

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

**Avaliação de coprodutos agroindustriais associados à *Tithonia diversifolia* na alimentação de ruminantes sobre parâmetros de degradabilidade ruminal, cinética fermentativa e produção de metano *in vitro***

**Laura Bertolaso De Vecchi**

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

**Piracicaba  
2023**

**Laura Bertolaso De Vecchi**  
**BACHARELA EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**Avaliação de coprodutos agroindustriais associados à *Tithonia diversifolia* na  
alimentação de ruminantes sobre parâmetros de degradabilidade ruminal, cinética  
fermentativa e produção de metano *in vitro***

Versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:  
Prof. Dr. **ADIBE LUIZ ABDALLA**

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

**Piracicaba**  
**2023**

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

De Vecchi, Laura Bertolaso

Avaliação de coprodutos agroindustriais associados à *Tithonia diversifolia* na alimentação de ruminantes sobre parâmetros de degradabilidade ruminal, cinética fermentativa e produção de metano *in vitro* / Laura Bertolaso De Vecchi. - - Versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011 - - Piracicaba, 2023.

63 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Gases de efeito estufa 2. Nutrição de ruminantes 3. Produção de gases *in vitro*  
4. Resíduos agroindustriais 5. Sustentabilidade 7. *Tithonia diversifolia* I. Título

Aos meus pais, Maurício e Martha, pelo apoio e ensinamentos. Aos meus irmãos, Sarah e Neto, por compartilharem as alegrias e desafios. À minha sobrinha, Valentina, por quem eu me inspiro. Ao meu noivo, Gustavo, pelo amor e incentivo constantes. Vocês me impulsionaram a alcançar cada conquista.

**Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por toda minha história. Aos meus pais, Maurício De Vecchi e Martha De Vecchi, pelo suporte e dedicação ilimitados para a construção da minha educação e caráter. Aos meus irmãos, Sarah De Vecchi e Neto De Vecchi, por serem meus melhores amigos e estarem presentes em cada fase da minha vida. À minha sobrinha, Valentina De Vecchi, por ser a minha inspiração e trazer leveza para os meus dias. Ao meu noivo, Gustavo Neves, por toda parceria e incentivos diários. Vocês são a minha base.

Agradeço à Universidade de São Paulo, à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura pelo apoio e disponibilidade para a conclusão do meu trabalho; e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro durante a pesquisa (processo nº 161122/2021-3).

Ao Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla, pela oportunidade. A confiança, recepção e orientação do professor foi muito importante para a conclusão da minha pesquisa. Ao meu amigo Dr. Simón Pérez Márquez pela sua dedicação, disponibilidade, paciência e ensinamentos durante toda a realização deste trabalho. Ao Prof. Dr. Helder Louvandini pela colaboração, e aos técnicos do Laboratório de Nutrição Animal pelo suporte necessário.

Aos irmãos que a vida me deu: Adriane, Ana Carolina, Bárbara, Fernanda, Lucas, Tatiane e Ricardo por compartilharem as alegrias e dificuldades, tornando tudo muito mais bonito. E aos amigos que encontrei durante essa jornada acadêmica e que pretendo levar para a vida: Anna Rosa, Josiel, Joyce, Karoline, Leonardo, Robson e Vagner, pela companhia, auxílio e conversas produtivas.

Muito obrigada a todos os envolvidos!

## **EPIGRAFE**

*“Não é a mais forte das espécies que sobrevive, nem a mais inteligente.  
É aquela que é mais adaptável as mudanças” – Charles Darwin*

## SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	12
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. HIPÓTESES .....	17
3. OBJETIVOS .....	19
3.1 Objetivos específicos.....	19
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
4.1 Produção de ruminantes e emissões de gases de efeito estufa (GEE).....	21
4.1.1 CH <sub>4</sub> entérico .....	23
4.1.2 Técnicas <i>in vitro</i> para avaliação de produção de gases .....	24
4.2 Utilização de coprodutos agroindustriais em dietas de ruminantes .....	25
4.3 Uso de <i>Tithonia diversifolia</i> como biomassa forrageira não convencional na dieta de ruminantes.....	27
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	31
5.1 Local.....	31
5.2 Experimento 1 – Caracterização e seleção dos coprodutos .....	31
5.2.1 Preparação dos substratos e análises bromatológicas.....	31
5.2.2 Delineamento experimental .....	33
5.2.3 Preparo do inóculo e ensaio de produção de gases <i>in vitro</i> .....	33
5.2.4 Determinação de CH <sub>4</sub> .....	34
5.2.5 Degradabilidade da matéria orgânica.....	35
5.2.6 Seleção dos coprodutos.....	35
5.3 Experimento 2 – Formulação e seleção das dietas experimentais.....	36
5.3.1 Formulação das dietas experimentais.....	36
5.3.2 Análises bromatológicas .....	37
5.3.3 Preparo dos inóculos e ensaio de produção de gases <i>in vitro</i> .....	38
5.3.4 Determinação de CH <sub>4</sub> , degradabilidade <i>in vitro</i> e parâmetros	

	7
fermentativos.....	39
5.3.5    Particionamento da matéria orgânica .....	39
5.3.6    Modelo estatístico para avaliação da cinética fermentativa .....	39
5.3.7    Análise estatística.....	40
5.3.8    Seleção das dietas de maior potencial .....	40
6. RESULTADOS .....	42
6.1    Experimento 1 – Caracterização e seleção dos coprodutos.....	42
6.1.1    Ensaio <i>in vitro</i> – degradabilidade e produção de CH <sub>4</sub> .....	42
6.2    Experimento 2 – Formulação e seleção das dietas experimentais.....	43
6.2.1    Ensaio <i>in vitro</i> de produção de gases.....	43
6.2.2    Degradabilidade <i>in vitro</i> .....	46
6.2.3    Cinética de fermentação <i>in vitro</i> .....	46
7. DISCUSSÃO.....	48
7.1    Degradabilidade, produção de gases, CH <sub>4</sub> e parâmetros fermentativos <i>in vitro</i>	48
7.2    Cinética de fermentação <i>in vitro</i> .....	50
8. CONCLUSÃO .....	52



## RESUMO

### **Avaliação de coprodutos agroindustriais associados à *Tithonia diversifolia* na alimentação de ruminantes sobre parâmetros de degradabilidade ruminal, cinética fermentativa e produção de metano *in vitro***

O crescimento populacional resulta em uma demanda cada vez maior por alimentos, especialmente carne e leite, o que levanta preocupações sobre a sustentabilidade desse setor a longo prazo, sendo necessário repensar os sistemas de produção agrícola. O uso de coprodutos agroindustriais e forrageiras não convencionais, como a *Tithonia diversifolia*, é uma estratégia promissora para reduzir os impactos ambientais, melhorar a produtividade dos ruminantes e reduzir as emissões de gases de efeito estufa mantendo um bom desempenho dos animais. O objetivo foi investigar a viabilidade dessas abordagens avaliando a composição nutricional dos coprodutos e seu uso em dietas, parâmetros de degradabilidade ruminal, produção de metano *in vitro* e impacto ambiental em comparação com as dietas convencionais. Primeiramente, foram caracterizados 25 coprodutos provenientes da agroindústria de acordo com sua composição bromatológica, parâmetros fermentativos *in vitro*, degradabilidade e produção de CH<sub>4</sub>, dos quais metade foram selecionados (bagaço de laranja (BL), bagaço de mandioca (BM), bagaço de uva tinta (BUT), canola moída (CM), farelo de algodão (FA), farelo de girassol (FG), farelo de soja (FS), palhada de milho (PM), palhada de feijão (PF), resíduo de feijão (RF), rolão de milho (RM), resíduo de cervejaria – bagaço (RCB), resíduo de cervejaria - levedura (RCL), resíduo de cervejaria – TRUB (RCT), torta de macaúba (TM), e torta de nabo forrageiro (TN)) para constituírem 10 dietas experimentais formuladas para serem compostas por coprodutos e *Tithonia diversifolia* como forrageira não convencional. As dietas foram avaliadas por análises bromatológicas, ensaios *in vitro* de degradabilidade e produção de gases e comparadas estatisticamente contra uma dieta controle (DC) contendo ingredientes convencionais (milho, soja e capim xaraés). Foram selecionadas três dietas com alto valor nutricional, degradabilidade e potencial de redução de CH<sub>4</sub> entérico em comparação com a DC, sendo elas: Dieta 2 (composta por 25% de *Urochloa brizantha*, 25% de TD, 22% de bagaço de mandioca e 28% de farelo de girassol), Dieta 3 (25% de *Urochloa brizantha*, 25% de TD, 3% de bagaço de laranja, 26% de bagaço de mandioca e 21% de farelo de algodão) e Dieta 5 (25% de *Urochloa brizantha*, 25% de TD, 16% de bagaço de laranja, 12% de palhada de feijão e 22% de resíduo de cervejaria – levedura); sendo possível concluir a viabilidade de formular dietas utilizando coprodutos agroindustriais selecionados, sem comprometer a produtividade dos animais e a qualidade nutricional da dieta fornecida.

