mantido a 280°C. O forno do cromatógrafo a gás foi mantido a 40°C durante as análises, sendo a temperatura do injetor de 200°C. A calibração do cromatógrafo a gás foi realizada com material de referência padrão que consiste na mistura gasosa composta por 4% de metano e 96% de ar atmosférico, partindo de uma mistura gasosa com 50% de metano em ar sintético (Linde Gás[®]), com base na proporção mol/mol. O gás de arraste foi o N₂ de alta pureza mantido em fluxo de 30 mL/minuto. O número de repetições por amostra foi aquele necessário para que a diferença entre leituras apresentasse coeficiente de variação inferior a 5%.

4.2.9. Quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta

O volume líquido do conteúdo ruminal, dentro dos frascos (micro-rúmen), foi calculado pela diferença de pesos entre o peso do frasco contendo a amostra após a estufa (65°C por 15 dias) e o peso do frasco contendo a amostra antes da estufa, sendo este volume corrigido pelo volume líquido usado na amostragem para a determinação dos AGCCs.

Para a quantificação de AGCC foi retirada uma alíquota da fração líquida do conteúdo ruminal contida no frasco do tipo penicilina após a mensuração do metano. Esta fração líquida foi colocada em tubos de ensaio e centrifugada por 15min em rotação de 3500rpm. Ao final da centrifugação foi retirado 1,0mL do sobrenadante e acondicionado em tubo de ensaio de vidro, contendo 0,2mL de ácido fórmico PA. Estes foram armazenados em refrigerador a 4°C para, posteriormente, serem realizadas as quantificações dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC): acético, propiônico e butírico. A quantificação foi realizada pela técnica de cromatografia gasosa, segundo Erwin, Marco e Emery (1961), com utilização de um cromatógrafo a gás (Thermo Scientific®, modelo Focus GC) com injetor automático de amostras (Thermo Electron Corporation®, modelo AS-3000) equipado com coluna de vidro de 2m de comprimento e 1/5 de polegada de diâmetro interno empacotada com fase estacionária 80/120 Carbopack® B-DA/4% Carbowax® 20M (Supelco®) e detetor de ionização de chama (FID) mantido à 270°C. O forno do cromatógrafo a gás foi mantido a 190°C durante as análises e a temperatura do injetor foi de 220°C. O gás de arraste foi o H₂ de alta pureza mantido em fluxo de 30 mL/minuto. O número de repetições por amostra foi aquele necessário para que a diferença entre leituras fosse inferior a 5%.

4.2.10. Cálculo da produção de ácidos graxos de cadeia curta, metano e a perda de energia relativa (PER)

A quantificação do gás metano, produzido desde o momento da injeção do conteúdo ruminal no frasco de penicilina até o momento de sua inativação por autoclavagem, foi obtida pela multiplicação entre o volume de gás no frasco e a concentração de metano e, então, o resultado encontrado no frasco incubado por 30 minutos foi subtraído do valor observado no frasco não incubado.

Sendo assim:

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

No qual:

Prod. CH₄ = Produção de metano no momento compreendido entre a injeção do conteúdo ruminal no frasco de penicilina até a inativação por pressão (mmol/g/h; mmol/kg; g/kg/d);

Conc.CH₄ = Concentração de metano (mMol/L);

Vol. gás total: somatória do volume obtido da seringa e o volume do headspace do frasco de penicilina (mL);

T₃₀ = Tempo de 30 min de incubação;

T₀ = Tempo de 0 min de incubação (frasco branco);

Os valores obtidos nos frascos foram corrigidos para as condições de pressão e temperatura local, através da equação geral dos gases.

De forma semelhante a produção de AGCC desde o momento da injeção da amostra nos frascos até a inativação por autoclavagem é dada por:

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

No qual:

Prod. AGCC = Produção de AGCC no momento compreendido entre a injeção do conteúdo ruminal no frasco de penicilina até a inativação por autoclavagem (mmol/g/h; mol/kg/d; g/kg/d);

Conc.AGCC = Concentração de AGCC (mMol/L);

Vol. Líq. Total: volume líquido no frasco de penicilina obtido por diferença de pesagem antes e depois da estufa (mL);

T₃₀ = Tempo de 30 min de incubação;

T₀ = Tempo de 0 min de incubação (frasco branco).

As produções de CH₄ e AGCC foram expressas com base no conteúdo sólido incubado nos frascos (gramas ou quilos), conteúdo esse que foi obtido pela diferença de pesagem entre o peso do frasco contendo a amostra após a estufa (65°C por 15 dias e 105° por 3 dias) e o peso do frasco vazio.

Após a quantificação dos produtos da fermentação na amostra contida nos frascos (metano ou AGCC) cada produto foi multiplicado pelo seu calor de combustão, a fim de se expressar a produção de metano em porcentagem da energia oriunda da fermentação produzida. Assim, a perda de energia relativa (PER) é a razão entre a energia contida no metano produzido e a somatória da energia contida em todos os produtos da fermentação quantificados (metano e AGCC), expressa em porcentagem. Logo:

$$\text{PER} = 100 \times \left(\frac{\text{Energia do CH}_4}{\text{Energia do CH}_4 + \text{C}_2 + \text{C}_3 + \text{C}_4} \right)$$

No qual:

PER = perda de energia relativa do metano em relação aos demais produtos da fermentação (%);

CH₄ = metano;

C₂ = ácido acético;

C₃ = ácido propiônico;

C₄ = ácido butírico.

4.2.11. Produção de proteína microbiana

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). As amostras "spot" de 50 mL de urina foram obtidas de todas as vacas no 18º dia de cada período experimental, sendo coletados 10mL a cada 6 horas, até finalizar 24 horas, durante micção estimulada por massagem na vulva. As amostras de 50 mL de urina (amostra spot) foram filtradas e alíquotas de 10 mL foram diluídas imediatamente 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 -15°C para posteriores análises de ácido úrico, alantoína, ureia e creatinina.

As concentrações de creatinina foram determinadas por meio de kits comerciais (Bioclin® Ref K067), através da reação com Picrato Alcalino em meio tamponado.

O ácido úrico foi determinado por reação enzimática colorimétrica com uricase e peroxidase, através do kit comercial (Bioclin® Ref k139). As concentrações de ureia também foram determinadas por reação enzimática colorimétrica, através da utilização do kit comercial (Bioclin® Ref k047). As análises de alantoína foram realizadas pelo método colorimétrico, de acordo com a técnica de Chen e Gomes (1992).

A partir da concentração de ureia na urina foi possível calcular o nitrogênio ureico na urina por meio da multiplicação da concentração de ureia pelo teor de N na ureia (0,466).

As análises dos derivados de purinas (alantoína e ácido úrico) foram realizadas por calorimetria, descrita por Chen e Gomes (1992).

As purinas microbianas absorvidas (Pabs, mmol/dia) foram calculadas conforme a fórmula a seguir:

$$Pabs = \left(\frac{DP - (0,385 \times PM)}{0,85} \right)$$

Onde:

Pabs: purinas microbianas absorvidas, mmol/dia;

DP: derivados de purina, mmol/dia;

PM: peso metabólico, kg;

0,385×PM: contribuição endógena para a excreção de purinas;

0,85: recuperação de purinas absorvidas como DP (VERBIC et al., 1990).

O cálculo para determinação dos compostos nitrogenados microbianos foi feito de acordo com a seguinte fórmula:

$$Nmic = \frac{(70 \times Pabs)}{(0,83 \times 0,116 \times 1000)}$$

Onde:

Nmic: nitrogênio microbiano, gN/dia;

70: conteúdo de N nas purinas, mgN/mmol;

Pabs: purinas microbianas absorvidas, mmol/dia;

1000: fator de correção da unidade;

0,83: digestibilidade das purinas microbianas;

0,116: relação entre N purina e N total dos microrganismos ruminais (CHEN; GOMES, 1992).

O volume urinário total diário foi estimado dividindo-se as excreções urinárias diárias de creatinina pelos valores observados de concentração de creatinina na urina das amostras “spot”, segundo Oliveira et al. (2001). A excreção urinária diária de creatinina (EC) foi estimada a partir da seguinte equação, proposta por Chizzotti (2004).

$$EC \text{ (mg/kgPV)} = 32,27 - 0,01093 \times PV \text{ (kg)}$$

Dessa forma, com a excreção média diária de creatinina e a concentração de creatinina (mg/dL) na amostra “spot” de urina, foi estimado o volume total diário de urina, em litros por vaca/dia, para o cálculo do balanço de nitrogênio.

O consumo de nitrogênio foi determinado dividindo o consumo de proteína bruta por 6,25, obtendo-se a quantidade em gramas de nitrogênio consumida. O

mesmo cálculo é realizado com os valores de proteína bruta das fezes, obtendo-se a excreção total de nitrogênio em g/kg MS.

O nitrogênio total das amostras de urina foi determinado de acordo com as metodologias descritas por Silva e Queiroz (2002), onde a quantidade em gramas de nitrogênio, para cada 100 mL de urina, foi obtido dividindo-se o valor de proteína bruta das amostras pelo fator 6,25 para as amostras de urina.

O balanço de nitrogênio foi obtido subtraindo o total de nitrogênio (em gramas) consumido pelos valores de nitrogênio na urina e fezes, obtendo-se os valores de nitrogênio retido em gramas.

4.2.12. Análise estatística

Os dados referentes às variáveis de consumo de matéria seca, dinâmica ruminal, proteína microbiana e pH foram analisados pelo programa Statistical Analysis System (SAS, versão 9.3, 2010). Antes das análises propriamente ditas, os dados foram analisados em relação à presença de informações discrepantes (“outliers”), normalidade dos resíduos pelo teste Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias pelo teste Levene. Quando a premissa de normalidade não foi atendida, a transformação logarítmica ou pela raiz quadrada foi necessária.

Os dados foram analisados utilizando o PROC MIXED para modelos mistos e submetidos à análise de variância, cujo o modelo incluiu o efeito de nível de nitrato de cálcio, genética e interação entre nível de nitrato e genética como fatores fixos e os efeitos de animal dentro de quadrado e período como fatores aleatórios. Os efeitos de nível de nitrato foram avaliados pelo teste de regressão polinomial. O modelo estatístico utilizado está descrito conforme a equação abaixo:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + P_j + Q_k + A_l(Q_k) + E_{ijkl}$$

Onde:

Y_{ijkl} = observação referente ao nível de nitrato (i) + período (j) + genética (k) + animal (l) + animal dentro de genética (k);

μ = Média geral;

T_i = Efeito de nível de nitrato de cálcio (efeito fixo);

P_j = Efeito de período (efeito aleatório);

Q_k = Efeito de genética (efeito fixo);

$A_l(Q_k)$ = Efeito de animal dentro de quadrado (efeito aleatório);

E_{ijkl} = Erro aleatório associado a cada observação.

Para os dados referentes às variáveis de contagem total e diferencial de protozoários, produção de metano, AGCC e N-NH₃ também foram analisados pelo programa SAS, antes verificando-se normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias. Os dados foram analisados de acordo com o PROC MIXED para modelos mistos, tendo diferentes horas de coleta (0, 3, 6, 9, 12) como medidas repetidas no tempo. Para as análises, dentre as 15 diferentes estruturas de covariância testadas, a que melhor se ajustou ao modelo estatístico foi escolhida baseado no menor valor do critério de informação Akaike corrigido (AICC) (Wang e Goonewardene, 2004).

O modelo incluiu os efeitos de nível de nitrato, genética, tempo e as possíveis interações entre eles como fatores fixos e o animal dentro de genética e período como fatores aleatórios.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Consumo

Os animais taurinos apresentaram maiores valores para CMS. Porém, quando estes parâmetros foram calculados em relação ao PV e PM os zebuínos é que apresentaram valores superiores. A inclusão crescente de nitrato de cálcio na dieta teve efeito linear decrescente sobre os valores de CMSPV e CMSPM. Não foi verificado efeito de interação entre os fatores sobre nenhuma variável de consumo.

Tabela 7 - Efeito do aumento do nível de nitrato de cálcio na dieta de fêmeas bovinas (taurino e zebuino) sobre as variáveis de consumo de MS.

Variável	Genética		Nitrato				EPM	Probabilidade		
	Tauri	Zebu	0%	1%	2%	3%		Gen	Nitrato	G*N
CMS	12,54	8,19	10,87	10,22	10,32	10,06	0,437	<,0001	NS	NS
CMSPV	1,32	1,89	1,65	1,60	1,60	1,56	0,061	0,0004	0,0285 ^L	NS
CMSPM	73,22	86,03	82,55	79,25	79,27	77,43	1,888	0,0100	0,0427 ^L	NS

Tauri: Taurino; Zebu: Zebuino; EPM: Erro Padrão da Média; Gen: Genética; Nitrato: Nível de nitrato de cálcio; G*N: interação entre genética e nível de nitrato; NS: Não significativo; CMS: Consumo de Matéria Seca (kg/dia); CMSPV: Consumo em função do Peso Vivo (%); CMSPM: Consumo em função do Peso Metabólico (gMS/kgPM); Tauri: Taurino; Gen: Genética; N*G: interação entre nível e genética.

