**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Desempenho, características de carcaça, produção de metano e
metabolismo ruminal em ovinos alimentados com dietas contendo nitrato
de cálcio**

Ana Paula Alves Freire

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e
Pastagens

**Piracicaba
2015**

Ana Paula Alves Freire
Zootecnista

**Desempenho, características de carcaça, produção de metano e
metabolismo ruminal em ovinos alimentados com dietas contendo nitrato
de cálcio**

Versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Profa. Dra. **IVANETE SUSIN**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e
Pastagens

Piracicaba
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Freire, Ana Paula Alves

Desempenho, características de carcaça, produção de metano e metabolismo ruminal em ovinos alimentados com dietas contendo nitrato de cálcio / Ana Paula Alves Freire. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015. 113 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Ácidos graxos de cadeia curta 2. Consumo 3. Confinamento 4. Digestibilidade
5. Metano I. Título

CDD 636.3085
F866d

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

A Deus e a minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradecer a Deus.

Aos meus pais e meus irmãos pelo apoio e ensinamentos.

Ao Kayami e sua família pelo companheirismo.

A Escola Superior de Agricultura” Luiz de Queiroz”.

A CAPES e ao CNPq pela bolsa concedida.

A Prof^a Dr^a Ivanete Susin pela orientação durante o curso de doutorado.

Aos Professores do Programa Ciência Animal e Pastagens.

Aos funcionários do SIPOC: Sr. Marcos, Sr. Roberto, Joseval, Adilson e Dona Ilda.

Aos amigos do grupo SIPOC pela ajuda nos trabalhos desenvolvidos: Fernanda, Rodrigo, Daniel, Renato, Maria Izabel, Luiz Guilherme, Manon, Djoy, Diego, Juliana, Carolina, Sérgio, Paula, Isabela, Gustavo, José Alípio e Elizângela.

Aos técnicos de laboratório César e Alan.

A GRASP, pela parceria no fornecimento do nitrato.

Ao Dr. Rafael Canonenco de Araujo, pela parceria e contribuição do desenvolvimento da pesquisa.

Ao CENA, pela estrutura utilizada na medição da produção de metano.

Ao Prof. Dr. Adibe Abdala.

A Andressa Natel e Lília Raquel pela ajuda durante as medições da produção de metano.

Aos funcionários do CENA: Regina e Lécio.

EPIGRAFE

**"Não basta saber,
é preciso também aplicar;
não basta querer,
é preciso também agir."**

Goethe

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
LISTA DE FIGURAS	17
LISTA DE TABELAS	19
1 INTRODUÇÃO.....	22
Referências	22
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 Emissões de metano	24
2.2 Fermentação ruminal e microrganismos metanogênicos.....	25
2.3 Estratégias alimentares para redução da produção de metano	27
2.4 Nitrogênio não proteico na alimentação de ruminantes	31
2.5 Nitrato na alimentação de ruminantes	33
Referências	36
3 DESEMPENHO, PRODUÇÃO DE METANO E CARACTERÍSTICAS DE CARCAÇA DE OVINOS ALIMENTADOS COM NITRATO DE CÁLCIO	42
Resumo.....	42
Abstract.....	42
3.1 Introdução	43
3.2 Material e Métodos	44
3.2.1 Animais e instalações	44
3.2.2 Delineamento experimental e dietas.....	45
3.2.3 Amostragem e análise dos alimentos	47
3.2.4 Desempenho	47
3.2.5 Produção de metano.....	47
3.2.6 Características da carcaça e da carne.....	48
3.2.7 Análise estatística	50
3.3 Resultados e discussão	51
3.3.1 Desempenho	51
3.3.2 Produção de metano.....	54
3.3.3 Características de carcaça e carne	56
3.4 Conclusão	59

Referências.....	59
4 DIGESTIBILIDADE DOS NUTRIENTES, BALANÇO DE NITROGÊNIO E CONSTITUINTES RUMINAIS EM OVINOS ALIMENTADOS COM NITRATO DE CÁLCIO ENCAPSULADO.....	61
Resumo.....	64
Abstract.....	64
4.1 Introdução	65
4.2 Material e métodos.....	66
4.2.1 Instalações e animais.....	66
4.2.2 Delineamento experimental e dietas	66
4.2.3 Consumo e digestibilidade dos nutrientes.....	68
4.2.4 Consumo de água	69
4.2.5 Balanço de nitrogênio	69
4.2.6 Constituintes ruminais.....	70
4.2.7 Análise estatística.....	71
4.3 Resultados e discussão	71
4.4 Conclusão.....	81
Referências.....	81
5 DESEMPENHO, CARACTERÍSTICAS DE CARCAÇA, CONSUMO E DIGESTIBILIDADE DOS NUTRIENTES, CONSTITUINTES RUMINAIS E BALANÇO DE NITROGÊNIO DE OVINOS ALIMENTADOS COM DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO	86
Resumo.....	86
Abstract.....	86
5.1 Introdução	87
5.2 Material e Métodos	88
5.2.1 Dietas experimentais	88
5.2.2 Experimento 3. Determinação do desempenho e características de carcaça	90
5.2.2.1 Animais e instalações.....	90
5.2.2.2 Delineamento experimental	87
5.2.2.3 Desempenho.....	91
5.2.2.4 Abate dos animais e características das carcaças.....	92

5.2.3 Experimento 4. Determinação do consumo e digestibilidade dos nutrientes, constituintes ruminais e balanço de nitrogênio.....	93
5.2.3.1 Animais e instalações	93
5.2.3.2 Delineamento experimental.....	90
5.2.3.3 Consumo e digestibilidade dos nutrientes	93
5.2.3.4 Balanço de nitrogênio	94
5.2.3.5 Constituintes ruminais	95
5.2.4 Análise estatística	96
5.3 Resultados e discussão	97
5.3.3 Desempenho e características de carcaça	97
5.3.4 Digestibilidade, metabolismo ruminal e balanço de nitrogênio	100
5.4 Conclusão	110
Referências	110

RESUMO

Desempenho, características de carcaça, produção de metano e metabolismo ruminal em ovinos alimentados com dietas contendo nitrato de cálcio

Quatro experimentos foram realizados para estudar o desempenho, produção de metano e metabolismo ruminal em ovinos alimentados com dietas contendo nitrato de cálcio (NC).

Experimento 1: Cinquenta borregas foram utilizadas, em delineamento em blocos completos casualizados, para avaliar o desempenho, as características de carcaça e a produção de CH₄. As dietas continham teores crescentes (0, 1, 2, 3 ou 4% na MS) de NC. Houve efeito quadrático para consumo de MS, peso final, ganho médio diário e eficiência alimentar. O aumento do consumo de NC promoveu redução da produção de CH₄. O peso ao abate, peso da carcaça quente e fria e espessura da parede corporal reduziram linearmente. Houve efeito quadrático para a espessura de gordura, área de olho de lombo e para a luminosidade. A inclusão de NC reduz a produção de metano, no entanto, em teores a partir de 2%, reduz o consumo, o ganho médio diário e a eficiência alimentar. Em teores de até 4% de NC não alterou os valores de NaNO₃ e NaNO₂ na carne fresca.

Experimento 2: Cinco ovinos canulados no rúmen, distribuídos em delineamento em quadrado latino, foram utilizados para avaliar o metabolismo ruminal, digestibilidade e balanço de N. As dietas continham teores crescentes (0, 1, 2, 3 ou 4% na MS) de NC encapsulado. Houve efeito quadrático para o consumo de MS, consumo de água/kg MS e N retido. Houve efeito linear crescente para a digestibilidade da MO, da FDN e da PB. Houve efeito linear decrescente para o N fecal. Houve efeito quadrático para a concentração de AGCC total e para a proporção molar de ácido valérico. Houve efeito linear crescente para a proporção de ácido acético, butírico e isobutírico. Houve efeito quadrático para o N-NH₃ e aumento linear para o pH ruminal. O NC encapsulado até teores de 4% para ovinos aumenta a digestibilidade dos nutrientes e da fibra insolúvel em detergente neutro, o pH ruminal e a proporção de ácido acético em relação a concentração de AGCC. No entanto o consumo é reduzido quando o NCE é adicionado em teores de 4%.

Experimentos 3 e 4: foram realizados em delineamento em blocos completos casualizados para avaliar dietas contendo diferentes fontes de nitrogênio: farelo de soja (controle), ureia, nitrato de cálcio encapsulado (NCE) e nitrato de cálcio não encapsulado (NCNE). Em ambos os experimentos analisou-se os contrastes: controle vs nitrogênio não-proteico (ureia, NCE e NCNE), ureia vs nitrato de cálcio (NCE e NCNE) e NCE vs NCNE. No experimento 3 foram utilizados 44 cordeiros para determinar os efeitos de diferentes fontes de nitrogênio nas características de desempenho e de carcaça. O peso final, o ganho médio diário e a eficiência alimentar foram maiores no controle em relação ao NNP. No experimento 4 foram utilizados 20 ovinos machos castrados, canulados no rúmen, para avaliar o metabolismo ruminal e a digestibilidade dos nutrientes. A digestibilidade da FDN foi maior nas dietas contendo NNP em relação à dieta controle. O pH ruminal foi maior nas dietas com NNP em relação ao controle; e maior no NC em relação a dieta com ureia. O ácido acético foi maior nas dietas com NC em relação a dieta com ureia. O ácido propiônico foi maior com NNP comparados à dieta controle e menor nas dietas com NC comparada à dieta com ureia. A relação acetato: propionato foi maior no NC em relação à ureia. A inclusão de 2% do íon nitrato, tanto na forma de NCE como NCNE para ovinos, permite que o desempenho e características de carcaça sejam similares a dieta com inclusão de 1,1% de ureia. O NC influencia no aumento da digestibilidade da fibra em detergente neutro, do pH ruminal, da proporção de acetato em relação a concentração de AGCC total e da relação Ac:Pr.

Palavras-chave: Ácidos graxos de cadeia curta; Consumo; Digestibilidade; Metano

ABSTRACT

Performance, carcass characteristics, methane production and ruminal metabolism in sheep fed diets containing calcium nitrate

Four experiments were conducted to study the performance, methane production and ruminal metabolism in sheep fed diets containing calcium nitrate (CN). **Experiment 1:** Fifty ewe lambs were used, in a randomized complete block design, to determine the performance, carcass characteristics and methane production. Diets contained increasing levels (0, 1, 2, 3 or 4%, DM basis) of CN. There was a quadratic effect on dry matter intake, final body weight, average daily gain and feed efficiency. Increased CN intake promoted reduction in methane production. Slaughter weight, hot carcass weight and chilled carcass weight reduced linearly. There were a quadratic effect on the fat thickness, rib eye area and for brightness. Increased CN reduces the production of methane, however, in amounts from 2% reduces intake, average daily gain and feed efficiency. In amounts of up to 4% did not change NaNO_3 and NaNO_2 in fresh meat. **Experiment 2:** Five sheep, cannulated in the rumen, distributed in a Latin Square design, were used to determine ruminal metabolism and digestibility. There was a quadratic effect for DM intake, water intake/kg DM and N retained. There was a linear increase for the digestibility of OM, NDF and CP, while fecal N decreased linearly. There was a quadratic effect on the concentration of the total SCFA and the molar proportion of valeric acid. There was a linear effect on the proportion of acetic acid, butyric acid and isobutyric acid. There was a quadratic effect for N-NH_3 while ruminal pH increased linearly. The encapsulated CN up to 4% in sheep increases the digestibility of the nutrients and insoluble in neutral detergent fiber, ruminal pH and the proportion of acetic acid relative concentration of SCFA. However intake is reduced when the encapsulated CN is added at 4%. **Experiments 3 and 4:** were conducted in a randomized complete block design to evaluate diets containing different nitrogen sources: soybean meal (control), urea, encapsulated calcium nitrate (ECN) and non-encapsulated calcium nitrate (NECN). In both experiments were analyzed the following contrasts: control *vs* non-protein nitrogen (urea, ECN and NECN), urea *vs* calcium nitrate (ECN and NECN) and ECN *vs* NECN. In Experiment 3, 44 ram lambs were used to determine the effects of different nitrogen sources on performance and carcass traits. The final weight, average daily gain and feed efficiency were greater in the control diet compared to the NPN. In the experiment 4, 20 wethers, cannulated in the rumen, were used to assess the rumen metabolism and diets digestibility. The NDF digestibility was greater in diets containing NPN compared to the control. The ruminal pH was higher in the NPN diets compared to the control; and greater in the diets with NC than those with urea. The acetic acid was higher in diets with CN than the urea diet. The propionic acid was higher in the NPN diets compared to the control and lower in CN compared to the urea diet. The acetate: propionate ratio was higher for diets with CN compared to the urea diet. CN influences the increased digestibility of neutral detergent fiber, ruminal pH, the proportion of acetate relative to the total SCFA concentration and the relationship Ac: Pr.

Keywords: Digestibility; Intake; Methane, Short-chain fatty acids

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Relação da produção de CH ₄ (L/dia) e consumo de nitrato de cálcio (g/dia) em borregas.....	55
Figura 2 - Relação da produção de metano por peso corporal (CH ₄ /PC) e consumo de nitrato de cálcio (g/dia) em borregas.....	56
Figura 3 - pH do fluido ruminal de ovinos em função da inclusão de teores crescente de nitrato de cálcio encapsulado e das horas após a alimentação.....	80
Figura 4 - N-NH ₃ do fluido ruminal de ovinos em função da inclusão de teores crescente de nitrato de cálcio encapsulado e das horas após a alimentação.....	81
Figura 5 – Proporção molar de ácido acético ruminal de ovinos em função dos tratamentos com diferentes fontes de nitrogênio e das horas após a alimentação.....	104
Figura 6 - Proporção molar de ácido propiônico ruminal de ovinos em função dos tratamentos com diferentes fontes de nitrogênio e das horas após a alimentação.....	105
Figura 7 - Proporção molar de ácido butírico ruminal de ovinos em função dos tratamentos com diferentes fontes de nitrogênio e das horas após a alimentação.....	106
Figura 8 - Relação acetato:propionato em função dos tratamentos com diferentes fontes de nitrogênio e das horas após a alimentação de ovinos.....	107
Figura 9 - pH do fluido ruminal de ovinos em função dos tratamentos com diferentes fontes de nitrogênio e das horas após a alimentação.....	108
Figura 10 - N-NH ₃ no fluido ruminal de ovinos em função dos tratamentos com diferentes fontes de nitrogênio e das horas após a alimentação.....	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Proporção dos ingredientes e composição química (%) das dietas experimentais contendo teores crescentes de nitrato de cálcio (% da MS).....	46
Tabela 2 - Desempenho de borregas alimentadas com dietas contendo teores crescentes de nitrato de cálcio.....	53
Tabela 3 - Consumo de MS por borregas alimentadas com dietas contendo teores crescentes de nitrato de cálcio nos períodos.....	54
Tabela 4 - Características de carcaça e cor do músculo <i>Longissimus dorsi</i> de borregas alimentadas com dietas contendo teores crescentes de nitrato de cálcio.....	57
Tabela 5 - Proporção dos ingredientes e composição química das dietas contendo teores crescentes de nitrato de cálcio encapsulado (% da MS).....	67
Tabela 6 - Consumo diário e digestibilidade aparente total dos nutrientes pelos ovinos alimentados com dietas contendo teores crescentes de nitrato de cálcio encapsulado.....	73
Tabela 7 - Consumo e balanço de nitrogênio em ovinos alimentados com dietas contendo teores crescentes de nitrato de cálcio encapsulado.....	75
Tabela 8 - Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), nitrogênio amoniacal (N- NH ₃) e pH ruminal em ovinos alimentados com dietas contendo teores crescentes de nitrato de cálcio encapsulado.....	78
Tabela 9 - proporção dos ingredientes e composição química das dietas experimentais contendo ureia, nitrato de cálcio encapsulado (NCE) e nitrato de cálcio não encapsulado (NNE) (% da MS).....	90
Tabela 10 - Desempenho de cordeiros alimentadas com dietas contendo diferentes fontes de nitrogênio não-proteico.....	98
Tabela 11 - Características de carcaça de cordeiros alimentados com dietas contendo diferentes fontes de nitrogênio não-proteico.....	99
Tabela 12 - Consumo e digestibilidade aparente total dos nutrientes de ovinos alimentados com dietas contendo diferentes fontes de nitrogênio não-proteico.....	100
Tabela 13 - Consumo e balanço de nitrogênio em ovinos alimentados com dietas contendo diferentes fontes de nitrogênio não-proteico.....	102

Tabela 14 - Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), nitrogênio amoniacal (N-NH ₃) e pH ruminal em ovinos alimentados com dietas contendo diferentes fontes de nitrogênio não-proteico.....	103
--	-----

1 INTRODUÇÃO

A atividade enzimática microbiana no rúmen resulta da hidrólise da maior parte da matéria orgânica dietética e o metano proveniente da digestão dos alimentos representa uma perda de energia para o animal e também contribui para o aumento do metano presente na atmosfera que é um dos gases responsável pelo efeito estufa.

A fermentação microbiana da matéria orgânica por microorganismos do rúmen depende de um abastecimento de NAD^+ , o qual é convertido para NADH . H_2 e os elétrons do NADH são usados pelos microrganismos Archaeas para reduzir CO_2 em metano, permitindo que NAD^+ seja regenerado para que a fermentação possa continuar (NOLAN et al., 2010).

O fornecimento de nitrato como ingrediente na ração permite que as bactérias redutoras de nitrato utilizem o hidrogênio da fermentação ruminal e reduza a metanogênese. O nitrato utiliza os íons hidrogênio do metabolismo fermentativo no rúmen para reduzir-se a nitrito e posteriormente à amônia. Várias pesquisas *in vivo* com ruminantes tem mostrado que a adição de nitrato mitiga metano (NOLAN et al, 2010; VAN ZIJDERVELD et al., 2011; EL-ZAIAT et al., 2014; NEWBOLD et al., 2014, LEE et al, 2015). Pesquisas que utilizam aditivos alimentares, como o nitrato, sem prejudicar o desempenho produtivo dos animais e que ainda permitem utilizar a energia que seria perdida com a produção de metano, são importantes para determinar uma melhor utilização dos nutrientes.

Portanto objetivou-se avaliar o nitrato de cálcio encapsulado e não encapsulado comparados com outras fontes de nitrogênio (ureia ou farelo de soja) no desempenho, características de carcaça, produção de metano, características de fermentação ruminal, consumo e digestibilidade dos nutrientes e balanço de nitrogênio em ovinos.

Referências

- 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. Encapsulated nitrate and cashew nut shell liquid on blood and rumen constituents, methane emission, and growth performance of lambs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 92, p. 2214-2224, 2014.
- 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**, Champaign, v. 93, p. 2391-2404, 2015.

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**, Champaign, v. 92, p. 5032-5040, 2014.

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**, Victoria, v. 50, p. 801-806, 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**, Champaign, v. 94, p. 4028-4038, 2011.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Emissões de metano

A atmosfera terrestre é constituída de gases que absorvem grande parte da radiação solar emitida pela superfície aquecida da Terra. Isso faz com que a sua superfície tenha uma temperatura maior do que se não houvesse a atmosfera. Tal processo é conhecido como efeito estufa. Os principais gases responsáveis pelo efeito estufa são o dióxido de carbono, produzido através da queima de combustíveis fósseis e queima da biomassa; o metano, que pode ser produzido naturalmente em solos inundados, em lavouras de arroz e oriundo da fermentação ruminal e produzido artificialmente ou de fontes sintéticas na produção de gás natural, mineração de carvão, tratamento de esgoto e aterros sanitários; os clorofluorcarbonos, oriundos da atividade industrial; o óxido nitroso liberado após aplicação de fertilizantes nitrogenados em áreas agrícolas (MILICH, 1999; LASSEY, 2008). Dentre esses gases, o metano é um dos principais, devido à quantidade emitida, superada somente pelo CO₂ e à atividade desempenhada na absorção radioativa, com capacidade de absorção de calor atmosférico superior ao CO₂ (MARSHALL, 1998; MOSS; JOUANY; NEWBOLD, 2000; CAO; GREGSON).

A pecuária representa uma importante fonte de liberação dos gases do efeito estufa gerando dióxido de carbono, óxido nitroso e metano tanto de forma direta, através da fermentação ruminal nos ruminantes ou de forma indireta, através das atividades, como por exemplo, na produção de rações (HRISTOV et al., 2013b).

O metano e o CO₂ são subprodutos naturais da fermentação microbiana no rúmen e no intestino grosso dos animais (HRISTOV et al., 2013a). O metano é produzido em condições estritamente anaeróbias por microorganismos procariontes metanogênicos altamente especializados. O metano produzido pelos ruminantes compreende 17% e 3,3% das emissões globais de metano e gases de efeito estufa, respectivamente (KNAPP et al., 2014). O metano do esterco tanto de ruminantes e não ruminantes contribui de 2% das emissões globais de metano e 0,4% das emissões globais de gases de efeito estufa (KNAPP et al., 2014). Ovinos e caprinos produzem 10 a 16 kg de CH₄/ano e bovinos cerca de 60 a 160 kg de CH₄/ano, dependendo do tamanho corporal e da ingestão de matéria seca pelo animal.

As técnicas atuais para quantificar CH₄ em ruminantes estimam que a maioria da produção de metano ocorre no rúmen-retículo (HRISTOV et al., 2013a). As técnicas de mensuração da produção de metano permitem que diversas pesquisas sejam realizadas

utilizando uma diversidade de aditivos e ingredientes alimentares que atuam sobre a metanogênese nos ruminantes. Estratégias de alimentação são importantes para que a eficiência de utilização do alimento seja aumentada e ainda, que venha a contribuir potencialmente para a estabilização da concentração de metano na atmosfera.

No contexto global, uma atenção especial deve ser colocada na mitigação das emissões dos gases de efeito estufa. Em 2005, a Europa, a América do Norte e os países da antiga União Soviética produziram 46,3% de carne e leite de ruminantes e foram responsáveis por apenas 25,5% das emissões de metano. Em contraste a Ásia, África e América Latina produziram quantidades semelhante (47,1%) de carne e leite, no entanto as emissões de metano produzido por ruminantes foi de 69% (O'MARA, 2011). Nos países em desenvolvimento, a maioria dos agricultores trabalham em pequenos sistemas produtores lavoura-pecuária, e muitas pessoas dependem de tais sistemas para sua fonte de alimento. Nessas regiões a eficiência é reduzida, pois os pequenos agricultores normalmente contam com maior número de animais de baixa produção, com baixa qualidade da alimentação e baixo potencial genético.

Melhoria na alimentação dos animais através de uso estratégico de recursos disponíveis, com uma dieta equilibrada com base nas necessidades fisiológicas dos animais contribui para a redução da emissão dos gases.

2.2 Fermentação ruminal e microrganismos metanogênicos

Os alimentos consumidos pelos ruminantes são fermentados no rúmen por microrganismos e são convertidos em ácidos graxos de cadeia curta e proteína microbiana acompanhado pela liberação de dióxido de carbono e hidrogênio, dentre outros (KAMRA, 2005).

A maior parte do metano é produzido no rúmen-retículo e grande parte é emitido pelas narinas e boca e somente cerca de 3% do metano emitido é proveniente do reto (MUÑOZ et al., 2012). O metano é produzido em condições anaeróbias por microrganismos metanogênicos presentes no ambiente ruminal, sendo influenciado pela idade, nível produtivo do animal e alimentação. A sua produção é modulada principalmente pela presença de dióxido de carbono e de hidrogênio livre no ambiente ruminal, onde, a partir do hidrogênio livre, ocorre a redução do dióxido de carbono por microrganismos metanogênicos, com consequente formação de metano. A fermentação de equivalentes de glicose liberados a partir

de polímeros de carboidratos é um processo oxidativo sob condições anaeróbias que ocorre pela via Embden-Meyerhof e formando co-factores reduzidos como o NADH. Estes cofactores reduzidos devem ser re-oxidados para NAD para que a fermentação de açúcares tenha continuidade. NAD^+ é regenerado por transferência de elétrons para outros receptores de oxigênio (CO_2 , sulfato, nitrato e fumarato) (MOSS; JOUANY; NEWBOLD, 2000). A fermentação da matéria orgânica dietética e o catabolismo dos carboidratos pelas bactérias ruminais gera piruvato que é metabolizado até ácidos graxos de cadeia curta, sendo a proporção com que cada um é produzido dependente da concentração de NADH e H_2 na célula e da espécie bacteriana (KOZLOSKI, 2009).

O fator primário que afeta a emissão de metano pelos ruminantes é a alimentação, pelo fato de fornecer substrato para os microrganismos metanogênicos. A conversão anaeróbia para produção de metano no primeiro passo, ocorre a hidrólise de polímeros orgânicos (tais como o polissacarídeos, lipídios, proteínas e gorduras) em monômeros orgânicos solúveis. Este passo é realizado por bactérias anaeróbias, tais como *Bacterioides*, *Clostridium*, e *Streptococcus*. O segundo passo envolve a fermentação anaeróbia de monômeros em H_2 , CO_2 , acetato, propionato e butirato. A terceira etapa, a metanogênese, envolve a conversão de acetato, H_2 e CO_2 em metano pelos microrganismos metanogênicos. A metanogênese é considerada uma etapa limitante, e a atividade dos microrganismos metanogênicos é importante para a manutenção da digestão anaeróbia eficiente e evita o acúmulo de H_2 e ácidos graxos de cadeia curta (LIU e WHITMAN, 2008). O H_2 é um dos principais produtos finais da fermentação por protozoários, fungos e bactérias, e ele é imediatamente utilizado por outros microrganismos. No rúmen, a formação de metano é a principal via de eliminação do hidrogênio por meio da seguinte reação: $\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ (MOSS; JOUANY; NEWBOLD, 2000).

Os microrganismos metanogênicos são vulneráveis a condições tais como temperatura, pH, e podem ser inibidos por produtos químicos (LIU e WHITMAN, 2008). Os microrganismos metanogênicos pertencem a um separado domínio de Archaeas sobre o reino dos *Euryarchaeota* e encontram-se em vários outros ambientes anaeróbios além do rúmen. As Archaeas no rúmen utilizam energia para o seu crescimento utilizando uma redução bioquímica de CO_2 com H_2 , e algumas bactérias utilizam acetato e compostos contendo grupo metil para produzir metano (LIU e WHITMAN, 2008).

As Archaeas formam um grupo distinto de microrganismos, que possuem co-fatores (coenzima M, F 420, F 430) e lipídeos (ésteres de isopranil glicerol) únicos (MCALLISTER et

al., 1996). As Archaeas estão presentes no rúmen em quantidade que varia de 10^7 a 10^9 células/mL de líquido ruminal que irá depender do tipo da dieta dada ao animal, especialmente o conteúdo de fibra na ração (KAMRA, 2005). Segundo Chaucheyras-Durand e Ossa (2014), no rúmen há aproximadamente 1.500 espécies de Archaea e mais de 75% das Archaea são do gênero *Methanobrevibacter* (> 60%) e *Methanomicrobium* (15%). No rúmen, as Archaeas são associadas com os protozoários (LANGE; WESTERMANN; AHRING, 2005), portanto, qualquer aditivo que reduz a população de protozoários irá inibir a produção de metano. Os microrganismos metanogênicos também interagem com outros microrganismos ruminais em uma competição pelo uso do hidrogênio para produzir metano e outros produtos finais na fermentação ruminal. O tipo de fermentação resultante pode variar de alta emissão de metano, caracterizado por uma alta relação acetato:propionato, a uma baixa emissão de metano, caracterizado por uma baixa relação acetato:propionato (JOHNSON; JOHNSON, 1995).

2.3 Estratégias alimentares para redução da produção de metano

Há várias estratégias estudadas para redução do metano e elas podem ser classificadas em três grandes categorias: a primeira é o manejo alimentar, pelo fornecimento de alimentos de boa qualidade e aumento da produtividade animal e eficiência alimentar. Alguns alimentos podem aumentar ou diminuir a produção de propionato, diminuindo H_2 que seria convertido à metano; a segunda são os modificadores ruminais, pela adição de substâncias específicas que direta ou indiretamente inibem as Archaeas; a terceira é o aumento da produção animal através da genética e outras abordagens de gestão, com a melhoria de utilização de nutrientes para fins produtivos, aumentando a eficiência alimentar e diminuindo a produção de metano por unidade de produto, seja carne ou leite (KNAPP et al., 2014).