Palavras-chave: Gases de efeito estufa, Nutrição de ruminantes, Produção de gases *in vitro*, Resíduos agroindustriais, Sustentabilidade, *Tithonia diversifolia*

## ABSTRACT

### **Evaluation of agro-industrial by-products associated with *Tithonia diversifolia* in ruminant feeding on ruminal degradability parameters, fermentative kinetics, and *in vitro* methane production**

Population growth leads to an increasing demand for food, especially meat and milk, raising concerns about the long-term sustainability of this sector. It becomes necessary to rethink agricultural production systems. One promising strategy involves the use of agro-industrial by-products and unconventional forages, such as *Tithonia diversifolia*, to reduce environmental impacts, improve ruminant productivity, and decrease greenhouse gas emissions while maintaining good animal performance. This study aims to investigate the viability of these approaches by evaluating the nutritional composition of the by-products and their use in diets, ruminal degradability parameters, *in vitro* methane production, and environmental impact compared to conventional diets. Initially, 25 by-products from the agro-industry were characterized based on their bromatological composition, *in vitro* fermentative parameters, degradability, and methane production. Half of these by-products were selected (orange pulp (BL), cassava bagasse (BM), red grape pomace (BUT), ground canola (CM), cottonseed meal (FA), sunflower meal (FG), soybean meal (FS), corn straw (PM), bean straw (PF), bean waste (RF), corn cob (R), brewery waste - bagasse (RCB), brewery waste - yeast (RCL), brewery waste - TRUB (RCT), macaw palm cake (TM) and forage turnip cake (TN) to compose 10 experimental diets with *Tithonia diversifolia* as an unconventional forage. The diets were evaluated through bromatological analyses, *in vitro* degradability, and gas production assays, statistically compared to a control diet (DC) containing conventional ingredients (corn, soybean, and Xaraés grass). Three diets were selected with high nutritional value, degradability, and potential for enteric methane reduction compared to the DC. These diets are: Diet 2 (composed of 25% *Urochloa brizantha*, 25% TD, 22% cassava bagasse, and 28% sunflower meal), Diet 3 (25% *Urochloa brizantha*, 25% TD, 3% orange pulp, 26% cassava bagasse, and 21% cottonseed meal), and Diet 5 (25% *Urochloa brizantha*, 25% TD, 16% orange pulp, 12% bean straw, and 22% brewery waste - yeast). This study concludes the feasibility of formulating diets using selected agro-industrial by-products without compromising animal productivity and the nutritional quality of the provided diet.