4.3.2. Dinâmica ruminal

Os diferentes níveis de nitrato não influenciaram nenhuma das medidas de dinâmica ruminal. O grupo de animais taurinos apresentou maiores valores de massa líquida e sólida (em kg), assim como maior taxa de desaparecimento de matéria total em kg. Já os animais do grupo zebuínio obtiveram valores superiores para massa sólida, líquida e total em relação ao peso vivo (Tabela 8).

A taxa de desaparecimento em % por hora e concentração de matéria seca do conteúdo não sofreram influência nem dos níveis de nitrato na dieta e nem do grupo genético.

Tabela 8 - Efeito do aumento do nível de nitrato de cálcio na dieta de fêmeas bovinas sobre a dinâmica ruminal.

Variável	Genética		Nitrato				EPM	Probabilidade		
	Tauri	Zebu	0%	1%	2%	3%		Gen	Nitrato	G*N
ML (kg)	59,11	35,95	47,68	46,39	48,70	45,65	2,446	0,0028	NS	NS
MST (kg)	7,77	4,72	6,48	6,02	6,33	6,11	0,337	0,0043	NS	NS
MT (kg)	66,88	40,67	54,16	52,41	55,03	51,61	2,774	0,0029	NS	NS
MLPV (% PV)	6,27	8,26	7,18	7,13	7,40	7,34	0,267	0,0140	NS	NS
MSPV (% PV)	0,82	1,09	0,97	0,93	0,98	0,93	0,042	0,0305	NS	NS
MTPV (% PV)	7,09	9,34	8,15	8,06	8,38	8,27	0,306	0,0149	NS	NS
MSC (%)	11,48	11,57	11,88	11,51	11,53	11,17	0,189	NS	NS	NS
TDS (%/hora)	7,53	8,08	8,06	7,94	7,63	7,61	0,225	NS	NS	NS
TDS _k (kg/hora)	0,57	0,37	0,49	0,48	0,47	0,46	0,020	0,0001	NS	NS

Tauri: Taurino; Zebu: Zebuínio; EPM: Erro Padrão da Média; Gen: Genética; Nitrato: Nível de nitrato de cálcio; G*N: interação entre genética e nível de nitrato; NS: Não significativo; ML: Massa de líquido (kg); MST: Massa sólida total (kg); MT: Massa total (kg); MLPV: Massa de líquido em relação ao peso vivo; MSPV: massa de sólido em relação ao peso vivo; MTPV: Massa total em relação ao peso vivo; MSC: Matéria seca do conteúdo ruminal (%); TDS: Taxa de desaparecimento de sólidos (%/hora); TDS_k: Taxa de desaparecimento de sólidos (kg/hora).

4.3.3. Mensuração contínua do pH

O pH ruminal não sofreu interferência do nível de nitrato de cálcio. Os animais taurinos apresentaram maiores valores para tempo abaixo de pH 6,2, e os zebuínos apresentaram valores superiores para pH médio e mínimo. Não foi verificado efeito de interação entre genética e nível de nitrato entre as variáveis de pH.

Tabela 9 - Efeito do nível de nitrato de cálcio sobre o pH ruminal de dois grupos de bovinos.

Variável	Genética		Nitrato				EPM	Probabilidade		
	Tauri	Zebu	0%	1%	2%	3%		Gen	Nitrato	G*N
pH										
Máximo	6,78	6,90	6,83	6,81	6,87	6,84	0,034	NS	NS	NS
Médio	6,27	6,58	6,39	6,41	6,44	6,45	0,042	0,0288	NS	NS
Mínimo	5,62	6,01	5,74	5,86	5,84	5,82	0,058	0,0345	NS	NS
Tempo de pH abaixo de (em minutos)										
5,8	135,62	8,67	76,25	81,43	62,50	77,50	25,736	NS	NS	NS
6,0	300,00	39,37	148,75	216,25	137,50	176,25	38,101	NS	NS	NS
6,2	571,25	107,50	376,25	367,50	283,75	330,00	58,900	0,0176	NS	NS
Área de pH abaixo de (h.pH/dia)										
5,8	0,31	0,01	0,21	0,21	0,01	0,21	0,079	NS	NS	NS
6,0	1,10	0,13	0,56	0,73	0,54	0,63	0,188	NS	NS	NS
6,2	2,56	0,36	1,39	1,72	1,25	1,49	0,349	NS	NS	NS

Tauri: Taurino; Zebu: Zebuino; EPM: Erro Padrão da Média; Gen: Genética; Nitrato: Nível de nitrato de cálcio; G*N: interação entre genética e nível de nitrato; NS: Não significativo.

4.3.4. Contagem total e diferencial de protozoários ruminais

O nível de nitrato de cálcio não influenciou nenhuma das populações de protozoários avaliadas no presente trabalho. As contagens de *Diploniidae*, *Entodinium*, *Isotricha*, assim como a contagem total de protozoários sofreram influência do grupo genético, com os zebuínos apresentando os maiores valores (Tabela 10).

Tabela 10 - Efeito do aumento do nível de nitrato de cálcio na dieta de fêmeas taurinas e zebuínas sobre a contagem total e diferencial de protozoários ruminais.

Variável	Genética		Nitrato				EPM	Probabilidade		
	Tauri	Zebu	0%	1%	2%	3%		Gen	Nitrato	N*G
Protozoários (x10 ³ /mL)										
Dasy	2,46	3,17	2,69	2,68	2,46	3,38	0,191	NS	NS	NS
Dipl	28,10	51,88	37,08	39,66	38,72	43,26	2,012	0,0037	NS	NS
Ento	477,83	697,26	554,31	608,94	599,22	584,13	21,990	0,0101	NS	NS
Iso	1,20	2,35	1,97	2,11	1,41	1,63	0,175	0,0110	NS	NS
Total	509,96	759,51	596,52	654,21	648,96	635,16	23,773	0,0105	NS	NS
Protozoários (%)										
Dasy	0,49	0,53	0,51	0,44	0,52	0,56	0,033	NS	NS	NS
Dipl	5,96	7,49	6,76	5,84	7,06	7,22	0,270	NS	NS	NS
Ento	93,36	91,54	92,51	93,23	92,16	91,89	0,285	NS	NS	NS
Iso	0,18	0,35	0,34	0,28	0,20	0,26	0,027	NS	NS	NS

Tauri: Taurino; Zebu: Zebuino; EPM: Erro Padrão da Média; Gen: Genética; Nitrato: Nível de nitrato de cálcio; G*N: interação entre genética e nível de nitrato; NS: Não significativo; *Dasy*: *Dasytricha*; *Diplo*: *Diplonidae*; *Ento*: *Entodinium*; *Iso*: *Isotricha*.

4.3.5. Concentração ruminal de nitrogênio amoniacal

O balanço de nitrogênio amoniacal apresentou efeito quadrático quanto ao nível de nitrato na dieta, sendo que o maior balanço foi observado na dieta com 1% de NC. Não foram verificadas diferenças entre as concentrações de N-NH₃ para os diferentes níveis de nitrato adicionados à dieta. Os animais zebuínos apresentaram valores superiores nos frascos antes (0 min) e depois da incubação (30 min).

Tabela 11 - Efeito de diferentes níveis de nitrato de cálcio na dieta de fêmeas bovinas sobre a concentração e balanço de N-NH₃.

Variável	Genética		Nitrato				EPM	Probabilidade		
	Tauri	Zebu	0%	1%	2%	3%		Gen	Nitrato	N*G
0 minuto	11,96	16,22	14,38	14,49	12,79	14,68	0,507	<,0001	NS	NS
30 minutos	12,27	16,67	14,68	14,85	13,28	15,06	0,524	<,0001	NS	NS
Balanço	0,69	0,91	0,49	1,10	0,97	0,64	0,078	NS	0,0027 ^Q	NS

Tauri: Taurino; Zebu: Zebuino; EPM: Erro Padrão da Média; Gen: Genética; Nitrato: Nível de nitrato de cálcio; G*N: interação entre genética e nível de nitrato; NS: Não significativo; 0 minuto: Concentração de nitrogênio amoniacal nos frascos não submetidos à incubação (mg/dL); 30 minutos: Concentração de nitrogênio amoniacal nos frascos submetidos à 30 minutos de incubação (mg/dL); Balanço: Balanço entre os frascos não submetidos à incubação e os frascos submetidos à 30 minutos de incubação.

4.3.6. Produção de ácidos graxos de cadeia curta, metano e perda de energia relativa de metano em relação aos AGCCs

Os volumes de ácido acético nos frascos aumentaram linearmente com a adição de nitrato de cálcio. Os volumes de metano nos frascos no tempo 0 e no tempo 30 minutos, apresentaram efeito de desvio da quadrática, com o maior valor quando a inclusão de NC foi de 1% e menor valor para a inclusão de 3%.

Os animais do grupo de zebuínos apresentaram maiores valores para produção de metano.

A relação de produção entre ácido acético e ácido propiônico (Ac:Pr) apresentou efeito de desvio da quadrática com o maior valor na inclusão de 1% de NC e menor valor para a inclusão de 2% de NC. Também foi verificada interação entre grupo genético e nível de adição de NC para relação Ac:Pr.

Tabela 12 - Efeito da inclusão de diferentes níveis de nitrato de cálcio na dieta de fêmeas bovinas sobre as produções de ácidos graxos de cadeia curta, metano e perda de energia relativa do metano em relação aos AGCCs.

(Continua)

Variável	Genética		Nitrato				EPM	Probabilidade		
	Tauri	Zebu	0%	1%	2%	3%		Gen	Nitrato	N*G
Acético										
T ₀ (mmol/L)	75,86	74,63	71,92	74,36	75,62	79,09	0,478	NS	0,0008 ^L	NS
T ₃₀ (mmol/L)	77,24	76,35	73,30	76,06	77,08	80,75	0,499	NS	0,0005 ^L	NS
Dif (mmol/L)	1,29	1,62	1,19	1,51	1,45	1,66	0,129	NS	NS	NS
Pro (mmol/(g.h))	0,043	0,052	0,038	0,051	0,047	0,054	0,004	NS	NS	NS
Pr _{mk} (mol/(kg.dia))	1,02	1,25	0,92	1,22	1,11	1,29	0,100	NS	NS	NS
Pr _{gk} (g/(kg.dia))	61,33	75,26	55,41	73,26	67,04	77,28	5,980	NS	NS	NS
EB (kcal/(kg.dia))	214,04	262,65	193,38	255,66	233,96	269,71	20,872	NS	NS	NS
Propiônico										
T ₀ (mmol/L)	17,28	16,17	17,39	16,65	16,47	16,37	0,204	NS	NS	NS
T ₃₀ (mmol/L)	17,73	16,64	17,84	17,15	16,86	16,87	0,210	NS	NS	NS
Dif (mmol/L)	0,46	0,44	0,45	0,51	0,41	0,44	0,042	NS	NS	NS
Pro (mmol/(g.h))	0,014	0,014	0,013	0,017	0,012	0,014	0,001	NS	NS	NS
Pr _{mk} (mol/(kg.dia))	0,33	0,34	0,31	0,41	0,29	0,34	0,031	NS	NS	NS
Pr _{gk} (g/(kg.dia))	24,46	25,38	23,30	30,20	21,19	24,87	2,258	NS	NS	NS
EB (kcal/(kg.dia))	121,80	126,40	116,04	150,38	105,53	123,84	11,244	NS	NS	NS
Butírico										
T ₀ (mmol/L)	11,03	10,50	10,69	11,17	10,96	10,22	0,145	NS	NS	NS
T ₃₀ (mmol/L)	11,41	10,99	11,09	11,68	11,41	10,62	0,153	NS	NS	NS
Dif (mmol/L)	0,36	0,49	0,35	0,50	0,45	0,40	0,038	NS	NS	NS
Pro (mmol/(g.h))	0,011	0,016	0,012	0,017	0,012	0,013	0,002	NS	NS	NS
Pr _{mk} (mol/(kg.dia))	0,26	0,38	0,28	0,41	0,29	0,30	0,029	NS	NS	NS
Pr _{gk} (g/(kg.dia))	22,93	32,19	24,71	33,37	25,64	26,74	2,453	NS	NS	NS
EB (kcal/(kg.dia))	136,68	198,85	147,25	212,67	152,82	159,40	14,998	NS	NS	NS
Total										
T ₀ (mmol/L)	104,31	101,29	100,01	102,18	103,36	105,67	0,707	NS	NS	NS
T ₃₀ (mmol/L)	106,53	103,97	102,23	104,88	105,67	108,22	0,737	NS	NS	NS
Dif (mmol/L)	2,09	2,54	1,96	2,44	2,31	2,55	0,192	NS	NS	NS
Pro (mmol/(g.h))	0,069	0,082	0,063	0,083	0,074	0,082	0,006	NS	NS	NS
Pr _{mk} (mol/(kg.dia))	1,66	1,97	1,52	1,98	1,78	1,97	0,147	NS	NS	NS

Tabela 12- Efeito da inclusão de diferentes níveis de nitrato de cálcio na dieta de fêmeas bovinas sobre as produções de ácidos graxos de cadeia curta, metano e perda de energia relativa do metano em relação aos AGCCs.