Devido à má qualidade de algumas pastagens, o manejo do pastejo pode não ser uma opção viável para melhorar a nutrição animal em muitas regiões, e a melhoria da produtividade deve vir pelo fornecimento de forragens conservadas ou concentrados. O crescimento da produção de grãos de cereais geralmente acompanhou o crescimento da população mundial (HRISTOV et al., 2013a), no entanto é questionável se grande quantidade de grãos estarão disponíveis para a alimentação dos animais ruminantes. Aumentar a inclusão de grãos nas rações dos ruminantes pode ser economicamente viável para aumentar a

produção de leite e, particularmente, a produção de carne e, assim, reduzir o impacto ambiental da pecuária, porém, é questionável a longo prazo (HRISTOV et al., 2013b).

A composição nutricional da dieta de ruminantes pode alterar a produção de metano, pois a composição e as qualidades dos alimentos interferem na fermentação e nos produtos da degradação e digestão ruminal (SHIBATA; TERADO, 2010). Segundo Johnson e Johnson (1995) a produção de metano é influenciada pelo nível de ingestão de ração, o tipo de carboidrato da dieta e a alteração da microflora ruminal. Desta maneira, estratégias alimentares que reduzam as emissões de metano podem trazer benefícios não somente ao meio ambiente, mas também ao próprio ruminante.

Para reduzir a produção de metano pelos ruminantes alguns aditivos estão sendo estudados e utilizados, como os ionóforos; lipídeos; os receptores de elétrons, por exemplo o nitrato; componentes secundários de plantas, como taninos condensados, saponinas e óleos essenciais (VAN NEVEL; DEMAYER, 1996; JORDAN et al., 2006; ODONGO et al., 2007; GRAINGER et al., 2010; TAN et al., 2011; MOHAMMED et al., 2011; VAN ZIJDERVELD et al., 2011; PUCHALA et al., 2012; EL-ZAIAT et al., 2014; NEWBOLD et al., 2014).

O modo de ação depende do aditivo, mas pode incluir inibição direta da metanogênese, supressão de protozoários ciliados, fornecer ou estimular um caminho competitivo para eliminação de H_2 (KANAPP et al., 2014). Quando os microrganismos metanogênicos são reduzidos ou eliminados, uma outra rota deve existir para eliminação de hidrogênio, ou as concentrações de hidrogênio no rúmen aumentará e potencialmente inibe a fermentação. Segundo Brown et al. (2011), idealmente este dissipador de hidrogênio alternativo resultaria na produção de um composto que pode ser absorvido e metabolizado pelo animal de modo que a energia não seja perdida.

Além disso, estratégias também são utilizadas, tais como a defaunação; a inclusão de concentrado na ração dos ruminantes e alteração do processamento de rações (HALES; COLE; MCDONALD, 2012). Hales, Cole e McDonald (2012) estudaram o fornecimento de rações para bovinos da raça Jersey contendo milho floculado e grão úmido de destilaria em 0 e 30% e dieta contendo milho laminado e grão úmido de destilaria em 0 e 30%. Os autores constataram que a ingestão de matéria seca e a produção de metano foram menores em dietas contendo milho floculado. Segundo os autores a diminuição do metano foi devido a mudança no sítio de digestão que passou do rúmen para os intestinos, ou ainda devido a redução do pH, já que os microrganismos metanogênicos são sensíveis a baixo pH. Além disso, a energia

retida em Mcal/dia foi maior para bovinos consumindo milho floculado, pois as perdas de metano foram maiores para bovinos alimentados com dietas contendo milho laminado.

A monensina é o ionóforo mais estudado e é rotineiramente utilizado em bovinos de corte e na alimentação de gado leiteiro. Há também algumas pesquisas com o uso de monensina como modificador no rúmen em vários sistemas de produção quanto a mitigação da produção de metano. Os ionóforos afetam a produção de metano de duas maneiras, aumentando a eficiência da conversão alimentar e reduzindo o metano por unidade de produto e diminuindo a quantidade de metano produzido por unidade de matéria seca consumida devido seu efeito sobre a fermentação ruminal (VAN NEVEL; DEMAYER, 1996). Odongo et al. (2007) forneceram 24 mg de Rumesin Premix para vacas em lactação, que não influenciou no consumo de matéria seca e nem na produção de leite, porém a produção de metano foi reduzida quando adicionaram o ionóforo. Diferentemente Grainger et al. (2010) em dois experimentos, um com animais em pastejo com a técnica do marcador hexafluoreto (SF₆) e outro com os animais em câmaras respirométricas, administraram 471 mg/dia de monensina para vacas em lactação, e a produção de metano não foi influenciada com a adição do ionóforo. Morsy et al. (2015) avaliaram *in vitro* o extrato de própolis (brasileiro e egípcio) de abelha e o ionóforo monensina e observaram que ambos atuam na redução do metano, além disso o extrato de própolis reduz a população de protozoários. Segundo os mesmos autores a composição química, que está intimamente relacionado com a vegetação do local, da própolis e sua atividade biológica é altamente variável, e no estudo atribuiu-se a presença de flavonóides e ácidos graxos no controle microbiano.

Outro componente da dieta que vem sendo estudado são as leguminosas, pois tem sido demonstrado que os compostos secundários, tais como taninos condensados reduzem a metanogênese (TIEMANN et al., 2008). Puchala et al. (2012) observaram que o fornecimento da planta forrageira *Lespedeza cuneata*, rica em tanino condensado, para caprinos reduz os protozoários ciliados e produção de metano. Tan et al. (2011) avaliaram *in vitro* teores taninos condensados extraídos e purificados da *Leucaena leucocephala* e observaram que taninos condensados reduz os protozoários, os microrganismos metanogênicos e a produção de metano.

A suplementação lipídica é uma estratégia pesquisada para a mitigação do metano produzido por ruminantes e o efeito dos lipídios da dieta é dependente da fonte, do perfil de ácidos graxos, da taxa de inclusão e da composição da dieta (BEAUCHEMIN; MCGINN; PETIT, 2007). Mohammed et al. (2011) estudaram o fornecimento de sementes de girassol,

linhaça e canola para vacas e observaram que os animais que consumiram as dietas que continham essas sementes oleaginosas produziram menos metano em relação a uma dieta controle. Grainger et al. (2010) suplementaram vacas leiteiras com caroço de algodão e concluíram que a adição de caroço de algodão resultou em uma redução persistente das emissões de metano ao longo de um período de 12 semanas, e afirmaram que essa redução é devido a população ruminal de protozoários e de microrganismos metanogênicos reduzirem. Beauchemin et al. (2009) observaram redução significativa no número de protozoários quando adicionaram sementes de girassol ou canola na dieta de vacas, e além disso, afirmaram que a adição de sementes de oleaginosas na alimentação pode mitigar metano. Segundo Jordan et al. (2006), a produção de metano reduziu de 334,4 L para 271,6 L quando incluiu o óleo de coco na alimentação de bovinos mestiços Charolês e Limousin, além disso propiciou o aumento do desempenho dos animais com o aumento do ganho de peso e da eficiência alimentar.

O nitrato também é uma alternativa, pois no rúmen ele atua na utilização do hidrogênio proveniente da fermentação de carboidratos, produzindo amônia em vez de metano. Alguns microrganismos do rúmen são capazes de reduzir nitrato a nitrito e então nitrito a amônia com o uso de hidrogênio, assim a metanogênese pode ser reduzida pela adição de receptores de elétrons (SAR et al., 2004).

A suplementação com nitrato, além de inibir as emissões de metano, contribui com a produção de amônia, que para ruminantes é uma importante fonte de nitrogênio não-proteico para o crescimento microbiano. Patra e Yu (2013) avaliaram *in vitro* o efeito de saponina de Quillaja (0,6 e 1,2 g/L), propionato (4 e 8 mM) e nitrato (5 e 10 mM), sozinhos ou em combinações. Os autores observaram que todos os tratamentos diminuíram a produção de metano, no entanto a combinação de todos os três inibidores com a dose mais elevada permitiu maior diminuição da produção de metano (85%). Troy et al. (2015) avaliaram dietas com alta proporção de concentrado (92%) e baixa proporção de concentrado (50%) com a adição de nitrato de cálcio (21,5 g/kg MS) ou óleo (53 g/kg MS) na alimentação de bovinos. Segundo os autores a adição de nitrato reduziu a produção de CH₄ em 17%, enquanto o aumento do teor de óleo de 53 g/kg de MS reduziu a produção de CH₄ em 7,5%. No entanto, nenhuma destas estratégias de redução da produção de CH₄ foram menores nas dietas com alto teor de concentrado. Os autores concluíram que, embora a adição de nitrato e aumento da concentração de óleo são estratégias apropriadas para mitigar as emissões de CH₄, são

necessárias mais pesquisas quanto a utilização destes ingredientes em dietas de alto concentrado.

2.4 Nitrogênio não proteico na alimentação de ruminantes

Os microrganismos ruminais são capazes de sintetizar proteína microbiana a partir de amônia e esqueleto carbônico, e o nitrogênio não protéico é uma das fontes de amônia para os microorganismos. A ureia e o nitrato são fontes de nitrogênio não-proteico utilizadas na alimentação de ruminantes.

A ureia sintética é um produto químico obtido a partir da síntese da amônia com o dióxido de carbono, sob condições elevadas de temperatura e pressão. A ureia encontrada no Brasil apresenta na sua composição 46,4% de nitrogênio; 0,55% de biureto; 0,25% de água; e 0,008% de amônio livre, 0,003% de cinzas e 0,003% de ferro e chumbo (SANTOS; CAVALIERI; MODESTO, 2001). Desde que mostraram o potencial de se administrar ureia aos ruminantes, ela tem sido amplamente utilizada. No rúmen, a ureia é rapidamente hidrolisada gerando compostos amoniacais e gás carbônico por ação da enzima urease. Essa amônia ruminal pode ser convertida em proteína microbiana no rúmen e/ou convertida em ureia no fígado.

O nitrato comporta-se como um aceptor de elétrons e assim as enzimas nitrato redutase e nitrito redutase dos microrganismos ruminais fazem a redução do nitrato a nitrito e, posteriormente, para amônia. A amônia é incorporada nos compostos nitrogenados microbianos ou é absorvida através do epitélio ruminal e entra na circulação portal, chegando ao fígado, onde é convertida em ureia (KOZLOSKI, 2009).

Porém, o nitrogênio não proteico deve ser utilizado com cuidado, pois tanto o excesso de ureia como de nitrato podem levar o animal a intoxicação, sendo assim, é necessário fazer uma adaptação com teores crescentes de inclusão até o teor definitivo na ração. Há preocupações quanto ao uso devido à rápida liberação de amônia, que pode ser mais rápido do que o seu uso por microorganismos para a síntese de proteínas no rúmen. A eficiência da síntese de proteína microbiana a partir de ureia depende, entre outros fatores, da energia disponível no rúmen. Além disso, uma rápida liberação de nitrogênio pode causar uma assincronia de $N-NH_3$ e energia no ambiente ruminal. Como consequência com a quantidade excessiva de $N-NH_3$ no rúmen, o desempenho dos animais pode diminuir e, em alguns casos, causa toxicidade (BENEDETE et al., 2014). Com o fornecimento excessivo de ureia, a

amônia em excesso bloqueia o ciclo de Krebs, diminuindo a disponibilidade de glicose para as células, ocorre menor disponibilidade de energia e afeta intensamente as células do sistema nervoso central. Além disso, o excesso de amônia afeta o funcionamento do ciclo da ureia, pois bloqueia a atividade da enzima glutamina sintetase, assim como o ciclo da ureia, diminuindo a oferta de ATP para a transformação de amônia em ureia (SANTOS, 2006).

O fornecimento de nitrato, em teores excessivos para ruminantes, sem cuidados quanto à adaptação dos animais as dietas, pode levar a ocorrência de meta-hemoglobinemia. A meta-hemoglobinemia é uma condição causada pela oxidação do ferro férrico da hemoglobina, tornando a molécula incapaz de transportar oxigênio, ocorrendo assim anóxia celular (VAN ZIJDERVELD et al., 2011). van Zijderveld et al. (2010) constataram 7% de meta-hemoglobina em ovinos alimentados com 2,6% de nitrato, e concluíram que é possível fornecer como ingrediente alimentar essa substância de maneira segura.

Devido aos fatores citados anteriormente começou-se a usar fontes protegidas de NNP. O uso de ureia encapsulada em pesquisas é para que a partícula seja de liberação lenta no rúmen e permita melhorar a sincronia de energia e $N-NH_3$, levando a melhor eficiência de crescimento de bactérias ruminais, além de reduzir o uso de fontes de proteína verdadeira.

Alguns autores, no entanto, não observaram benefícios em utilizar ureia encapsulada, como Benedete et al. (2014) que avaliaram os efeitos da substituição de farelo de soja por ureia encapsulada em dietas isonitrogenadas contendo 12% de PB para bovinos de corte, e observaram que a ureia encapsulada diminuiu a ingestão de matéria seca e não alterou a eficiência microbiana ruminal e a digestibilidade dos nutrientes. Highstreet et al. (2010) forneceram 1,8% de ureia encapsulada em substituição a 1,7% de ureia não encapsulada em dietas com 18% de PB para vacas em lactação e a produção de leite, o consumo, a digestibilidade dos nutrientes e o N urinário não foram alterados, no entanto propiciou o aumento da gordura e proteína do leite. Além da ureia, pesquisas com nitrato encapsulado também vem sendo realizadas, como El-Zaiat et al. (2014) que estudaram dietas contendo ureia, 4,51% de nitrato encapsulado e 4,51% de nitrato encapsulado contendo o líquido da casca da castanha de caju na dieta de ovinos Santa Inês. Os autores não observaram diferenças no consumo de matéria seca e no ganho de peso, no entanto o nitrato de cálcio encapsulado reduziu a produção de metano.

2.5 Nitrato na alimentação de ruminantes

Sob certas condições de estresse, uma grande variedade de plantas podem acumular quantidades de nitrato. Além disso, certas ervas daninhas que normalmente habitam pastagens ou lavouras também podem acumular nitratos. No entanto, grãos de cereais e concentrados proteicos raramente contêm concentrações de nitrato apreciáveis. O nitrato não é distribuído uniformemente em plantas, por exemplo, onde os teores são normalmente mais elevados em hastes, menor em folhas e extremamente baixo em sementes (LENG, 2008).

Nos animais em pastejo sob condições normais, as concentrações de nitrato são baixas e não são significativas no que diz respeito à quantidade de nitrogênio necessária para a fermentação microbiana eficiente no rúmen. É apenas sob condições especiais que o nitrato é elevado o suficiente para estar perto das exigências do nitrogênio ruminal (LENG, 2008). Além do nitrato naturalmente encontrado nas pastagens, é possível fornecê-lo como ingrediente nas rações de ruminantes como uma fonte de nitrogênio não-proteico.

Em experimento *in vitro*, o pH ótimo para redução do nitrato e nitrito é entre 6,2 e 5,6 e na presença de hidrogênio, o nitrato é reduzido a amônia com o consumo de hidrogênio, de acordo com a equação: $\text{KNO}_3 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{NH}_3 + 2\text{H}_2\text{O} + \text{KOH}$ (LEWIS, 1951b).

As bactérias ficam aderidas ao epitélio ruminal e liberam enzimas nitrato redutase e nitrito redutase que são produzidas somente quando há presença de substrato, o nitrato é reduzido a nitrito e posteriormente a amônia (KOZLOSKI, 2009). Stephenson e Whetham (1925) mostraram que *Escherichia coli* reduz o nitrato a nitrito na presença de doadores de hidrogênio, como lactato, glicerol, ácido succínico ou ácido málico. Adicionalmente, segundo Woods (1938), a *Escherichia coli* e *Clostridium welchii* foram capazes, na presença de hidrogênio, de reduzir o nitrato a amônia quantitativamente. Segundo Iwamoto, Asanuma e Hino (2002) a redução de nitrato a nitrito é realizada por *Selenomonas ruminantium*, *Veillonella parvula*, e *Wollinella Succinogenes*, e estas bactérias redutoras de nitrato obtém energia a partir da redução de nitrato e /ou nitrito e, além disso, elas são menos sensíveis a nitrito. A alimentação com nitrato leva a um aumento do número de bactérias redutoras de nitrato, principalmente a *Wollinella succinogenes*.

A necessidade de equivalentes de redução (elétrons e hidrogênio), para reduzir nitrato a nitrito, é bem menor que para reduzir este último a amônia, de modo que a taxa de redução de nitrato é cerca de 2,5 vezes mais alta que a redução do nitrito. Em função disso quando a taxa de nitrato no rúmen é alta, ocorre acúmulo de nitrito (KOZLOSKI, 2009). O nitrato, em teores

excessivos para ruminantes podem levar a ocorrência de meta-hemoglobinemia, que é uma condição causada pela oxidação do ferro férrico da hemoglobina, tornando a molécula incapaz de transportar oxigênio, ocorrendo anóxia celular (VAN ZIJDERVELD et al., 2011). Isso se deve ao nitrato ser reduzido pelas bactérias ruminais a nitrito, que ao ser absorvido, oxida o íon ferro da hemoglobina no sangue que se transforma em meta-hemoglobina (LEWIS, 1951b). Segundo Hubert e Voordouw (2007) a adição de sulfato à dieta contendo nitrato atua como doador de elétrons na redução de nitrito à amônia, evitando a formação de meta-hemoglobina. Além disso, é importante também o fornecimento gradativo dos teores de nitrato aos animais, para que possibilite adaptação da microbiota ruminal e assim tenha capacidade de reduzir nitrato a amônia.

Além de riscos de intoxicação por meta-hemoglobina, quando é fornecido um teor elevado de nitrato, é provável que parte do nitrato ingerido e do nitrito formado no rúmen sejam absorvidos através da parede do rúmen para o sangue e perdido na urina (TAKAHASHI et al., 1998).

Pesquisas tem mostrado que é possível utilizar nitrato sem que os animais venham a se intoxicar, como no estudo em que van Zijderveld et al. (2010) estudaram ovinos alimentados com 2,6% do íon nitrato, e concluíram que desde que essa substância seja administrada de maneira segura, representa uma alternativa para redução do metano produzido. El-Zaiat et al. (2014) também observaram que a meta-hemoglobina manteve-se na normalidade, ou seja, a concentração de meta-hemoglobina em cordeiros alimentados com 4,51% de nitrato encapsulado foi de 1,08% do total de hemoglobina.

Apesar dos riscos de intoxicação com nitrito, desde que não sejam utilizados teores muito elevados, a utilização de nitrato tem mostrado benefícios quanto a redução do metano produzido pelos ruminantes, e, além disso, é uma fonte de nitrogênio não protéico para a microbiota ruminal.

Em estudo *in vitro* Zhou, Yu e Meng (2012) estudaram a incubação de feno de alfafa com concentrações de 12, 24, 36 e 48 $\mu\text{mol/mL}$ de nitrato e observaram que a produção de metano foi inibida com o nitrato e os microrganismos metanogênicos reduziram. Em estudos com ruminantes, vários autores verificaram que o nitrato reduz a produção de metano. Segundo Nolan et al. (2010), a produção de metano nos animais que consumiram KNO_3 foi 23% menor. Os autores constataram que a redução da produção de metano duas horas após a alimentação não permaneceu. Assim, talvez uma forma de liberação lenta do nitrato pode melhorar a mitigação de metano e reduzir o nitrato e o nitrito absorvido pelo rúmen e assim

reduzir o risco de toxicidade. van Zijderveld et al. (2010) constataram que a produção de metano (L/dia) reduziu 32% em ovinos alimentados com ração contendo 2,6 % de nitrato. O nitrato influenciou na redução dos microrganismos metanogênicos, e segundo os autores, foi devido a menor disponibilidade de elétrons para essas bactérias ou ainda pela toxicidade do nitrito a esses microrganismos. van Zijderveld et al. (2011) observaram que a adição de 2,1% de nitrato de cálcio em substituição a ureia em dietas fornecidas a vacas reduziu a produção de metano em 16%. Newbold et al. (2014) estudaram a influência de teores de nitrato em 0; 0,6; 1,2; 1,8; 2,4 e 3% em bovinos da raça Honlandês e observaram que o nitrato reduziu a produção de metano em até 28%.

O nitrato influencia nas populações de *F. succinogenes* e *R. Flavefaciens*, pois segundo Zhou, Yu e Meng (2012) estas espécies são sensíveis ao nitrato. Foi sugerido que o nitrito inibe bactérias que produzem ATP através de sistemas de transporte de elétrons, mas não as bactérias que não possuem citocromos e utilizam ATP através da fosforilação de substratos (MARAIS et al., 1988). Este modo de atuação aos microrganismos pode explicar, pelo menos parcialmente, a inibição que o nitrato causa a *R. flavefaciens* que obtém para 50% do seu ATP através de processos de transporte de elétrons (DAWSON et al., 1979). Hulshof et al. (2012) constataram que a emissão de metano reduziu em 32% nas dietas com nitrato, e possivelmente, o nitrato como um dissipador de elétron não foi a única razão para a diminuição da emissão de metano, podendo o efeito tóxico do nitrito intermediário ter afetado os microrganismos e consequentemente a fermentação ruminal. Adicionalmente o nitrato pode inibir a população de protozoários no rúmen, como em ovinos Santa Inês alimentados com 4,51% de nitrato de cálcio encapsulado (El-Zaiat et al., 2014).

Pesquisas tem mostrado que a influência do nitrato no consumo de matéria seca é variável. Segundo Hulshof et al. (2012), a suplementação com nitrato (22g/kg de MS) em comparação com dieta contendo ureia fornecida a bovinos Nelore x Guzerá reduziu a ingestão de matéria seca. Velazco, Cottle e Hegarty (2014) forneceram dietas contendo 2,57% de nitrato de cálcio a bovinos da raça Angus, e observaram que os animais tiveram refeições menores (0,770 kg MS/refeição), no entanto, um maior número de refeições diárias (14,69) em relação a dieta com ureia (1,820 kg MS/refeição e 7,39 refeições/dia). No entanto, van Zijderveld et al. (2011) observaram em vacas alimentadas com 2,1% de nitrato de cálcio que o consumo de matéria seca não foi alterado na dieta com nitrato (25 g de nitrato por kg de matéria seca). El-Zaiat et al. (2014) estudaram dietas com 4,51% de nitrato de cálcio

encapsulado fornecido a ovinos e também não observaram diferença no consumo pelos animais.

Na literatura, os efeitos da inclusão de nitrato sobre as concentrações ruminais dos ácidos graxos de cadeia curta são variáveis. Segundo Zhou, Yu e Meng (2012) a administração de nitrato resultou em diminuição das concentrações totais de ácidos graxos de cadeia curta quando a concentração de nitrato foi em 24 $\mu\text{mol/mL}$ ou superior e influenciou no aumento do pH ruminal. No entanto, Hulshof et al. (2012) observaram que a adição de nitrato não influenciou na concentração de ácidos graxos de cadeia curta totais. Nolan et al. (2010) estudaram ovinos da raça Merino alimentados com 4% de KNO_3 e diferentemente, os autores registraram que os animais tiveram aumento dos ácidos graxos de cadeia curta no rúmen, principalmente acetato. de Raphélis-Soissan et al. (2014), avaliaram 2% de nitrato ou 1,1% de ureia em rações para ovinos da raça Merino e verificaram aumento na concentração de acetato e na relação acetato:propionato e redução nas concentrações de propionato.

Referências

- BEAUCHEMIN, K.A.; MCGINN, S.M.; PETIT, H.V. Methane abatement strategies for cattle: Lipid supplementation of diets. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 87, p. 431- 440, 2007.
- BEAUCHEMIN, K.A.; MCGINN, S.M.; BENCHAAAR, C.; HOLTHAUSEN, L. Crushed sunflower, flax, or canola seeds in lactating dairy cow diets: Effects on methane production, rumen fermentation, and milk production. **Journal of Dairy Science**. Champaign, v. 92, p. 2118-2127, 2009.
- BENEDETI, P.D.B.; PAULINO, P.V.R.; MARCONDES, M.I.; VALADARES FILHO, S.C.; MARTINS, T.S.; LISBOA, E.F.; SILVA, L.H.P.; TEIXEIRA, C.R.V.; DUARTE, M.S. Soybean meal replaced by slow release urea in finishing diets for beef cattle. **Livestock Science**, Philadelphia, v. 165, p. 51-60, 2014.
- BROWN, E.G.; ANDERSON, R.C.; CARSTENS, G.E.; GUTIERREZ-BAÑUELOS, H.; MCREYNOLDS, J.L.; SLAY, L.J.; CALLAWAY, T.R.; NISBET, D.J. Effects of oral nitroethane administration on enteric methane emissions and ruminal fermentation in cattle. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 166/167, p. 275-281, 2011.
- CAO, M.; GREGSON, K.; MARSHALL, S. Global methane emission from wetlands and its sensitivity to climate change. **Atmospheric Environment**, Amsterdam, v. 32, p. 3293-3299, 1998.
- CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; OSSA, F. Review: The rumen microbiome: Composition, abundance, diversity, and new investigative tools. **The Professional Animal Scientist**, Champaign, v. 30, p. 1-12, 2014

DAWSON, K.A.; PREZIOSI, M.C.; CALDWELL, D.R. Some effects of uncouplers and inhibitors on growth and electron transport in rumen bacteria. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 139, p. 384-392, 1979.

DE RAPHÉLIS-SOISSAN, V.; LI, L.; GODWIN, I.R.; BARNETT, M.C.; PERDOK, H.B.; HEGARTY, R.S. Use of nitrate and *Propionibacterium acidipropionici* to reduce methane emissions and increase wool growth of Merino sheep. **Animal Production Science**, Melbourne, v. 54, p. 1860-1866, 2014.

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. Encapsulated nitrate and cashew nut shell liquid on blood and rumen constituents, methane emission, and growth performance of lambs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 92, p. 2214-2224, 2014.

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

GRAINGER, C.; WILLIAMS, R.; ECKARD, R.J.; HANNAH, M.C. A high dose of monensin does not reduce methane emissions of dairy cows offered pasture supplemented with grain. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, p. 5300-5308, 2010.

HALES, K.E.; COLE, N.A.; MACDONALD, J.C. Effects of corn processing method and dietary inclusion of wet distillers grains with solubles on energy metabolism, carbon-nitrogen balance, and methane emissions of cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 90, p. 3174-3185, 2012.

HIGHSTREET, A.; ROBINSON, P.H.; ROBINSON, J.; GARRETT, J.G. Response of Holstein cows to replacing urea with a slowly rumen released urea in a diet high in soluble crude protein. **Livestock Science**, Philadelphia, v. 129, p. 179-185, 2010.

HRISTOV, A.N.; OH, J.; FIRKINS, J.L.; DIJKSTRA, J.; KEBREAB, E.; WAGHORN, G.; MAKAR, H.P.S.; ADESOGAN, A.T.; YANG, W.; LEE, C.; GERBER, P.J.; HENDERSON, B.; TRICARICO, J.M. special topics: mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 91, p. 5045-5069, 2013a.

HRISTOV, A.N.; OTT, T.; TRICARICO, J.; ROTZ, A.; WAGHORN, G.; ADESOGAN, A.; DIJKSTRA, J.; MONTES, F.; OH, J.; KEBREAB, E.; OOSTING, S.J.; GERBER, P.J.; HENDERSON, B.; MAKAR, H.P.S.; FIRKINS, J.L. Special topics: mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: III. A review of animal management mitigation options. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 91, p. 5095-5113, 2013b.

HUBERT, C.; VOORDOUW, G. Oil field souring control by nitrate reducing *Sulfurospirillum* spp. that outcompete sulfate-reducing bacteria for organic electron donors. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 2644-2652, 2007.

HULSHOF, R.B.A.; BERNDT, A.; GERRITS, W.J.J.; DIJKSTRA, J.; VAN ZIJDERVELD, S.M.; NEWBOLD, J.R.; PERDOK, H.B. Dietary nitrate supplementation reduces methane

emission in beef cattle fed sugarcane-based diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 90, p. 2317-2323, 2012.

IWAMOTO, M.; ASANUMA, N.; HINO, T. Ability of *Selenomonas ruminantium*, *Veillonella parvula*, and *Wolinella succinogenes* to reduce nitrate and nitrite with special reference to the suppression of ruminal methanogenesis. **Anaerobe**, Amsterdam, v. 8, p. 209-215, 2002.

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

JORDAN, E.; LOVETT, D.K.; MONAHAN, F.J.; CALLAN, J.; FLYNN, B.; O'MARA, F.P. Effect of refined coconut oil or copra meal on methane output and on intake and performance of beef heifers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, p. 162-170, 2006.

KAMRA, D.N. Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, Columbus, v. 89, p. 124-134, 2005.