**Keywords:** Greenhouse gases, Ruminant nutrition, *In vitro* gas production, Agro-industrial byproducts, Sustainability, *Tithonia diversifolia*

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Contribuições das categorias para emissões de CO <sub>2</sub> .....	22
Figura 2. Contribuições das categorias para emissões de CH <sub>4</sub> .....	22
Figura 3. Contribuições das categorias para emissões de N <sub>2</sub> O .....	22

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 5.1 – Composição bromatológica dos coprodutos .....	32
Tabela 5.2 – Proporção (%) dos ingredientes nas dietas experimentais.....	37
Tabela 5.3 – Composição bromatológica das dietas experimentais. ....	38
Tabela 5.4 – Modelos estatísticos para ajuste das curvas de fermentação de gases <i>in vitro</i> .....	40
Tabela 6.1 – Caracterização dos coprodutos nos ensaios <i>in vitro</i> de degradabilidade e produção de gases. ....	43
Tabela 6.2 – Degradabilidade e produção de gases <i>in vitro</i> das dietas experimentais. ....	45
Tabela 6.3 – Parâmetros estimados para a cinética de fermentação <i>in vitro</i> das dietas experimentais.....	47

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

°C	Graus Celsius
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
BC	Bagaço de cana-de-açúcar
BC	Bagaço de cana-de-açúcar
BL	Bagaço de laranja
BL	Bagaço de laranja
BM	Bagaço de mandioca
BUB	Bagaço de uva branca
BUT	Bagaço de uva tinto
BX	<i>Urochloa brizantha</i>
C	Carbono
CC	Casca de café
CENA	Centro de Energia Nuclear na Agricultura
CH <sub>4</sub> MO	Produção de metano por matéria orgânica
CH <sub>4</sub> MS	Produção de metano por matéria seca
CH <sub>4</sub>	Metano
CM	Canola moída
CM	Canola moída
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CS	Casca de soja
d	Parâmetro que define a forma da curva
D1	Dieta 1
D10	Dieta 10
D2	Dieta 2
D3	Dieta 3
D4	Dieta 4
D5	Dieta 5
D6	Dieta 6
D7	Dieta 7
D8	Dieta 8
D9	Dieta 9

DC	Dieta controle
DGPB	Degradabilidade da proteína bruta
DMO	Degradabilidade da matéria orgânica
DMS	Degradabilidade da matéria seca
EB	Energia bruta
EE	Extrato etéreo
EM	Energia metabolizável
EPM	Erro padrão da média
FA	Farelo de algodão
FDA	Fibra em detergente ácido
FDN	Fibra em detergente neutro
FG	Farelo de girassol
FP	Fator de partição
FS	Farelo de soja
g	Gramas
GEE	Gases de Efeito Estufa
GP MO	Produção de gases por matéria orgânica
GP MS	Produção de gases por matéria seca
GP	Produção de gás
h	Hora
H <sub>2</sub>	Hidrogênio
K	Taxa constante de degradação do substrato
K1	Taxa de produção de gases da porção rapidamente degradável
K2	Taxa de produção de gases da porção lentamente degradável
kcal	Quilocalorias
kg	Quilogramas
L	Lagtime
L	Litro
LANA	Laboratório de Nutrição Animal
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MM	Massa fresca
MM	Matéria mineral

MO	Matéria orgânica
MOVD	Matéria orgânica verdadeiramente degradada
MS	Matéria seca
N	Nitrogênio
N <sub>2</sub> O	Óxido nitroso
P	Palhada de milho
PB	Proteína bruta
PC	Palhada de cana
PF	Palhada de feijão
PG	Produção de gases
pH	Potencial hidrogênico
RCB	Resíduo de cervejaria (bagaço)
RCL	Resíduo de cervejaria (levedura)
RCT	Resíduo de cervejaria (TRUB)
RF	Resíduo de feijão
RM	Resíduo de mandioca
SC	Silagem de cana-de-açúcar
SM	Sabugo de milho
SSP	Sistema Silvopastoril
T	Tempo
T <sub>0.5</sub>	Tempo à metade da produção total de gases
TD	<i>Tithonia diversifolia</i>
TM	Torta de mamona
TMA	Torta de macaúba
TN	Torta de nabo forrageiro
U <sub>0.5</sub>	Taxa de produção de gás no T <sub>0.5</sub>
USP	Universidade de São Paulo
V	Volume de gases
VF	Volume de gás assintótico
Vf1	Volume de gás produzido pela porção rapidamente degradada
Vf2	Volume de gás produzido pela porção lentamente degradada
VGP	Volume de gás produzido