(Conclusão)

Variável	Genética		Nitrato				EPM	Probabilidade		
	Tauri	Zebu	0%	1%	2%	3%		Gen	Nitrato	N*G
Total										
Pr _{gk} (g/(kg.dia))	112,25	133,28	103,42	134,79	120,78	131,89	9,905	NS	NS	NS
EB (kcal/(kg.dia))	492,47	583,15	456,67	594,79	531,29	567,90	43,126	NS	NS	NS
Relação Acético/Propiônico										
Pro (mol/(kg.dia))	2,52	3,23	2,63	3,27	2,57	3,01	0,217	NS	0,0392 ^D	0,0059
Metano										
T ₀ (mmol/frasco)	0,020	0,024	0,023	0,024	0,021	0,020	0,000	0,0178	0,0196 ^D	NS
T ₃₀ (mmol/frasco)	0,071	0,089	0,081	0,086	0,078	0,077	0,001	0,0185	0,0038 ^D	NS
Dif (mmol/frasco)	0,051	0,066	0,058	0,062	0,058	0,057	0,001	0,0068	NS	NS
Pro (mmol/(g.h))	0,070	0,083	0,076	0,082	0,076	0,073	0,001	0,0195	NS	NS
Pr _{mk} (mol/(kg.dia))	1,68	2,00	1,84	1,97	1,81	1,74	0,030	0,0196	NS	NS
Pr _{gk} (g/(kg.dia))	26,84	31,92	29,37	31,44	29,00	27,88	0,472	0,0196	NS	NS
EB (kcal/(kg.dia))	353,20	420,08	386,53	413,73	381,65	366,86	6,217	0,0196	NS	NS
Per (%)	17,41	17,71	18,64	17,97	17,00	16,65	0,392	NS	NS	NS

Tauri: Taurino; Zebu: Zebuino; EPM: Erro Padrão da Média; Gen: Genética; Nitrato: Nível de nitrato de cálcio; G*N: interação entre genética e nível de nitrato; NS: Não significativo; T₀ = Tempo de 0 min de incubação; T₃₀ = Tempo de 30 min de incubação; Dif: Diferença entre T₀ e T₃₀; Pro: Produção; EB: Energia bruta (kcal/kg/dia).

Figura 1 – Interação entre dieta e genética sobre a relação de produção acético:propiónico.

4.3.6. Parâmetros urinários e balanço de nitrogênio

Houve efeito de grupo genético para todos os parâmetros apresentados na Tabela 13, exceto para concentração de ácido úrico urinário por litro de urina (AUUL, mmol/L), derivados de purinas por litro de urina (DPL, mmol/L) e porcentagem de alantoína dos derivados de purinas (AI, %)

A produção de urina (L) e concentração de creatinina (mg/kg) sofreram influência da adição de nitrato de cálcio na dieta, desvio da quadrática e quadrática (respectivamente), sendo que os maiores valores para ambos os parâmetros foram quando o nível de nitrato de cálcio na dieta foi de 1%.

Tabela 13 - Efeito da adição de quatro níveis de nitrato de cálcio sobre a síntese de proteína microbiana em dois grupos genéticos de bovinos.

Variável	Genética		Nitrato				EPM	Probabilidade		
	Tauri	Zebu	0%	1%	2%	3%		Gen	Nitrato	N*G
Urina (L/dia)	16,07	8,40	11,34	13,79	11,28	12,53	0,882	0,0008	0,0168 ^D	NS
Crea (mg/kgPV)	21,80	27,49	24,61	24,69	24,66	24,63	0,521	<,0001	0,0482 ^Q	NS
NUU (mg/kgPV)	133,67	191,48	184,20	152,85	157,64	155,61	7,882	0,0042	NS	NS
AIUL (mmol/L)	10,58	14,45	13,91	11,61	12,25	12,28	0,652	0,0545	NS	NS
AIUd (mmol/dia)	161,20	116,66	146,77	135,60	132,35	141,02	5,250	<,0001	NS	NS
AUUL (mmol/L)	1,30	1,50	1,61	1,24	1,44	1,32	0,078	NS	NS	NS
AUUd (mmol/dia)	20,11	12,10	17,71	14,96	16,30	15,44	0,984	0,0029	NS	NS
DPL (mmol/L)	11,88	15,95	15,51	12,85	13,69	13,60	0,701	NS	NS	NS
DPd (mmol/dia)	181,31	128,76	164,48	150,56	148,65	156,46	5,987	<,0001	NS	NS
AI (%)	88,90	90,53	89,33	90,07	89,26	90,21	0,429	NS	NS	NS
PabsL (mmol/L)	8,87	13,43	12,75	10,25	10,68	10,94	0,704	0,0362	NS	NS
Pabsd (mmol/dia)	135,36	108,24	132,70	116,80	114,37	123,33	4,833	0,0044	NS	NS
Nmicd (g/dia)	98,42	78,69	96,48	84,92	83,15	89,67	3,514	0,0044	NS	NS
Nmic (mg/kgPV)	103,07	180,60	152,95	139,14	132,53	142,73	8,608	0,0009	NS	NS

Tauri: Taurino; Zebu: Zebuino; EPM: Erro Padrão da Média; Gen: Genética; Nitrato: Nível de nitrato de cálcio; G*N: interação entre genética e nível de nitrato; NS: Não significativo; Crea: Creatinina em relação ao peso vivo (mg/kgPV); NUU: Nitrogênio ureico na urina em relação ao peso vivo (mg/kgPV); AIUL: Alantoína urinária por litro de urina (mmol/L); AIUd: Alantoína urinária por dia (mmol/dia); AUUL: Ácido úrico urinário por litro de urina (mmol/L); AUUd: Ácido úrico urinário por dia (mmol/dia); DPL: Derivados de purinas por litro de urina (mmol/L); DPd: Derivados de purina por dia (mmol/dia); AI (%): Porcentagem de alantoína dos derivados de purinas; PabsL: Purinas microbianas absorvidas por litro de urina (mmol/L); Pabsd: Purinas microbianas por dia (mmol/dia); Nmicd: Nitrogênio microbiano por dia (g/dia); Nmic: Nitrogênio microbiano em relação ao peso vivo (mg/kgPV).

O maior valor de N ingerido ocorreu quando o nível de NC foi de 0% na dieta, sendo que seu valor diminuiu linearmente ao se aumentar o nível de NC na dieta. Já a genética dos animais interferiu em todos os parâmetros, excluindo o nitrogênio retido e o balanço de nitrogênio na urina.

Tabela 14 - Efeito da adição de quatro níveis de nitrato de cálcio sobre o consumo, excreção e retenção de nitrogênio em dois grupos genéticos de bovinos.

Variável	Genética		Nitrato				EPM	Probabilidade		
	Tauri	Zebu	0%	1%	2%	3%		Gen	Nitrato	N*G
N ing, g/d/PM	1,53	1,85	1,79	1,64	1,68	1,64	0,046	0,0329	0,0306 ^L	ns
N excretado (g/d/PM)										
Fezes	0,58	0,92	0,80	0,72	0,74	0,74	0,039	0,0007	ns	ns
Urina	0,74	0,87	0,92	0,76	0,78	0,77	0,033	0,0717	ns	ns
Total	1,33	1,79	1,72	1,48	1,53	1,51	0,061	0,0006	ns	ns
N retido	0,20	0,05	0,07	0,16	0,15	0,13	0,048	ns	ns	ns
N balanço (g N excretado/kg N ingerido)										
Fezes	388,8	498,1	443,0	450,1	435,9	444,9	18,163	0,0282	ns	ns
Urina	496,0	476,9	514,7	491,4	464,1	475,7	22,590	ns	ns	ns
Retido	166,9	24,9	42,36	161,2	99,9	79,37	25,414	0,0099	ns	ns
N mic, mg/d/PM	572,8	824,3	755,7	680,7	653,7	704,2	32,983	0,0028	ns	ns

Tauri: Taurino; Zebu: Zebuino; EPM: Erro Padrão da Média; Gen: Genética; Nitrato: Nível de nitrato de cálcio; G*N: interação entre genética e nível de nitrato; NS: Não significativo; N ing: Nitrogênio ingerido por dia em relação ao peso metabólico (g/kg PM.d⁻¹).

4.4. DISCUSSÃO

Já era esperado o maior CMS pelos taurinos, pois estes apresentavam os maiores pesos. Também era esperado que os zebuínos apresentassem maior CMSPV e também CMSPM, pois, apesar de mais leves, também eram mais novos, apresentando maior ingestão pelo seu estágio fisiológico de crescimento.

Os valores de CMSPV e CMSPM decresceram linearmente ao se aumentar o teor de nitrato de cálcio na dieta, corroborando com Farra e Satter (1971), que atribuíram a queda no consumo à baixa palatabilidade no nitrato.

A dinâmica ruminal é um importante indicador da relação entre consumo e desempenho do animal, podendo ser afetada pela composição do alimento, condições fisiológicas do animal e capacidade retículo rúmen (REYNOLDS et al., 2004). Os animais taurinos apresentaram maior consumo de MS e maior taxa de desaparecimento de sólidos (kg/hora). Esses dados estão de acordo com Clauss et al. (2007) que afirmam que uma maior ingestão de alimento diminui o tempo de retenção no rúmen, sendo assim, reduzindo o tempo disponível para a degradação ruminal do alimento.

Park et al. (2011) reportaram valores de 6,1 a 11,4 kg de massa sólida e 44,3 a 66 kg de massa líquida para vacas leiteiras em diferentes estágios de produção. Esses valores estão de acordo com os encontrados neste estudo para os animais taurinos, sendo que os zebuínos apresentaram valores inferiores, podendo ser devido ao tamanho corporal desses animais.

Nolan et al. (2010) reportaram diminuição na retenção de fluido ruminal em ovelhas alimentadas com 3% de KNO_3 , atribuindo o aumento da concentração de AGCC à esse aumento na retenção. Porém no presente experimento, nota-se que os diferentes níveis de nitrato não afetaram de forma alguma os parâmetros de dinâmica ruminal, nem a produção de AGCC.

Contradizendo alguns estudos (VAN ZIJDERVELD et al., 2010; GUYADER et al., 2015; LEE et al., 2015), a inclusão de nitrato não alterou o pH ruminal no presente experimento. Segundo Zhou et al. (2012), o aumento da produção de NH_3 em dietas adicionadas de nitrato pode aumentar o pH ruminal. Apesar de a concentração de nitrogênio amoniacal ter sido afetada pelo nível de nitrato, isso parece não ter sido o suficiente para afetar o pH neste experimento.

Outro fator que pode afetar o pH ruminal é a salivação, que é estimulada pela mastigação. Os zebuínos apresentaram maior taxa de mastigação de MS e FDN em min/kg, portanto, ficando mais tempo mastigando por kg de alimento, tendo um maior estímulo para a salivação. Isso explicaria o fato de os animais zebuínos apresentarem valores superiores de pH médio e mínimo.

Segundo Brown, Ponce e Pulikanti (2006), o gênero de protozoários predominantes no ecossistema ruminal é o *Entodinium*, que chega a representar mais de 90% dos protozoários no rúmen. Guan et al. (2006), ao utilizarem dieta com 70% de concentrado encontraram 91,1% de protozoários do gênero *Entodinium*. Os dois trabalhos apresentaram valores próximos ao encontrado no presente estudo que foi de 92,45%.

A identificação da população de protozoários é importante em estudos que buscam alternativas para reduzir as emissões de metano em ruminantes pois, segundo Kazunari (2010), as arqueas estão intimamente associadas aos protozoários ciliados. Com a inclusão de 4,51% de nitrato de cálcio encapsulado, El-Zaiat et al. (2014) observaram redução na população de protozoários em ovinos, assim como Sar et al. (2005b). Porém, no presente estudo a inclusão de nitrato não afetou o número de protozoários no rúmen.

A população de protozoários foi diretamente influenciada pelo grupo genético, onde os zebuínos apresentaram a maior população. Isso pode ter sido em consequência da menor taxa de desaparecimento de sólidos (kg/hora), por parte dos zebuínos, pois, mesmo tendo uma ingestão menor de MS, os protozoários tiveram maior tempo ábil para sua proliferação. Sendo que, a produção de CH₄ também foi maior para os zebuínos, demonstrando que houve uma relação entre a população de protozoários e produção de CH₄. Outro fator que pode ter influenciado uma maior população de protozoários nos zebuínos pode ter sido a maior concentração de amônia nesses animais, tornando o ambiente ruminal mais propício a proliferação desses microrganismos.