KNAPP, J.R.; LAUR, G.L.; VADAS, P.A.; WEISS, W.P.; TRICARICO, J.M. Invited review: enteric methane in dairy cattle production: quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, p. 3231-3261, 2014.

KOSLOSKI, G.V. **Bioquímica dos ruminantes**. 2. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2009. 216 p.

LANGE, M.; WESTERMANN, P.; AHRING, B.K. Archaea in protozoa and metazoan. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Washington, v. 66, p. 465-474, 2005.

LASSEY, K.R. Livestock methane emission and its perspective in the global methane cycle. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v. 48, p. 114-118, 2008.

LENG, R.A. **The potential of feeding nitrate to reduce enteric methane production in ruminants**. Canberra: Report to Department of Climate Change, Commonwealth Government of Australia, 2008. 82 p. Disponível em: <<http://www.penambulbooks.com/Downloads/Leng-Final%20Modified%202017-9-2008.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2014.

LEWIS, D. The metabolism of nitrate and nitrite in the sheep. 1. The reduction of nitrate in the rumen of the sheep. **The Biochemical Journal**, London, v. 48, p. 175, 1951a.

_____. 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, 1951b.

LIU, Y; WHITMAN, W.B. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic Archaea. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1125, p. 171-189, 2008.

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**, Cambridge, v. 59, p. 301-313, 1988.

McALLISTER, A.T.; OKINE, E.K.; MATHISON, G.W.; CHENG, K.J. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 76, p. 231-243, 1996.

MILICH, L. The role of methane in global warming: where might mitigation strategies be focused? **Global Environmental Change-Human and Policy Dimensions**, Oxford, v. 9, p. 179-201, 1999.

MOHAMMED, R.; MCGINN, S.M.; BEAUCHEMIN, K.A. Prediction of enteric methane output from milk fatty acid concentrations and rumen fermentation parameters in dairy cows fed sunflower, flax, or canola seeds. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, p. 6057-606, 2011.

MORSY, A.S.; SOLTAN, Y.A.; SALLAM, S.M.A.; KREUZER, M.; ALENCAR, S.M.; ABDALLA, A.L. Comparison of the in vitro efficiency of supplementary bee propolis extracts of different origin in enhancing the ruminal degradability of organic matter and mitigating the formation of methane. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 199, p. 51-60, 2015.

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

MUÑOZ, C.; YAN, T.; WILLS, D.A.; MURRAY, S.; GORDON, A.W. Comparison of the sulfur hexafluoride tracer and respiration chamber techniques for estimating methane emissions and correction for rectum methane output from dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 95, p. 3139-3148, 2012.

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

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**, Champaign, v. 92, p. 5032-5040, 2014.

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**, Melbourne, v. 50, p. 801-806, 2010.

O'MARA, F.P. The significance of livestock as a contributor to global greenhouse gas emissions today and in the near future. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 166, p. 7-15, 2011.

ODONGO, N.E.; BAGG, R.; VESSIE, G.; DICK, P.; OR-RASHID, M.M.; HOOK, S.E.; GRAY, J.T.; KEBREAB, E.; FRANCE, J.; MCBRIDE, B.W. Long-term effects of feeding monensin on methane production in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, p. 1781-1788, 2007.

PATRA, A.K.; YU, Z. Effective reduction of enteric methane production by a combination of nitrate and saponin without adverse effect on feed degradability, fermentation, or bacterial and Archaeal communities of the rumen. **Bioresource Technology**, Essex, v. 148, p. 352-360, 2013.

PUCHALA, R.; ANIMUT, G.; PATRA, A.K.; DETWEILER, G.D.; WELLS, J.E.; VAREL, V.H.; SAHLU, T.; GOETSCH, A.L. Effects of different fresh-cut forages and their hays on feed intake, digestibility, heat production, and ruminal methane emission by Boer × Spanish goats. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 90, p. 2754-2762, 2012.

SANTOS, G.T.; CAVALIERI, F.L.B.; MODESTO, E. C. Recentes avanços em nitrogênio não protéico na nutrição de vacas leiteiras. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL EM BOVINOCULTURA DE LEITE: NOVOS CONCEITOS EM NUTRIÇÃO, nº 2, 2001, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2001. p. 199-228.

SANTOS, J.E.P. Distúrbios metabólicos. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2011. p. 439-516.

SAR, C.; SANTOSO, B.; GAMO, Y.; KOBAYASHI, T.; SHIOZAKI, S.; KIMURA, K.; MIZUKOSHI, H.; ARAI, I.; TAKAHASHI, J. Effects of combination of nitrate with β -1,4galacto-oligosaccharides and yeast (*Candida kefyr*) on methane emission from sheep. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Gwanak-gu, v.17, p.73-79, 2004.

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

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.

TAKAHASHI, J.; IKEDA, M.; MATSUOKA, S.; FUJITA, H. Prophylactic effect of L-cysteine to acute and subclinical nitrate toxicity in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 74, p. 273-280, 1998.

TAN, H.Y.; SIEO, C.C.; ABDULLAH, N.; LIANG, J.B.; HUANG, X.D.; HO, Y.W. Effects of condensed tannins from *Leucaena* on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa *in vitro*. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 169, p. 185-193, 2011.

TIEMANN, T.T.; LASCANO, C.E.; KREUZER, M.; HESS, H.D. The ruminal degradability of fibre explains part of the low nutritional value and reduced methanogenesis in highly tanniniferous tropical legumes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 88, p. 1794-1803, 2008.

TROY, S. M.; DUTHIE, C. A.; HYSLOP, J. J.; ROEHE, R.; ROSS, D. W.; WALLACE, R. J.; WATERHOUSE, A.; ROOKE, J. A. Effectiveness of nitrate addition and increased oil

content as methane mitigation strategies for beef cattle fed two contrasting basal diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 93, p. 1815-1823, 2015.

VAN NEVEL, C. J.; DEMEYER, D.I. Control of rumen methanogenesis. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 42, p. 73-97, 1996.

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**, Champaign, v. 94, p. 4028-4038, 2011.

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**, Champaign, v. 93, p. 5856-5866, 2010.

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

WOODS, D.D. The reduction of nitrate to ammonia by *Clostridium welchii*. **The Biochemical Journal**, London, v. 32, p. 2000-2012, 1938.

ZHOU, Z.; YU, Z.; MENG, Q. Effects of nitrate on methane production, fermentation, and microbial populations *in vitro* ruminal cultures. **Bioresource Technology**, Essex, v. 103, p. 173-179, 2012.

3 DESEMPENHO, PRODUÇÃO DE METANO *IN VIVO* E CARACTERÍSTICAS DE CARÇA DE OVINOS ALIMENTADOS COM NITRATO DE CÁLCIO

Resumo

O nitrato pode ser usado na alimentação de ruminantes como fonte de nitrogênio não proteico (NNP) e reduz a produção de metano. Cinquenta borregas (peso inicial $37,4 \pm 3,1$ kg e 185 ± 4 d de idade) foram utilizadas em um delineamento em blocos completos casualizados, de acordo com peso inicial e idade, para determinar os efeitos de nitrato de cálcio (NC) nas características de desempenho, de carcaça e de produção de metano. As dietas experimentais continham 14% de proteína bruta e teores crescentes de nitrato de cálcio (0, 1, 2, 3 ou 4% na matéria seca) substituindo o farelo de soja. Um período de adaptação foi utilizado antes de mudar para o teor de nitrato superior para evitar efeitos tóxicos. Para a mensuração do metano *in vivo* os animais foram mantidos individualmente em câmaras de circuito aberto. Houve efeito quadrático para consumo de matéria seca (1,40; 1,44; 1,36; 1,32 e 1,17 kg MS/dia), peso final (51,52; 51,73; 50,80; 49,20 e 46,09 kg), ganho médio diário (0,207; 0,213; 0,199; 0,177 e 0,152 kg) e eficiência alimentar (0,148; 0,151; 0,146; 0,133 e 0,128). O aumento do consumo de NC pelas borregas promoveu redução da produção de metano (L/dia). O consumo de nitrato de cálcio em até 31g/dia permitiu redução média de 28% da produção de metano. O peso ao abate (60,8; 57,7; 56,2; 55,9 e 54,9 kg), o peso de carcaça quente (32,3; 31,3; 30,9; 30,9 e 29,9 kg), o peso de carcaça fria (32,1; 30,8; 30,5; 30,4 e 29,7 kg) e a espessura da parede corporal (31,0; 34,5; 28,0; 28,0 e 29,0 mm) foram reduzidos à medida que houve aumento da inclusão de nitrato de cálcio. A perda por resfriamento, rendimento de carcaça quente e rendimento de carcaça fria não foram influenciados pela inclusão do NC. Não houve diferença no teor de nitrato e não foi detectado resíduo de nitrito na carne. Houve efeito quadrático na espessura de gordura subcutânea (11,2; 8,6; 6,3; 6,9 e 8,5 mm) e na área de olho de lombo (15,4; 16,4; 17,5; 17,0 e 15,9 cm²). Com relação as características da carne houve efeito quadrático para a luminosidade (35,17; 36,38; 37,76; 37,75 e 36,29) e o teor de amarelo e vermelho não foram influenciados pela inclusão de NC. A inclusão de NC na dieta de ovinos pode ser utilizada para reduzir a produção de metano. No entanto, em teores a partir de 2% de NC, reduz o consumo e consequentemente, o ganho médio diário e a eficiência alimentar. Nos teores estudados, o nitrato de cálcio fornecido na dieta não alterou os valores de NO₃ e NO₂ na carne fresca.

Palavras-chave: Confinamento; Ganho de peso; Nitrogênio não-proteico; Nitrito

Abstract

Nitrate can be used in ruminant feeding as a source of non-protein nitrogen (NPN) and can reduce the production of methane. Fifty ewe lambs (initial weight 37.4 ± 3.1 kg and 185 ± 4 d old) were used in a randomized complete block design, according to initial age and weight to determine the effects of calcium nitrate (CN) on performance, carcass characteristics and methane production. Experimental diets contained 14% crude protein and increasing levels of calcium nitrate (0, 1, 2, 3 or 4%, DM basis) replacing soybean meal. A period of adjustment was used before moving to the upper nitrate content to avoid toxic effects. For the *in vivo* measurement of methane, animals were kept individually in open circuit chambers. There was a quadratic effect for dry matter intake (1.40; 1.44; 1.36; 1.32 and 1.17 kg DM /day), final body weight (51.52; 51.73; 50.80; 49.20 and 46.09 kg), average daily gain (0.207; 0.213; 0.199; 0.177 and 0.152 kg) and feed efficiency (0.148; 0.151; 0.146; 0.133 and 0.128).

Increased CN intake by lambs promoted reduction of methane production (L/day). The intake of calcium nitrate up to 31g/day reduced on average 28% the production of methane. The slaughter weight (60.8; 57.7; 56.2; 55.9 and 54.9 kg), hot carcass weight (32.3; 31.3; 30.9; 30.9 e 29.9 kg), chilled carcass weight (32.1; 30.8; 30.5; 30.4 e 29.7 kg) and body wall thickness (31.0; 34.5; 28.0; 28.0 e 29.0 mm) were reduced as calcium nitrate increased in the diet. Cooling losses and carcass yield were not affected by using CN. There was no difference in nitrate content and no nitrite residue was detected in meat. There was a quadratic effect on fat thickness (11.2, 8.6, 6.3, 6.9 and 8.5 mm) and rib eye area (15.4; 16.4; 17.5; 17.0 e 15.9 cm²). Regarding meat characteristics, the brightness (35.17; 36.38; 37.76, 37.75 and 36.29) showed a quadratic response. The inclusion of calcium nitrate in the diet of sheep may be used to reduce methane production. However, at levels of from 2% lower fuel consumption and therefore the average daily gain and feed efficiency. In the contents studied calcium nitrate supplied in the diet did not change the values of NO₃ and NO₂ in fresh meat.

Keywords: Feedlot; Nitrite; Non-protein nitrogen; Weight gain

3.1 Introdução

A metanogênese é um processo que utiliza hidrogênios provenientes do metabolismo ruminal, permitindo que cofatores reduzidos sejam reoxidados. No entanto o metano produzido pelos ruminantes compreende 17% das emissões globais de metano e 3,3% dos gases de efeito estufa (KNAPP et al., 2014). Além disso o metano representa uma perda de energia pelos ruminantes.

O nitrato é um ingrediente que está sendo utilizado como alternativa para reduzir a metanogênese ruminal, além de ser uma fonte de nitrogênio não-proteico (HRISTOV et al., 2013). A redução de nitrato é energeticamente mais favorável do que a redução do CO₂; e a presença de nitrato no rúmen redireciona o H₂ que seria usado na metanogênese para a redução de nitrato, diminuindo assim a produção de metano. As bactérias *Selenomonas ruminantium*, *Veillonella parvula*, e *Wollinella Succinogenes* (IWAMOTO, ASANUMA e HINO, 2002) utilizam as enzimas nitrato redutase e nitrito redutase que são produzidas somente quando há presença de nitrato o qual é reduzido a nitrito e posteriormente a amônia (LEWIS, 1951).

A vantagem energética, com o aumento da produção, seja de carne ou leite, devido a redução da produção de metano pela adição de nitrato, não tem sido mostrada na literatura (van Zijderveld et al., 2011). Além disso, pesquisas que avaliaram nitrato em dietas de alta proporção de concentrado são escassas. Segundo Troy et al. (2015) a adição de nitrato é uma

estratégia para mitigar CH_4 , e em dietas com alta proporção de volumoso há uma maior redução de metano do que dietas com alta proporção de concentrado.

Os objetivos neste experimento foram determinar os efeitos da inclusão de teores crescentes de nitrato de cálcio em dietas de alto concentrado sobre o crescimento, consumo alimentar, características de carcaça e produção de metano de borregas confinadas.

3.2 Material e Métodos

Todos os protocolos e procedimentos com os animais experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisas (CEUAP) da ESALQ.

3.2.1 Animais e instalações

No ensaio de desempenho, foram utilizadas 50 borregas Dorper x Santa Inês com peso médio de $37,4 \pm 3,1$ kg (PC $\pm$ DP) e média de 185 ± 4 dias (d $\pm$ DP) de idade. Os animais foram mantidos em baias individuais com dimensões de 1,3 m x 3,5 m, cobertas e com piso de concreto. As baias foram providas de cochos de madeira para fornecimento da ração e bebedouros.

O ensaio de produção de metano foi realizado no Centro de Energia Nuclear de Agricultura (CENA) e iniciou-se ao final do período de desempenho, aos 71 dias de confinamento.

Utilizou-se 34 borregas, de sete blocos e um bloco estava incompleto, pois um animal do tratamento com 1% de NC teve prolapso retal e foi retirada do experimento, as quais estavam adaptadas às dietas experimentais contendo nitrato de cálcio.

Os animais foram alocados nas câmaras para avaliação da produção de metano em blocos. Cada animal foi mantido por cinco dias nas câmaras, sendo três dias de adaptação às gaiolas e dois dias de colheita de metano, totalizando 68 observações da produção de metano. Os animais anteriormente ao período de medição de metano apresentavam consumo de MS em média de 1,3 kg/dia. No entanto quando o animal foi mantido na câmara o consumo foi afetado negativamente variando de 0,07 a 1,4 kg/dia. Devido ao baixo consumo de alguns animais dentro das câmaras, foram utilizadas somente 25 observações da produção de metano. Foram utilizados os dados dos animais que tiveram consumo superior a 600 g de MS/dia, correspondendo a média de 1,14% do peso corporal.

A medida que a medição da produção de metano era realizada os animais retornaram às baias de confinamento, e ao final de todo o período de mensuração do metano (35 dias), 25 animais (5 blocos) foram abatidos para determinação das características de carcaça.

3.2.2 Delineamento experimental e dietas

O período experimental total do desempenho teve duração de 70 dias, divididos em cinco períodos de 14 dias, sendo o primeiro período utilizado para adaptação dos animais às dietas. O ensaio de desempenho foi em delineamento de blocos completos ao acaso, composto por cinco tratamentos, distribuídos em 10 blocos. Os blocos foram determinados pela idade e peso corporal das borregas no início do ensaio. Os tratamentos fornecidos consistiam da dieta controle, contendo farelo de soja e sem a inclusão de NC e teores crescentes de 1%, 2%, 3% e 4% de NC em substituição ao farelo de soja. As dietas foram formuladas para serem isonitrogenadas, contendo 14% de proteína bruta (PB) (Tabela 1). No período de adaptação para evitar intoxicação nos animais, o nitrato de cálcio foi adicionado às dietas gradualmente. No 1º dia todos os animais consumiram a ração controle. No 2º dia os animais dos tratamentos com NC receberam a dieta com 0,5% de NC, e a partir do 3º dia o NC foi adicionado às dietas gradualmente (a cada três dias aumentou-se 1% do teor) para que houvesse adaptação dos animais, até atingir o teor de cada tratamento. Durante o período de adaptação os animais também receberam as dietas isonitrogenadas.

As dietas utilizadas nos experimentos tinham uma relação 20% de volumoso e 80% de concentrado, formuladas pelo Small Ruminant Nutrition System (SRNS) - versão 1.8.6. A fonte do nitrato utilizada foi o sal duplo de nitrato de cálcio e amônio decahidratado. O nitrato de cálcio utilizado possuía 85% de MS, 16,5% de N, 19,6% de cálcio e 66,9% de NO_3^- na MS.

O milho, a casca de soja e o feno de *coastcross* foram grosseiramente moídos utilizando-se um moedor (Nogueira® DPM – 4, Itapira, Brasil) com peneira com crivos de 1cm e misturados ao farelo de soja, calcário, mistura mineral, monensina sódica, sulfato de magnésio monohidratado e nitrato de cálcio utilizando-se um misturador horizontal (Lucato®, Limeira, Brasil) com capacidade para 500 kg. A monensina sódica foi utilizada para evitar coccidiose nos animais (Tabela 1).

As dietas experimentais foram fornecidas na forma de ração total e as sobras foram quantificadas para estimativa do consumo diário de MS e ajuste da quantidade de alimento a ser fornecida, sendo adotado como critério de sobra diária de 10% da oferta para que os animais tivessem consumo *ad libitum*. As sobras foram quantificadas diariamente. A ração foi pesada individualmente para cada animal em balança eletrônica de precisão de 1 grama.

Tabela 1 – Proporção dos ingredientes e composição química das dietas experimentais contendo teores crescentes de nitrato de cálcio (% da MS)

	Dietas ¹				
	0%	1%	2%	3%	4%
Ingredientes					
Feno de <i>coastcross</i>	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Casca de soja	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Milho moído	43,6	45,3	46,4	47,3	48,2
Farelo de soja	13,50	11,40	9,40	7,35	5,35
Nitrato de cálcio	-	1,00	2,00	3,0	4,0
Sulfato de magnésio ²	-	0,11	0,21	0,35	0,46
Calcário calcítico	0,90	0,20	-	-	-
Sal mineral ³	2,00	1,99	1,99	2,0	1,99
Composição química					
Matéria seca, %	88,4	88,3	88,2	87,7	88,2
Matéria orgânica, %	93,0	92,7	91,9	90,8	89,8
Proteína bruta, %	14,8	14,9	14,9	15,2	15,3
FDN ⁴ , %	36,5	32,4	35,2	36,0	36,2
NDT ⁵ estimado, %	75,19	73,72	73,38	77,21	74,17
EM ⁶ , Mcal/kg	2,72	2,67	2,65	2,79	2,68

¹0% = dieta controle com 0% de nitrato de cálcio; 1% = dieta com 1% de nitrato de cálcio; 2% = dieta com 2% de nitrato de cálcio; 3% = dieta com 3% de nitrato de cálcio; 4% = dieta com 4% de nitrato de cálcio. Todas as dietas continham 25 ppm de monensina sódica (Rumensin 200). ²MgSO₄. H₂O (87% de MS, 26,7% de enxofre e 20% de magnésio na MS). ³Composição = 13,4% Ca; 7,5% P; 1% Mg; 7% S; 21,8% Cl; 14,5% Na; 500 ppm Fe; 300 ppm Cu; 4.600 ppm Zn; 1.100 ppm Mn; 80 ppm I; 405 ppm Co; 15 ppm Se. ⁴FDN = Fibra insolúvel em detergente neutro. ⁵NDT = Nutrientes digestíveis totais estimados de acordo com Crampton et al. (1957) e Lofgreen (1953). ⁶EM = Energia metabolizável (Energia Digestível = NDT estimado x 0,04409 e EM = 82% da ED) de acordo com NRC, 1985.

3.2.3 Amostragem e análise dos alimentos

Foram colhidas amostras das sobras e das partidas das rações semanalmente, as quais foram conservadas a -18°C para posterior análise bromatológica. As amostras foram moídas em moinho tipo Wiley provido de peneira de crivos de 1 mm de diâmetro e armazenadas para as análises químicas.

Foi realizada a determinação de MS por meio de secagem das amostras em estufa a 105°C por 24 horas e matéria mineral (MM) através da incineração das amostras em mufla a 550°C por 4 horas (AOAC, 1990). A matéria orgânica foi obtida pela subtração de 100% pelo valor da % da matéria mineral. Para a determinação do nitrogênio total foi utilizado o aparelho Leco FP528 (Leco Corporation, St. Joseph, MI), conforme a AOAC (1997), e fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) conforme Van Soest, Robertson e Lewis (1991), utilizando α -amilase termo estável e sulfito de sódio, em um aparelho Ankom 200 (Ankom Tech. Corp., Fairport, NY).

3.2.4 Desempenho

As borregas foram mantidas em jejum por 12 horas e após foram pesadas no primeiro dia do experimento para obtenção do peso inicial. As pesagens também foram realizadas ao longo do experimento a cada 14 dias para calcular o ganho de peso diário das borregas. Nas pesagens a cada 14 dias os animais foram mantidos em jejum de 6 horas para não ocorrer risco de intoxicação com formação de meta-hemoglobina devido ao excesso de consumo quando os animais recebessem as rações após o jejum.

O fornecimento da ração total foi realizado diariamente e as sobras foram colhidas e quantificadas semanalmente. O consumo médio de MS foi obtido pela diferença da ração fornecida e das sobras. A eficiência alimentar das borregas foi obtida pela relação do ganho de peso médio e consumo de MS.

3.2.5 Produção de metano

Na mensuração do metano foram utilizadas 6 câmaras de circuito aberto. Os animais do mesmo bloco foram mantidos nas câmaras individuais e ao término da medição após 5 dias os animais retornavam as instalações de confinamento e um outro bloco era alocado nas câmaras

para medição da produção de metano. O fornecimento da ração total (fornecida uma vez ao dia às 8:00 horas) e a pesagem das sobras foram realizadas diariamente, quando as borregas permaneciam nas câmaras, para determinação do consumo de MS.

Os animais permaneceram 5 dias consecutivos nas câmaras, 3 dias de adaptação às câmaras e 2 dias de colheita. Foram utilizadas seis câmaras de respiração, cinco com os animais e uma como branco, em circuito aberto (1,57 por 0,71 m por 1,67 a 1,9 m³), como descrito por Abdalla et al. (2012). Os animais entraram nas câmaras de uma maneira escalonada de acordo com o bloco. Os dados de produção de metano de cada animal foram colhidos nas câmaras em duas observações de 23 horas. O gás foi amostrado continuamente em sacos de colheita de gás de 5 L (revestido com película de alumínio) usando uma bomba peristáltica (IPC-N-8 v1.34; Ismatec, Glattbrugg Zürich, Suíça). A velocidade do ar de saída foi medido a cada 2 h usando um anemômetro digital portátil (AD-250 modelo; Instrutherm Instrumentos de Medição Ltda, São Paulo, SP, Brasil), para calcular o volume total do ar circulado nas câmaras. A temperatura (23 ± 2 °C) e umidade ($87 \pm 4\%$) também foram monitorados a cada 2 h para corrigir o volume de gás a pressão e condições de temperatura padrão. As câmaras de respiração foram previamente calibradas inserindo quantidade conhecida de metano puro em cada câmara. A taxa de metano recuperado foi ajustado para 100%. A concentração de metano em gás amostrado foi determinada utilizando um cromatógrafo a gás (Shimadzu 2014, Tóquio, Japão) equipado com uma coluna 100/120 micro Shincarbon ST (1,5875 milímetro de diâmetro externo, 1,0 mm de diâmetro interno e 1 m de comprimento; Resteck, Bellefonte, PA). As temperaturas da coluna, injetor e detector de ionização de chama foram de 60, 200, e 240 °C, respectivamente. O gás hélio a 10 mL/min foi o gás de arraste. A concentração de metano foi determinada por calibração externa utilizando uma curva analítica preparada com metano puro (White Martins Gases Industriais PRAXAIR Inc., Osasco, SP, Brasil; 995 mL/L de pureza).

3.2.6 Abate dos animais, características da carcaça e da carne

Para a avaliação das características de carcaça os animais foram mantidos em jejum alimentar médio de 16 horas, sendo em seguida pesados para obtenção do peso corporal ao abate (PCA). Os animais foram abatidos no frigorífico DiPaulo (Jundiaí, São Paulo, Brasil). Os animais saíram da ESALQ (Piracicaba, São Paulo, Brasil) para o frigorífico cerca de 14 horas antes do abate, e o tempo de transporte foi cerca de uma hora e meia. O abate seguiu as

normas descritas no Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal-RIISPOA.

As carcaças quentes foram pesadas (PCQ) e logo após foram lavadas com água refrigerada a 5 °C para serem resfriadas em câmara de refrigeração a 4°C por 24 horas. Após 24 horas as carcaças foram novamente pesadas para a obtenção do peso da carcaça fria (PCF). O rendimento da carcaça quente (RCQ), rendimento da carcaça fria (RCF) e a perda por resfriamento (PR) foram determinados. Para a determinação do RCQ, RCF e PR foram utilizadas as seguintes equações: $RCQ = (PCQ / PVA) \times 100$; $RCF = (PCF / PVA) \times 100$; $PR = [(PCQ - PCF) / PCQ] \times 100$.

Após 24 horas de refrigeração o músculo *Longissimus dorsi* foi seccionado de maneira transversal. A medida da espessura de gordura subcutânea (EGS) foi realizada sobre o músculo *Longissimus dorsi*, entre 12° e 13° vértebras torácicas e foi determinada dos dois lados da carcaça utilizando-se um paquímetro digital graduado em mm. A face exposta do músculo *Longissimus dorsi* foi desenhada em papel vegetal e sua área mensurada com auxílio de um planímetro graduado em cm² para obtenção da área de olho de lombo (AOL). A espessura da parede corporal (EPC) foi determinada na mesma secção transversal entre a 12° e 13° vértebras torácicas, medida 12,5 cm lateralmente da linha média da coluna vertebral (NOTTER, GREINER, WAHLBERG, 2004). A partir dos valores obtidos do lado direito e esquerdo da carcaça, foi calculada a média aritmética da EGS, EPC e AOL por carcaça.

No frigorífico foram retirados os lombos dos lados esquerdo e direito das carcaças, conservados em caixas térmicas e transportados imediatamente até o laboratório da ESALQ (Piracicaba, São Paulo, Brasil). No laboratório foram retiradas amostras do músculo *Longissimus dorsi* nos lombos do lado direito para determinação da cor. A amostra ficou exposta ao ar atmosférico por 30 minutos para realização da leitura em três pontos distintos de cada amostra. Utilizou-se um colorímetro (Minolta Chroma Meter CR 400) com as seguintes características: área de medição de 8 mm de diâmetro, ângulo de observação 10° e fonte iluminante D65 com componente especular incluído, calibrado em padrão branco. Os parâmetros utilizados na avaliação da cor baseiam-se no sistema colorimétrico estabelecido pelo sistema The Commission Internationale de L'Eclairage, em 1976 e suas definições de cor são: teor de vermelho, representado por a* e teor de amarelo, representado por b*, além da luminosidade representada por L*.

Amostras dos lombos do lado esquerdo das carcaças foram congelados e posteriormente transportados, em caixa térmica contendo gelo seco, até o Instituto de Tecnologia de

Alimentos (ITAL, Campinas, São Paulo, Brasil). Estas amostras foram utilizadas para determinação do resíduo de nitrato de sódio e nitrito de sódio na carne fresca, determinados pelo método de espectrofotometria de acordo com os Métodos físico-químicos para análise de alimentos do Ministério da Saúde (BRASIL, 2005a, b)

3.2.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Proc. MIXED do SAS (2002). Todos os dados foram submetidos ao teste de Shapiro Wilk para verificar a normalidade dos resíduos, a retirada de *outliers* e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene. O conjunto de dados de área de olho de lombo que não respeitaram tais premissas foram submetidos à transformação logarítmica.