## 1. INTRODUÇÃO

A população mundial está em constante crescimento, e estima-se que possa atingir o número de 9,7 bilhões de pessoas até 2050 (ONU, 2022). Esse crescimento contínuo resulta em uma demanda cada vez maior por alimentos, em especial carne e leite. O aumento do consumo de proteína de origem animal, especialmente proveniente da produção de ruminantes, levanta preocupações sobre a sustentabilidade desse setor a longo prazo devido às suas contribuições para as emissões de gases de efeito estufa (GEE) (FAO, 2020). Em consequência deste cenário, o sistema de produção de ruminantes tem enfrentado desafios relacionados a suprir a demanda alimentar mundial, garantir a segurança alimentar, e reduzir a emissão de GEE (Gutiérrez-Gómez, 2021). Além disso, há a necessidade de lidar com a competição pelos recursos disponíveis, como terras aráveis, que podem ser utilizadas tanto para a produção de alimentos para humanos quanto para a produção de ração animal (Halmemies-Beauchet-Filleau, 2018; Mlambo, 2019).

Nesse contexto, diferentes abordagens surgem com o intuito de repensar os sistemas de produção agropecuária a fim de alcançar mudanças mais sustentáveis (Wijerathna-Yapa, 2021). Na nutrição animal, destacam-se estratégias com grande potencial para redução dos impactos ambientais associados ao sistema, especialmente por meio do uso de coprodutos agroindustriais como ingredientes na formulação de rações. A utilização destes coprodutos como ingredientes alternativos em dietas pode reduzir a competição por alimentos de consumo em comum entre humanos e animais, além de apresentarem potencial de mitigar a produção de metano (CH<sub>4</sub>) e apresentar maior degradabilidade ruminal (Bizzuti, 2023).

Os coprodutos são provenientes da transformação de alimentos em féculas, farinhas, polpas, sucos, entre outros, bem como o beneficiamento de grãos (Salami et al., 2019). Normalmente, esses coprodutos não são destinados para consumo humano devido à sua composição bromatológica, porém podem ser aproveitados por ruminantes, que são animais que conseguem converter esses alimentos em proteínas de qualidade para os seres humanos (Mottet, 2017). A viabilidade do uso desses ingredientes em dietas para animais depende de vários fatores como toxicidade, potencial nutritivo, desempenho da produção animal e os custos de produção em comparação aos alimentos convencionais utilizados (Halmemies-Beauchet-Filleau, 2018).

Além disso, é importante reconhecer que na pecuária, o manejo inadequado dos pastos pode levar à degradação do solo e à redução da biodiversidade, prejudicando a pegada ecológica do setor (Bogunovic, 2022). Nesse sentido, outra estratégia promissora para mitigar os impactos ambientais é a implantação de sistemas silvopastoris (SSP), que são sistemas integrados que



associam árvores ou arbustos com pastagens para os animais, contribuindo para a fertilidade do solo, armazenamento de carbono (C) (Valenzuela Que, 2022), aumento da biodiversidade (Maurício, 2019) e suplementação de dietas. A adoção desses sistemas pode auxiliar sistemas pecuários com manejo inadequado de pastos, que podem levar à degradação do solo e à redução da biodiversidade, prejudicando a pegada ecológica do setor (Bogunovic, 2022).

Nos SSP, um arbusto que vem sendo bastante utilizado é a *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A.Gray (TD). A TD é conhecida popularmente como botão de ouro, margaridão ou girassol mexicano, e é uma planta forrageira com alto potencial nutritivo, elevada produção de biomassa, além de ser amplamente disponível em várias regiões (Rivera, 2021). O uso de coprodutos em combinação com a TD na dieta dos ruminantes pode ser uma associação promissora, podendo fornecer uma dieta equilibrada e econômica, além de possuir grande potencial para melhorar o desempenho produtivo dos animais.