A amônia é formada, em parte, pela redução de nitrato. A *Echerichia coli* é capaz de reduzir nitrato à nitrito na presença de lactato, glicerol, ácido succínico ou málico, bem como outros doadores de hidrogênio (STEPHENSON; WHETHAM, 1925), e a *E. coli* e *C. welchii* reduzem nitrito à amônia, quando na presença de hidrogênio (WOODS, 1938). Provavelmente, a adição de nitrato de cálcio promoveu o aumento no organismos citados, aumentando a concentração de amônia. Porém, ao se aumentar o nível de nitrato a 2 e 3% a concentração de amônia começa a diminuir, podendo ser decorrente de um aumento no uso da amônia pela síntese microbiana.

El-Zaiat et al. (2014), ao adicionarem 4,51% de nitrato de cálcio protegido na dieta de ovinos, observaram aumento na produção de AGCC totais, argumentando que fosse uma resposta ao aumento na taxa de fermentação ruminal, sendo que houve aumento na concentração de ácidos acético, propiônico e butírico.

A concentração de amônia encontrada no presente estudo para os taurinos está próxima ao relatado por Leng (1990), de 10mg/dL, necessária para maximizar a digestibilidade ruminal, sendo que os zebuínos apresentaram valores superiores. De acordo com o NRC a concentração de amônia no rúmen para uma adequada digestibilidade ruminal é de 5mg/dL, inferior aos relatados neste estudo.

Ainda, segundo El-Zaiat et al. (2014), a conversão de nitrato à amônia compete pelo hidrogênio, não somente nas archeas, como também nas bactérias produtoras de propionato e butirato, podendo aumentar a relação acetato:propionato. No presente trabalho, a adição de nitrato não foi capaz de alterar significativamente a produção dos AGCC. Resultado que corrobora com estudo de Lee et al. (2015), que não observaram diferenças nas concentrações de AGCC ao testarem doses de 0 e 3% de nitrato de cálcio protegido na dieta de bovinos.

Segundo Farra e Satter (1971), ao se adicionar nitrato à dieta de ruminantes, é esperado que diminua a produção de butirato e aumente a de acetato, isso porque, os elétrons que seriam utilizados para a redução de Acetil-CoA a butirato são desviados para a redução de nitrato a amônia, aumentando a síntese de acetato.

No presente estudo, a proporção acetato:propionato teve efeito de desvio da quadrática com o aumento do teor de nitrato de cálcio na dieta. Isso pode ser explicado pela maior afinidade, termodinamicamente, de H_2 pela redução de nitrato do que pela produção de propionato (UNGERFELD; KOHN, 2006), isso faz com que as concentrações de NAD^+ aumentem em detrimento da remoção do hidrogênio pelo nitrato, diminuindo a produção de propionato e aumentando a de acetato (SUTHERLAND, 1977).

No atual experimento, houve aumento na concentração ruminal de acetato sem interferência nas concentrações de propionato ou butirato, o que pode ter sido em resposta aos efeitos antimicrobianos do nitrato ou nitrito sobre bactérias produtoras destes AGCC (NEWBOLD et al., 2014).

Substituindo 1,1% de ureia por 2% de nitrato de cálcio na dieta de ovinos, De Raphélis-Soissan et al. (2014) observaram redução de 19 e 15% na produção de metano em g/dia e g/kg de ingestão de matéria seca, respectivamente, com aumento na relação acetato:propionato. Neste experimento a relação entre acetato e propionato teve o mesmo comportamento que a concentração de amônia, corroborando com estudo de Sar et al. (2005).

A produção do gás metano está intimamente relacionada à população de protozoários, pois, segundo Morgavi et al. (2010), os protozoários são os grandes responsáveis em produzir H_2 , substrato utilizado pelas metanogênicas. Como visto anteriormente, a população de protozoários deste experimento não foi afetada pelo uso de nitrato, o que pode ter ocasionado a não alteração na produção de metano. Porém, o grupo de zebuínos apresentou maior número de protozoários aliado à menor taxa de desaparecimento de sólidos (kg/hora), o que pode ter favorecido as metanogênicas que, ligadas aos protozoários, utilizaram o H_2 produzido (Ushida e Jouany, 1996), aumentando a produção de CH_4 pelo grupo de zebuínos.

Outra explicação possível para que o nitrato não tenha alterado a produção de gás metano seria que a adição de nitrato na dieta serviria como fonte de N para o proliferamento de algumas espécies de metanogênicas (Belay et al., 1990).

O nível de nitrato na dieta não alterou parâmetros como excreção ou retenção de N, pela urina e fezes, com valores positivos para o balanço de N, corroborando com Guyader et al. (2015) que trabalharam com a substituição de ureia por nitrato, até o nível de 3% de nitrato na alimentação de vacas com dietas isonitrogenadas. Sampaio, Vieira e Brito (2000), suplementaram novilhos holandeses com farelo de algodão, levedura e ureia, encontrando valores médios de N retido de 0,419g/d/PM, sem diferenças entre os tratamentos. Valores similares foram encontrados por Alleoni (1988) que reportou valores médios de N retido de 0,432g/d/PM sem diferença entre as diferentes fontes protéicas testadas. No presente estudo não houve diferença entre as dietas para os valores de N retido. Porém, os valores encontrados (média de 0,125g/d/PM) foram inferiores aos reportados pelos dois autores citados.

Corroborando com o presente estudo, Guyader et al. (2015) não encontraram efeito da adição de 3% de nitrato de cálcio, na dieta de vacas holandesas, sobre a retenção ou excreção de nitrogênio.

4.5. CONCLUSÃO

O nitrato de cálcio não se mostrou eficiente em diminuir as emissões de metano no presente experimento. O fator de grupo genético se mostrou a maior fonte de interferência sobre os parâmetros avaliados, sendo que os animais zebuínos tiveram uma maior produção de CH₄, porém sem ter diferença sobre as perdas de energia relativa.

REFERÊNCIAS

- 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, p. 486-496, 2006.
- BELAY, N.; JUNG, K. Y.; RAJOGOPAL, B. S.; KREMER, J. D.; DANIELS, L. Nitrate as a sole nitrogen source for *Methanococcus thermolithotrophicus* and its effect on growth of several methanogenic bacteria. **Current Microbiology**, New York, v. 21, p. 193 – 198, 1990.
- BROWN, M.; PONCE, C.; PULIKANTI, R. Adaptation of beef cattle to high-concentrate diets: performance and ruminal metabolism. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, p. 25-33, 2006.
- CAPPER, J. L.; BAUMAN, D. E. The Role of Productivity in Improving the Environmental Sustainability of Ruminant Production Systems. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 1, p. 4698-489. 2013.
- 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, UK: Rowett Research Institute. 1992. 21 p.
- CHIZZOTTI, M.L. **Avaliação da casca de algodão para novilhos de origem leiteira e determinação da excreção de creatinina e produção de proteína microbiana em novilhas e vacas leiteiras**, 2004. 132 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.
- CLARK, J.H.; KLUSMEYER, T.H.; CAMERON, M.R. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 8, p. 2304-2323, 1992.
- CLAUSS, M.; SCHWARM, A.; ORTMANN, S.; STREICH, W. J.; HUMMEL, J. A case of non-scaling in mammalian physiology? Body size, digestive capacity, food intake, and ingesta passage in mammalian herbivores. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, Philadelphia, v. 148, n. 2, p. 249-265, 2007. doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.05.024
- DADO, R.G.; ALLEN, M.S. Nutrition, feeding, and calves: Intake limitations, feeding behavior, and rumen function of cows challenged with fill from dietary fiber or inert bulk. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p.118-133. 1995.
- DEHORITY, B.A. Classification and morphology of rumen protozoa. Wooster: Ohio Agriculture Research and Development Center, 1977. 82 p.
- DE RAPHÉLIS-SOISSAN, V.; LI, L.; GODWIN, I. R.; BARNETT, M. C.; PERDOK, H. B.; HEGARTY, R. S. Use of nitrate and *Propionibacterium acicpropionici* to reduce methane emissions and increase wool growth of Merino sheep. **Animal Production Science**, v. 54, p. 1860–1866. 2014. Doi:10.1071/ANI14329.

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

EL-ZAIAT, H. M.; ARAUJO, R. C.; SOLTAN, Y. A.; MORSY, A. S.; LOUVANDINI, H.; PIRES, A. V.; PATINO, H. O.; CORREA, P. S.; ABDALLA, A. L. Encapsulate nitrate and cashew nut shell liquid on blood and rumen constituents, methane emission, and growth performance of lambs. **Journal of Animal Science**, v. 92, p. 2214–2224, 2014. Doi:10.2527/jas2013-7084.

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, p. 1768–1771, 1961.

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

FOLDAGER, J. **Protein requirement and non-protein nitrogen for high producing cow in early lactation**. Ph.D. Thesis, East Lansing - Michigan State University, 1977.

GUAN, H.; WITTENBERG, K. M.; OMINSKI, K. H.; KRAUSE, D. O. Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, n. 7, p. 1896-1906, 2006.

GUYADER, J.; EUGÈNE, M.; MEUNIER, B.; DOREAU, M.; MORGAVI, D. P.; SILBERBERG, M.; ROCHETTE, Y.; GERARD, C.; LONCKE, C. Additive methane-mitigation effect between linseed oil and nitrate fed to cattle. **Journal of Animal Science**, Campaign, v. 93, p. 3564-3577, 2015. doi: 102527/jas2014-8196.

HARMEYER, J.; MARTENS, H. Aspects of urea metabolism with reference to the goat. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 10, p. 1707-1728, 1980.

HUNTINGTON, G.B.; ARCHIBEQUE, S.L. Practical aspects of urea and ammonia metabolism in ruminants. **Proceedings of the American Society of Animal Science**. American Society of Animal Science, 1999. p.1-11.

KAZUNARI, U. Symbiotic Methanogens and Rumen Ciliates. In HACKSTEIN, J. H. P. (Edo) symbiotic Methanogenic Archeae, Springer, 2010, p. 25-33.

KLIEVE, A.V. Microbial contribution to and amelioration of enteric methane emissions from domestic herbivores. **Australia Microbiology**, Osborne Park WA, v. 30, n. 2, p. 82–84, 2009.

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.

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

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

LENG, R. A.; PRESTON, T. R. Further considerations of the potential of nitrate as a high affinity electron acceptor to lower enteric methane production in ruminants. **Livestock Research for Rural Development**, v. 22, n. 221, 2010.

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

LI, C.; SALAS, W.; ZHANG, R.H.; KRAUTER, C.; ROTZ, A.; MITLOEHNER, F. Manure-DNDC: a biogeochemical process model for quantifying greenhouse gas and ammonia emissions from livestock manure systems. **Nutrient Cycling Agroecosystems**, v. 93, p. 163–200, 2012.

MARTIN, C.; MORGAVI, D.P.; MOREAU, D. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. **Animal**, v. 4, p. 351–365, 2010.

MORGAVI, D.P.; FORANO, E.; MARTIN, C.; NEWBOLD, C.J. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. **Animal**, Cambridge, v. 4, p. 1024-1036, 2010.

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

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

NEWBOLD, J. R.; VAN ZIJDERVELD, S. M.; HULSHOF, R. B. A.; FOKKINK, W. B.; LENG, R. A.; TERCENIO, P.; POWERS, W. J.; VAN ADRICHEM, P. S. J.; PATON, N. D.; PERDOK, H. B. The effect of incremental levels of dietary nitrate on methane emissions in Holstein steers and performance in Nelore bulls. **Journal of Animal Science**, v. 92, p. 5032–5040. 2014. Doi:10.2527/jas2014-7677.

NOCECK, J.E.; RUSSEL, J.B. Protein 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, p. 2070-2107, 1988.

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

NOLLET, L.; DEMEYER, D.; VERSTRAETE, W. Effect of 2- bromoethanesulfonic Acid and Peptostreptococcus productus ATCC 35244 Addition on Stimulation of Reductive Acetogenesis in the Ruminal Ecosystem by Selective Inhibition of Methanogenesis. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 1, p. 194-200, 1997.

OLIVEIRA, A.S.; VALADARES, R.F.D.; VALADARES FILHO, S.C.; CECON, P.R.; RENNÓ, L.N.; QUEIROZ, A.C.; CHIZZOTTI, M.L. Produção de proteína microbiana e

estimativas das excreções de derivados de purinas e de ureia em vacas lactantes alimentadas com rações isoproteicas contendo diferentes níveis de compostos nitrogenados não-proteicos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 5, p. 1621-1629. 2001.

PARK, A. F.; SHIRLEY, J. E.; TITGEMEYER, E. C.; DEFRAIN, J. M.; COCHRAN, R. C.; WICKERSHAM, E. E.; NAGARAJA, T. G.; JOHNSON, D. E. Characterization of ruminal dynamics in Holstein dairy cows during the periparturient period. **Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 95, n. 5, p. 571-582, 2011.

PRESTON, R.L.; SCHNAKENBERG, D.D.; PFANDER, W.H. Protein utilization in ruminants. I. Blood urea nitrogen as affected by protein intake. **Journal of Nutrition**, v. 68, p. 281-288, 1965.

REYNOLDS, C. K.; DURST, B.; LUPOLI, B.; HUMPHIRES, D. J.; BEEVER, D. E. Visceral tissue mass and rume volume in dairy cows during the transition from late gestation to early lactation. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 87, n. 4, p. 961-971, 2004.