A análise da produção de metano foi determinada por regressão não polinomial para a quantidade de metano (L/dia) em relação aos diferentes consumos de NC (g/dia).

Para as variáveis relacionadas ao ganho médio diário, consumo de nutrientes, eficiência alimentar, empregou-se o seguinte modelo de análise:

$$Y_{ijk} = \mu + B_i + T_j + E_{ij} + P_k + (BP)_{ik} + (TP)_{jk} + E_{ijk}$$

onde μ = média geral; B_i = efeito de bloco ($i = 1$ a 10); T_j = efeito do tratamento ($j = 1$ a 5); P_k = efeito de período experimental ($k = 1$ a 5); E_{ij} = erro termo A; $(BP)_{ik}$ = interação bloco x período experimental; $(TP)_{jk}$ = interação tratamento x período experimental, e E_{ijk} = erro termo B. Bloco e interação bloco x período foram incluídos como efeitos aleatórios. Foram testadas várias matrizes e definidas para cada conjunto de dados, utilizando-se a que apresentou menor valor “fit statistics – (AIC)”. Os efeitos de período e interação tratamento x período foram definidos pelo teste F da análise de variância.

Para os parâmetros de carcaça e carne foi utilizado o modelo:

$$Y_{ij} = \mu + B_i + T_j + E_{ij},$$

em que μ = média geral; B_i = efeito de bloco ($i = 1$ a 5); T_j = efeito do tratamento ($j = 1$ a 5), e E_{ij} = erro residual.

O dados de desempenho e características de carcaça foram avaliados por meio de polinômios ortogonais (linear, quadrático e cúbico). Efeito cúbico não foram significativos nas variáveis estudadas. Foram considerados diferenças estatísticas quando $P \leq 0,05$.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Desempenho

Durante o período experimental não foi observado sinal clínico de intoxicação por nitrito nas borregas. A adição de sulfato de magnésio as dietas foi com o objetivo de reduzir os riscos de intoxicação. Segundo Hubert e Voordouw (2007), a adição de sulfato à dieta contendo nitrato, atua como doador de elétrons na redução de nitrito à amônia, evitando a formação de meta-hemoglobina.

Houve efeito quadrático ($P=0,019$) para consumo de MS (Tabela 2). Um dos motivos que pode ter levado a redução do consumo de MS pelos animais pode ter sido o sabor amargo do nitrato. Quando uma experiência desagradável metabólica ocorre em torno da ingestão de um novo alimento, este alimento torna-se aversivo pelo animal e segundo Forbes (1995) o sabor é mais responsável pela aversão do que percepções visuais ou auditivas em mamíferos.

O nitrato anteriormente era considerado apenas como um produto final do metabolismo do óxido nítrico (MONCADA e HIGGS, 1993) ou como componente potencialmente tóxico na dieta tanto de humanos (TANNENBAUM e CORREA, 1985), como de animais. No entanto, atualmente em processos biológicos tem sido cada vez mais importante (LUNDBERG et al., 2008; LARSEN et al., 2011). Segundo alguns autores a suplementação dietética com nitrato causa uma redução no custo de oxigênio de indivíduos saudáveis quando submetidos ao exercício (LARSEN et al., 2007; BAILEY et al., 2010 e LARSEN et al., 2010). O óxido nítrico se liga ao citocromo c oxidase, o aceitador terminal de elétrons no sistema de transporte de elétrons (BROWN e COOPER, 1994). Esta ligação, que é reversível e regulada pelo oxigênio, também pode servir para controlar espécies reativas do oxigênio e regular gradientes de oxigênio no tecido (THOMAS et al., 2001). Além disso, o óxido nítrico estimula a biogênese mitocondrial através de um mecanismo dependente de GMPc (NISOLI et al., 2003). Os efeitos de nitrito pode ser semelhante aos do óxido nítrico (LARSEN et al., 2011). Diante disso, outro motivo que pode ter reduzido o consumo de MS nos teores mais elevados de nitrato pode ser devido a produção de ATP mais eficiente, pois segundo Larser et al. (2011) ocorre efeito poupador de oxigênio sem alterações do lactato na circulação, indicando um metabolismo anaeróbico mais eficiente.

Zijderveld et al. (2010) estudaram cordeiros mestiços Texel fornecendo 2,6% de nitrato e verificaram que não houve diferença no consumo de MS de 990,5 g para os animais consumindo a dieta controle e 987,5 g para os animais consumindo a dieta com nitrato.

Corroborando com este estudo alguns autores observaram que o nitrato influencia no consumo. Newbold et al. (2014) observaram redução do consumo de MS em bovinos da raça Nelore alimentados com teores crescentes de nitrato até 2,4%. Lee et al. (2015) estudaram a inclusão de teores crescentes de nitrato de cálcio de 0 a 3% nas dietas de novilhas e observaram que o teor de 3% de nitrato de cálcio causou tendência na redução do consumo de MS dos animais.

No presente experimento, após 70 dias de confinamento, verificou-se resposta quadrática para o peso corporal final das borregas. Adicionalmente, houve efeito quadrático para ganho médio diário ($P=0,010$) e eficiência alimentar ($P=0,016$) (Tabela 2).

A inclusão de NC até o teor de 1% aumentou o consumo de MS e consequentemente o peso corporal final, o GMD e a EA. Quando se adicionou teores maiores que 2% de NC observou-se redução no consumo de MS e, consequentemente, no desempenho das borregas.

Houve efeito de período para GMD ($P<0,01$), consumo de MS ($P<0,01$) e EA ($P<0,01$). Não houve interação ($P>0,05$) entre tratamento e período para as variáveis GMD e EA, no entanto, houve interação ($P<0,01$) para o consumo de MS (Tabela 2).

Tabela 2 - Desempenho de borregas alimentadas com dietas contendo teores crescentes de nitrato de cálcio

Variáveis ¹	Dietas ²					EPM ³	Valor de P ⁴				Equação	r ²
	0%	1%	2%	3%	4%		L	Q	Per	Dieta*Per		
PCI, kg	37,25	37,42	37,30	37,45	37,40	0,441	-	-	-	-	-	-
PF, kg	51,52	51,73	50,80	49,20	46,09	0,618	<0,01	0,016	-	-	$51,5+0,75x - 0,52x^2$	0,25
GMD, g	207	213	199	177	152	7,923	<0,01	0,010	<0,01	0,216	$209+4,91x-4,88x^2$	0,03
CMS, kg/d	1,40	1,44	1,36	1,32	1,17	0,013	<0,01	0,019	<0,01	<0,01	$1,4+0,04x-0,02x^2$	0,19
EA, kg:kg	0,148	0,151	0,146	0,133	0,128	0,006	<0,01	0,016	<0,01	0,127	$0,15+0,001x-0,002x^2$	0,01

¹PCI = peso corporal inicial; PF = peso final; GMD = ganho de peso médio diário; CMS = consumo de matéria seca; EA = eficiência alimentar

²0% = dietação controle, contendo 0% de nitrato de cálcio; 1% = dieta contendo 1% de nitrato de cálcio; 2% = dieta contendo 2% de nitrato de cálcio; 3% = dieta contendo 3% de nitrato de cálcio; 4% = dieta contendo 4% de nitrato de cálcio.

³EPM = Erro padrão da média.

⁴Efeito de P para o teste de polinômio ortogonal (L = efeito linear; Q = efeito quadrático). Per = valor de P para o período; Dieta*Per = valor de P para interação dieta e período

Realizando o desdobramento da interação durante o primeiro período não houve efeito. Com relação ao segundo e quinto períodos houve efeito linear decrescente (Tabela 3). No terceiro e quarto períodos houve efeito quadrático (Tabela 3). O primeiro período foi o de adaptação dos animais às dietas e como o NC foi adicionado gradativamente não afetou o consumo pelos animais. A partir do segundo período a inclusão de NC influenciou o consumo. No segundo período os animais reduziram o consumo de MS com o aumento dos teores de NC. A partir do terceiro período até o quarto o consumo de MS aumentou até o teor de 1% de NC e no último período o consumo reduziu com a inclusão de NC. A ingestão de ração influencia o desempenho animal que é susceptível de ser maior quando o consumo é aumentado (FORBES, 1995). Assim, o aumento do peso corporal final dos animais foi devido ao aumento do consumo de MS no terceiro e quarto períodos com a inclusão de 1% de NC.

Tabela 3. Consumo de MS por borregas alimentadas com dietas contendo teores crescentes de nitrato de cálcio nos períodos

Período	Dietas ¹					EPM ²	Valor de P ³	
	0%	1%	2%	3%	4%		L	Q
Primeiro	1,27	1,25	1,21	1,21	1,26	0,027	0,52	0,23
Segundo	1,38	1,40	1,31	1,30	1,09	0,028	<0,01	0,08
Terceiro	1,50	1,62	1,53	1,48	1,24	0,028	<0,01	<0,01
Quarto	1,44	1,52	1,46	1,34	1,15	0,027	<0,01	<0,01
Quinto	1,43	1,42	1,29	1,24	1,07	0,029	<0,01	0,20

¹0% = dietação controle, contendo 0% de nitrato de cálcio; 1% = dieta contendo 1% de nitrato de cálcio; 2% = dieta contendo 2% de nitrato de cálcio; 3% = dieta contendo 3% de nitrato de cálcio; 4% = dieta contendo 4% de nitrato de cálcio.

²EPM = Erro padrão da média.

³Efeito de P para o teste de polinômio ortogonal (L = efeito linear; Q = efeito quadrático).

3.3.2 Produção de metano

A análise dos valores de produção de CH₄ (L/dia) é representada pela equação linear: $y = - 0,3072 * (\text{consumo de NC}) + 19,956$ (Figura 1). À medida que o consumo de NC pelas borregas aumentou houve redução (P = 0,0011) da produção de CH₄ (L/dia). A produção de metano por peso corporal (CH₄/PC) é representada pela equação linear: $y = - 0,004 * (\text{consumo de NC}) + 0,350$ (Figura 2). O consumo médio de NC em até 31g permitiu redução de 28% da produção de metano em relação aos animais que não consumiram NC. Segundo

Ungerfeld e Kohn (2006), cada grama de NO_3 ingerida reduz 0,258 g ou 0,361 L de metano. Considerando que nesta pesquisa cada grama de NO_3 , equivalente a 1,49 g de NC ingerido, obteve uma redução de 0,457 L de metano. Corroborando com os resultados obtidos, Lee et al. (2015), Newbold et al. (2014) e van Zijderveld et al. (2010) constataram que a produção de metano reduziu quando bovinos e ovinos, foram alimentados com ração contendo nitrato. van Zijderveld et al. (2010) estudaram ovinos da raça Texel substituindo a ração controle contendo ureia por 2,6% de nitrato e, segundo os autores, na redução de nitrato no rúmen há utilização de quatro moles de hidrogênio, equivalendo ao decréscimo de 25,8 g de metano por 100 g de nitrato consumido.

Figura 1 - Relação da produção de CH_4 (L/dia) e consumo de nitrato de cálcio (g/dia) em borregas. Efeito linear (valor de $P=0,0011$).

O nitrato influencia na redução dos microrganismos metanogênicos, devido à menor disponibilidade de elétrons para essas bactérias ou ainda pela toxicidade do nitrito a esses microrganismos (VAN ZIJDERVELD et al., 2010; HULSHOF et al., 2012). Segundo Iwamoto, Asanuma e Hino (2002), a presença de nitrato favorece o crescimento das bactérias *Selenomonas ruminantium*, *Veillonella parvula*, e *Wolinella succinogenes*, pois estas bactérias são nitroreductoras e obtêm energia a partir da redução de nitrato e /ou nitrito.

Adicionalmente, segundo El-Zaiat et al. (2014), a inclusão de 4,51% de nitrato de cálcio encapsulado (contendo 60,83% NO_3^- na MS) reduziu a população de protozoários no rúmen quando se adiciona nitrato de cálcio. Esta redução é devido aos protozoários estabelecerem uma estreita relação simbiótica com as Archaeas. Protozoários são conhecidos por produzir grandes quantidades de H_2 , o qual é utilizado pelas Archaeas, encontrados dentro e próximas aos protozoários (MORGAVI et al., 2010).

Figura 2 - Relação da produção de metano por peso corporal (CH_4/PC) e consumo de nitrato de cálcio (g/dia) em borregas. Efeito linear (valor de $P=0,003$).

3.3.3 Características de carcaça e carne

Com relação às características de carcaça houve efeito linear decrescente com a inclusão de NC para o PCA ($P=0,026$), PCQ ($P=0,013$), PCF ($P=0,010$) e EPC ($P=0,036$). Houve efeito quadrático para as variáveis EGS ($P=0,016$), AOL ($P=0,027$). Não houve efeito ($P>0,05$) de inclusão do NC nas variáveis RCQ, RCF e PR (Tabela 4). O peso corporal ao abate e consequentemente o peso das carcaças quente e fria foram influenciadas pelo consumo de MS. No tratamento com 4% de NC, o consumo de MS foi reduzido, no entanto a eficiência de utilização de energia pode ter sido aumentada com o NC, ao ser reduzido no rúmen a amônia que foi utilizada pelos microrganismos ruminais para síntese de proteína microbiana e consequentemente propiciou o aumento da fermentação ruminal.

Tabela 4 - Características de carcaça e cor do músculo *Longissimus dorsi* de borregas alimentadas com dietas contendo teores crescentes de nitrato de cálcio

Variáveis ¹	Dietas ²					EPM ³	Valor de P ⁴		Equação	r ²
	0%	1%	2%	3%	4%		L	Q		
Características de carcaça										
PCA, kg	60,8	57,7	56,2	55,9	54,9	0,842	0,016	0,468	59,82-1,36x	0,22
PCQ, kg	32,3	31,3	30,9	30,9	29,9	0,470	0,013	0,604	32,09-0,52x	0,10
PCF, kg	32,1	30,8	30,5	30,4	29,7	0,477	0,010	0,706	31,75-0,52x	0,10
PR, %	0,64	1,42	1,32	1,37	0,79	0,118	0,098	0,645	-	-
RCQ, %	53,1	54,2	55,0	55,2	54,5	0,430	0,651	0,144	-	-
RCF, %	52,8	53,4	54,3	54,5	54,1	0,429	0,830	0,206	-	-
EGS, mm	11,2	8,6	6,3	6,9	8,5	0,506	0,029	0,016	11,36-3,97x+0,81x ²	0,47
EPC, mm	31,0	34,5	28,0	28,0	29,0	0,914	0,036	0,907	32,18-1,04x	0,11
AOL, cm ²	15,4	16,4	17,5	17,0	15,9	0,387	0,826	0,027	15,28+1,81x-0,41x ²	0,15
NaNO ₃ , mg/kg	0,95	0,27	0,19	0,59	0,37	0,096	0,277	0,259	-	-
NaNO ₂ , mg/kg	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-	-	-
Cor do músculo <i>Longissimus dorsi</i>										
L*	35,2	36,4	37,8	37,8	36,3	0,299	0,059	0,046	35,0+2,17x-0,44x ²	0,43
a*	18,7	19,4	19,9	18,7	19,2	0,215	0,889	0,348	-	-
b*	5,45	5,99	6,29	6,05	6,31	0,113	0,277	0,259	-	-

¹PCA = peso corporal ao abate; PCQ = peso de carcaça quente; PCF = peso de carcaça fria; PR = perda por resfriamento; RCQ = rendimento de carcaça quente; RCF = rendimento de carcaça fria; EGS = espessura de gordura subcutânea; EPC = espessura da parede corporal; AOL = área de olho de lombo; NO₃ = nitrato na carne fresca, ; NO₂ = nitrito na carne fresca, L*= luminosidade; a*= teor de vermelho; b*= teor de amarelo. ²0% = dieta controle, contendo 0% de nitrato de cálcio; 1% = dieta contendo 1% de nitrato de cálcio; 2% = dieta contendo 2% de nitrato de cálcio; 3% = dieta contendo 3% de nitrato de cálcio; 4% = dieta contendo 4% de nitrato de cálcio.

³EPM = Erro padrão da média. ⁴Efeito de P para o teste de polinômio ortogonal (L = efeito linear; Q = efeito quadrático). nd = não detectado.

A gordura subcutânea tem participação na maciez da carne ao atuar como isolante, evitando o resfriamento em excesso da carcaça, que produz encurtamento dos sarcômeros e maior dureza da carne (SILVA SOBRINHO et al., 2005). A idade do animal dentre outros fatores influencia na gordura da carcaça. O valor médio da EGS foi 8,3 mm, considerado alto devido a idade dos animais. Os valores encontrados na literatura para cordeiros mestiços Dorper x Santa Inês variam de 1,0 a 3,2 mm (MAIA, 2011; POLIZEL, 2013; SOUSA, 2014). Até teores de 3% de NC observou-se redução da EGS e segundo Okeudo e Moss (2005) a quantidade de gordura presente na carcaça é influenciado pelo peso dos animais. A AOL é uma medida que indica a quantidade de carne (GONZAGA NETO et al., 2006) e quando EGS foi reduzida a AOL foi maior.

Não foi verificada a presença de NaNO_2 na carne fresca em nenhuma das amostras analisadas. Não houve efeito ($P>0,05$) de inclusão do NC no teor de NaNO_3 na carne fresca (Tabela 4). A Organização Mundial para Agricultura e Alimentação (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceram como admissíveis as doses diárias de 3,65 mg de nitrato e 0,133 mg de nitrito/kg de peso corporal (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1973). Os valores de nitrato na carne foram baixos, e variaram em média de 0,19 a 0,95 mg de NaNO_3 e podemos considerar seguro para a alimentação humana.

Com relação a cor do músculo *Longissimus dorsi*, não foi observado efeito ($P>0,05$) da inclusão de NC na variável a^* e b^* . Houve efeito quadrático ($P=0,004$) para L^* (Tabela 4).

A cor da carne utilizando-se colorímetro, é um método objetivo que determina os componentes de cor L^* (luminosidade), a^* (teor de vermelho) e b^* (teor de amarelo). Efeitos diretos das dietas sobre a cor da carne são considerados raros e dependentes de um efeito direto sobre a mioglobina muscular (HOPKINS; NICHOLSON, 1999), que é a principal proteína responsável pela cor da carne (MANCINI; HUNT, 2005). Como o nitrito é um agente oxidante da mioglobina, provavelmente a reação inicial consiste na conversão da mioglobina e oximioglobina em metamioglobina, o que poderia alterar a cor da carne. Portanto, como não foi verificado a presença de nitrito nas amostras analisadas, a ausência de efeito no teor de vermelho é justificado.

A cor da carne também pode ser influenciada por fatores como a gordura que pode ser responsável por diferenças de luminosidade (L^*). A mensuração da espessura da gordura subcutânea tomada acima do músculo *longissimus dorsi* na altura da inserção da 12ª e 13ª vértebra torácica apresenta correlação com o teor de gordura da carcaça (WOOD e MACFIE, 1980; FISHER, 1990). A gordura é mais leve na cor do músculo e, portanto, contribui para o

aumento do valor de luminosidade (PRIOLO; MICOL; AGABRIEL, 2001). No entanto, as carcaças estudadas que tinham menor espessura de gordura subcutânea apresentaram maiores valores de L^* .

3.4 Conclusão

A inclusão de nitrato de cálcio na dieta de ovinos pode ser utilizada para reduzir a produção de metano. No entanto, em teores a partir de 2% reduz o consumo e consequentemente o ganho médio diário e a eficiência alimentar.

Nos teores estudados, o nitrato de cálcio fornecido na dieta não alterou os valores de NaNO_3 e NaNO_2 na carne fresca.

Referências

ABDALLA, A. L.; LOUVANDINI, H.; SALLAM, S. M. A. H.; DA SILVA BUENO, I. C.; TSAI, S. M.; DE OLIVEIRA FIGUEIRA, A. V. *In vitro* evaluation, *in vivo* quantification, and microbial diversity studies of nutritional strategies for reducing enteric methane production. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 44, p. 953-964, 2012.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15th ed. Arlington, 1990. v. 1.

_____. **Official methods of analysis**. 16th ed. Gaithersburg, 1997. 1141 p.

BAILEY, S.J.; FULFORD, J.; VANHATALO, A.; WINYARD, P.G.; BLACKWELL, J.R.; DIMENNA, F.J.; WILKERSON, D.P.; BENJAMIN, N.; JONES, A.M. Dietary nitrate supplementation enhances muscle contractile efficiency during knee-extensor exercise in humans. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 109, p. 135-148, 2010.

BEAUCHEMIN, K. A.; COATES, T.; FARR, B.; MCGINN, S. M. Technical Note: Can the sulfur hexafluoride tracer gas technique be used to accurately measure enteric methane production from ruminally cannulated cattle? **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 90, p. 2727-2732, 2012.

BLAXTER, K. L.; CLAPPERTON, J. L. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. **British Journal of nutrition**, Cambridge, v. 19, p. 511-522, 1965.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. Brasília, 2005. 1018 p.

BROWN, G.C.; COOPER, C.E. Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 356, p. 295-298, 1994.

BRUCE, H.L.; STARK, J.L.; BEIKEN, S.L. The effects of fishing diet and postmortem ageing on the eating quality of the *M. longissimus thoracis* of electrically stimulated Brahman steer carcasses. **Meat Science**, Barking, v. 67, p. 261-268, 2004.

CRAMPTON, E. W. Interrelations between digestible nutrient and energy content, voluntary dry matter intake, and the overall feeding value of forages. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 16, p. 546-552, 1957.

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. Encapsulated nitrate and cashew nut shell liquid on blood and rumen constituents, methane emission, and growth performance of lambs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 92, p. 2214-2224, 2014.

FISHER, A.V. New approaches to measuring fat in the carcasses of meat animals. In: WOOD, J.D., FISHER, A.V. Reducing fat in meat animals. 1. ed. London: Elsevier Science Publishers, 1990. p. 255-343.

FORBES, J.M. **Voluntary food intake and diet selection in farm animals**. 2nd ed. Wallingford: Oxford, 1995. 453 p.

HOPKINS, D.L.; NICHOLSON, A. Meat quality of wether lambs grazed on either saltbush (*Atriplex munonularia*) plus supplements or lucerne. **Meat Science**, Barking, v. 61, p. 91-95, 1999.

HRISTOV, A.N.; OH, J.; FIRKINS, J.L.; DIJKSTRA, J.; KEBREAB, E.; WAGHORN, G.; MAKKAR, H.P.S.; ADESOGAN, A.T.; YANG, W.; LEE, C.; GERBER, P.J.; HENDERSON, B.; TRICARICO, J.M. Special topics: Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 91, p. 5045-5069, 2013.

HUBERT, C.; VOORDOUW, G. Oil field souring control by nitrate reducing *sulfurospirillum* spp. that out compete sulfate-reducing bacteria for organic electron donors. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 2644-2652, 2007.

HULSHOF, R.B.A.; BERNDT, A.; GERRITS, W.J.J.; DIJKSTRA, J.; VAN ZIJDERVELD, S.M.; NEWBOLD, J.R.; PERDOK, D.H.B. Dietary nitrate supplementation reduces methane emission in beef cattle fed sugarcane based diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 90, p. 2317-2323, 2012.

IWAMOTO, M.; ASANUMA, N.; HINO, T. Ability of *Selenomonas ruminantium*, *Veillonella parvula*, and *Wolinella succinogenes* to reduce nitrate and nitrite with special reference to the suppression of ruminal methanogenesis. **Anaerobe**, Amsterdam, v. 8, p. 209-215, 2002.

JOHNSON, K.; HUYLEER, M.; WESTBERG, H.; LAMB, B.; ZIMMERMAN, P. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a sulfur hexafluoride tracer technique. **Environmental science & technology**, Washington, v. 28, p. 359-362. 1994.

KNAPP, J.R.; LAUR, G.L.; VADAS, P.A.; WEISS, W.P.; TRICARICO, J.M. Invited review: enteric methane in dairy cattle production: quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, p. 3231–3261, 2014.

LARSEN, F.J.; WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J.O.; EKBLOM, B. Effects of dietary nitrate on oxygen cost during exercise. **Acta Physiologica**, Oxford, v. 191, p. 59-66, 2007.

LARSEN, F.J.; WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J.O.; EKBLOM, B. Dietary nitrate reduces maximal oxygen consumption while maintaining work performance in maximal exercise. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 48, p. 342-347, 2010.

LARSEN, F. J.; SCHIFFER, T. A.; BORNIQUEL, S.; SAHLIN, K.; EKBLOM, B.; LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E. Dietary inorganic nitrate improves mitochondrial efficiency in humans. **Cell Metabolism**, Maryland Heights, v. 13, p. 149-159, 2011.

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**, Champaign, v. 93, p. 2391-2404, 2015.

LOFGREEN, G. P. The estimation of total digestible nutrients from digestible organic matter. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 12, p.359-365, 1953.

LEWIS, D. The metabolism of nitrate and nitrite in the sheep 1. The reduction of nitrate in the rumen of the sheep. **The Biochemical Journal**, London, v. 48, p. 175, 1951.

LUNDBERG, J.O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M.T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nature Reviews. Drug Discovery**, London, V. 7, p. 156-167, 2008.

MANCINI, R.A.; HUNT, M.C. Current research in meat color. **Meat Science**, Barking, v. 71, p. 100-121, 2005.

MAIA, M. O. **Efeito da adição de diferentes fontes de óleo vegetal na dieta de ovinos sobre o desempenho, a composição e o perfil de ácidos graxos na carne e no leite**. 2011. 140 p. Tese (Doutorado em Ciências)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2011.

MONCADA, S.; HIGGS, A.. The L-arginine-nitric oxide pathway. **The new England Journal of Medicine**. v. 329, p. 2002–2012, 1993.

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

MUÑOZ, C.; YAN, T.; WILLS, D. A.; MURRAY, S.; GORDON, A. W. Comparison of the sulfur hexafluoride tracer and respiration chamber techniques for estimating methane emissions and correction for rectum methane output from dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 95, p. 3139-3148, 2012.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of sheep. 6th ed. Washington: National Academy Press, 1985. 99 p.

- NETO, S. G.; DA SILVA SOBRINHO, A. G.; LOPES, N. M. B.; ZEOLA, C. A. T. M.; DE AZEVEDO SILVA, A. M.; MORAIS, J.; PEREIRA FILHO, Â. C. D. F. Características quantitativas da carcaça de cordeiros deslanados Morada Nova em função da relação volumoso: concentrado na dieta 1. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, p. 1487-1495, 2006.
- 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**, Champaign, v. 92, p. 5032-5040, 2014.
- NISOLI, E., CLEMENTI, E., PAOLUCCI, C., COZZI, V., TONELLO, C., SCIORATI, C., BRACALE, R., VALERIO, A., FRANCOLINI, M., MONCADA, S., CARRUBA, M. O.. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. **Science**, Washington, v. 299, p. 896-899, 2003.
- NOTTER, D. R.; GREINER, S. P.; WAHLBERG, M. L. Growth and carcass characteristics of lambs sired by Dorper and Dorset rams. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, p.1323-1328, 2004.
- OKEUDO, N. J.; MOSS, B. W. Interrelationships amongst carcass and meat quality characteristics of sheep. **Meat Science**, Barking, v. 69, p. 1-8, 2005.
- POLIZEL, D. M. **Inclusão de glicerina bruta em substituição parcial ao milho na dieta de ovinos**. 2013. 119 p. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2013.
- PRIOLO, A.; MICOL, D.; AGABRIEL, J. Effects of grass feeding systems on ruminant meat color and flavor. A review. **Animal Research**, Cambridge, v. 50, p. 185-200, 2001.
- SAS INSTITUTE. **Sas systems for Windows**: version 9. Cary, 2002.
- SILVA SOBRINHO, A. G. D.; PURCHAS, R. W.; KADIM, I. T.; YAMAMOTO, S. M. Características de qualidade da carne de ovinos de diferentes genótipos e idades ao abate. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 34, p. 1070-1078, 2005.
- SOUSA, R. A. Carvão de algodão moído na alimentação de cordeiros(as) em confinamento. 2014. 102 p. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2014.
- UNGERFELD, E.M.; KOHN, R.A. The role of thermodynamics in the control of ruminal fermentation. In: SEJRSEN, K.; HVELPLUND, T.; NIELSEN, M.O. **Ruminant physiology: digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress**. Wageningen: Academic Publishers, 2006. p. 55-85.
- TANNENBAUM, S.R.; CORREA, P. . Nitrate and gastric cancer risks. **Nature**, London, v. 317, p. 675-676, 1985.

THOMAS, D. D.; LIU, X.; KANTROW, S. P.; LANCASTER, J. R., . The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.98, p. 355-360, 2001.