Além dos benefícios produtivos, o uso de coprodutos associados à TD pode reduzir as emissões de GEE, pois a inclusão de forrageiras alternativas nos sistemas de produção pecuária permite a captura e o armazenamento de C (Gava et al., 2022), enquanto a utilização de coprodutos reduz a necessidade de insumos convencionais e os impactos ambientais associados.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi explorar e avaliar a viabilidade da utilização de coprodutos agroindustriais em dietas direcionadas a ruminantes, com a inclusão de uma forrageira não convencional, como a TD, propondo essa associação como uma forma sustentável de produção de ruminantes. Buscou-se investigar a possível redução das emissões de GEE associadas a essas alternativas.

A análise dessas práticas busca fornecer subsídios para a adoção de estratégias mais sustentáveis no setor pecuário, contribuindo para a melhoria do setor produtivo, redução das emissões de GEE, promovendo a sustentabilidade ambiental. Essas medidas são promissoras para garantir a segurança alimentar, a prosperidade econômica e a preservação do meio ambiente em escala global.

## 2. HIPÓTESES

- i. Coprodutos agroindustriais não comestíveis por humanos associados à forrageiras não convencionais com baixa demanda de fertilidade do solo como a *T. diversifolia*, tem potencial de substituir parcial ou totalmente ingredientes tradicionais utilizados nas dietas de ruminantes (principalmente farelo de milho e soja), fornecendo a mesma qualidade nutricional, sem alterar parâmetros de degradabilidade e fermentação ruminal.
- ii. Coprodutos agroindustriais associados à *T. diversifolia* adicionados na dieta de ruminantes apresentam potencial de diminuir a produção e emissão de metano ruminal quando comparados à dietas de uso convencional.



### 3. OBJETIVOS

Avaliar alternativas nutricionais para reduzir a produção e emissão de GEE, substituindo total ou parcialmente ingredientes tradicionais presentes em dietas de animais bovinos e ovinos por coprodutos agroindustriais não comestíveis por humanos associados à *T. diversifolia* como fonte de biomassa não convencional.

#### 3.1 Objetivos específicos

- i. Quantificar e avaliar a composição bromatológica dos coprodutos estudados para determinar seus valores nutricionais;
- ii. Determinar degradabilidade, produção de CH<sub>4</sub> entérico e funcionalidade dos parâmetros fermentativos do rúmen por meio de ensaios *in vitro* de amostras individuais de cada subproduto e de cada dieta experimental;
- iii. Caracterizar e selecionar os coprodutos de maior potencial para formulação de dietas experimentais balanceadas para suprir exigências nutricionais de animais bovinos e ovinos
- iv. Selecionar três dietas de maior potencial nutricional e sustentável quando comparadas com dietas de uso convencional, para utilização em fazendas com disponibilidade dos ingredientes.



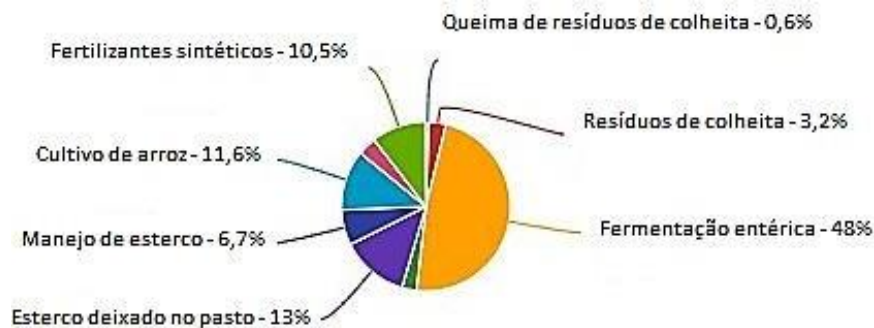
## **4. REVISÃO DE LITERATURA**

### **4.1 Produção de ruminantes e emissões de gases de efeito estufa (GEE)**

Devido ao acelerado crescimento populacional, estima-se que até 2050 seja necessário produzir duas vezes mais carne e leite do que se produz hoje (ONU, 2022), portanto, essa demanda nutricional pressiona a indústria pecuária, e aumentam de forma simultânea e constante (Giamouri et al., 2023). Os ruminantes podem utilizar áreas de terras onde a vegetação é rica em fibras e converter essas fibras em nutrientes de alta qualidade para consumo humano, portanto, há uma grande responsabilidade desse setor frente à segurança alimentar (Scholtz; Nesser; Makgalela, 2020). Dessa forma, a intensificação da produção traz preocupações quanto à sua contribuição nos impactos ambientais, principalmente em relação às emissões de GEE (Mlambo e Mnisi 2019)