RUSSELL, J.B.; O'CONNOR, J.D.; FOX, D.G; VAN SOEST, P.J; SNIFFEN, C.J. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 11, p. 3551-3561, 1992.

SAMPAIO, A. A. M.; VIEIRA, P. F.; BRITO, R. M.; Digestão Total e Parcial de Nutrientes em Bovinos Alimentados com Rações Contendo Levedura, Ureia ou Farelo de Algodão. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 2, p. 589-597, 2000.

SAR, C., B. MWENYA, B. PEN, K. TAKAURA, R. MORIKAWA, A. TSUJIMOTO, K. KUWAKI, N. ISOGAI, I. SHINZATO, Y. ASAKURA, Y. TORIDE, J. TAKAHASHI. Effect of ruminal administration of Escherichia coli wild type or a genetically modified strain with enhanced high nitrite reductase activity on methane emission and nitrate toxicity in nitrate-infused sheep. **British Journal of Nutrition**, v. 94, p. 691-697, 2005.

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

SHIBATA, M; TERADA, F. Factors affecting methane production and mitigation in ruminants. In: Review article. **Animal Science Journal**, v. 81, p. 2-10, 2010.

SILVA, J.D; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos)** 2 ed. Viçosa, M.G: Universidade Federal de Viçosa, 2002, 156 p.

STEPHENSON, M.; WHETHAM, M. D. Some Reactions of Resting Bacteria in Relation to Anaerobic Growth. **The Biochemical Journal**, London, v. 19, p. 304-317, 1925.

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

- UNGERFELD, E. M.; KOHN, R. A. The role of thermodynamics in the control of ruminal fermentation. In: SEJRSEN, T.; PLUND, H.; NIELSEN, D. M. O. (Ed). **Ruminant Physiology**: digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress. Wageningen: Wageningen Academic Published, 2006, p. 55-85.
- USHIDA, K.; JOUANY, J. Methane production associated with rumen-ciliated protozoa and its effect on protozoa activity. **Letters in Applied Microbiology Hobokrn**, v. 23, p. 129–132, 1996.
- VALADARES, R.F.D.; BRODERICK, GA.; 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 Dairy Science** v. 82, p. 2686–2696, 1999.
- VALADARES R.F.D.; GONÇALVES L.C.; SAMPAIO I.B.; VALADARES FILHO S.C. Metodologia de coleta de urina em vacas utilizando sondas de folley. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 26, p.1279-1282, 1997.
- VAN ZIJDERVELD, S.M.; GERRITS, W.J.J.; APAJALAHTI, J.A.; NEWBOLD, J.R.; DIJKSTRA, J.; LENG, R.A.; PERDOK, H.B. Nitrate and sulfate: Effective alternative hydrogen sinks for mitigation of ruminal methane production in sheep. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 5856–5866, 2010.
- VAN ZIJDERVELD, S.M.; FONKEN, B.; DIJKSTRA, J.; GERRITS, W.J.J.; PERDOK, H.B.; FOKKINK, W.; NEWBOLD, J.R. Effects of a combination of feed additives on methane production, diet digestibility, and animal performance in lactating dairy cows. **Journal Dairy Science**, v. 94, p.1445–1454, 2011.
- VERBIC, J.; CHEN, X. B.; MACLEOD, N. A.; ORSKOV, E. R. Excretion of purine derivatives by ruminants: effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. **Journal of Agricultural Science**, v. 142, p. 243–248, 1990.
- 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.
- WOODS, D. D. The reduction of nitrate to ammonia by *Clostridium welchii*. **The Biochemical Journal**, London, v. 32, p. 2000-2012, 1938.
- ZHOU ZM, YU ZT, MENG QX. Effects of nitrate on methane production, fermentation, and microbial populations in in vitro ruminal cultures. *Bioresour Technol* 103: 173-179, 2012. doi: 10.1016/j.biortech.2011.10.013

5. BIODIGESTÃO DE DEJETOS DE BOVINOS ALIMENTADOS COM NITRATO DE CÁLCIO

RESUMO: Objetivou-se avaliar o efeito de diferentes níveis de nitrato de cálcio na dieta de fêmeas bovinas (zebuínas e taurinas) sobre a produção de gases e biodigestão de seus dejetos. Foram utilizadas oito fêmeas bovinas, quatro holandesas e quatro nelores, canuladas no rúmen e com peso médio inicial de $909,0 \text{ kg} \pm 72,0$ e $387,0 \text{ kg} \pm 25,5$, respectivamente. As vacas foram alimentadas com diferentes níveis de nitrato de cálcio: **0%**: dieta sem adição de nitrato de cálcio (NC); **1%**: dieta com adição de 1% de nitrato de cálcio; **2%**: dieta com adição de 2% de nitrato de cálcio e **3%**: dieta com adição de 3% de nitrato de cálcio, utilizando um quadrado latino 4X4 replicado. Foram utilizados 32 biodigestores do tipo batelada em delineamento inteiramente casualizado com 8 tratamentos (2 grupos genéticos e 4 dietas) e 4 repetições. Cada biodigestor foi confeccionado para conter uma carga única de 2kg de substrato (água, inóculo, fezes e urina). Foram avaliados os nutrientes contidos no afluente e no biofertilizante, a eficiência de remoção dos nutrientes, a produção e curva de produção de metano (CH_4), dióxido de carbono (CO_2) e óxido nitroso (N_2O). Os afluentes provenientes dos taurinos tiveram maiores valores de FDN e FDA e menor valor de sólidos totais (ST), sendo que a adição de NC interferiu nos teores de PB, sendo que o maior valor de PB foi observado na dieta sem NC e o menor valor na dieta com 1% de NC, FDN, que aumentou à medida que se adicionou NC, e extrato etéreo (EE), que diminuiu com a inclusão de NC. Houve interação entre nutrição e genética para o teor de FDN no afluente e no biofertilizante. Os biodigestores com os dejetos dos taurinos foram mais eficientes na remoção de FDN e FDA e a adição de NC afetou negativamente a remoção de EE. Os biodigestores contendo dejetos do grupo de zebuínos foi responsável pela maior produção de biogás total (L), produção de CH_4 e CO_2 em litro por grama de fezes (L/g) e de sólidos voláteis (SV). A produção assintótica (A), tanto de CH_4 quanto de CO_2 , tiveram maiores valores para os biodigestores abastecidos com fezes de zebuínos, que também apresentaram maiores valores para tempo de inflexão (t) para CH_4 , CO_2 e N_2O , e produção no ponto de inflexão (y) de CH_4 e CO_2 . O grupo genético teve maior influência sobre a produção de biogás que o teor de nitrato de cálcio na dieta dos animais, evidenciando a diferença entre os sistemas de produção na produção de gases de efeito estufa pelo dejetos bovino.

Palavras-chave: Biodigestão anaeróbia. Biodigestor. Dióxido de carbono. Metano. Óxido nitroso.

BIODIGESTION WASTE OF CATTLE FED WITH CALCIUM NITRATE

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the effect of different levels of calcium nitrate in the diet of bovine females (zebu and taurine cattle) on the anaerobic digestion of their manure. To this end, eight bovine females, four Holsteins and four Nellores, rumen cannulated and initial average weight of $909.0 \text{ kg} \pm 72.0$ and $387.0 \text{ kg} \pm 25.5$, respectively, were used. Cows were fed different levels of calcium nitrate (CN): **0%**: diet with no added calcium nitrate; **1%**: diet with addition of 1% calcium nitrate; **2%**: diet with the addition of 2% calcium nitrate and **3%**: diet with addition of 3% calcium nitrate, all based on diet dry matter, using a replicated latin square 4x4. Thirty two batch type biodigestors were used, in completely randomized design with 8 treatments (two genetic groups and four diets) with 4 repetitions. Each batch digester was made to contain a single load of 2 kg of substrate (water, inoculum, feces and urine), with 4% of total solids. Nutrients contained in the affluent and biofertilizer, nutrient removal efficiency and production and curve production of methane (CH_4), carbon dioxide (CO_2) and nitrous oxide (N_2O) were evaluated. The affluent from Holsteins had the higher values for NDF and ADF and lower values of total solids (TS). The addition of CN had influence on CP levels, with the greatest value of CP observed for the diet without CN and the smallest value in the diet with 1% of CN, NDF, which increased with CN addition, with decreased of ether extract (EE). There was interaction between nutrition and genetics for the content of NDF in the affluent and biofertilizer. The batch digesters with the taurines manure were more efficient in the removal of NDF and ADF, with CN addition negatively affecting the removal of EE. The batch digesters with manure from zebu group was responsible for the largest total biogas production (L), CH_4 and CO_2 production per liter and in relation to the addition feces (L/g) or volatile solids (VS). Asymptotic production (A) as far as CO_2 and CH_4 , had higher values for the batch digesters supplied with feces of zebu cattle, which also showed higher values of time of inflection (t) for CH_4 , CO_2 and N_2O , and production at the inflection point (y) of CH_4 and CO_2 . The genetic group had greater influence in biogas production than the diet of animals, showing the difference between production systems on greenhouse gas production by bovine waste.

Keywords: Anaerobic biodigestion. Biodigester. Carbon dioxide. Methane. Nitrous oxide.

5.1. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional mundial e o aumento na demanda por proteína animal tem provocado intensificação dos sistemas de produção animal. Em 2015, o Brasil contou com um efetivo bovino de 215,2 milhões de cabeças, sendo 21,8 milhões de vacas ordenhadas (IBGE, 2016) e, aproximadamente, 4 milhões de cabeças terminadas em confinamento, segundo a Associação Nacional de Pecuária Intensiva (BRIGHETTI, 2017). Isso se traduz em uma alta produção de dejetos animal em áreas cada vez mais concentradas.

Segundo Chynoweth (1996), 13% do metano produzido pela produção animal é proveniente dos dejetos dos animais. Além da emissão dos gases de efeito estufa, os dejetos animais, se não bem manejados corretamente, geram problemas como odores indesejáveis, atração de insetos, atuam como fonte de patógenos, causam contaminação da água superficial e subterrânea e deterioração da estrutura do solo (STENFIELD et al., 2006).

Uma alternativa para o devido manejo dos dejetos animais é o uso de biodigestores. A matéria orgânica contida nos dejetos sofre degradação anaeróbia, tendo como resultado a produção de biogás e biofertilizante graças à ação de bactérias hidrolíticas e acetogênicas e também de arqueas metanogênicas (SOMMER et al., 2007).

A biodegradação dos dejetos libera o biogás, que é rico em gases do efeito estufa, dentre eles o metano, dióxido de carbono e óxido nitroso, sendo o metano o de maior proporção no biogás, possibilitando a queima do gás, podendo ser utilizado pelo produtor.

Outro coproduto do biodigestor é o biofertilizante, ocorrendo a concentração da matéria orgânica restante e a mineralização dos elementos presentes no efluente líquido. O biofertilizante é uma excelente fonte de minerais que, conhecendo-se suas características, pode ser de grande utilidade na fertilização do solo para o plantio de várias culturas.

Kulling et al. (2001) descreveram que a produção de biogás proveniente dos dejetos animais pode estar relacionado com a dieta à que os animais estão submetidos. Além da dieta, há outras fontes de variação sobre a degradabilidade dos dejetos, que podem ser: o sistema em que os animais são criados, idade e genética, assim com a forma de coleta desses dejetos.

A hipótese principal do trabalho é que animais provenientes de genéticas diferentes, assim como alimentados com dietas diferentes, resultam em fezes com características químicas distintas e, conseqüentemente, alteram as características do efluente e a produção de biogás nos biodigestores.

O objetivo deste trabalho foi verificar o potencial de produção e a concentração de metano, dióxido de carbono e óxido nitroso do biogás, bem como verificar a biodegradabilidade de nutrientes do efluente gerado por biodigestores abastecidos com os dejetos de bovinos de dois grupos genéticos alimentados com diferentes níveis de nitrato de cálcio.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente experimento foi aprovado pela comissão de Ética no Uso dos Animais da Universidade de São Paulo sob o protocolo CEUA nº 6652271113. O estudo foi desenvolvido no Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga, nas instalações do Estábulo Experimental e Laboratório de Nutrição Animal e Bromatologia.

Para quantificar o potencial de emissão do biogás, gás metano, dióxido de carbono e óxido nitroso, bem como avaliar a degradabilidade de nutrientes, foram coletados dejetos de oito vacas não gestantes e não lactantes, sendo quatro da raça holandesa e quatro da raça nelore, canuladas no rúmen, com peso vivo médio inicial de $909,0 \text{ kg} \pm 72$ e $387,0 \text{ kg} \pm 25,5$, respectivamente.