TROY, S. M.; DUTHIE, C. A.; HYSLOP, J. J.; ROEHE, R.; ROSS, D. W.; WALLACE, R. J.; WATERHOUSE, A.; ROOKE, J. A. Effectiveness of nitrate addition and increased oil content as methane mitigation strategies for beef cattle fed two contrasting basal diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 93, p. 1815-1823, 2015.

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

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**, Champaign, v. 94, p. 4028-4038, 2011.

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**, Champaign, v. 93, p. 5856-5866, 2010.

WOOD, J.D., MACFIE, H.J.H. The significance of breed in the prediction of lamb carcass composition from fat thickness measurements. **Animal Production**, Victoria, v. 31, p. 315-319, 1980.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Toxicological evaluation of certain food additives with a review of general principles and of specifications**: seventeenth report of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva, 1973. 42 p. (FAO Nutrition Report Series, 539).

4 DIGESTIBILIDADE DOS NUTRIENTES, BALANÇO DE NITROGÊNIO E CONSTITUENTES RUMINAIS EM OVINOS ALIMENTADOS COM NITRATO DE CÁLCIO ENCAPSULADO

Resumo

O nitrato interfere na metanogênese e modifica o metabolismo ruminal. Cinco ovinos com peso de $74,6 \pm 6,5$ kg (PC $\pm$ DP), canulados no rúmen, foram utilizados para avaliar os efeitos do uso de dietas contendo teores crescentes (0, 1, 2, 3 ou 4% na matéria seca) de nitrato de cálcio encapsulado (NCE) substituindo o farelo de soja sobre o consumo, a digestibilidade, o balanço de nitrogênio, a concentração ruminal dos ácidos graxos de cadeia curta, o nitrogênio amoniacal e o pH ruminal. Os animais foram distribuídos em delineamento de Quadrado Latino 5 x 5 e alimentados com dietas contendo 14% de proteína bruta. Houve efeito quadrático para o consumo de matéria seca (1,82; 1,87; 2,07; 1,84 e 1,61 kg/d) e consumo de água/kg MS (3,17; 3,53; 3,12; 3,40 e 3,77 kg/kg). Houve efeito linear crescente para a digestibilidade da matéria orgânica (77,74; 76,56; 76,87; 81,96 e 79,70%), da fibra em detergente neutro (65,47; 64,86; 65,10; 70,67 e 69,95%) e da proteína bruta (67,78; 67,50; 69,30; 74,94 e 75,09%). O N retido (13,26; 15,15; 19,78; 19,73 e 17,43 g/d) apresentou resposta quadrática. Houve efeito linear decrescente para o N fecal (14,63; 15,08; 16,01; 12,24 e 11,14 g/d). Houve efeito quadrático para a concentração de ácidos graxos de cadeia curta total (89,54; 91,25; 97,33; 100,6 e 74,76 mM) e na proporção molar de ácido valérico (0,85; 0,70; 0,79; 0,62; 0,41 mM/100mM). Houve efeito linear crescente para o ácido acético (64,51; 62,36; 65,52; 68,00 e 69,21 mM/100mM). Houve efeito linear decrescente para o ácido butírico (9,81; 8,49; 9,41; 9,38; 6,69 mM/100mM) e isobutírico (0,66; 0,56; 0,55; 0,53 e 0,47 mM/100mM). Houve efeito quadrático para o N-NH₃ (17,25; 17,48; 17,51; 18,57 e 13,74 mg/dL) e efeito linear crescente para o pH ruminal. O nitrato de cálcio encapsulado até teores de 4% para ovinos aumenta a digestibilidade dos nutrientes e da fibra insolúvel em detergente neutro, o pH ruminal e a proporção de ácido acético em relação a concentração de AGCC. No entanto o consumo é reduzido quando o NCE é adicionado em teores de 4%.

Palavras-chave: Ácidos graxos de cadeia curta; Nitrogênio amoniacal; Nitrogênio não-proteico; pH ruminal

Abstract

Nitrate interferes with methanogenesis and changes ruminal metabolism. Five sheep weighing 74.6 ± 6.5 kg (BW $\pm$ SD), cannulated in the rumen, were used to determine the effects of feeding diets containing increasing levels (0, 1, 2, 3 or 4%, dry matter basis) of encapsulated calcium nitrate (ECN) replacing soybean meal on intake, nutrient digestibility, nitrogen balance, ruminal concentration of short-chain fatty acids, ruminal ammonia and ruminal pH. Animals were distributed in a 5 x 5 Latin Square design and fed diets containing 14% crude protein. There was a quadratic effect on dry matter intake (1.82; 1.87; 2.07; 1.84 and 1.61 kg/d) and water consumption/kg DM (3.17; 3.53; 3.12; 3.40 and 3.77 kg/kg). There was a linear increase for organic matter digestibility (77.74; 76.56; 76.87; 81.96 and 79.70%), neutral detergent fiber (65.47; 64.86; 65.10; 70.67 and 69.95%) and crude protein (67.78; 67.50; 69.30; 74.94 and 75.09%). There was a quadratic effect for retained N (13.26; 15.15; 19.78; 19.73 and 17.43 g/d). There was a linear decrease for fecal N (14.63; 15.08; 16.01; 12.24 and 11.14 g/d). There was a quadratic effect on total short-chain fatty acids (89.54; 91.25; 97.33; 100.6 and 74.76 mM) concentration and the molar concentration of valeric acid

(0.85; 0.70; 0.79; 0.62; 0.41 mM/100 mM). Acetic acid (64.51; 62.36; 65.52; 68.00 and 69.21 mM/100 mM) increased linearly, while butyric acid (9.81; 8.49; 9.41; 9.38; 6.69 mM/100 mM) and isobutyric acid (0.66; 0.56; 0.55; 0.53 and 0.47 mM / 100 mM) decreased linearly. There was a quadratic effect for N-NH₃ (17.25; 17.48; 17.51; 18.57 and 13.74 mg/dL) and an increasing linear effect for ruminal pH. The encapsulated calcium nitrate up to 4% for sheep increases the digestibility of the nutrients and insoluble in neutral detergent fiber, ruminal pH and the proportion of acetic acid relative concentration of SCFA. However intake is reduced by 4% ECN.

Keywords: Ammonia; Non-protein nitrogen; Ruminal pH; Short-chain fatty acids

4.1 Introdução

A alimentação fornecida aos animais está relacionada com o desempenho dos animais, pois os componentes da alimentação dos ruminantes influenciam nos microrganismos e nos produtos gerados na fermentação ruminal. O nitrato é um sal inorgânico com alto potencial redox e também pode ser utilizado como um efetivo redutor da metanogênese (HRISTOV et al., 2013), além de poder substituir em parte ingredientes proteicos (ZHOU et al., 2012). A via predominante do metabolismo de nitrato no rúmen é a redução de nitrato com subsequente redução de nitrito à amônia (LENG, 2008).

Em animais não adaptados, a capacidade da microflora ruminal em reduzir o nitrato à nitrito excede a capacidade de redução de nitrito à amônia (LEWIS, 1951). Isto leva à acumulação de nitrito no rúmen, que é prontamente absorvido na parede ruminal e converte a hemoglobina no sangue em metemoglobina, que confere à molécula incapacidade de transportar oxigênio para os tecidos (MORRIS et al., 1958). Uma estratégia para diminuir os riscos de toxicidade com nitrito, é fazer a adaptação por aumentos graduais de nitrato na dieta. No entanto, apesar da adaptação, a intoxicação por nitrito pode ocorrer, dependendo dos níveis de nitrato na dieta e das taxas de consumo (LEE et al., 2015a). Portanto, o nitrato encapsulado foi desenvolvido para reduzir a produção de metano entérico e também a sua potencial toxicidade.

O objetivo neste experimento foi avaliar teores crescentes de nitrato de cálcio encapsulado em substituição ao farelo de soja sobre o consumo e digestibilidade dos nutrientes, balanço de nitrogênio, pH, ácidos graxos de cadeia curta e nitrogênio amoniacal ruminal em ovinos.

4.2 Material e métodos

Este estudo foi realizado de outubro de 2012 a março de 2013. Todos os protocolos e procedimentos com os animais experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisas (CEUAP) da ESALQ.

4.2.1 Instalações e animais

O ensaio experimental foi conduzido nas instalações do Sistema Intensivo de Produção de Ovinos e Caprinos (SIPOC) do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo em Piracicaba. Está situado na latitude 22°43’31” S e longitude 47°38’57” W, com altitude de 547 metros.

Foram utilizados cinco ovinos machos inteiros, F1 Dorper x Santa Inês, canulados no rúmen. Os animais tinham peso médio de $74,6 \pm 6,5$ kg (PC $\pm$ DP) e aproximadamente um ano e meio de idade. Os animais foram everminados com moxidectin (Cydectin, Fort Dodge Saúde Animal, Campinas, São Paulo, Brasil) na dosagem de 1 mL/50 kg de peso corporal antes do início do experimento.

Os animais permaneceram alojados em sistema de “tie stall” durante o período de adaptação e durante as colheitas foram alocados individualmente em gaiolas metálicas para ensaios de metabolismo, com dimensões de 1,30 x 0,55 m, providas de cocho, bebedouros e dispositivos para colheita de fezes e urina. Os animais foram pesados no início do experimento e no início de cada período sem jejum alimentar.

4.2.2 Delineamento experimental e dietas

O experimento teve duração de 95 dias, sendo dividido em cinco períodos de 19 dias, sendo os primeiros 13 dias destinados à adaptação dos animais às dietas experimentais e nos últimos seis dias foram realizadas as colheitas de dados. Os animais foram pesados no início de cada período. O delineamento experimental utilizado foi o Quadrado Latino 5 x 5.

Os tratamentos fornecidos consistiam da dieta controle, contendo farelo de soja e sem a inclusão de NCE e teores crescentes de 1%, 2%, 3% e 4% de NCE em substituição ao farelo de soja (Tabela 5). Foram testadas cinco dietas com relação de 20% de volumoso e 80% de

concentrado formuladas pelo Small Ruminant Nutrition System (SRNS) - versão 1.8.6. As dietas foram formuladas para serem isonitrogenadas, contendo 14% de proteína bruta.

O nitrato de cálcio encapsulado utilizado é protegido por uma patente internacional e foi produzido pela GRASP Ind. & Com. LTDA (Curitiba, Paraná, Brasil). O produto foi fabricado usando o sal duplo de cálcio e nitrato de amônio deca-hidrato revestido com uma matriz de liberação controlada. O nitrato de cálcio utilizado era composto de 13% de N, 16,3% de cálcio e 66,9% de NO_3^- com 85,3% de MS.

Tabela 5 – Proporção dos ingredientes e composição química das dietas contendo teores crescentes de nitrato de cálcio encapsulado (% da MS)

	Dietas ¹				
	0%	1%	2%	3%	4%
Ingredientes					
Feno de <i>coastcross</i>	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Casca de soja	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Milho moído	44,3	46,7	48,3	48,4	49,5
Farelo de soja	12,7	10,0	7,49	6,24	4,04
Nitrato de cálcio	-	1,00	2,00	3,00	4,00
encapsulado					
Sulfato de magnésio ²	-	0,11	0,21	0,35	0,46
Calcário calcítico	0,92	0,19	-	-	-
Sal mineral ³	2,08	2,00	2,00	2,01	2,00
Composição química					
Matéria seca, %	89,4	88,8	88,8	88,3	88,8
Matéria orgânica, %	93,5	93,8	93,8	93,5	93,0
Proteína bruta, %	14,2	14,1	14,1	15,3	15,1
FDN ⁴ , %	29,3	28,6	29,9	29,9	29,6
NDT estimado ⁵ , %	75,59	74,60	74,81	79,51	76,51
EM ⁶ , Mcal/kg	2,73	2,70	2,71	2,88	2,78

¹0% = dieta controle com 0% de nitrato de cálcio ; 1% = dieta com 1% de nitrato de cálcio encapsulado; 2% = dieta com 2% de nitrato de cálcio encapsulado; 3% = dieta com 3% de nitrato de cálcio encapsulado; 4% = dieta com 4% de nitrato de cálcio encapsulado. Todas as dietas continham 25 ppm de monensina sódica (Rumensin 200). ²MgSO₄. H₂O (87% de MS, 26,7% de enxofre e 20% de magnésio). ³Composição = 13,4% Ca; 7,5% P; 1% Mg; 7% S; 21,8% Cl; 14,5% Na; 500 ppm Fe; 300 ppm Cu; 4.600 ppm Zn; 1.100 ppm Mn; 80 ppm I; 405 ppm Co; 15 ppm Se. ⁴FDN = Fibra insolúvel em detergente neutro. ⁵NDT = Nutrientes digestíveis totais estimados de acordo com Crampton et al. (1957) e Lofgreen (1953). ⁶EM = Energia metabolizável (Energia Digestível = NDT estimado x 0,04409 e EM = 82% da ED) de acordo com NRC, 1985.

O milho, a casca de soja e o feno de *coastcross* foram grosseiramente moídos utilizando-se um moedor (Nogueira[®] DPM – 4, Itapira, São Paulo, Brasil) com peneira com crivos de 1 cm e misturados ao farelo de soja, calcário, mistura mineral, monensina sódica, sulfato de magnésio monohidratado e nitrato de cálcio utilizando-se um misturador horizontal (Lucato[®], Limeira, São Paulo, Brasil) com capacidade para 500 kg. A monensina sódica foi utilizada para evitar coccidiose nos animais.

O fornecimento da dieta foi na forma de ração total, em cochos. No 1º dia todos os animais consumiram a ração controle. A partir do 2º dia o NCE foi adicionado às dietas gradualmente (a cada três dias aumentou-se 1% do teor) para que houvesse adaptação dos animais, até atingir o teor de cada tratamento, na MS.

4.2.3 Consumo e digestibilidade dos nutrientes

As sobras do alimento oferecido foram quantificadas diariamente para a estimativa do consumo diário de MS e ajuste da quantidade de alimento a ser fornecida por animal, sendo permitido sobrar 10% da oferta para que os animais tivessem consumo *ad libitum*. A ração foi pesada individualmente para cada animal em balança eletrônica de precisão de 1 g (Marte[®], LC 100, São Paulo, Brasil) e ofertada aos animais diariamente às 8 horas da manhã.

Do 14º ao 18º dia de cada período a oferta, sobras e fezes de cada animal foram pesadas, amostradas (10%) e conservadas a -18°C para posterior análise e cálculo de digestibilidade aparente dos nutrientes. Para a colheita das fezes, utilizou-se arreios providos de bolsas coletoras de fezes, a fim de evitar a mistura das fezes com a urina.

As análises foram realizadas no Laboratório de Nutrição e Reprodução Animal e no Laboratório de Bromatologia, ambos do Departamento de Zootecnia da ESALQ – USP. As amostras de fezes foram pré-secadas em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas. As amostras pré-secas de fezes e as amostras das rações e das sobras foram moídas em moinho provido de peneira tipo Wiley de crivos de 1 mm de diâmetro e armazenadas para as análises químicas no laboratório de bromatologia. Foi realizada a determinação de MS por meio de secagem das amostras em estufa a 105°C por 24 horas e matéria mineral (MM) através da incineração das amostras em mufla a 550°C por 4 horas (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC, 1990). Para a determinação do nitrogênio total das fezes, rações e sobras foi utilizado o aparelho Leco FP528 (Leco Corporation, St. Joseph, MI), conforme a ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC (1997) e

fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) conforme Van Soest, Robertson e Lewis (1991), utilizando α -amilase termoestável e sulfito de sódio, em um aparelho Ankom 200 (Ankom Tech. Corp., Fairport, NY).

A digestibilidade aparente dos nutrientes foi calculada a partir da seguinte formula:

$$\text{DAT} (\%) = [(\text{MSC} \cdot \text{NMS}) - (\text{MSF} \cdot \text{NMF}) / (\text{MSC} \cdot \text{NMS})] \cdot 100$$

MSC = material seca consumida;

MSF = matéria seca fecal;

NMF = porcentagem do nutriente na matéria seca fecal;

NMS = porcentagem do nutriente na matéria seca consumida.

4.2.4 Consumo de água

Do 14º ao 18º dia também foi quantificado o consumo de água. Diariamente a oferta de água foi pesada em baldes plásticos e ao final de 24 horas a sobra foi novamente pesada para cálculo do consumo. Além disso, um balde com as mesmas características dos usados nas gaiolas foi utilizado para avaliar a perda por evaporação. Pela diferença entre o peso inicial e final foi calculado a perda por evaporação. Esse valor foi usado para correção dos dados de consumo de água.

4.2.5 Balanço de nitrogênio

Do 14º ao 18º dia foram colhidas as amostras de urina produzida em 24 horas. A urina foi colhida em recipientes plásticos contendo solução de ácido clorídrico a 50% para manter o pH da urina abaixo de 3, evitando perda de nitrogênio. O total colhido foi medido e homogeneizado, sendo em seguida filtrado e retirado uma alíquota de 10% que posteriormente foi composta por animal e por período. O nitrogênio da urina foi determinado em micro Kjeldahl segundo a ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC (1990). O balanço de nitrogênio (N) foi calculado através das fórmulas:

$$\text{Nitrogênio absorvido (g/d)} = \text{N consumido} - \text{N fecal}$$

$$\text{Nitrogênio retido (g/d)} = \text{N absorvido} - \text{N urinário}$$

$$\text{Balanço de N (\% N absorvido)} = (\text{N retido} / \text{N absorvido}) \cdot 100$$

$$\text{Balanço de N (\% N ingerido)} = (\text{N retido} / \text{N ingerido}) \cdot 100$$

4.2.6 Constituintes ruminais

A colheita do conteúdo ruminal foi realizada no último dia de cada período (19º dia), com intervalos de duas horas entre as colheitas, sendo a hora zero o momento antes do fornecimento de alimento e 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas após o fornecimento da ração. Uma amostra do conteúdo ruminal foi obtida de cada animal, via cânula, sendo rapidamente filtrada em tecido de algodão, obtendo aproximadamente 200 mL de fluido ruminal filtrado e em seguida o pH foi determinado em potenciômetro digital. A fase sólida do conteúdo ruminal que permaneceu no tecido de algodão, após a filtração, foi devolvida ao rúmen. Após determinar o pH das amostras de fluido ruminal foram retiradas duas alíquotas de 20 mL, as quais foram armazenadas em frascos plásticos e congeladas a -18°C para posteriores análises de AGCC e nitrogênio amoniacal (N-NH₃).

Para a determinação dos AGCC, foram misturados 1,2 mL do fluido ruminal, 0,3 mL de solução 3:1 de metafosfórico 25% com ácido fórmico 98-100% e 0,15 mL de solução de ácido 2-etil-butírico 100 mM (padrão interno) e foram centrifugados a 12.000 x g durante 30 minutos e a 4°C. Posteriormente, 1,2 mL de cada amostra foi transferido para “vials” cromatográficos. Desse extrato injetou-se 1 µL em cromatógrafo gasoso (CG HP 7890^a; Injetor HP 7683B, Agilent Technologies) equipado com coluna capilar HP-FFAP (1909F-112; 25 m; 0,32 mm (diâmetro externo); 0,5 µm (diâmetro interno); J&W Agilent Technologies). A injeção foi realizada de maneira automática. O gás de arraste utilizado foi o H₂, mantido em fluxo de 31,35 mL/min. A temperatura do injetor e detector foi de 260°C. O tempo total da análise cromatográfica foi de 16,5 minutos, dividido em três rampas de aquecimento: 80°C (1min), 120°C (20°C/min; 3min) e 205°C (10°C/min; 2 min). A concentração dos AGCC (mM) foi determinada com base em uma curva de calibração externa.

Para determinação do N-NH₃ as amostras foram centrifugadas 12.000 x g, durante 20 minutos e a 4°C. Uma fração do sobrenadante foi utilizada para análise de N-NH₃, segundo o método colorimétrico descrito por Chaney e Marbach (1962) e adaptado para ser usado em placas de microtítulo com posterior leitura em aparelho do tipo “ELISA READER” (absorbância de 550 nm).

4.2.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o MIXED do SAS (2002). Todos os dados foram submetidos ao teste de Shapiro Wilk para verificar a normalidade dos resíduos, a retirada de outliers e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene.

Os dados relacionados à fermentação ruminal foram analisados como medidas repetidas no tempo.

O modelo estatístico empregado foi:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + T_j + P_k + E_{ijk} + H_r + (TH)_{jr} + (HP)_{rk} + (HA)_{ri} + E_{ijk},$$

Em que μ = média geral; A_i = efeito de animal ($i = 1$ a 5); T_j = efeito de tratamento ($j = 1$ a 5); P_k = efeito de período ($k = 1$ a 5); E_{ijk} = erro termo A; H_r = efeito de hora ($r = 0, 2, 4, 6, 8, 10$ e 12); $(TH)_{jr}$ = efeito da interação tratamento x hora, $(HP)_{rk}$ = efeito da interação hora x período; $(HA)_{ri}$ = efeito da interação hora x animal; e E_{ijk} = erro termo B.

Período, animal, interação hora x período e interação hora x animal foram incluídos como efeitos aleatórios. Foram testadas várias matrizes e definidas para cada conjunto de dados, utilizando-se a que apresentou menor valor “fit statistics – (AIC)”. Os efeitos de hora e interação tratamento x hora foram definidos pelo teste F da análise de variância.

Os dados de consumo e digestibilidade aparente dos nutrientes e balanço de nitrogênio foram analisados pelo modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + T_j + P_k + E_{ijk},$$

Em que μ = média geral; A_i = efeito de animal ($i = 1$ a 5); T_j = efeito de tratamento ($j = 1$ a 5); P_k = efeito de período ($k = 1$ a 5), e E_{ijk} = erro residual.

Período e animal foram incluídos como efeitos aleatórios. O conjunto de dados foi avaliado por meio de polinômios ortogonais (linear, quadrático e cúbico).

O conjunto de dados foi avaliado por meio de polinômios ortogonais (linear, quadrático e cúbico). As diferenças estatísticas foram consideradas quando o $P \leq 0,05$.

4.3 Resultados e discussão

Houve efeito quadrático no consumo de água/kg de MS consumida ($P=0,05$). Houve uma tendência linear crescente ($P=0,055$) no consumo diário de água (kg) com o aumento dos teores de NCE (Tabela 6). As exigências dos animais por água são influenciados pela quantidade e o tipo de alimento consumido (FORBES, 1995). O aumento da inclusão do NCE

influenciou o aumento do consumo de água pelos ovinos. Em ruminantes o mecanismo de controle do balanço hídrico no rúmen é importante na manutenção do equilíbrio de água e na regulação osmótica. Isto depende do balanço entre a entrada de água, principalmente a partir da ingestão de água (LÓPEZ et al., 1994). O consumo de água parece ter sido influenciado pelo consumo de NCE em teores mais elevados e observa-se que a medida que os animais consumiram mais NCE houve aumento do consumo de água.

Observou-se efeito quadrático nas variáveis consumo de MS ($P=0,004$), MO ($P=0,007$), FDN ($P=0,004$) e PB ($P=0,034$) (Tabela 6). A inclusão de NCE até 2% influenciou no aumento do consumo de MS, consequentemente, no aumento do consumo da MO, FDN e PB. Semelhante ao que foi observado no primeiro capítulo, teores acima de 2% de NC reduziram o consumo de MS. O consumo pode ter sido reduzido devido as características organolépticas do nitrato, o qual tem um sabor amargo.

Estudos com humanos tem mostrado que a ingestão de NO_3 causa uma redução no custo de oxigênio durante o exercício. Isto é um indicativo de um melhoramento na eficiência mitocondrial (FULFORD et al., 2013). Portanto o consumo de nitrato pelos ovinos pode ter afetado a redução do consumo de MS devido a produção de ATP mais eficiente, pois segundo Larser et al. (2011), ocorre efeito poupador de oxigênio, indicando um metabolismo anaeróbio mais eficiente.

Com relação à digestibilidade dos nutrientes não houve efeito ($P>0,05$) na digestibilidade da MS. Houve efeito linear crescente para a digestibilidade da MO ($P=0,038$), da FDN ($P=0,044$) e PB ($P<0,0001$) (Tabela 6). Poucos estudos utilizando nitrato avaliaram a digestibilidade de nutrientes e segundo Nolan et al. (2010) e Li et al. (2012) o nitrato não influenciou na digestibilidade. No entanto Lee et al. (2015b) observaram aumento da digestibilidade da MS quando aumentou os níveis de nitrato de cálcio encapsulado na dieta de bovinos. No presente estudo o aumento dos teores de NCE aumentou a digestibilidade da MO, FDN e PB. Nos tratamentos até 3% de NCE, provavelmente o aumento da digestibilidade foi devido a uma melhor sincronização de carboidratos e nitrogênio proveniente da redução de nitrato a amônia, pois o encapsulamento do nitrato de cálcio permite que o nitrato seja solubilizado gradativamente. Segundo o NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC (1996) de bovino de corte, ocorre aumento da síntese de proteína microbiana quando se tem disponibilidade de proteína degradável no rúmen com disponibilidade de carboidrato fermentável e pH ruminal adequado.

Tabela 6 – Consumo diário e digestibilidade aparente total dos nutrientes em ovinos alimentados com dietas contendo teores crescentes de nitrato de cálcio encapsulado

Variáveis ¹	Dietas ²					EPM ³	Valor de P ⁴		Equação	r ²
	0%	1%	2%	3%	4%		L	Q		
Consumo diário										
Água, kg	6,62	7,25	7,14	6,85	6,42	0,348	0,055	0,5308	7,07-0,10x	0,006
Água/CMS ⁵ , kg/kg	3,17	3,53	3,12	3,40	3,77	0,199	0,658	0,050	3,30-0,01x+0,05x ²	0,03
MS, kg	1,82	1,87	2,07	1,84	1,61	0,052	0,073	0,004	1,79+0,24x-0,072x ²	0,28
MO, kg	1,70	1,73	1,95	1,70	1,49	0,053	0,092	0,007	1,67+0,23x-0,07x ²	0,29
FDN, kg	0,54	0,55	0,62	0,56	0,49	0,015	0,158	0,004	0,53+0,07x-0,020x ²	0,27
PB, kg	0,26	0,26	0,29	0,28	0,24	0,009	0,660	0,034	0,25+0,04x-0,009x ²	0,16
Digestibilidade aparente total										
MS, %	76,45	75,46	75,23	78,87	77,51	0,703	0,150	0,477	-	-
MO, %	77,74	76,56	76,87	81,96	79,70	0,761	0,038	0,513	76,79+0,85x	0,12
FDN, %	65,47	64,86	65,10	70,67	69,95	1,210	0,044	0,524	64,25+1,48x	0,13
PB, %	67,78	67,50	69,30	74,94	75,09	1,043	<0,0001	0,631	66,52+2,20x	0,46

¹CMS = consumo de matéria seca; MS = matéria seca; MO = matéria orgânica; MM = matéria mineral; FDN = fibra em detergente neutro; PB = proteína bruta.

²0% = dieta controle, contendo 0% de nitrato de cálcio encapsulado; 1% = dieta contendo 1% de nitrato de cálcio encapsulado; 2% = dieta contendo 2% de nitrato de cálcio encapsulado; 3% = dieta contendo 3% de nitrato de cálcio encapsulado; 4% = dieta contendo 4% de nitrato de cálcio encapsulado.

³EPM = Erro padrão da média.

⁴Efeito de P para o teste de polinômio ortogonal (L = efeito linear; Q = efeito quadrático).

⁵Água/MS = Consumo de água por kg de matéria seca consumida.

A adição de nitrato na alimentação de ruminantes aumenta os microrganismos *Streptococcus bovis* e *Selonomonas ruminantium* que degradam o amido (ASANUMA, YOKOYAMA e HINO, 2015). As dietas experimentais tinham alta quantidade de concentrado (Tabela 5) e contendo em grande parte milho moído como fonte de amido.

A taxa de passagem afeta a digestibilidade, pois quanto mais rápida a digesta flui do rúmen menos tempo os microrganismos têm para fermentar a mesma, diminuindo a digestibilidade (OWENS e GOETSH, 1986). No tratamento com 4% de NCE a digestibilidade foi aumentada provavelmente devido ao consumo de MS e MO ter sido reduzido, o que provavelmente reduziu a taxa de passagem, e permitiu que os alimentos fossem fermentados no rúmen por mais tempo.

O nitrito inibe as bactérias que produzem ATP através de sistemas de transporte de elétrons, mas não tem efeito sobre as bactérias que dependem da glicólise para produção de ATP (ROWE et al., 1979). As bactérias celulolíticas *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Bacteriodes succinogenes* produzem ATP através de sistemas de transporte de elétrons e o crescimento delas, segundo Dawson et al. (1979) foi afetado na presença de nitrato. No entanto, segundo Yoshii, Asanuma e Hino (2003) a coexistência das bactérias celulolíticas facilitou o crescimento do *Selonomonas ruminantium* num meio contendo celulose, e consequentemente, aumentou a redução de nitrato o que pode ser importante para melhorar a digestão de fibra. Nesta pesquisa o nitrato de cálcio propiciou o aumento da digestibilidade da FDN. Além disso, segundo Russel et al. (1992) a digestibilidade da FDN é aumentada quando se adiciona fontes de NNP e isto provavelmente é devido os microrganismos que fermentam a celulose e hemicelulose utilizarem amônia como fonte de nitrogênio para a síntese de proteína microbiana.

Houve efeito quadrático para o N ingerido ($P=0,042$) e N retido em g/dia ($P=0,011$). Houve tendência de efeito quadrático para o N fecal ($P=0,055$) e N absorvido ($P=0,053$). Houve efeito linear crescente do N retido em relação a % N absorvido ($P=0,038$) e em relação a % de N ingerido ($P=0,008$). Não se observou efeito ($P>0,05$) dos teores de NCE no N urinário (Tabela 7).

Teores acima de 2% de NCE influenciaram na redução do CMS e consequentemente no consumo de nitrogênio. O N fecal foi influenciado pelo consumo de N, pois até teores de 2% de NCE o N fecal é aumentado, após este teor de inclusão o N fecal é reduzido.

Tabela 7 – Consumo e balanço de nitrogênio em ovinos alimentados com dietas contendo teores crescentes de nitrato de cálcio encapsulado (% na MS)

Variáveis	Dietas ¹					EPM ²	Valor de P ³		Equação	r ²
	0%	1%	2%	3%	4%		L	Q		
N ingerido, g/d	43,45	43,48	47,55	45,33	39,76	1,26	0,636	0,042	41,64+5,21x-1,39x ²	0,15
N fecal, g/d	14,63	15,08	16,01	12,24	11,14	0,66	0,008	0,055	14,67+1,25x-0,56x ²	0,27
N absorvido, g/d	27,82	28,40	31,54	33,09	28,63	0,81	0,195	0,053	26,97+3,97-0,83x ²	0,18
N urinário, g/d	14,56	13,25	11,76	13,36	11,20	0,84	0,254	0,834	-	-
N retido, g/d	13,26	15,15	19,78	19,73	17,43	1,10	0,003	0,011	12,62+5,03x-0,933x ²	0,20
% N absorvido	47,31	52,93	62,63	59,61	60,02	2,89	0,038	0,188	50,08+3,21x	0,13
% N ingerido	31,27	34,68	41,65	43,53	43,32	2,13	0,008	0,356	32,30+3,30x	0,20

¹0% = dieta controle, contendo 0% de nitrato de cálcio encapsulado; 1% = dieta contendo 1% de nitrato de cálcio encapsulado; 2% = dieta contendo 2% de nitrato de cálcio encapsulado; 3% = dieta contendo 3% de nitrato de cálcio encapsulado; 4% = dieta contendo 4% de nitrato de cálcio encapsulado. ²EPM = Erro padrão da média. ³Efeito de P para o teste de polinômio ortogonal (L= efeito linear; Q = efeito quadrático).

A inclusão de NCE aumentou a digestibilidade da MO e da PB e influenciou no aumento do N retido (em % do absorvido e % do ingerido). A eficiência de síntese de proteína microbiana é determinada por gramas de N microbiano por unidade de energia disponível, geralmente expressa como digestibilidade da MO (BACH et al., 2005). Segundo os mesmos autores a eficiência do uso de N pelas bactérias do rúmen está relacionada com a eficiência do uso de energia; e as perdas de N podem ser reduzidas pelo aumento do uso do N pelos microrganismos.

Provavelmente as dietas, as quais continham alto teor de concentrado, diminuem o risco do nitrito não ser reduzido à amônia, pois promove o rápido crescimento microbiano tendo energia disponível e o encapsulamento do nitrato de cálcio permite que sua solubilização no rúmen seja de forma gradativa, disponibilizando N amoniacal para síntese microbiana e contribuindo para o aumento da fermentação ruminal. A retenção de N aumentou com o aumento do NCE devido provavelmente a uma redução mais eficiente de nitrato à amônia, já que o encapsulamento permite que seja solubilizada lentamente pelos microrganismos.

Houve efeito quadrático para as concentrações de AGCC total ($P=0,023$). As proporções molares em relação a concentração de AGCC total observou-se efeito linear crescente para o ácido acético ($P=0,011$), ácido butírico ($P=0,047$) e ácido isobutírico ($P=0,015$). Os teores de NCE não influenciaram o ácido propiônico e o ácido isovalérico ($P>0,05$). Houve tendência linear para a relação Ac:Pr ($P=0,072$). Houve efeito linear crescente para o pH ruminal ($P<0,01$) com o aumento da inclusão de NCE. Houve efeito quadrático para o $N-NH_3$ ($P=0,005$) com a inclusão de NCE. Não houve interação entre tratamento e hora para o ácido acético, propiônico, butírico, isobutírico, isovalérico, AGCC total, Ac:Pr, pH e $N-NH_3$. No entanto houve efeito de hora para ácido propiônico, isobutírico, AGCC total e $N-NH_3$ (Tabela 8).

Os efeitos da inclusão de nitrato na literatura sobre as concentrações ruminiais de AGCC são variáveis. Hulshof et al. (2012) relataram maior acetato e menor propionato em bovinos. Da mesma forma, Nolan et al. (2010) encontraram uma tendência de aumento de acetato e diminuição da proporção de propionato em ovinos. Li et al. (2012) observaram uma tendência de menor proporção de butirato em ovinos. van Zijderveld et al. (2010) relataram diminuição dos ácidos graxos de cadeia ramificada sem nenhuma diferença nas outras proporções AGCC. As razões para resultados inconsistentes entre os estudos não estão certos, mas van Zijderveld et al. (2010) demonstraram que as diferenças no tempo de amostragem do conteúdo ruminal entre os estudos pode explicar parcialmente as diferenças.

As concentrações dos AGCC são influenciadas dentre outros fatores pela composição da dieta, e observou-se aumento da concentração de AGCC total até o teor de 3% de NCE. Provavelmente o tratamento com teor de 4% de NCE não influenciou no aumento da concentração molar dos AGCC total devido a redução do consumo de MS. Segundo López et al. (1994) as concentrações de AGCC são uma consequência das taxas de produção e de remoção (absorção e passagem) de AGCC no rúmen e este último pode ser influenciado por fatores tais como o pH, o volume ruminal e a pressão osmótica. Segundo Hall et al. (2015) além da dieta, os fatores que afetam a concentração de AGCC são a absorção e passagem de AGCC, a quantidade de líquido ruminal para qual a massa de AGCC é diluída, pois a entrada e saída de água dilui ou concentra os solutos ruminais. Devido aos fatores citados anteriormente a concentração de AGCC nos tratamentos com teores de NCE não pode explicar as taxas de fermentação ruminal, no entanto descreve as condições ruminais com o aumento dos teores de NCE.

O rúmen abriga um ecossistema microbiano anaeróbio onde os alimentos são fermentados, produzindo principalmente AGCC, CO₂, hidrogênio e metano, por um grande número de diferentes gêneros e espécies de bactérias, protozoários, fungos e Archaeas. Os substratos utilizados pelas Archaeas são três tipos principais: CO₂, compostos contendo grupo-metil e acetato; e dois terços do metano gerado são derivados de acetato. Dois gêneros são conhecidos por usar acetato para metanogênese: *Methanosarcina* e *Methanosaeta* (LIU; WHITMAN, 2008). Segundo Zhou, Yu e Meng (2012) a adição de nitrato no rúmen pode reduzir as Archaeas (), reduzindo a utilização de acetato para produzir metano e assim favorece uma maior proporção de ácido acético. Quando o H₂ é mais efetivamente removido, a redução de NADH a NAD⁺ é aumentada e favorece a formação de acetato. A transferência de elétrons em amônia na síntese celular retém mais energia em produtos finais no rúmen do que os elétrons que são utilizados para produção de metano. O resultado líquido deve ser produtos finais mais oxidados, como proporção mais elevada de acetato (LIU; WHITMAN, 2008).

A proporção de ácido butírico reduziu com o aumento dos teores de NCE. A redução da proporção de ácido butírico pode ter sido devido a utilização de elétrons na redução de nitrato (SAR et al., 2004); e isto faz que ocorra mudança da síntese de butirato para que ocorra formação de acetato.

Tabela 8 – Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), nitrogênio amoniacal (N-NH₃) e pH ruminal em ovinos alimentados com dietas contendo teores crescentes de nitrato de cálcio encapsulado

Variáveis	Dietas ¹					EPM ²	Valor de P ³				Equação	r ²
	0%	1%	2%	3%	4%		L	Q	H	D*H		
AGCC total, mM	89,54	91,25	97,33	100,6	74,76	2,07	0,500	0,023	<0,01	0,291	86,50+15,02x-4,26x ²	0,09
AGCC como proporção do total, %												
Acético	64,51	62,36	65,52	68,00	69,21	0,39	0,011	0,332	0,207	0,294	62,97+1,45x	0,17
Propiônico	21,86	25,58	21,45	19,76	21,42	0,41	0,367	0,879	0,001	0,177	-	-
Butírico	9,81	8,49	9,41	9,38	6,69	0,21	0,047	0,189	<0,01	0,340	9,83-0,52x	0,07
Isobutírico	0,66	0,56	0,55	0,53	0,47	0,02	0,015	0,836	<0,01	0,978	0,64-0,04x	0,06
Valérico	0,85	0,70	0,79	0,62	0,41	0,02	<0,01	<0,01	0,204	0,046	0,81+0,03x-0,03x ²	0,36
Isovalérico	1,85	1,52	1,55	1,60	1,67	0,05	0,259	0,139	0,001	0,337	-	-
Ac:Pr ⁴	3,05	2,61	3,16	3,57	3,52	0,07	0,072	0,585	0,352	0,061	-	-
pH	5,75	5,80	6,01	6,03	6,25	0,03	<0,01	0,569	0,086	0,135	5,73+0,12x	0,21
N-NH ₃ , mg/dL	17,25	17,48	17,51	18,57	13,74	0,40	0,021	0,005	0,013	0,171	16,81+1,98x-0,64x ²	0,07

¹0% = dieta controle contendo 0% de nitrato de cálcio encapsulado; 1% = dieta contendo 1% de nitrato de cálcio encapsulado; 2% = dieta contendo 2% de nitrato de cálcio encapsulado; 3% = dieta contendo 3% de nitrato de cálcio encapsulado; 4% = dieta contendo 4% de nitrato de cálcio encapsulado. ²EPM = Erro padrão da média. ³Efeito de P para o teste de polinômio ortogonal (L = efeito linear; Q = efeito quadrático). H = valor de P para hora; D*H = valor de P para a interação entre dieta e hora. ⁴Ac:Pr = relação acetato:propionato.

A desaminação no rúmen produz N-NH_3 e ácidos graxos de cadeia ramificada que são formados a partir dos aminoácidos (BERGMAN, 1990). O aumento dos teores de NCE reduziu as proporções de ácidos graxos de cadeia ramificada isobutírico. A inclusão de NCE reduziu a inclusão do farelo de soja, isto é, proteína verdadeira na alimentação e consequentemente reduziu a proporção de ácido graxos de cadeia ramificada. Van Zijderveld et al. (2010) afirmaram que o uso de nitrato na dieta de ovinos pode reduzir a proteólise dos alimentos no rúmen e refletir em menor concentração de ácidos graxos de cadeia ramificada.

Na Figura 3 pode-se observar que os valores de pH ruminal são maiores com o aumento dos teores de NCE ao longo das horas. Geralmente as diferenças de pH ruminal devido à inclusão de nitrato em comparação com ureia não foram encontrados (NOLAN et al, 2010; LI et al, 2012; El-ZAIAT et al, 2014), no entanto de Raphélis-Soissan et al. (2014 e Lee et al. (2015^a) observaram aumento do pH com o aumento do nitrato na dieta. Essas diferenças no efeito do nitrato com relação ao pH pode ser devido ao momento da colheita das amostras ruminais. Li et al. (2012) colheram amostras ruminais 1 hora antes da alimentação, El- Zaiat et al. (2014) colheram amostras 3 horas após a alimentação, Nolan et al. (2010) colheram 4 amostras com intervalos de 6 horas. Nesta pesquisa observou-se aumento no pH médio de 7 colheitas com intervalos de 2 horas, a medida que aumentou os teores de NCE em substituição ao farelo de soja.

O nitrato ao ser reduzido, utilizando hidrogênio, no rúmen resulta em amônia, moléculas de água e base (LEWIS, 1951), que torna o ambiente alcalino, e isto pode ter permitido que o pH ruminal aumentasse.

As *Selenomonas ruminantium* são bactérias redutoras de nitrato (IWAMOTO, ISANUMA e HINO, 2002), e estas bactérias são fermentadoras de lactato no rúmen (CHEN e WOLIN, 1977), portanto pode ter contribuído para o aumento do pH ruminal.

Figura 3 - pH do fluido ruminal de ovinos em função da inclusão de teores crescente de nitrato de cálcio encapsulado e das horas após a alimentação

Apesar das dietas serem isonitrogenadas, houve influência da adição do NCE no N-NH_3 . A concentração de N-NH_3 foi reduzida no tratamento de 4% de NCE provavelmente pela redução do consumo de MS e consequentemente de nitrogênio. Com aumento dos teores de NCE até 3% observou-se aumento do N-NH_3 no fluido ruminal. O nitrato ao ser reduzido completamente no rúmen tem como produto final a amônia, que permitiu concentrações maiores com a inclusão dos teores de NCE até o teor de 3%. Portanto, quando o nitrato é adicionado, os teores de amônia aumentam, embora substancialmente em taxas mais lentas (LENG, 2008). Semelhante aos resultados de AGCC e pH ruminal, na literatura são encontrados resultados diversos para o N-NH_3 devido às diferentes metodologias de colheita de conteúdo ruminal com relação aos momentos de colheita. Segundo Hulshof et al. (2012), a suplementação com nitrato (22 g kg/MS) fornecido a bovinos aumentou o N-NH_3 . Diferentemente, El-Zaiat et al. (2014) observaram menores concentrações de N-NH_3 quando ovinos foram alimentados com 4,51% de nitrato de cálcio encapsulado.

Figura 4 - N-NH₃ do fluido ruminal de ovinos em função da inclusão de teores crescente de nitrato de cálcio encapsulado e das horas após a alimentação

Na Figura 4 observa-se o N-NH₃ nos teores crescentes de NCE ao longo das horas após alimentação e verificou-se aumento 2 horas após a alimentação e novamente 10 horas após a alimentação. Provavelmente entre 4 e 10 horas após alimentação ocorreu maior atividade microbiana, pois segundo Bach et al. (2005) quando a eficiência de uso do nitrogênio pelos microrganismos aumenta, o acúmulo de nitrogênio amoniacal diminui no rúmen.

4.4 Conclusão

O nitrato de cálcio encapsulado até teores de 4% para ovinos aumenta a digestibilidade dos nutrientes e da fibra insolúvel em detergente neutro, o pH ruminal e a proporção de ácido acético em relação a concentração de AGCC. No entanto o consumo é afetado negativamente em teores de 4%.

Referências

ASANUMA, N.; YOKOYAMA, S.; HINO, T. Effects of nitrate addition to a diet on fermentation and microbial populations in the rumen of goats, with special reference to *Selenomonas ruminantium* having the ability to reduce nitrate and nitrite. **Animal Science Journal**, Tokyo, v.86, p. 378-384, 2015.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15th ed. Arlington, 1990. v. 1.

_____. **Official methods of analysis**. 16th ed. Gaithersburg, 1997. 1141 p.

BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M.D. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, p. 9-21, 2005.

BERGMAN, E.N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**, Baltimore, v. 70, p. 567-590, 1990.

CHANEY, A.L.; MARBACH, E.P. Modified reagentes for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 8, p. 130-137, 1962.

CRAMPTON, E. W. Interrelations between digestible nutrient and energy content, voluntary dry matter intake, and the overall feeding value of forages. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 16, p. 546-552, 1957.

CHEN, M.; WOLIN, M. J. Influence of CH₄ production by *Methanobacterium ruminantium* on the fermentation of glucose and lactate by *Selenomonas ruminantium*. **Applied and environmental microbiology**, Whashington, v. 34, p. 756-759, 1977.

DAWSON, K. A.; PREZIOSI, M. C.; CALDWELL, D. R. Some effects of uncouplers and inhibitors on growth and electron transport in rumen bacteria. **Journal of Bacteriology**, Whashington, v. 139, p. 384-392, 1979.

DE RAPHÉLIS-SOISSAN, V.; LI, L.; GODWIN, I. R.; BARNETT, M. C.; PERDOK, H. B.; HEGARTY, R. S. Use of nitrate and *Propionibacterium acidipropionici* to reduce methane emissions and increase wool growth of Merino sheep. **Animal Production Science**, Melbourne, v. 54, p. 1860-1866, 2014.

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. Encapsulated nitrate and cashew nut shell liquid on blood and rumen constituents, methane emission, and growth performance of lambs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 92, p. 2214-2224, 2014.

FORBES, J. M. **Voluntary food intake and diet selection in farm animals**. 2nd ed. Wallingford, 1995. 453 p.

FULFORD, J; WINYARD, P. G.; VANHATALO, A.; BAILEY, S. J.; BLACKWELL, J. R.; JONES, A. M. Influence of dietary nitrate supplementation on human skeletal muscle metabolism and force production during maximum voluntary contractions. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, Berlin, v. 465, P. 517-528, 2013.

HALL, M. B.; NENNICH, T. D.; DOANE, P. H.; BRINK, G. E. Total volatile fatty acid concentrations are unreliable estimators of treatment effects on ruminal fermentation in vivo. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 98, p. 1-12, 2015.

HRISTOV, A. N.; OH, J.; FIRKINS, J. L.; DIJKSTRA, J.; KEBREAB, E.; WAGHORN, G.; MAKKAR, H. P. S.; ADESOGAN, A. T.; YANG, W.; LEE, C.; GERBER, P. J.; HENDERSON, B.; TRICARICO, J. M. Special Topics: Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.91, p.5045-5069, 2013.

HULSHOF, R.B.A.; BERNDT, A.; GERRITS, W.J.J.; DIJKSTRA, J.; VAN ZIJDERVELD, S.M.; NEWBOLD, J.R.; PERDOK, D.H.B. Dietary nitrate supplementation reduces methane emission in beef cattle fed sugarcane based diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 90, p. 2317–2323, 2012.

LARSEN, F. J.; SCHIFFER, T. A.; BORNIQUEL, S.; SAHLIN, K.; EKBLOM, B.; LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E. Dietary inorganic nitrate improves mitochondrial efficiency in humans. **Cell Metabolism**, Maryland Heights, v. 13, p. 149-159, 2011.

LENG, R.A. **The potential of feeding nitrate to reduce enteric methane production in ruminants**. Canberra: Commonwealth Government of Australia, Report to Department of Climate Change, 2008. 82 p. Disponível em: <<http://www.penambulbooks.com/Downloads/Leng-Final%20Modified%20%2017-9-2008.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2014.

LEE, C.; ARAUJO, R. C.; KOENIG, K. M.; BEAUCHEMIN, K. A. 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, 2015a.

_____. Effects of encapsulated nitrate on enteric methane production and nitrogen and energy utilization in beef heifers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 93, p. 2391-2404, 2015b.

LEWIS, D. The metabolism of nitrate and nitrite in the sheep. 1. The reduction of nitrate in the rumen of the sheep. **The Biochemical Journal**, London, v. 48, p. 175, 1951.

LI, L.; SILVEIRA, C.I.; NOLAN, V.; GODWIN, R.A.; LENG, I.R.; HEGARTY, R.S. Effect of added dietary nitrate and elemental sulfur on wool growth and methane emission of Merino lambs. **Animal Production Science**, Melbourne, v. 53, p. 1195-1201, 2013.

LI, L.; DAVIS, J.; NOLAN, J.; HEGARTY, R. An initial investigation on rumen fermentation pattern and methane emission of sheep offered diets containing urea or nitrate as the nitrogen source. **Animal Production Science**, Melbourne, v.52, p.653-658, 2012.

LIU, Y.; WHITMAN, W.B. Metabolic, phylogenetic and ecological diversity of the methanogenic Archaea. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1125, p. 171-189, 2008.

LOFGREEN, G. P. The estimation of total digestible nutrients from digestible organic matter. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 12, p.359-365, 1953.

LÓPEZ S., HOVELL F.D., MACLEOD N.A. Osmotic pressure, water kinetics and volatile fatty acid absorption in the rumen of sheep sustained by intragastric infusions. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 71, p. 153-168, 1994.

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**, Cambridge, v. 59, p. 301-313, 1988.

MORRIS, M. P.; CANCEL, B.; GONZALEZ-MAS, A. Toxicity of nitrates and nitrites to dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 41, p. 694-696, 1958.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of sheep. 6th ed. Washington: National Academy Press, 1985. 99 p.

_____. **Nutrient requirements of beef cattle**. 7th ed. Washington: National Academy Press, 1996. 248 p.

_____. **Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids**. Washington: National Academy Press, 2007. 362 p.

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**, Melbourne, v. 50, p. 801-806, 2010.

OWENS, F.N.; GOESTSCH, A.L. Digesta passage and microbial protein synthesis. In: Milligan, L.P.; Govum, W. L. Dobson, A. **Control of digestion an metabolism in ruminants**. Englewood cliffs: Prentice Hall, 1986. p. 196-223.

ROWE, J. J.; YARBROUGH, J. M.; RAKE, J. B.; EAGON, R. G. Nitrite inhibition of aerobic bacteria. **Current Microbiology**, New York, v. 2, p. 51-54, 1979.

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**, Champaign, v. 70, p. 3551-3561, 1992.

SAS INSTITUTE. **Sas systems for Windows**: version 9. Cary, 2002.

SAR, C.; SANTOSO, B.; GAMO, Y.; KOBAYASHI, T.; SHIOZAKI, S.; KIMURA, K.; MIZUKOSHI, H.; ARAI, I.; TAKAHASHI, J. Effects of combination of nitrate with β -1,4galacto-oligosaccharides and yeast (*Candida kefyr*) on methane emission from sheep. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Gwanak-gu, v.17, p.73-79, 2004.

UNGERFELD, E.M.; KOHN, R.A; The role of thermodynamics in the control of ruminal fermentation. In: SEJRSEN, K.; HVELPLUND, T.; NIELSEN, M.O. **Ruminant physiology: digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress**. Wageningen: Wageningen Academic, 2006. p. 55-85.

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

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**, Champaign, v. 93, p. 5856-5866, 2010.

YOSHII, T.; ASANUMA, N.; HINO, T. Number of nitrate-and nitrite-reducing *Selenomonas ruminantium* in the rumen, and possible factors affecting its growth. **Animal Science Journal**, Tokyo, v. 74, p. 483-491, 2003.

ZHOU, Z.; YU, Z.; MENG, Q. Effects of nitrate on methane production, fermentation, and microbial populations *in vitro* ruminal cultures. **Bioresource Technology**, Essex, v. 103, p. 173-179, 2012.

5 DESEMPENHO, CARACTERÍSTICAS DE CARCAÇA, CONSUMO, DIGESTIBILIDADE DOS NUTRIENTES, CONSTITUINTES RUMINAIS E BALANÇO DE NITROGÊNIO EM OVINOS ALIMENTADOS COM DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO

Resumo

Assim como a ureia, o nitrato é uma fonte de nitrogênio não-proteico (NNP) que pode ser utilizado na ração de ruminantes. Os experimentos de desempenho e metabolismo foram realizados em delineamento em blocos completos casualizados para avaliar dietas (16% de PB) contendo diferentes fontes de nitrogênio (farelo de soja-controle, ureia, nitrato de cálcio encapsulado-NCE e nitrato de cálcio não encapsulado-NCNE). Um período de adaptação foi utilizado antes de se mudar para o teor de nitrato ou ureia a ser estudado para evitar efeitos tóxicos. Em ambos os experimentos analisou-se os contrastes: controle *vs* nitrogênio não-proteico (ureia, NCE e NNE), ureia *vs* nitrato de cálcio (NCE e NCNE) e NCE *vs* NCNE. No experimento de desempenho foram utilizados 44 cordeiros (peso inicial de $21,05 \pm 3,5$ kg e $79 \pm 5,7$ d de idade) para determinar os efeitos de diferentes fontes de nitrogênio nas características de desempenho e de carcaça. Não houve diferença no consumo de matéria seca enquanto o peso final (42,7; 40,9; 40,4 e 40,6 kg), o ganho médio diário (387; 355; 345 e 346 g) e a eficiência alimentar (0,296; 0,274; 0,278 e 0,271 kg:kg) foram maiores no controle em relação ao NNP. No experimento de metabolismo foram utilizados 20 ovinos machos com peso ($71,7 \pm 9,1$ kg), canulados no rúmen e castrados, para determinar o consumo e a digestibilidade da matéria seca e dos nutrientes, o balanço de nitrogênio, a concentração ruminal de ácidos graxos de cadeia curta, o N-NH₃ e o pH ruminal. A digestibilidade da fibra em detergente neutro (68,0; 73,0; 77,1 e 77,4%) foi maior nos tratamentos contendo NNP em relação ao controle. O balanço de nitrogênio e o N-NH₃ foram similares para todos os contrastes. O pH ruminal (6,09; 6,05; 6,31 e 6,21) foi maior nas dietas contendo NNP em relação à dieta controle e maior nas dietas com nitrato em relação aquela com ureia. A concentração de ácidos graxos de cadeia curta total e a proporção molar dos ácidos butírico, isobutírico, valérico e isovalérico não diferiram. A proporção molar de ácido acético (64,35; 63,89; 65,89 e 67,62 mM/100mM) foi maior nos tratamentos com nitrato de cálcio do que com ureia. A proporção molar de ácido propiônico (16,75; 20,38; 18,19 e 17,12 mM/100mM) foi maior no NNP em relação ao controle; e os tratamentos com nitrato de cálcio foi menor em relação a ureia. A relação Ac:Pr (3,80; 3,23; 3,67 e 3,95) foi maior nos tratamentos com nitrato em relação a ureia. A inclusão de 2% do íon nitrato, tanto na forma de NCE como NCNE para ovinos, permite que o desempenho e características de carcaça sejam similares a dieta com inclusão de 1,1% de ureia. O nitrato de cálcio influencia no aumento da digestibilidade da fibra em detergente neutro, do pH ruminal, da proporção de acetato em relação a concentração de AGCC total e da relação Ac:Pr.

Palavras-chave: Ácidos graxos de cadeia curta; Consumo; Ganho de peso; Nitrato; Ureia

Abstract

As urea, nitrate is a source of non-protein nitrogen (NPN) that can be used in ruminant feeding. The performance and metabolism experiments were performed in a randomized complete block design to evaluate diets (16% CP) containing different nitrogen sources: soybean meal (control), urea, encapsulated calcium nitrate (ECN) and non-encapsulated calcium nitrate (NECN). An adaptation period was used before moving to the nitrate or urea

to be studied to prevent toxic effects. In both experiments the following contrasts were analyzed: control *vs* non-protein nitrogen (urea, ECN and NECN), urea *vs* calcium nitrate (ECN and NECN) and ECN *vs* NECN. In performance experiment, 44 ram lambs (initial BW 21.05 ± 3.5 kg and 79 ± 5.7 d old) were used to determine the effects of different nitrogen sources on performance and carcass characteristics. There was no difference in dry matter intake. However, final weight (42.7; 40.9; 40.4 and 40.6 kg), average daily gain (387; 355; 345 and 346 g) and feed efficiency (0.296; 0.274; 0.278 and 0.271 kg: kg) were greater in the control diet compared to the NPN diets. In metabolism experiment, 20 wethers (BW 71.7 ± 9.1 kg), cannulated in the rumen, were used to determine the intake and digestibility of dry matter and nutrients, nitrogen balance, ruminal concentrations of short chain fatty acids, NH_3 and ruminal pH. The digestibility of NDF (68.0; 73.0; 77.1 and 77.4%) was higher in diets containing NPN when compared to the control diet. The nitrogen balance and the N-NH_3 were similar in all the contrasts. The ruminal pH (6.09; 6.05; 6.31 and 6.21) was greater in diets containing NPN compared to the control diet and higher in diets with nitrate compared to the urea diet. The concentration of total short chain fatty acids and the molar proportion of butyric, isobutyric, valeric and isovaleric acids did not differ. The molar proportion of acetic acid (64.35; 63.89; 65.89 and 67.62 mM/100mM) was greater in diets with calcium nitrate than the urea diet. The molar proportion of propionic acid (16.75; 20.38; 18.19 and 17.12 mM/100 mM) was higher in the NPN diets compared to the control diet while the diets with calcium nitrate were lower compared to the urea diet. The ratio Ac:Pr (3.80; 3.23; 3.67 and 3.95) was greater in the diets with nitrate compared to the urea diet. Calcium nitrate influences the increase in the digestibility of neutral detergent, ruminal pH, the proportion of acetate relative to the total SCFA concentration and the ratio Ac: Pr.