Os tratamentos foram diferenciados quanto aos níveis de nitrato de cálcio: **0%**: dieta sem adição de nitrato de cálcio; **1%**: dieta com adição de 1% de nitrato de cálcio; **2%**: dieta com adição de 2% de nitrato de cálcio e **3%**: dieta com adição de 3% de nitrato de cálcio, todos com base na matéria seca da dieta. Os diferentes níveis de nitrato foram preparados previamente ao experimento com a adição de ureia, calcário e caulim à medida que o nível de nitrato fosse diminuindo do 3%, mantendo assim todas as dietas isoenergéticas e isonitrogenadas e com a mesma concentração de cálcio. Esse preparado foi adicionado à dieta no momento da oferta aos animais. Os níveis dos ingredientes no preparado foram calculados de forma a sempre apresentar os valores de 15,5% de nitrogênio e 19% de cálcio.

Tabela 15 - Proporções de ingredientes e composição bromatológica das dietas experimentais, expressas em porcentagem de matéria seca.

Ingredientes (%)	Dietas			
	0%	1%	2%	3%
Silagem de milho	50,00	50,00	50,00	50,00
Milho grão moído	38,73	38,73	38,73	38,73
Farelo de soja	5,87	5,87	5,87	5,87
Sal comum	0,42	0,42	0,42	0,42
Enxofre – flor	0,19	0,19	0,19	0,19
Suplemento mineral ¹	1,79	1,79	1,79	1,79
Nitrato de cálcio	0	1,00	2,00	3,00
Ureia	1,03	0,69	0,35	0
Calcário	1,48	0,99	0,49	0
Caulim	0,49	0,32	0,16	0
Composição bromatológica ²				
Matéria seca (%)	62,45	62,45	62,45	62,45
MM (%MS)	5,51	5,51	5,51	5,51
PB (%MS)	12,80	12,80	12,80	12,80
EB (Mcal/kg)	4398,11	4398,11	4398,11	4398,11
FDN (%MS)	40,06	40,06	40,06	40,06
FDA (%MS)	24,93	24,93	24,93	24,93
Lignina (%MS)	3,70	3,70	3,70	3,70
EE (%MS)	4,38	4,38	4,38	4,38
P (%MS)	0,42	0,42	0,42	0,42
Ca (%MS)	1,88	1,88	1,88	1,88
S (ppm)	30,00	30,00	30,00	30,00

¹Suplemento mineral e vitamínico, quantidade por kg de produto: 200 g de cálcio, 60 g de fósforo, 20 g de enxofre, 20 g de magnésio, 70 g de sódio, 15 mg de cobalto, 700 mg de cobre, 700 mg de ferro, 40 mg de iodo, 1.600 mg de manganês, 19 mg de selênio, 2.500 mg de zinco, 200.000 UI de vitamina A, 50.000 UI de vitamina D3, 1.500 UI de vitamina E; ²Valores estimados de acordo com análise bromatológica dos alimentos.

Os animais foram mantidos em instalação coberta, provida de baias individuais. Os alimentos foram oferecidos duas vezes ao dia, às 08:00 e 16:00 h, na forma de ração completa. As dietas foram fornecidas *ad libitum* com garantia de sobras entre 5 a 10% do ofertado.

Para alimentação e coleta de fezes, os animais foram distribuídos em dois quadrados latinos 4X4 replicado, composto por 4 animais dentro de cada quadrado, 4 dietas e 4 períodos. A coleta de fezes foi realizada manualmente via reto, após 18 dias de adaptação dos animais às dietas, nos quatro períodos, durante 5 dias consecutivos, 2 vezes ao dia. Após coletada, as fezes foram armazenadas em sacos previamente identificados e acondicionadas em freezer a -20°C.

Foram utilizados 32 biodigestores do tipo batelada, confeccionados para conter uma carga única de 2kg de substrato (água, inóculo, fezes e urina), com um teor de

4% de ST. Cada substrato foi preparado com: 1,125kg de inóculo (proveniente de lagoa de decantação), 0,917kg de água, 0,708kg de fezes e 0,250kg de urina, sendo 2kg destinados ao abastecimento do biodigestor e 1kg destinado à análise de ST.

Os biodigestores foram compostos por três cilindros retos de PVC com diâmetros de 15, 10 e 7,5 cm, com capacidade média de 2 kg de substrato. Os cilindros de 15 e 7,5 cm foram 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 comportasse um volume de água (“selo de água”), atingindo profundidade de 60 cm. O cilindro de diâmetro intermediário possuía 40 cm de comprimento e possuía a função de gasômetro, sendo uma das extremidades vedada, conservando apenas um registro para descarga do biogás. O gasômetro ficava emborcado no selo de água para propiciar condições anaeróbias e armazenar o gás produzido, conforme ilustrado na Figura 2.

Figura 2 - Planta baixa e vista lateral dos biodigestores bateladas.

Figura 3 - Abastecimento dos biodigestores e amostragem dos substratos.

Após abastecidos (Figura 3), os biodigestores foram acondicionados em uma câmara climática com temperatura controlada entre 30 a 38°C, onde ficaram por todo o período de avaliação que durou 137 dias.

A temperatura ambiente foi monitorada por meio de termômetro digital (em °C), antes de cada leitura do biogás. Para aferição da temperatura do biogás, após a leitura do deslocamento vertical do gasômetro, colocava-se o termômetro dentro da saída de gás do registro. Em seguida, aguardava-se um período para estabilização da temperatura, o que ocorria em média de 60 segundos, procedendo-se então a tomada da temperatura do biogás.

5.2.1. Quantificação da produção e amostragem do biogás

A leitura do volume de biogás foi realizada com auxílio de uma régua de fita fixada no corpo do gasômetro, conforme ocorre o deslocamento vertical do gasômetro devido ao acúmulo de gás no seu interior. O monitoramento da altura, em cm, do gasômetro foi realizado diariamente, sendo que a coleta de amostra do biogás ocorria quando essa altura era superior à 15 cm e inferior à 30 cm (Figura 4).

O valor obtido na leitura foi multiplicado pela área de seção transversal interna dos gasômetros. A correção do volume de biogás para as condições de 1 atm de pressão em 20°C foi realizada segundo Caetano (1985), onde, pelo fator de

compressibilidade (Z), 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, onde:

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

No qual:

V_0 = volume de biogás corrigido, m³;

P_0 = pressão corrigida do biogás, 10.322,72 mm de H₂O;

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, 10.308,11 mm de H₂O;

T_1 = temperatura do biogás, em K, no instante da leitura.

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

$$V_0 = \left(\frac{V_1}{T_1} \right) \times 292,73509$$

Figura 4 - Aferição do deslocamento vertical do gasômetro.

No momento da coleta do biogás (Figura 5), uma seringa de 60 mL era utilizada para aspirá-lo e, em seguida, liberá-lo de volta para o gasômetro, repetindo 3 vezes antes de cada coleta. Esse procedimento visava homogeneizar o gás dentro do gasômetro.

A amostragem do biogás era realizada após leitura do deslocamento do gasômetro. O biogás foi coletado do gasômetro com o auxílio de uma válvula de 3 vias e seringa de 60 mL. A amostra de biogás da seringa foi injetada em um frasco de vidro de 50 mL, previamente identificado, lacrado com tampa de borracha e por um alicate de reclave e acoplado a uma válvula de 3 vias. Com o auxílio dessa válvula, o biogás era injetado nos frascos por uma das vias e por outra via o gás era expulso, garantindo a expulsão de todo ar presente no frasco, processo denominado de “lavagem do frasco” e realizado 3 vezes em cada frasco. Após a lavagem, 50 mL de amostra do biogás era coletada do gasômetro e injetada nos frascos de vidro para avaliação de sua composição.

Realizada a leitura de produção e retirada as amostras de biogás, os gasômetros eram esvaziados, com o auxílio de um registro, até que este atingisse 0 cm do nível da água.

Figura 5 - Coleta e amostragem do biogás.

5.2.2. Composição do biogás

Os frascos de vidro com as amostras de biogás foram encaminhados para a sala de cromatografia do Laboratório de Nutrição Animal e Bromatologia da FMVZ/USP, Campus Pirassununga. Para análise de composição do biogás foi utilizado o cromatógrafo Thermo Scientific®, modelo Trace 1310 equipado com sistema de injeção (split/splitless), duas colunas de aço inoxidável de 2 metros de comprimento e 2 mm de diâmetro interno. Uma coluna era empacotada com fase estacionária Porapak Q 80/100 (Restek) e a outra era empacotada com fase Hayseep Q 80/100 (Restek), ambas as colunas eram acopladas a uma pré-coluna de aço inoxidável de 1 metro de comprimento e 2 mm de diâmetro interno. Uma das colunas possui metanador seguido do detector de ionização de chama (FID), responsável pela mensuração de CO₂ e CH₄. A outra coluna possuía o detector de captura de elétrons (ECD), responsável pela quantificação do N₂O.

A calibração do cromatógrafo foi realizada por meio de um padrão misto de gases contendo 3,11% de metano, 3,11% de dióxido de carbono e 0,49% de óxido nitroso diluído em ar atmosférico, utilizando 2 materiais de referência padrão contendo 50% de metano e 50% de dióxido de carbono (mol/mol) e outro com 10% N₂O em balanço com He (mol/mol).

As amostras de biogás foram diluídas em frascos de vidro com volume conhecido, sendo a diluição de 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 utilizados para lavagem do sistema de injeção e 2 mL utilizados para análise, sendo 1 mL para o sistema FID e 1 mL para ECD.

O número de repetições por amostra foi aquele necessário para que a diferença entre leituras fossem inferiores a 5%.

5.2.3. Quantificação da produção de metano, dióxido de carbono e óxido nitroso

Para quantificação do potencial de produção de metano, dióxido de carbono e óxido nitroso foram utilizados os dados de produção de biogás (L) e concentração (%) dos diferentes gases nesse biogás. Após leitura da produção de biogás, foi calculado

o volume de biogás produzido e retirada uma amostra desse biogás para determinação da sua composição. O volume de biogás produzido é multiplicado pela concentração dos gases nele presentes, sendo obtido o volume do gás (metano, dióxido de carbono ou óxido nítrico) de acordo com a equação:

$$\text{Vol} = \frac{\text{Vol}_{\text{BIOGÁS}} \times \% \text{ gás}}{100}$$

No qual:

Vol = Volume do gás (metano e dióxido de carbono em L e óxido nítrico em mL);

Vol_{BIOGÁS} = Volume de biogás produzido (L);

% gás = Teor de gás no biogás (%).

A produção de gás em relação aos sólidos voláteis adicionados e reduzidos foi calculada pela divisão entre a produção total do gás (metano e dióxido de carbono em L e óxido nítrico em mL) e a quantidade de sólidos voláteis adicionados ou reduzidos, em gramas.

5.2.4. Remoção de nutrientes

A quantidade de matéria seca, em gramas, no afluente e no biofertilizante foi calculada pela multiplicação entre o teor de matéria seca, em porcentagem, e o volume do afluente e do biofertilizante, em gramas.

A quantidade de cada nutriente, em gramas, no afluente e no biofertilizante foi calculada pela multiplicação entre a concentração do nutriente, em porcentagem, e quantidade de matéria do afluente e do biodigestor, em gramas. No caso do afluente, para o cálculo dos nutrientes, foram utilizados os dados referentes às fezes, urina e inóculo em suas devidas proporções de inclusão.

A eficiência de remoção dos nutrientes, em porcentagem de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Eficiência de remoção (\%)} = 100 - (\text{N}_{\text{bio}} \times 100) / \text{N}_{\text{af}}$$

Sendo:

N_{bio}: nutriente no biofertilizante, em g;

N_{af}: nutriente no afluente, em g.

5.2.5. Características do biofertilizante

Para determinação das características e qualidade do biofertilizante foram realizadas amostragens do substrato que abasteceu os biodigestores (afluente) e do resíduo resultante (biofertilizante).

Para determinação de sólidos totais (ST), as amostras dos afluentes e efluentes foram acondicionadas em duplicata em recipientes de alumínio, previamente tarados e pesados para obtenção do peso úmido (PU) do material, levados à estufa com circulação forçada de ar, à temperatura de 65°C, até atingirem peso constante, sendo a seguir resfriadas em dessecador e novamente pesadas em balança com precisão de 0,01g, obtendo-se então o peso seco (PS). O teor de sólidos totais foi determinado de acordo com a equação descrita por Apha (2012).

$$ST = 100 - U$$

Onde U é representado por:

$$U = \frac{PU - PS}{PU} \times 100$$

No qual:

ST = teor de ST, em porcentagem;

U = teor de umidade, em porcentagem;

PU = peso úmido da amostra, em g;

PS = peso seco da amostra, em g.

Para a determinação dos sólidos voláteis (SV), o material já seco em estufa, resultante da determinação dos sólidos totais, foi levado à mufla, em cadinhos de porcelana previamente tarados, e mantidos a uma temperatura de 575°C por um período de 2 horas. Após a queima inicial, os cadinhos foram esfriados em dessecadores, o material resultante pesado em balança analítica com precisão de 0,0001g, obtendo-se o peso das cinzas ou matéria mineral. Os teores de sólidos voláteis foram determinados de acordo com a metodologia descrita por Apha (2012).

$$SV = ST - \text{cinzas}$$

O teor de cinzas foi determinado por:

$$\text{Cinzas} = \left\{ 1 - \left[\frac{PS - PM}{PU} \right] \right\} \times 100$$

No qual:

SV = teor de SV, em porcentagem;

PMS = peso da amostra após determinação da matéria seca, em g;

PM= peso obtido após queima em mufla, em g.