Keywords: Intake; Nitrate; Nutrition; short-chain fatty acids; Urea; Weight gain

5.1 Introdução

O uso de nitrogênio não-proteico para ruminantes tem baixo custo em comparação com outros alimentos proteicos. Além da ureia, o nitrato vem sendo estudado para ruminantes (VAN ZIJDERVELD et al.2010; NOLAN et al., 2010; VAN ZIJDERVELD et al., 2011; HULSHOF et al., 2012; NEWBOLD et al., 2014; EL-ZAIAT et al., 2014). A ureia e o nitrato no rúmen são convertidos à amônia e os microrganismos a utilizam para a síntese de proteína microbiana, que é uma importante fonte proteica para os ruminantes (LENG, 2008). O fornecimento de fontes de nitrogênio não-proteico faz com o que o pico de concentração de amônia no rúmen ocorra com maior intensidade e em menor tempo, quando comparado com fontes de nitrogênio proteico. Quando a velocidade de liberação da amônia é maior que sua utilização há elevação do nitrogênio amoniacal no rúmen, o que aumenta a excreção de compostos nitrogenados e o custo energético (RUSSEL et al., 1992).

Com relação ao nitrato no rúmen a necessidade de equivalentes de redução (elétrons e hidrogênio) para reduzir nitrato a nitrito é bem menor que para reduzir este último a amônia. O fornecimento de nitrato, em teores excessivos para ruminantes sem cuidados quanto à

adaptação dos animais as dietas pode levar à ocorrência de meta-hemoglobinemia. A meta-hemoglobinemia é uma condição causada quando o nitrito acumulado é absorvido e este oxida o ferro da hemoglobina que se transforma em meta-hemoglobina, tornando a molécula incapaz de transportar oxigênio, ocorrendo assim anóxia celular (LEWIS, 1951b; VAN ZIJDERVELD et al., 2011).

Para um melhor aproveitamento das fontes de nitrogênio não-proteico no rúmen, alternativas, como o encapsulamento de fontes de nitrogênio não-proteico são estudadas e consistem em modificar e controlar a velocidade de liberação no rúmen (EL-ZAIAT et al., 2014; LIZARAZO et al., 2014; LEE et al., 2015a; LEE et al., 2015b;). A proteção ao nitrato permite que as partículas tenham solubilização mais extensa ao longo do tempo e permite que a microbiota ruminal reduza nitrato a nitrito, e este a amônia e assim, diminua também os riscos de intoxicação e formação de meta-hemoglobina.

Portanto objetivou-se avaliar a ureia ou o nitrato de cálcio encapsulado e não encapsulado como fontes de nitrogênio não-proteico em dietas de alto concentrado sobre o desempenho, características de carcaça, consumo e digestibilidade dos nutrientes, balanço de nitrogênio, pH, ácidos graxos de cadeia curta e nitrogênio amoniacal ruminal em ovinos.

5.2 Material e Métodos

Os ensaios experimentais foram conduzidos nas instalações do Sistema Intensivo de Produção de Ovinos e Caprinos (SIPOC) do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo em Piracicaba. O município está situado na latitude 22°43’31” S e longitude 47°38’57” W, com altitude de 547 metros.

Todos os protocolos e procedimentos com os animais experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais em Pesquisas (CEUAP) da ESALQ.

5.2.1 Dietas experimentais

Nos ensaios de desempenho e metabolismo, as dietas experimentais tinham relação de 20% de volumoso e 80% de concentrado formuladas pelo Small Ruminant Nutrition System (SRNS)-versão 1.8.6. As dietas foram formuladas para serem isonitrogenadas, contendo 16% de proteína bruta. O nitrato de cálcio encapsulado experimental é protegido por uma patente internacional e foram fabricados pela GRASP Ind. & Com. LTDA (Curitiba, PR, Brasil). O

produto foi fabricado usando o sal duplo de cálcio e nitrato de amônio deca-hidrato. O nitrato de cálcio não encapsulado (NCNE) foi fabricado pela Yara (Calcinit, Oslo, Noruega) e possui 83,3% de MS, 18,7% de N, 22,2% de cálcio e 75,8% de NO_3 e o nitrato de cálcio encapsulado possui 85% de MS, 16,5% de N, 19,6% de cálcio e 66,9% de NO_3 . Os tratamentos foram: dieta controle (farelo de soja), dieta contendo 1,10% de ureia, dieta contendo 2,65% de nitrato de cálcio não encapsulado e dieta contendo 3% de nitrato de cálcio encapsulado (Tabela 9). As dietas contendo nitrato de cálcio foram formuladas para ter o mesmo teor de NO_3 na matéria seca, ou seja 2% de NO_3 . A ureia foi adicionada para ter o mesmo equivalente proteico do nitrato de cálcio adicionado às dietas.

O milho, a casca de soja e o feno de *coastcross* foram grosseiramente moídos utilizando-se um moedor (Nogueira[®] DPM – 4, Itapira, São Paulo, Brasil) com peneira com crivos de 1 cm e misturados ao farelo de soja, calcário, mistura mineral, monensina sódica, ureia, nitrato de cálcio não encapsulado e nitrato de cálcio encapsulado utilizando-se um misturador horizontal (Lucato[®], Limeira, São Paulo, Brasil) com capacidade para 500 kg. A monensina sódica foi utilizada para evitar coccidiose nos animais.

O NCNE, NCE e a ureia foram adicionados às rações gradualmente para que houvesse adaptação dos animais, sendo que a cada três dias se aumentou o teor do ingrediente fonte de nitrogênio não-proteico de acordo com os tratamentos até atingir o teor a ser estudado. O fornecimento da dieta foi na forma de ração total, em cochos, e as sobras foram quantificadas semanalmente para estimativa do consumo diário de matéria seca e ajuste da quantidade de alimento a ser fornecida, sendo adotado como critério de sobras de 10% da oferta para que os animais tivessem consumo *ad libitum*. A ração foi pesada individualmente para cada animal em balança eletrônica de precisão de 1 g (Marte[®], LC 100, São Paulo, Brasil) diariamente.

Tabela 9 – Proporção dos ingredientes e composição química das dietas experimentais contendo ureia, nitrato de cálcio não encapsulado (NCNE) e nitrato de cálcio encapsulado (NCE) (% da MS)

	Dietas ¹			
	Controle	Ureia	NCNE	NCE
Ingredientes				
Feno de <i>coastcross</i>	20,0	20,0	20,0	20,0
Casca de soja	20,0	20,0	20,0	20,0
Milho moído	38,6	45,7	45,5	45,0
Farelo de soja	17,9	10,0	9,83	10,0
ureia	-	1,10	-	-
NNE	-	-	2,65	-
NCE	-	-	-	3,0
Calcário calcítico	1,50	1,16	-	-
Sal mineral ²	2,00	2,04	2,02	2,00
Composição química				
Matéria seca, %	89,4	89,1	88,9	88,8
Matéria orgânica, %	91,9	93,1	93,5	93,2
Proteína bruta, %	16,1	17,7	16,6	16,3
FDN ³ , %	37,6	40,0	41,1	40,7
NDT ⁴ estimado, %	75,0	76,5	79,1	77,4
EM ⁵ , Mcal/kg	2,71	2,76	2,86	2,80

¹Todas as dietas continham 25 ppm de monensina sódica (Rumensin 200). ²Composição = 13,4% Ca; 7,5% P; 1% Mg; 7% S; 21,8% Cl; 14,5% Na; 500 ppm Fe; 300 ppm Cu; 4.600 ppm Zn; 1.100 ppm Mn; 80 ppm I; 405 ppm Co; 15 ppm Se. ³FDN = Fibra insolúvel em detergente neutro. ⁴NDT = Nutrientes digestíveis totais estimados de acordo com Crampton et al. (1957) e Lofgreen (1953). ⁵EM = Energia metabolizável (Energia Digestível = NDT estimado x 0,04409 e EM = 82% da ED) de acordo com NRC, 1985.

5.2.2 Ensaio de desempenho e características de carcaça

5.2.2.1 Animais e instalações

Quarenta e quatro ovinos Dorper x Santa Inês, machos inteiros, com peso médio de $21,05 \pm 3,5$ kg (PC $\pm$ DP) e idade média de $79 \pm 5,8$ (d $\pm$ DP) dias foram utilizados no experimento. Os animais foram mantidos individualmente em sistema de “tie stall” em piso ripado, cobertos e providos de cocho de madeira para fornecimento de ração e bebedouros.

5.2.2.2 Delineamento experimental

Os cordeiros foram distribuídos em delineamento experimental em blocos completos casualizados, sendo o ensaio composto por quatro tratamentos, distribuídos em onze blocos. Os animais foram blocados por peso corporal (kg) e idade ao início do experimento. O ensaio experimental teve duração de 56 dias, divididos em dois períodos de 28 dias. Os tratamentos fornecidos foram: dieta controle (farelo de soja), dieta contendo 1,10% de ureia, dieta contendo 2,65% de nitrato de cálcio não encapsulado e dieta contendo 3% de nitrato de cálcio encapsulado.

5.2.2.3 Desempenho

Foram colhidas amostras das sobras e das partidas de ração que foram conservadas a -18°C. As amostras foram moídas em moinho tipo Wiley provido de peneira de crivos de 1 mm de diâmetro e armazenadas para as análises químicas.

As análises foram realizadas no Laboratório de Nutrição e Reprodução Animal (LNRA) e no Laboratório de Bromatologia, ambos do Departamento de Zootecnia da ESALQ – USP. Foi realizada a determinação de matéria seca (MS) por meio de secagem das amostras em estufa a 105° C por 24 horas e matéria mineral (MM) através da incineração das amostras em mufla a 550°C por 4 horas (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC, 1990). Para a determinação do nitrogênio total foi utilizado o aparelho Leco FP528 (Leco Corporation, St. Joseph, MI), conforme a ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC (1997). A fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) foi determinada conforme Van Soest, Robertson e Lewis (1991), utilizando α -amilase termoestável e sulfito de sódio, em um aparelho Ankom 200 (Ankom Tech. Corp., Fairport, NY).

Os animais foram pesados no primeiro dia do experimento, aos 28 dias e aos 56 dias. Os animais foram submetidos a 6 horas de jejum para as pesagens. O período de jejum não foi longo para evitar os riscos de intoxicação por nitrato. Semanalmente foi avaliado o consumo médio de MS. A eficiência alimentar dos cordeiros foi obtida pela relação do ganho de peso e consumo de matéria seca.

5.2.2.4 Abate dos animais e características das carcaças

Após o período de confinamento os animais permaneceram consumindo os mesmos tratamentos e aos 71 dias os animais foram abatidos. Foi necessário 15 dias a mais após a colheita de dados de desempenho devido a problemas técnicos para organização do abate dos animais. Para o abate os animais foram mantidos em jejum alimentar por 16 horas, sendo em seguida pesados para obtenção do peso corporal ao abate (PCA). Foram abatidos segundo as normas descritas no Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal-RIISPOA. As carcaças quentes foram pesadas (PCQ), e resfriadas em câmara de refrigeração a 4°C por 24 horas, sendo novamente pesadas para a obtenção do peso da carcaça fria (PCF). O rendimento da carcaça quente (RCQ), rendimento da carcaça fria (RCF) e a perda por resfriamento (PR) foram determinados. Para determinação do RCQ, RCF e PR foram utilizadas as seguintes equações: $RCQ = (PCQ/PCA) \times 100$; $RCF = (PCF/PCA) \times 100$; $PR = [(PCQ - PCF)/PCQ] \times 100$.

Após 24 horas de refrigeração das carcaças, o músculo *Longissimus dorsi* foi seccionado de maneira transversal. A medida da espessura de gordura subcutânea (EGS) foi realizada sobre o músculo *Longissimus dorsi*, entre 12° e 13° vértebras torácicas utilizando-se um paquímetro digital graduado em mm. A face exposta do músculo *Longissimus dorsi* foi desenhada em papel vegetal e sua área mensurada com auxílio de um planímetro graduado em cm² para obtenção da área de olho de lombo (AOL). A espessura da parede corporal (EPC) foi determinada na mesma secção transversal entre a 12° e 13° vértebras torácicas, medida 12,5 cm lateralmente da linha média da coluna vertebral (NOTTER, GREINER, WAHLBERG, 2004).

5.2.3 Ensaio de consumo e digestibilidade dos nutrientes, constituintes ruminais e balanço de nitrogênio

5.2.3.1 Animais e instalações

Vinte ovinos Dorper x Santa Inês, machos castrados, canulados no rúmen, com peso médio de $71,7 \pm 9,05$ kg (PC $\pm$ DP) foram utilizados no experimento. Os animais foram mantidos em sistema de “tie stall” em piso ripado, cobertos e providos de cocho de madeira para fornecimento de ração e bebedouros durante o período de adaptação. Durante as colheitas foram alocados individualmente em gaiolas metálicas com dimensões de 1,30 x 0,55 m para ensaios de metabolismo providas de cocho, bebedouros, dispositivos para colheita de fezes e urina.

5.2.3.2 Delineamento experimental

Os 20 animais foram distribuídos em delineamento experimental em blocos completos casualizados, sendo o ensaio composto por quatro tratamentos, distribuído em cinco blocos. Os animais foram pesados no início do período de adaptação, no início e final do período de colheitas, sem jejum alimentar.

O período experimental teve duração de 24 dias. Os primeiros 18 dias foram destinados a adaptação dos animais às dietas e nos seis dias subsequentes foram realizadas as colheitas de dados e amostras para determinação do consumo, da digestibilidade aparente da MS e nutrientes e dos parâmetros ruminais (ácidos graxos de cadeia curta, pH e nitrogênio amoniacal).

5.2.3.3 Consumo e digestibilidade dos nutrientes

A ração foi pesada individualmente para cada animal em balança eletrônica de precisão de 1 g (Marte®, LC 100, São Paulo, Brasil) e ofertada aos animais diariamente às 8 horas da manhã. As sobras também foram pesadas diariamente para determinação do consumo diário de MS e ajuste da quantidade de alimento a ser fornecida por animal, sendo adotado como critério de sobras de 10% da oferta para que os animais tivessem consumo *ad libitum*.

Do 19º ao 23º dia de cada período a oferta, sobras e fezes de cada animal foram pesadas, amostradas (10%) e conservadas a uma temperatura de -18°C para posterior análise

e cálculo de digestibilidade aparente dos nutrientes. Para a colheita das fezes, utilizou-se arreios providos de bolsas coletoras de fezes, a fim de evitar a mistura das fezes com a urina.

As análises foram realizadas no Laboratório de Nutrição e Reprodução Animal (LNRA) e no Laboratório de Bromatologia, ambos do Departamento de Zootecnia da ESALQ – USP. As amostras de fezes foram pré-secadas em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas. As amostras pré secas de fezes e as amostras das rações e das sobras foram moídas em moinho provido de peneira tipo Wiley de crivos de 1 mm de diâmetro e armazenadas para as análises químicas no laboratório de bromatologia. Foi realizada a determinação de MS por meio de secagem das amostras em estufa a 105° C por 24 horas e MM através da incineração das amostras em mufla a 550°C por 4 horas (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC, 1990). Para a determinação do nitrogênio total das fezes, rações e sobras foi utilizado o aparelho Leco FP528 (Leco Corporation, St. Joseph, MI), conforme a ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC (1997), e FDN conforme Van Soest, Robertson e Lewis (1991), utilizando α -amilase termoestável e sulfito de sódio, em um aparelho Ankom 200 (Ankom Tech. Corp., Fairport, NY).

A digestibilidade aparente dos nutrientes foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\text{DAT} (\%) = [(\text{MSC} \cdot \text{NMS}) - (\text{MSF} \cdot \text{NMF}) / (\text{MSC} \cdot \text{NMS})] \cdot 100$$

MSC = matéria seca consumida;

MSF = matéria seca fecal;

NMF = porcentagem do nutriente na matéria seca fecal;

NMS = porcentagem do nutriente na matéria seca consumida.

5.2.3.4 Balanço de nitrogênio

Durante o período de colheita, no 19° ao 23° dia foram obtidas amostras de urina produzida a cada 24 horas. A urina foi colhida em recipientes plásticos contendo solução de ácido clorídrico a 50% para manter o pH da urina abaixo de 3, evitando perda de nitrogênio. O total colhido foi medido e homogeneizado, sendo em seguida filtrado e amostrado 10% e armazenado em frascos a -18°C. O nitrogênio da urina foi determinado em micro Kjeldahl segundo a ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC (1990). O balanço de nitrogênio (N) foi calculado através das fórmulas:

$$\text{Nitrogênio absorvido (g/d)} = \text{N consumido} - \text{N fecal}$$

$$\text{Nitrogênio retido (g/d)} = \text{N absorvido} - \text{N urinário}$$

Balanco de N (% N absorvido) = (N retido / N absorvido) * 100

Balando de N (% N ingerido) = (N retido / N ingerido) * 100

5.2.3.5 Constituintes ruminais

A colheita do conteúdo ruminal foi obtida no 24º dia, com intervalos de duas horas de cada colheita que iniciou no momento da alimentação, sendo a hora zero o momento antes do fornecimento de alimento e 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas após o fornecimento do alimento. Uma amostra do conteúdo ruminal foi colhida de cada animal via cânula, sendo rapidamente filtrada em tecido de algodão, obtendo aproximadamente 200 mL de fluido ruminal filtrado e em seguida o pH foi determinado em potenciômetro digital. A fase sólida do conteúdo ruminal que permaneceu no tecido de algodão e após a filtragem foi devolvida ao rúmen. Após determinar o pH das amostras de fluido ruminal foram retiradas duas alíquotas de 20 mL e armazenadas em frascos plásticos que foram congeladas a -18°C para posterior determinação dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e nitrogênio amoniacal (N-NH₃).

Para a determinação dos AGCC, foram misturados 1,2 mL do fluido ruminal, 0,3 mL de solução 3:1 de ácido metafosfórico 25% com ácido fórmico 98-100% e 0,15mL de solução de ácido 2-etil-butírico 100 mM (padrão interno) e foram centrifugados a 12.000 x g, durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente, 1,2 mL de cada amostra foi transferido para vials cromatográficos. Desse extrato injetou-se 1 µL em cromatógrafo gasoso (CG HP 7890A; Injetor HP 7683B, Agilent Technologies) equipado com coluna capilar HP-FFAP (1909F-112; 25 m; 0,32 mm; 0,5 µm; JeWAgilent Technologies). A injeção foi realizada de maneira automática. O gás de arraste utilizado foi o H₂, mantido em fluxo de 31,35 mL/min. A temperatura do injetor e detector foi de 260°C. O tempo total da análise cromatográfica foi de 16,5 minutos, dividido em três rampas de aquecimento: 80°C (1min), 120°C (20°C/min; 3min) e 205°C (10°/min; 2 min). A concentração dos AGCC (mM) foi determinada com base em uma curva de calibração externa.

Para determinação do N-NH₃ as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g, durante 20 minutos e a 4°C. Uma fração do sobrenadante foi utilizada para análise de N-NH₃, segundo o método colorimétrico descrito por Chaney e Marbach (1962) e adaptado para ser usado em placas de microtítulo com posterior leitura em aparelho do tipo “ELISA READER” (absorbância de 550 nanômetro).

5.2.4 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o PROC MIXED do SAS (2002). Todos os dados foram submetidos ao teste de Shapiro Wilk para verificar a normalidade dos resíduos, a retirada de outliers e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene. O conjunto de dados que não respeitou tais premissas foi submetido às transformações logarítmicas e inversa.

Para as variáveis relacionadas ao ganho médio diário, consumo de nutrientes, eficiência alimentar, empregou-se o seguinte modelo de análise:

$$Y_{ijk} = \mu + B_i + T_j + E_{ij} + P_k + (BP)_{ik} + (TP)_{jk} + E_{ijk},$$

onde μ = média geral; B_i = efeito de bloco ($i = 1$ a 11); T_j = efeito do tratamento ($j = 1$ a 4); E_{ij} = erro termo A; P_k = efeito de período ($k = 1$ a 2); $(BP)_{ik}$ = interação bloco x período; $(TP)_{jk}$ = interação tratamento x período, e E_{ijk} = erro termo B. Bloco e interação bloco x período foram incluídos como efeitos aleatórios. Foram testadas várias matrizes e definidas para cada conjunto de dados, utilizando-se a que apresentou menor valor “fit statistics – (AIC)”.

Para os parâmetros de carcaça, empregou-se o seguinte modelo de análise:

$$Y_{ijk} = \mu + B_i + T_j + E_{ijk},$$

onde μ = média geral; B_i = efeito de bloco ($i = 1$ a 11); T_j = efeito do tratamento ($j = 1$ a 4) e E_{ijk} = erro residual. Bloco foi incluído como efeito aleatório.

Os dados de consumo, digestibilidade aparente dos nutrientes e balanço de nitrogênio foram analisados através do modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + B_i + T_j + E_{ijk},$$

onde μ = média geral; B_i = efeito de bloco ($i = 1$ a 5); T_j = efeito do tratamento ($j = 1$ a 4) e E_{ijk} = erro residual. Bloco foi incluído como efeito aleatório.

Os dados relacionados à fermentação ruminal foram analisados como medidas repetidas no tempo. O modelo estatístico empregado foi:

$$Y_{ijr} = \mu + B_i + T_j + E_{ij} + H_r + (TH)_{jr} + (BH)_{ir} + E_{ijr},$$

onde μ = média geral; B_i = efeito de bloco ($i = 1$ a 5); T_j = efeito de tratamento ($j = 1$ a 5); E_{ij} = erro termo A; H_r = efeito de hora ($r = 0, 2, 4, 6, 8, 10$ e 12); $(TH)_{jr}$ = efeito da interação tratamento x hora; $(BH)_{ir}$ = efeito da interação hora x bloco; e E_{ijr} = erro termo B. Bloco e a interação bloco x hora foram incluídos como efeito aleatório. Foram testadas várias matrizes e definidas para cada conjunto de dados, utilizando-se a que apresentou menor valor “fit statistics – (AIC)”.

O conjunto de dados foi avaliado por meio de contrastes, sendo o primeiro contraste formado pelo tratamento controle versus o grupo nitrogênio não-proteico (tratamentos ureia, nitrato de cálcio não encapsulado e nitrato de cálcio encapsulado), o segundo contraste pelo grupo ureia versus nitrato de cálcio (nitrato de cálcio não encapsulado e nitrato de cálcio encapsulado) e o terceiro contraste formado pelo nitrato de cálcio não encapsulado versus nitrato de cálcio encapsulado. As diferenças estatísticas foram consideradas quando o $P < 0,05$.

5.3 Resultados e discussão

5.3.3 Desempenho e características de carcaça

O consumo de MS dos cordeiros não diferiram ($P > 0,05$). Sais de nitrato podem acarretar em redução no consumo pelos animais (WEICHENTHAL et al., 1963; NEWBOLD et al., 2014). No entanto a adição de nitrato de cálcio neste estudo não influenciou o consumo de MS provavelmente devido ao teor de nitrato de cálcio utilizado não ser elevado, como mostrado no capítulo 1 e 2 que o aumento do teor de nitrato de cálcio acima de 3% reduziu o CMS pelos ovinos.

O peso corporal final ($P = 0,007$), o ganho médio diário ($P = 0,003$) e a eficiência alimentar ($P < 0,01$) dos animais que consumiram a ração controle foi maior em relação aos animais que consumiram as rações com fontes de nitrogênio não-proteico (Tabela 10).

Não houve diferenças ($P > 0,05$) em todas as variáveis de desempenho dos animais que consumiram as rações com ureia e com nitrato de cálcio, e também entre as rações contendo nitrato de cálcio não encapsulado e nitrato de cálcio encapsulado. Não houve interação entre tratamento e período em nenhuma das variáveis avaliadas ($P > 0,05$). No entanto houve efeito do período no ganho médio diário ($P = 0,045$), no consumo de MS ($P < 0,001$) e na eficiência alimentar ($P < 0,001$) (Tabela 10).

Tabela 10 – Desempenho de cordeiros alimentados com dietas contendo diferentes fontes de nitrogênio não-proteico

Variáveis ¹	Dietas ²				EPM ³	Valor de P ⁴				
	CONT	UREIA	NCNE	NCE		CxNNP	UxNC	NCNExNCE	Per	Dieta*Per
PCI, kg	20,87	21,04	21,12	21,16	-	-	-	-	-	-
PF, kg	42,66	40,91	40,44	40,55	0,594	0,007	0,583	0,892	-	-
GMD, g	387	355	345	346	5,861	0,003	0,419	0,926	0,045	0,078
CMS, kg/d	1,37	1,35	1,29	1,32	0,028	0,192	0,248	0,491	<0,001	0,257
EA, kg:kg	0,296	0,274	0,278	0,271	0,007	<0,01	0,911	0,314	<0,001	0,095

¹PCI = peso corporal inicial; PF = peso final; CMS = Consumo de matéria seca; GMD = ganho de peso médio diário; EA = eficiência alimentar. ²CONT = dieta controle; UREIA = dieta contendo ureia; NCNE = dieta contendo nitrato de cálcio não encapsulado; NCE = dieta contendo nitrato de cálcio encapsulado. ³EPM = erro padrão da média. ⁴Valores de P para os contrastes: C x NNP = contraste dieta controle e dietas com nitrogênio não-proteico; U x NC = contraste dieta com ureia e dietas com nitrato de cálcio; NCNE x NCE = contraste dieta com nitrato de cálcio não encapsulado e dieta com nitrato de cálcio encapsulado. Per = valor de P para período; Dieta*Per = valor de P para interação dieta e período

O consumo de MS foi similar entre os tratamentos, no entanto os animais que consumiram a dieta controle tiveram maior ganho de peso e portanto o peso corporal maior ao final do confinamento e melhor eficiência alimentar do que os tratamentos com nitrato de cálcio ou ureia. Os teores de NC utilizados neste estudo não influenciaram no consumo pelos ovinos, no entanto o desempenho dos animais foi afetado. Diferentemente deste estudo, a literatura mostra que animais alimentados com nitrato apresentam redução da eficiência alimentar devido o nitrato influenciar na redução do consumo de ração (NEWBOLD et al., 2014). Newbold et al. (2014) observaram redução do consumo de MS, porém nenhuma diferença no ganho de peso e no peso de carcaça quente e maior eficiência alimentar em bovinos Nelore alimentados com a adição de teores de nitrato até 2,6%.

O peso corporal ao abate ($P=0,079$), o peso da carcaça quente ($P=0,052$) e o peso da carcaça fria ($P=0,070$) tiveram tendência do tratamento controle ser maior que os tratamentos com NNP. O rendimento de carcaça quente, o rendimento de carcaça fria, a espessura de gordura subcutânea e a área de olho de lombo não diferiram ($P>0,05$) em nenhum dos contrastes estudados. A espessura da parede corporal teve tendência de ser maior no tratamento controle em relação ao NNP ($P=0,072$) (Tabela 11).

Tabela 11 – Características de carcaça de cordeiros alimentados com dietas contendo diferentes fontes de nitrogênio não-proteico

Variáveis ¹	Dietas ²				EPM ³	Valor de P ⁴		
	CONT	UREIA	NCNE	NCE		CxNNP	UxNC	NCNExNCE
PCA, kg	46,96	45,75	44,50	44,90	0,465	0,079	0,355	0,758
PCQ, kg	22,99	22,53	21,73	21,54	0,272	0,052	0,115	0,768
PCF, kg	22,43	22,06	21,25	21,06	0,271	0,070	0,110	0,766
RCQ, %	48,95	49,21	48,80	48,05	0,340	0,709	0,288	0,381
RCF, %	47,75	48,19	47,72	46,99	0,350	0,866	0,260	0,385
EGS, mm	1,91	1,93	1,84	1,75	0,059	0,613	0,366	0,613
EPC, mm	15,71	14,09	14,50	14,42	0,323	0,074	0,644	0,925
AOL, cm ²	15,20	16,24	15,33	14,81	0,386	0,773	0,227	0,641

¹PCA = peso corporal ao abate; PCQ = peso de carcaça quente; PCF = peso de carcaça fria; RCQ = rendimento de carcaça quente; RCF = rendimento de carcaça fria; EGS = espessura de gordura subcutânea; EPC = espessura da parede corporal; AOL = área de olho de lombo. ²CONT = dieta controle; UREIA = dieta contendo ureia; NCNE = dieta contendo nitrato de cálcio não encapsulado; NCE = dieta contendo nitrato de cálcio encapsulado

³EPM = erro padrão da média. ⁴Valores de P para os contrastes: C x NNP = contraste dieta controle e dietas com nitrogênio não-proteico; U x NC = contraste dieta com ureia e dietas com nitrato de cálcio; NCNE x NCE = contraste dieta com nitrato de cálcio não encapsulado e dieta com nitrato de cálcio encapsulado.