A partir das amostras do afluente e do efluente foram verificados os teores de matéria seca (MS), determinados pela secagem em estufa com ventilação e renovação de ar constante a 60°C durante 48 horas, segundo AOAC (1995). Após secas, as amostras foram moídas em moinho willye, tipo facas, em peneiras de 1 mm e armazenadas em potes de vidro, sendo a partir daí realizado a composição bromatológica.

A matéria mineral (MM) foi obtida pela calcinação em forno mufla a 600°C durante 3 horas, segundo AOAC (1995). Pela diferença entre o valor da MS e da MM, estimou-se o teor de matéria orgânica (MO) da amostra (CAMPOS; NUSSIO; NUSSIO, 2004). A determinação de proteína bruta (PB) foi feita pela decomposição das proteínas e outros componentes nitrogenados na presença de H₂SO₄ concentrado a quente, segundo o modelo Micro-Kjeldhal (AOAC, 1995), sendo a conversão da proteína bruta utilizando o fator de correção 6,25. O teor de extrato etéreo (EE) foi determinado por extração em éter, no aparelho Soxhlet, seguido de evaporação desse solvente de acordo com AOAC (1995).

Os teores de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina foram determinados pelo método do Filter Bag Technique da Ankom® (FBT), utilizando-se 0,5 g de amostra, as quais foram acondicionadas dentro de um bag (filtro F57), sendo este posteriormente lacrado a quente com utilização de seladora. Os bags lacrados com as amostras foram acondicionados com o detergente neutro ou com o detergente ácido, obtidos pelo método convencional de Van Soest, Robertson e Lewis (1991), e alocados no determinador de fibra. Os bags ficaram no determinador de fibras, em fervura, durante 60 minutos e após este tempo fez-se quatro lavagens com água destilada em fervura por 10 minutos cada e, em seguida, os bags foram retirados do determinador de fibra e lavados com acetona para serem alocados na estufa a 105°C por 4 horas, para posterior obtenção do resíduo (FDN, FDA, respectivamente).

5.2.6. Curva de produção acumulada de gases

A curva de produção de gases foi estimada a partir da produção de metano, dióxido de carbono, ambos em L, e óxido nitroso, em mL, utilizando modelo de Gompertz analisado pelo método Gauss-Newton do SAS, de acordo com Kurnianto, Shinjo e Suga (1997).

O modelo de Gompertz foi formulado da seguinte forma:

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

Onde:

y: produção do gás no ponto de inflexão (CH₄ e CO₂, L/g e N₂O, mL/g);

A: Assíntota;

B: Constante de integração, parâmetro de escala de tempo sem significado biológico específico;

k: constante de produção (CH₄ e CO₂ em L/g.dia e N₂O em mL/g.dia);

t: tempo no ponto de inflexão (dia).

5.2.7. Análise estatística

Foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado com 32 parcelas experimentais, sendo 8 tratamentos (2 grupos genéticos e 4 níveis de nitrato de cálcio na dieta) e 4 repetições.

Os dados foram analisados com o pacote STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM (SAS Inst. Inc., Cary, NC). Antes das análises propriamente ditas, os dados foram analisados em relação à presença de informações discrepantes (“outliers”) e normalidade dos resíduos (Shapiro-Wilk). Quando a premissa de normalidade não foi atendida, a transformação logarítmica ou pela raiz quadrada foi necessária.

O modelo estatístico incluiu efeito de níveis de nitrato de cálcio e grupo genético como fatores fixos. Os resultados foram comparados pelo PROC MIXED do SAS.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Eficiência de remoção de nutrientes

Os biodigestores nos quais foram utilizadas fezes de animais taurinos apresentaram maiores valores de FDN (44,73 vs. 542,14g) e menor valor de EE (1,76 vs. 2,20g), ST (76,89 vs. 85,55g) e SV (64,16 vs. 70,97g) no afluente. O aumento na inclusão de nitrato de cálcio aumentou o FDN (%), diminuiu o EE (%) e teve efeito quadrático sobre a PB (%) do afluente (Tabela 16).

A eficiência de remoção de FDN e FDA foi maior nos biodigestores abastecidos com os dejetos das vacas taurinas (64,54 vs. 58,52% e 60,55 vs. 53,03%, respectivamente). Com o aumento do nível de nitrato, a eficiência de remoção de EE (%) diminuiu.

Tabela 16 – Nutrientes no afluente, biofertilizante e eficiência de remoção em biodigestores abastecidos com fezes de dois grupos genéticos de bovinos alimentados com diferentes níveis de nitrato de cálcio.

Variáveis	Genética		Nitrato				EPM	Probabilidade		
	Tauri	Zebu	0%	1%	2%	3%		Gen	Nitrato	N*G
Nutrientes do afluente										
N, g	3,20	3,15	3,38	2,92	3,23	3,17	0,092	NS	NS	NS
FDN, g	44,73	42,14	41,98	41,31	45,44	45,00	0,626	0,0182	0,0083 ^L	NS
FDA, g	30,94	30,20	29,93	29,17	31,68	31,48	0,596	NS	NS	NS
EE, g	1,76	2,20	2,21	2,32	1,71	1,68	0,092	0,0036	0,0448 ^Q	NS
ST, g	76,89	85,55	80,47	82,47	81,16	80,79	1,102	<,0001	NS	NS
SV, g	64,16	70,97	67,20	68,72	67,25	67,07	0,930	<,0001	NS	NS
Nutrientes no biofertilizante										
N, g	1,11	1,15	1,11	1,14	1,20	1,06	0,050	NS	NS	NS
FDN, g	15,79	16,42	15,56	16,91	16,91	15,05	0,691	NS	NS	NS
FDA, g	12,12	13,15	11,80	12,95	14,58	11,22	0,604	NS	NS	NS
EE, g	0,56	0,63	0,61	0,60	0,58	0,57	0,037	NS	NS	NS
ST, g	46,37	51,88	46,42	48,88	50,38	50,83	1,281	0,0367	NS	NS
SV, g	35,92	39,58	35,51	37,72	38,39	39,39	1,009	NS	NS	NS
Eficiência de remoção										
PB, %	64,11	62,34	67,06	63,73	61,75	60,36	1,363	NS	NS	NS
FDN, %	64,54	58,52	62,75	58,81	62,72	61,85	1,164	0,0112	NS	NS
FDA, %	60,55	53,03	59,92	54,74	53,36	59,15	1,854	0,0439	NS	NS
EE, %	66,12	67,61	70,86	73,54	65,08	57,98	2,346	NS	0,0329 ^L	NS
ST, %	48,20	47,50	50,63	49,20	46,18	45,39	1,477	NS	NS	NS
SV, %	43,75	44,10	46,90	45,13	42,96	40,23	1,498	NS	NS	NS

Tauri: Taurino; Zebu: Zebuino; EPM: Erro Padrão da Média; Gen: Genética; Nitrato: Nível de nitrato de cálcio; G*N: interação entre genética e nível de nitrato; NS: Não significativo; N: Concentração de N; FDN: Concentração de FDN; FDA: Concentração de FDA; EE: concentração de EE; ST: Concentração de sólidos totais; SV: concentração de sólidos voláteis.

Figura 6 – Efeito da interação entre nível de nitrato de cálcio e genética na porcentagem de FDN no afluente.

Figura 7 – Efeito da interação entre nível de nitrato de cálcio e genética na porcentagem de FDN no biofertilizante.

5.3.2. Produção de gases

Os biodigestores com fezes dos animais zebuínos apresentaram maior produção de biogás total (20,70 vs. 16,29L), CH₄ (14,54 vs. 11,48L) e CO₂ (4,11 vs. 3,24L), maior produção de CH₄ (0,0205 vs. 0,0163L/g) e CO₂ (0,0058 vs. 0,0046L/g) em relação às fezes adicionadas e aos sólidos voláteis adicionados (0,2059 vs. 0,1790L/g e 0,0582 vs. 0,0505L/g, respectivamente).

A assíntota (A), tanto de CH₄ quanto de CO₂, tiveram maiores valores para os biodigestores abastecidos com fezes de zebuínos (0,205 vs. 0,165L e 0,058 vs. 0,051L, respectivamente).

Os biodigestores com dejetos de zebuínos necessitaram de mais dias para a inflexão (t) da curva de produção de CH₄ (40,09 vs. 36,20d), de CO₂ (40,28 vs. 34,91d) e de N₂O (40,02 vs. 34,90d) bem como produção no ponto de inflexão (y) de CH₄ (0,075 vs. 0,055L/d) e CO₂ (0,021 vs. 0,019L/d).

Tabela 17 – Produção de biogás, metano, dióxido de carbono e óxido nitroso em biodigestores tipo batelada abastecidos com fezes de dois grupos genéticos de bovinos alimentados com diferentes níveis de nitrato de cálcio.

Variável	Genética		Nitrato				EPM	Probabilidade		
	Taurino	Zebuino	0%	1%	2%	3%		Genética	Nitrato	G*N
Biogás	16,29	20,70	19,68	17,99	18,23	18,07	0,558	<,0001	NS	NS
CH ₄ , L	11,48	14,54	13,75	12,69	12,84	12,77	0,378	<,0001	NS	NS
CH ₄ , %	70,63	70,30	69,96	70,78	70,45	70,67	0,326	NS	NS	NS
CH ₄ /fezes	0,0163	0,0205	0,0194	0,0179	0,0182	0,0180	0,001	<,0001	NS	NS
CH ₄ /SV ad	0,179	0,206	0,204	0,185	0,190	0,191	0,005	0,0065	NS	NS
³ A	0,165	0,205	0,192	0,183	0,171	0,195	0,008	0,0246	NS	NS
⁴ k	0,035	0,043	0,043	0,035	0,032	0,046	0,002	NS	NS	NS
⁵ t	36,20	40,09	37,37	38,66	39,51	37,03	0,767	0,0108	NS	NS
⁶ y	0,055	0,075	0,070	0,056	0,063	0,072	0,004	0,0096	NS	NS
CH ₄ /SV red	0,439	0,487	0,439	0,446	0,451	0,513	0,029	NS	NS	NS
CO ₂ , L	3,24	4,11	4,03	3,66	3,48	3,56	0,131	0,0006	NS	NS
CO ₂ , %	19,82	19,80	20,50	20,17	18,95	19,61	0,240	NS	NS	NS
CO ₂ /fezes	0,0046	0,0058	0,0057	0,0051	0,0049	0,0050	0,000	0,0006	NS	NS
CO ₂ /SV ad	0,051	0,058	0,060	0,053	0,051	0,053	0,002	0,0288	NS	NS
³ A	0,051	0,058	0,060	0,053	0,053	0,052	0,002	0,0462	NS	NS
⁴ k	0,045	0,043	0,044	0,041	0,043	0,046	0,001	NS	NS	NS
⁵ t	34,91	40,28	37,76	39,06	37,10	36,47	0,774	0,0002	NS	NS
⁶ y	0,019	0,021	0,022	0,020	0,020	0,019	0,001	0,0462	NS	NS
CO ₂ /SV red	0,123	0,137	0,129	0,128	0,122	0,142	0,009	NS	NS	NS
N ₂ O, mL	4,49	5,56	4,49	6,42	4,76	4,32	0,542	NS	NS	NS
N ₂ O, %	0,027	0,026	0,023	0,035	0,025	0,023	0,003	NS	NS	NS
N ₂ O /fezes	0,0063	0,0078	0,0065	0,0091	0,0067	0,0061	0,001	NS	NS	NS
N ₂ O /SV ad	0,069	0,080	0,068	0,096	0,070	0,065	0,008	NS	NS	NS
³ A	0,063	0,060	0,057	0,069	0,057	0,064	0,005	NS	NS	NS
⁴ k	0,045	0,043	0,044	0,041	0,044	0,046	0,001	NS	NS	NS
⁵ t	34,90	40,02	37,75	39,06	36,56	36,47	0,787	0,0004	NS	NS
⁶ y	0,023	0,022	0,021	0,025	0,021	0,023	0,002	NS	NS	NS
N ₂ O/SV red	0,160	0,186	0,149	0,221	0,164	0,158	0,020	NS	NS	NS

Tauri: Taurino; Zebu: Zebuino; EPM: Erro Padrão da Média; Gen: Genética; Nitrato: Nível de nitrato de cálcio; G*N: interação entre genética e nível de nitrato; NS: Não significativo; CH₄/fezes: produção de metano em relação ao peso da matéria original das fezes adicionadas (L/g); CH₄/SV ad: produção de metano em relação aos sólidos voláteis adicionados (L/g); CH₄/SV red: produção de metano em relação aos sólidos voláteis reduzidos (L/g); CO₂/fezes: produção de dióxido de carbono em relação ao peso da matéria original das fezes adicionadas (L/g); CO₂/SV ad: produção de dióxido de carbono em relação aos sólidos voláteis adicionados (L/g); CO₂/SV red: produção de dióxido de carbono em relação aos sólidos voláteis reduzidos (L/g); N₂O/fezes: produção de óxido nitroso em relação ao peso da matéria original das fezes adicionadas (mL/g); N₂O /SV ad: produção de óxido nitroso em relação aos sólidos voláteis adicionados (mL/g); N₂O /SV red: produção de óxido nitroso em relação aos sólidos voláteis reduzidos (mL/g); ³A: Assintota; ⁴k: constante de produção (mL/g.dia); ⁵t: tempo no ponto de inflexão (dia); ⁶y: produção no ponto de inflexão (mL/g).