Os animais que consumiram a dieta controle tiveram maior ganho de peso e peso corporal final e influenciou no aumento do peso corporal ao abate, no peso de carcaça quente e peso de carcaça fria. Os valores do PCA foram diferentes do peso corporal no final do ensaio de desempenho devido ao abate dos animais ter acontecido 15 dias após a mensuração do peso final no confinamento.

5.3.4 Digestibilidade, metabolismo ruminal e balanço de nitrogênio

O consumo de MS, MO, PB e FDN não diferiram entre os contrastes avaliados ($P>0,05$) (Tabela 12).

Semelhante aos resultados encontrados com ovinos machos no confinamento, a inclusão de NCE, NCNE e ureia não influenciaram no consumo de MS e consequentemente dos nutrientes nos ovinos utilizados no ensaio de metabolismo. Segundo Forbes (1995) os ruminantes ingerem até que satisfaçam as suas necessidades de energia, a menos que sejam impedidos de o fazer pelo volume físico ou por características do alimento.

Tabela 12 – Consumo e digestibilidade aparente total dos nutrientes em ovinos alimentados com dietas contendo diferentes fontes de nitrogênio não-proteico

Variáveis ¹	Dietas ²				EPM ³	Valor de P ⁴		
	CONT	UREIA	NCNE	NCE		CxNNP	UxNC	NCNExNCE
Consumo diário, kg								
MS	1,31	1,15	1,29	0,99	0,068	0,308	0,951	0,153
MO	1,07	0,93	1,04	0,81	0,056	0,258	0,978	0,155
FDN	0,56	0,54	0,61	0,56	0,028	0,865	0,474	0,549
PB	0,21	0,20	0,21	0,16	0,011	0,509	0,579	0,134
Digestibilidade aparente total, %								
MS	77,6	78,7	80,6	78,9	0,746	0,325	0,619	0,457
MO	78,5	79,1	81,4	80,0	0,806	0,409	0,464	0,559
FDN	68,0	73,0	77,1	77,4	1,490	0,027	0,174	0,948
PB	75,6	79,3	80,9	79,1	0,429	0,061	0,760	0,489

¹MS = matéria seca; MSPM = matéria seca por peso metabólico; MO = matéria orgânica; MM = matéria mineral; FDN = fibra em detergente neutro; PB = proteína bruta. ²CONT = dieta controle; UREIA = dieta contendo ureia; NCNE = dieta contendo nitrato de cálcio não encapsulado; NCE = dieta contendo nitrato de cálcio encapsulado. ³EPM = erro padrão da média. ⁴Valores de P para os contrastes: C x NNP = contraste dieta controle e dietas com nitrogênio não-proteico; U x NC = contraste dieta com ureia e dietas com nitrato de cálcio; NCNE x NCE = contraste dieta com nitrato de cálcio não encapsulado e dieta com nitrato de cálcio encapsulado.

A digestibilidade aparente total da MS e MO não diferiram entre os contrastes ($P>0,05$) (Tabela 12). A digestibilidade do alimento é sua capacidade de permitir que o animal utilize seus nutrientes. A digestibilidade é influenciada entre muitos fatores, dentre eles pelo nível de ingestão de MS, que não diferiu e consequentemente não influenciou na digestibilidade da MO.

A digestibilidade da PB ($P=0,061$) teve uma tendência, sendo maior no NNP em relação ao controle (Tabela 12). A digestibilidade da PB foi maior quando tinha NNP, provavelmente por constituir uma fonte que tem solubilidade mais rápida no rúmen.

A digestibilidade da FDN diferiu ($P=0,027$) no contraste entre o tratamento controle e NNP, porém não diferiu nos outros contrastes (Tabela 12). As rações continham teores de fibra semelhantes e os mesmos ingredientes fibrosos. No entanto a digestibilidade da FDN foi maior quando os animais ingeriram uma fonte de nitrogênio não-proteico em relação a dieta controle. A adição de fontes de NNP aumentou a digestibilidade da FDN e isto provavelmente é devido aos microrganismos que fermentam a celulose e hemicelulose utilizarem amônia como fonte de nitrogênio para a síntese de proteína microbiana (RUSSELL et al., 1992). Ceconi et al. (2015) observaram que dietas contendo 0,6% de ureia propiciaram o aumento da digestibilidade da FDN em relação a dieta controle contendo farelo de soja e os autores atribuíram o aumento da digestibilidade à degradação da ureia no rúmen produzir $N-NH_3$, que desempenha papel importante na nutrição das bactérias que digerem fibra, em comparação com as de crescimento rápido que fermentam açúcares ou amido solúvel.

Adicionalmente, o aumento da digestibilidade da FDN nos tratamentos com NNP foi devido a digestibilidade da FDN nos tratamentos com nitrato de cálcio serem numericamente maiores. Segundo Yoshii, Asanuma e Hino (2003), a presença de nitrato resulta na co-existência de bactérias *Selenomonas ruminantium*, que foi classificada como redutora de nitrato, e bactérias celulolíticas e isto pode ter sido responsável pelo aumento da digestibilidade da FDN.

Tabela 13 – Consumo e balanço de nitrogênio em ovinos alimentados com dietas contendo diferentes fontes de nitrogênio não-proteico

Variáveis ¹	Dietas ²				EPM ³	Valor de P ⁴		
	CONT	UREIA	NCNE	NCE		CxNNP	UxNC	NCNExNCE
N ingerido, g/d	134,8	130,2	136,4	103,9	7,32	0,509	0,579	0,134
N fecal, g/d	32,7	27,3	27,1	21,1	2,11	0,132	0,534	0,314
N absorvido, g/d	102,1	102,9	109,2	82,8	5,61	0,773	0,621	0,114
N urinário g/d	18,9	16,6	13,4	12,7	1,14	0,078	0,191	0,833
N retido, g/d	83,2	86,3	95,8	70,1	5,09	0,940	0,792	0,090
% N absorvido	81,6	83,9	87,7	82,1	1,33	0,330	0,752	0,141
% N ingerido	61,7	66,5	70,9	65,0	1,42	0,070	0,648	0,127

²CONT = dieta controle; UREIA = dieta contendo ureia; NCNE = dieta contendo nitrato de cálcio não encapsulado; NE = dieta contendo nitrato de cálcio encapsulado

³EPM = erro padrão da média

⁴Valores de P para os contrastes: C x NNP = contraste dieta controle e rações com nitrogênio não-proteico; U x NC = contraste dieta com ureia e dietas com nitrato de cálcio; NCNE x NCE = contraste dieta com nitrato de cálcio não encapsulado e dieta com nitrato de cálcio encapsulado.

Não houve diferença ($P>0,05$) nos contrastes para ingestão de nitrogênio, N fecal, N absorvido e N retido em % do absorvido e N retido (Tabela 13). Houve tendência para aumento do N urinário e N retido em % do ingerido no tratamento controle em relação ao NNP. O nitrogênio urinário é mais susceptível de perda gasosa que o nitrogênio fecal. A urina dos ruminantes contém uma variedade de componentes nitrogenados, mas a forma dominante de N na urina é a ureia (DIJKISTRA et al., 2013). Os tratamentos com fontes de NNP tiveram um maior N retido em % do ingerido e, portanto, menor N urinário, e isso pode ser devido a uma maior eficiência do uso do N no rúmen. Corroborando, Lee et al. (2015) ao adicionar nitrato de cálcio protegido observaram que houve maior N retido e menor N urinário.

Não houve diferença ($P>0,05$) nos contrastes estudados em relação à concentração de ácidos graxos total e na proporção dos ácidos acético, butírico, isobutírico, valérico e isovalérico (Tabela 14). A proporção de ácido acético diferiu ($P=0,008$), sendo maior nos tratamentos com nitrato de cálcio em relação ao com ureia. A proporção de ácido propiônico diferiu, sendo o tratamento controle menor que os tratamentos com NNP ($P=0,018$); e o tratamento com ureia foi maior que os tratamentos com nitrato de cálcio ($P=0,007$). A relação Ac:Pr diferiu ($P=0,029$), sendo maior nos tratamentos com nitrato de cálcio em relação ao tratamento com ureia. Os outros contrastes não diferiram (Tabela 14).

Houve efeito de hora ($P < 0,05$) para a concentração de AGCC total, nas proporções do ácido propiônico, butírico, isobutírico e isovalérico e na relação Ac:Pr. Houve interação ($P < 0,05$) entre tratamento e hora para a concentração de AGCC total, para o ácido acético, propiônico, butírico e para a relação Ac:Pr.

Realizando o desdobramento da interação quanto ao AGCC total não houve efeito da interação nas horas 0, 2, 4, 6, 8 e 10 ($P > 0,05$). Na hora 12 o controle foi maior do que os tratamentos com NNP (152,4; 129,6; 125,4 e 105,7 mM para o tratamento controle, ureia, NCNE e NCE, respectivamente).

Tabela 14 – Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), nitrogênio amoniacal ($N-NH_3$) e pH ruminal em ovinos alimentados com dietas contendo diferentes fontes de nitrogênio não-proteico

Variáveis ¹	Dietas ²					Valor de P ⁴				
	CONT	UREIA	NCNE	NCE	EPM ³	Cx NNP	Ux NC	NCNE x NCE	H	D*H
AGCC, mM										
AGCC total	107,3	106,9	103,4	106,7	2,05	0,767	0,997	0,402	<0,01	0,023
AGCC como proporção do total, %										
Acético	64,35	63,84	65,89	67,62	0,29	0,154	0,008	0,124	0,261	<0,01
Propiônico	16,75	20,38	18,19	17,12	0,28	0,018	0,007	0,114	<0,01	<0,01
Butírico	9,90	11,50	10,92	10,25	0,02	0,207	0,268	0,475	<0,01	0,016
Isobutírico	0,916	0,879	0,836	0,826	0,17	0,230	0,436	0,960	<0,01	0,383
Valérico	1,10	1,08	0,99	0,97	0,06	0,157	0,188	0,817	0,107	0,567
Isovalérico	1,94	2,15	2,09	1,98	0,02	0,673	0,658	0,693	0,001	0,055
Ac:Pr	3,80	3,23	3,67	3,95	0,07	0,784	0,029	0,386	0,013	0,014
pH	6,09	6,05	6,31	6,21	0,03	0,023	<0,01	0,064	<0,01	0,864
$N-NH_3$, mg/dL	19,9	22,2	20,8	21,9	0,46	0,856	0,636	0,583	<0,01	0,093

¹Ac:Pr = relação acetato:propionato.

²CONT = dieta controle; UREIA = dieta contendo ureia; NCNE = dieta contendo nitrato de cálcio não encapsulado; NCE = dieta contendo nitrato de cálcio encapsulado.

³EPM = erro padrão da média

⁴Valores de P para os contrastes: C x NNP = contraste dieta controle e rações com nitrogênio não-proteico; U x NC = contraste dieta com ureia e dietas com nitrato de cálcio; NCNE x NCE = contraste dieta com nitrato de cálcio não encapsulado e dieta com nitrato de cálcio encapsulado. H = valor de P para hora; D*H = valor de P da interação entre dieta e hora.

Realizando o desdobramento da interação quanto ao ácido acético na hora 0, 6 não houve efeito ($P > 0,05$). Com relação a hora 2 (64,18; 65,01; 64,05 e 70,64 mM/100mM para o

tratamento controle, ureia, NCNE e NCE, respectivamente) e hora 4 (63,90; 64,33; 63,76 e 67,55 mM/100 mM para o tratamento controle, ureia, NCNE e NCE, respectivamente) o tratamento com NCE foi maior do que o tratamento com NCNE (Figura 6). Na hora 8 (63,37; 63,10; 68,51; 66,86 mM/100 mM para o tratamento controle, ureia, NCNE e NCE, respectivamente) os tratamentos com NNP foi maior que o controle; os tratamentos com nitrato de cálcio foi maior que o com ureia; e o tratamento com NCNE foi maior que o NCE. Na hora 10 (64,60; 62,66; 67,26 e 68,31 mM/100 mM para o tratamento controle, ureia, NCNE e NCE, respectivamente) e hora 12 (63,87; 62,17; 67,37 e 68,26 mM/100 mM para o tratamento controle, ureia, NCNE e NCE, respectivamente) os tratamentos com nitrato de cálcio foi maior que o tratamento com ureia (Figura 5).

Figura 5 – Proporção molar de ácido acético ruminal de ovinos em função dos tratamentos com diferentes fontes de nitrogênio e das horas após a alimentação

Realizando o desdobramento da interação quanto ao ácido propiônico na hora 0 (13,82; 16,83; 17,75 e 17,75 mM/100 mM para o tratamento controle, ureia, NCNE e NCE, respectivamente) os tratamentos com NNP foram maiores que o tratamento controle. A hora 2 (14,79; 18,21; 19,96 e 16,16 mM/100 mM para o tratamento controle, ureia, NCNE e NCE, respectivamente) e hora 4 (13,20; 18,49; 20,34 e 16,41 mM/100 mM para o tratamento controle, ureia, NCNE e NCE, respectivamente) os tratamentos com NNP foi maior que o controle; e o tratamento com NCNE foi maior que o NCE. Com relação a hora 6 (17,64; 20,82; 15,95 e 16,39 mM/100 mM para o tratamento controle, ureia, NCNE e NCE, respectivamente), hora 8 (18,34; 22,11; 17,10 e 17,18 mM/100 mM para o tratamento

controle, ureia, NCNE e NCE, respectivamente), hora 10 (18,85; 22,87; 17,09 e 17,83 mM/100 mM para o tratamento controle, ureia, NCNE e NCE, respectivamente) e hora 12 (19,41; 23,32; 18,68 e 18,42 mM/100 mM para o tratamento controle, ureia, NCNE e NCE, respectivamente) o tratamento com ureia foi maior do que os tratamentos com nitrato de cálcio (Figura 6).

Figura 6 – Proporção molar de ácido propiônico ruminal de ovinos em função dos tratamentos com diferentes fontes de nitrogênio e das horas após a alimentação

O desdobramento quanto ao ácido butírico durante as horas 0, 2, 6, 8, 10 e 12 não houve efeito. Com relação a hora 4 (7,50; 12,00; 11,64 e 11,85 mM para o tratamento controle, ureia, NCNE e NCE, respectivamente) os tratamentos com NNP foi maior do que o controle (Figura 7).

Figura 7 – Proporção molar ruminal de ácido butírico de ovinos em função dos tratamentos com diferentes fontes de nitrogênio e das horas após a alimentação

O desdobramento quanto a relação Ac:Pr na hora 4 não houve efeito. Na hora 0 o tratamento controle foi maior do que aqueles com NNP (4,92; 3,97; 3,57 e 3,78 mM, para o tratamento controle, ureia, NCNE e NCE, respectivamente). Na hora 2 (4,88; 3,61; 3,22 e 4,52 mM para o tratamento controle, ureia, NCNE e NCE, respectivamente) o NCNE foi menor do que o encapsulado. Na hora 6 (3,90; 3,10; 3,23 e 3,94 mM para o tratamento controle, ureia, NCNE e NCE, respectivamente), hora 8 (3,25; 2,87; 4,04 e 3,75 mM para o tratamento controle, ureia, NCNE e NCE, respectivamente), hora 10 (3,21; 2,77; 3,96 e 3,71 mM para o tratamento controle, ureia, NCNE e NCE, respectivamente) e hora 12 (3,09; 2,72; 3,63 e 3,76 mM para o tratamento controle, ureia, NCNE e NCE, respectivamente) a relação Ac:Pr foi maior nos tratamentos com nitrato de cálcio em relação ao com ureia (Figura 8).

Figura 8 – Relação acetato:propionato em função dos tratamentos com diferentes fontes de nitrogênio e das horas após a alimentação de ovinos

As concentrações de AGCC são uma consequência das taxas de produção e de remoção dos AGCC e este último pode ser afetado por fatores como o pH, o volume ruminal, o fluxo de água do rúmen e a pressão osmótica (LÓPEZ et al., 1994). As concentrações de AGCC total nas dietas neste estudo não diferiram e corroborando van Zijderveld et al. (2010) estudando 2,6% do íon nitrato na ração de ovinos e Lee et al. (2015b) estudando teores de 0 a 3% de nitrato de cálcio encapsulado na dieta de bovinos assim como neste estudo não verificaram diferenças nas concentrações de ácidos graxos de cadeia curta total. Hulshof et al. (2012) também não observaram diferenças na concentração de ácidos graxos quando adicionaram 22 g de nitrato/kg MS ingerida para bovinos.

Assim como neste estudo, em algumas pesquisas verificou-se que a adição de nitrato na alimentação de ruminantes apresentou tendência de aumento do ácido acético e redução do ácido propiônico (NOLAN et al., 2010; HULSHOF et al., 2012). Segundo Ungerfeld e Kohn (2006), as bactérias ao reduzirem nitrato, que tem maior afinidade com H_2 , competem com os microrganismos metanogênicos e com as bactérias produtoras de ácido propiônico por equivalentes redutores, o que resulta na redução de metano e ácido propiônico. Ao contrário Lee et al. (2015b) não observaram nenhuma diferença nas proporções dos ácidos acético, propiônico e butírico.

Corroborando, de Raphélis-Soissan et al. (2014) avaliaram rações para ovinos contendo 2% de nitrato ou 1,1% de ureia e observaram maior relação acetato:propionato quando adicionaram nitrato. Segundo LIU e WHITMAN (2008), o nitrato no rúmen remove

mais efetivamente o H_2 e a redução de $NADH$ a NAD^+ é aumentada e favorece a formação de acetato. A transferência de elétrons em amônia na síntese celular retém mais energia em produtos finais no rúmen do que os elétrons que são utilizados para produção de metano. O resultado líquido são produtos finais mais oxidados, com a proporção mais elevada de acetato do que propionato (LENG, 2008).

Figura 9 - pH do fluido ruminal de ovinos em função dos tratamentos com diferentes fontes de nitrogênio e das horas após a alimentação

Não houve interação entre tratamento e hora para nenhuma variável ($P>0,05$), no entanto houve efeito de hora para as variáveis pH e $N-NH_3$ (Tabela 14).

O pH ruminal foi maior nos tratamentos com NNP em relação ao controle ($P=0,023$) e maior nos tratamentos com nitrato de cálcio em relação ao tratamento com ureia ($P<0,01$), e nos outros contrastes não houve diferença (Tabela 14).

Embora o nitrato seja uma fonte de NNP como a ureia, ele atua no rúmen utilizando os íons hidrogênio proveniente da fermentação ruminal para que ocorra redução a nitrito e depois à amônia e provavelmente isto influenciou nos maiores valores de pH nos tratamentos com nitrato de cálcio. Segundo Lee et al. (2015b) no rúmen os íons são removidos de forma mais eficaz durante a redução de nitrato. O ácido láctico produzido pelo *Streptococcus bovis* reduz o pH ruminal. No entanto, este ácido pode ser fermentado pelas *Selenomonas ruminantium*, bactérias que segundo Iwamoto, Isanuma e Hino (2002) atuam na redução de nitrato e isto permitiu que o pH ruminal fosse maior nas dietas que continham NC. Assim como foi observado aumento do pH e da relação acetato: propionato neste estudo, segundo Zhou, Yu e Meng (2012) e de Raphélis-Soissan et al. (2014), o nitrato propiciou aumento do pH e

aumento da proporção acetato: propionato. O aumento do pH nos tratamentos com NNP em relação ao controle foi maior devido a contribuição dos valores maiores de pH nos tratamentos com nitrato de cálcio, pois o valor de pH do tratamento com ureia numericamente é menor que o tratamento controle.

Na Figura 9 observa-se que o pH ruminal aumentou duas horas após o fornecimento da alimentação e a medida que as horas passaram o pH reduziu. Provavelmente a redução mais acentuada do pH do tratamento controle nas últimas horas foi devido o aumento dos AGCC total.

O N-NH₃ não diferiu em nenhum dos contrastes estudados ($P>0,05$) (atabela 14). O N-NH₃ apresentou elevação às 4 horas e novamente as 8 horas após a alimentação (Figura 10). Como observado neste estudo, Nolan et al. (2010) observaram que a substituição de KNO₃ à ureia fornecidos a ovinos não influenciou na amônia ruminal. A ureia é rapidamente convertida em amônia no rúmen e o padrão de acúmulo de amônia a partir de uma carga de ureia no rúmen deve ser qualitativamente semelhante à que ocorre a partir de uma carga de nitrato (LENG, 2008). Segundo Tillman et al. (1965) 80% da dose do nitrato fornecido desaparece no rúmen após uma hora da administração e o acúmulo de nitrito atinge um pico em duas a quatro horas do fornecimento de nitrato. Lewis (1951a) em experimento com ovinos observou queda rápida da concentração de nitrato no rúmen, coincidente com a produção de nitrito que desapareceu 5 horas após.

As fontes de NNP utilizadas não causaram aumento de N-NH₃ no rúmen, provavelmente devido as dietas constituírem de alto teor de concentrado que permitiu disponibilidade de energia para a microbiota ruminal. A eficiência da síntese de proteína microbiana depende da disponibilidade de energia proveniente da fermentação da matéria orgânica; e o aumento microbiano implica aumento da eficiência de uso do nitrogênio pelos microrganismos e influencia na concentração de amônia ruminal (BACH et al., 2005).

Figura 10 - N-NH₃ no fluido ruminal de ovinos em função dos tratamentos com diferentes fontes de nitrogênio e das horas após a alimentação

5.4 Conclusão

A inclusão de 2% do íon nitrato, tanto na forma de NC encapsulado como NC não encapsulado para ovinos, permite que o desempenho e características de carcaça sejam similares a dieta com inclusão de 1,1% de ureia.

O nitrato de cálcio influencia no aumento da digestibilidade da fibra em detergente neutro, do pH ruminal, da proporção de acetato em relação a concentração de AGCC total e da relação Ac:Pr.

Referências

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16th ed. Gaithersburg, 1997. 1141 p.

_____. **Official methods of analysis**. 15th ed. Arlington, 1990. v. 1.

BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M.D. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, p. 9-21, 2005.

CRAMPTON, E. W. Interrelations between digestible nutrient and energy content, voluntary dry matter intake, and the overall feeding value of forages. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 16, p. 546-552, 1957.

CECONI, I.; RUIZ-MORENO, M. J.; DILORENZO, N.; DICOSTANZO, A.; CRAWFORD, G. I. Effect of urea inclusion in diets containing corn dried distillers grains on feedlot cattle performance, carcass characteristics, ruminal fermentation, total tract digestibility, and purine

derivatives-to-creatinine index. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 93, p. 357-369, 2015.

CHANEY, A.L.; MARBACH, E.P. Modified reagentes for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 8, p. 130-137, 1962.

CHIZZOTTI, F.H.M.; PEREIRA, O.G.; TEDESCHI, L.O.; VALADARES FILHO, S.C.; CHIZZOTTI, M.L.; LEÃO, M.I.; PEREIRA, D.H. Effects of dietary nonprotein nitrogen on performance, digestibility, ruminal characteristics, and microbial efficiency in crossbred steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, p. 1173-1181, 2008.

DE RAPHÉLIS-SOISSAN, V.; LI, L.; GODWIN, I. R., BARNETT, M.C.; PERDOK, H.B.; HEGARTY, R.S. Use of nitrate and *Propionibacterium acidipropionici* to reduce methane emissions and increase wool growth of Merino sheep. **Animal Production Science**, Melbourne, v. 54, p. 1860-1866, 2014.

DIJKSTRA, J.; OENEMA, O.; VAN GROENIGEN, J.W.; SPEK, J.W.; VAN VUUREN, A.M.; BANNINK, A. Diet effects on urine composition of cattle and N₂O emissions. **Animal**, Cambridge, v. 7, p. 292-302, 2013.

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. Encapsulated nitrate and cashew nut shell liquid on blood and rumen constituents, methane emission, and growth performance of lambs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 92, p. 2214-2224, 2014.

FORBES, J.M. **Voluntary food intake and diet selection in farm animals**. 2nd ed. Wallingford: Oxford, 1995. 453 p.

HULSHOF, R.B.A.; BERNDT, A.; GERRITS, W.J.J.; DIJKSTRA, J.; VAN ZIJDERVELD, S.M.; NEWBOLD, J.R.; PERDOK, D.H.B. Dietary nitrate supplementation reduces methane emission in beef cattle fed sugarcane based diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 90, p. 2317-2323, 2012.

KOSLOSKI, G.V. **Bioquímica dos ruminantes**. 2. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2009. 216 p.

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**, Champaign, v. 93, p. 2391-2404, 2015a.

_____. 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, 2015b.

LENG, R.A. **The potential of feeding nitrate to reduce enteric methane production in ruminants**. Canberra: Commonwealth Government of Australia, Report to Department of Climate Change, 2008. 82 p. Disponível em: <<http://www.penambulbooks.com/Downloads/Leng-Final%20Modified%20%2017-9-2008.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2014.

LEWIS, D. The metabolism of nitrate and nitrite in the sheep 1. The reduction of nitrate in the rumen of the sheep. **The Biochemical Journal**, London, v. 48, p. 175, 1951a.

_____. 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, 1951b.

LIU, Y.; WHITMAN, W.B. Metabolic, phylogenetic and ecological diversity of the methanogenic Archaea. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1125, p. 171-189, 2008.

LIZARAZO, A. C.; MENDOZA, G. D.; KÚ, J.; MELGOZA, L. M.; CROSBY, M. Effects of slow-release urea and molasses on ruminal metabolism of lambs fed with low-quality tropical forage. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 116, p. 28-31, 2014.

LOFGREEN, G. P. The estimation of total digestible nutrients from digestible organic matter. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 12, p. 359-365, 1953.

LÓPEZ S., HOVELL F.D., MACLEOD N.A. Osmotic pressure, water kinetics and volatile fatty acid absorption in the rumen of sheep sustained by intragastric infusions. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 71, p. 153-168, 1994.

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

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of sheep. 6th ed. Washington: National Academy Press, 1985. 99 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**, Champaign, v. 92, p. 5032-5040, 2014.

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**, Melbourne, v. 50, p. 801-806, 2010.

NOTTER, D. R.; GREINER, S. P.; WAHLBERG, M. L. Growth and carcass characteristics of lambs sired by Dorper and Dorset rams. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, p. 1323-1328, 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**, Champaign, v. 70, p. 3551-3561, 1992.

SAS INSTITUTE. **Sas systems for Windows**: version 9. Cary, 2002.

TILLMAN, A.D.; SHERIHA, G.M.; SIRNY, R.J. Nitrate reduction studies with sheep. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 24, p. 1140-1146, 1965.

UNGERFELD, E.M.; KOHN, R.A. The role of thermodynamics in the control of ruminal fermentation. In: SEJRSEN, K.; HVELPLUND, T.; NIELSEN, M.O. **Ruminant physiology: digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress.** Wageningen: Wageningen Academic, 2006. p. 55-85.

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

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**, Champaign, v. 94, p. 4028-4038, 2011.

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**, Champaign, v. 93, p. 5856-5866, 2010.

WEICHENTHAL, B.A.; EMBRY, L.B.; EMERICK, R.J.; WHETZAL, D.F.W. Influence of sodium nitrate, vitamin A and protein level on feedlot performance and vitamin A status of fattening cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 22, p. 979-984, 1963.

YOSHII, T.; ASANUMA, N.; HINO, T. Number of nitrate-and nitrite-reducing *Selenomonas ruminantium* in the rumen, and possible factors affecting its growth. **Animal Science Journal**, Tokyo, v. 74, p. 483-491, 2003.

ZHOU, Z.; YU, Z.; MENG, Q. Effects of nitrate on methane production, fermentation, and microbial populations *in vitro* ruminal cultures. **Bioresource Technology**, Essex, v. 103, p. 173-179, 2012.