Figura 8 – Curva para a produção acumulada de gás metano em biodigestores abastecidos com dejetos de animais de dois grupos genéticos.

Figura 9 – Curva para a produção acumulada de gás metano em biodigestores abastecidos com dejetos de animais alimentados com diferentes doses de nitrato de cálcio.

Figura 10 – Curva para a produção acumulada de dióxido de carbono em biodigestores abastecidos com dejetos de animais de dois grupos genéticos.

Figura 11 – Curva para a produção acumulada de dióxido de carbono em biodigestores abastecidos com dejetos de animais alimentados com diferentes doses de nitrato de cálcio.

Figura 12 – Curva para a produção acumulada de óxido nitroso em biodigestores abastecidos com dejetos de animais de dois grupos genéticos.

Figura 13 – Curva para a produção acumulada de óxido nitroso em biodigestores abastecidos com dejetos de animais alimentados com diferentes doses de nitrato de cálcio.

5.4. DISCUSSÃO

Jarret, Martinez e Dourmad (2011) observaram que as dietas dos bovinos afetam a composição do substrato utilizado para abastecer o biodigestor, o que corrobora com esse estudo, pois a adição de nitrato de cálcio na dieta afetou diretamente o teor de PB, FDN e EE no afluente.

As concentrações de FDN e FDA no afluente foram maiores para os dejetos provenientes dos taurinos, reflexo da maior excreção destes componentes pelos animais taurinos. De acordo com Amorim (2005), a degradação dos sólidos está associada com os teores de FDA e, principalmente, lignina no substrato, sendo que maiores quantidades destas frações comprometem a degradação dos substratos. Mesmo com diferenças nos teores de FDA entre os grupos genéticos, a degradabilidade dos sólidos não apresentou diferença significativa demonstrando que, provavelmente, a diferença entre os teores de lignina não tenham sido suficientes para afetar a redução dos sólidos.

A redução dos SV são usualmente utilizados para avaliar o desempenho do processo de biodigestão anaeróbia e da atividade metabólica microbiana. Segundo Rimkus et al. (1982), um valor aceitável para a redução de SV em biodigestores em escala industrial seria de 40%. Davidsson et al. (2008) relataram valores entre 30 e 45% para redução de SV em biodigestores alimentados com dejetos bovinos. Ainda, Orrico Junior, Orrico e Lucas Junior (2010) encontraram valores médios de 44,05%, na remoção de SV, testando biodigestores abastecidos com dejetos bovinos alimentados com dietas com relações 60:40 e 40:60 concentrado:volumoso. No presente estudo foram encontrados valores de 43,75 e 44,10% de remoção de SV, para taurinos e zebuínos, respectivamente, corroborando com os autores citados.

Segundo Soussana, Tallec e Blanfort (2010), quanto maior a proporção de metano no biogás, maior seu rendimento de energia para uso como combustível. No presente estudo a concentração média de metano no biogás foi de 70,46% de metano, valor próximo aos encontrados por Orrico, Lucas Junior e Orrico Junior (2007), que reportaram valor de 66,55% de metano no biogás de biodigestores tipo batelada, e Miranda (2005), que reportou valor de 65,73% de metano em biodigestores de bancada. Sendo que Silva (1998) descreve que o valor de metano no biogás, em biodigestores tipo batelada, varia de 60 a 70%.

Apesar de não ter havido diferença entre as concentrações de metano no biogás, os biodigestores abastecidos com dejetos de zebuínos apresentaram maior produção total de biogás em L, demonstrando sua maior eficiência para produção de combustível, em volume. A produção de CO_2 apresentou características semelhantes à de CH_4 , tendo maior volume nos digestores de zebuínos, sem mudar sua concentração entre os tratamentos, sendo que não houve diferença significativa para a produção de N_2O . Durante o experimento de fermentação ruminal, os animais zebuínos apresentaram maior excreção de N que pode ter servido como substrato para proliferação de metanogênicas aumentando a produção de biogás.

O potencial de produção de gases em termos de sólidos voláteis reduzidos corresponde ao potencial teórico de rendimento de gás (IPCC, 2006), indicando a completa degradação de toda a fração orgânica das fezes. A produção em termos de sólidos voláteis adicionados é referente ao rendimento verdadeiro do gás (IPCC, 2006). No presente trabalho, a produção dos três gases (metano, dióxido de carbono e óxido nitroso) em relação aos sólidos voláteis adicionados foram menores que em relação aos sólidos voláteis reduzidos, o que está de acordo com Franco et al. (2007), qual informa que o rendimento verdadeiro é sempre menor que o rendimento teórico devido uma fração do substrato ser usada para sintetizar massa bacteriana.

A produção de CH_4 em relação ao SV reduzido no atual experimento foi de 0,44L/g para os animais holandeses e 0,49L/g para os zebuínos, resultados próximos aos 0,46L/g reportados por Angelidaki et al. (2000) e 0,4L/g reportado por Moller, Sommer e Ahring (2004).

Produções de CH_4 por grama de SV adicionado tem sido reportados com uma variação de 0,07 a 0,28L/g (GOPALAN; JENSEN; BATSTONE, 2013), sendo que Pratt, Redding e Hill et al. (2016) reportaram resultados de 0,13 a 0,16L/g, resultados que corroboram com os encontrados no presente experimento que foi de 0,19L/g de média.

O ponto de inflexão se caracteriza pela maior velocidade de produção de biogás num determinado instante, sendo seguido pela diminuição da produção (QUEIROZ, 2001). No caso de presente experimento, o ponto de inflexão sofreu influência de grupo genético, com os dejetos taurinos apresentando valores próximos a 35 dias e os zebuínos valores próximos aos 40 dias, para os três gases avaliados. Sendo que, a produção de CH_4 e CO_2 no ponto de inflexão foi maior para os biodigestores abastecidos com dejetos de zebuínos. As fezes provenientes dos zebuínos também

apresentaram maiores valores no ponto de assíntota, tanto para produção de CH₄ como de CO₂, demonstrando maior capacidade de produção em relação aos dejetos dos taurinos.

Apesar de a dieta ter afetado o substrato utilizado no atual estudo, ela não influenciou a produção de gás, o que corrobora com estudo de Mathot et al. (2012), quais notaram que diferentes dietas não afetaram o desempenho de biodigestores.

O efeito genético se mostrou mais importante na produção do biogás que a dieta fornecida aos animais no presente experimento. Isso pode ser em consequência na diferença de microrganismos presentes nas fezes ou pela composição da urina, que também foi utilizada para a confecção dos biodigestores.

6.5. CONCLUSÕES

A inclusão de diferentes níveis de nitrato de cálcio alterou apenas a composição do afluyente, não tendo qualquer influência sobre a composição do biofertilizante nem sobre a produção de biogás.

O fator genético não foi importante para a composição do biofertilizante, porém se mostrou importante fator para a produção de biogás, demonstrando que a seleção de animais de determinada genética pode interferir no aproveitamento dos dejetos animais.

REFERÊNCIAS

- 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.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS- AOAC. **Official methods of analyses**. 16th ed. Virginia, USA: AOAC, 1995.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION- APHA. **Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater**, 22nd ed. Washington DC, 2012.
- BIGHETTI, H. Número de bovinos confinados no Brasil deve voltar a crescer em 2007, diz Assocon. 2017. Disponível em : <http://www.canalrural.com.br/noticias/pecuaria/numero-bovinos-confinados-brasil-deve-voltar-crescer-2017-diz-assocon-65559>. Acesso em: 15 jul. 2017.
- CAETANO, L. **Proposição de um sistema modificado para quantificação de biogás**. 1985. 75f. Dissertação (Mestrado em Energia na Agricultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1985.
- CAMPOS, F. P.; NUSSIO, C. M. B.; NUSSIO, L. G. Métodos de análise de alimentos. FEALQ, 2004. 135 p.
- CHYNOWETH, D. P. Enviromental impact of biomethanogenesis. **Enviromental Monitoring and Assessment**, v. 42, p. 3–18, 1996.
- DAVIDSSON, A.; LOVSTEDT, C.; IA COUR JANSEN, J.; GRUVBERGER, C.; ASPEGREN, H. Co-digestion of grease trap sludge and sewage sludge. **Waste Management**, Kidlington, v. 28, n. 6, p. 986-992, 2008.
- FRANCO, A.; MOSQUERA-CORRAL, A.; CAMPOS, J. L.; ROCA, E. **Learning to operate anaerobic bioreactors**. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, p.618-627, 2007.
- GOPALAN, P.; JENSEN, P. D.; BATSTONE, D. J. Biochemical methane potential of beef feedlot manure: impact of manure age and storage. **Journal Environmental Quality**, v. 42, p. 205–1212, 2013.
- IBGE. Comunicação Social 2016. PPM: Rebanho bovino alcança a marca recorde de 215,2 milhões de cabeças, mas produção de leite cai 0,4%. Disponível em: < <http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias.html?view=noticia&id=1&idnoticia=3268&busca=1&t=ppm-rebanho-bovino-alcanca-marca-recorde-215-2-milhoes-cabecas-producao-leite>>. Acesso em: 16 jul 2017.
- IPCC. “Emissions from Livestock and Manure Management. IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories”. Volume 4. Agriculture, Forestry and Land Use. Kanagawa, Japan, 2006.
- JARRET, G.; MARTINEZ, J.; DOURMAD, J. Y. Effect of biofuel co-products in pig diets on the excretory patterns of N and C and on the subsequent ammonia and methane emissions from pig effluent. **Animal**, v. 5, n. 4, p. 622-631, 2011.

KULLING, D. R.; MENZI, H.; KRÖBER, T. F.; NEFTEL, A.; SUTTER, F.; LISCHER, P.; KREUZER, M. 'Emissions of ammonia, nitrous oxide and methane from different types of dairy manure during storage as affected by dietary protein content'. **Journal of Agricultural Science**. Cambridge, v. 137, n. 5, p. 235–250, 2001.

KURNIANTO, E.; SHINJO, A.; SUGA, D. Comparison of three growth curve models for describing the growth patterns in wild and laboratory mice. **Journal of Veterinary Epidemiology**, v. 1, n. 2, p. 49–55, 1997.

MATHOT, K. J.; WRIGHT, J.; KEMPENAEERS, B.; DINGEMANSE, N. J. Adaptive strategies for managing uncertainty may explain personality-related differences in behavioural plasticity. **OIKOS**, v. 121, p. 1009–1020, 2012. doi: 10.1111/j.1600-0706.2012.20339.x.

MIRANDA, A. P. **Influência da temperatura e do tempo de retenção hidráulica em biodigestores alimentados com dejetos de bovinos e suínos**. 2005. 113 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

MOLLER, 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.

ORRICO, A. C. A.; LUCAS JÚNIOR, J.; ORRICO JUNIOR, M. A. P. Caracterização e biodigestão anaeróbia dos dejetos de caprinos. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 639-647, 2007.

ORRICO JUNIOR, M. A. P.; ORRICO, A. C. A.; LUCAS JUNIOR, J. Influência da relação volumoso: concentrado e do tempo de retenção hidráulica sob a biodigestão anaeróbia de dejetos de bovinos. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 30, n. 3, p. 386-394, 2010.

PRATT, C.; REDDING, M. R.; HIL, J. A promising and simple method to quantify soil/manure mixing on beef feedlot pens. **Animal Production Science**, v. 56, p. 1361-1366, 2016.

QUEIROZ, S. C. **The gompertz function applied to modeling biogas production in batch biodigestor**., 2001. 64 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

RIMKUS, R. R. et al. Full-scale thermophilic digestion at the West-Southwest Sewage Treatment Works, Chicago, Illinois. **Water Pollution Control Federation**, Alexandria, v. 54, n. 11, p. 1447-1457, 1982.

SILVA, F. M. Utilização do biogás como combustível. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 27., 1998, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA/SBEA, 1998. p. 96-125.

SOMMER, S.G.; PETERSEN, S.O.; SORENSEN, P.; POULSEN, H.D.; MOLLER, H.B. Methane and carbon dioxide emissions and nitrogen turnover during liquid manure storage. **Nutrient Cycling Agroecosystems**, v. 36, p. 78-27, 2007.

SOUSSANA, J. F.; TALLEC, T.; BLANFORT, V. Mitigation the greenhouse gas balance of ruminant production systems through carbon sequestration in grasslands. **Animal**, Cambridge, v. 4, p. 334-350, 2010.

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