Os GEE mais impactantes resultantes de atividades pecuárias são o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), o metano ( $\text{CH}_4$ ) e o óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), pois estão fortemente associados às atividades humanas (Giamouri et al., 2023). O  $\text{CO}_2$  e o  $\text{CH}_4$  são produzidos durante a fermentação do alimento dentro do rúmen, ou seja, resultado da degradação microbiana dos alimentos durante o processo de fermentação entérica que ocorre no sistema digestivo de animais ruminantes (Seketeme et al., 2022). Sabe-se que o  $\text{CH}_4$  tem um potencial de aquecimento global 28 vezes maior que o  $\text{CO}_2$  (Beauchemin et al., 2020). No entanto, o  $\text{CH}_4$  tem vida na atmosfera relativamente curta, estimado em apenas 12 anos, em comparação com a média de 150 anos para o  $\text{CO}_2$  (Lynch et al. 2020; Balcombe et al. 2018). Além disso, o  $\text{CO}_2$  pode ser liberado na atmosfera por meio do desmatamento de áreas para a expansão ou estabelecimento de pastagens e produção de insumos agrícolas utilizados na alimentação animal, enquanto o  $\text{N}_2\text{O}$  origina-se tanto da aplicação de nitrogênio em cultivos quanto da conversão do nitrogênio presente nas excreções de animais, através dos processos de nitrificação e desnitrificação (IPCC, 2019).

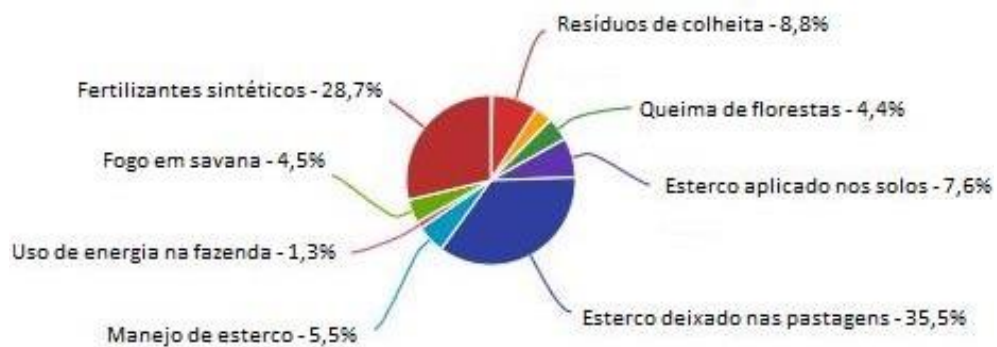
Segundo dados da FAOSTAT (2020), a pecuária é responsável por aproximadamente 14,5% das emissões dos GEE induzida pelo homem, e estima-se que a fermentação entérica de animais ruminantes seja responsável por 68,3% e 48,1% do  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$  que são liberados na atmosfera, respectivamente (Figuras 1 e 2). Em relação ao  $\text{N}_2\text{O}$ , estima-se que cerca de 35,5% das emissões são provenientes do esterco deixados nas pastagens, seguido de 28,7% advinda do uso de fertilizantes sintéticos (Figura 3).

**Figura 1** – Contribuições das categorias para emissões de CO<sub>2</sub>

Fonte: Adaptado de FAOSTAT, 2020.

**Figura 2** – Contribuições das categorias para emissões de CH<sub>4</sub>

Fonte: Adaptado de FAOSTAT, 2020.

**Figura 3** – Contribuições das categorias para emissões de N<sub>2</sub>O

Fonte: Adaptado de FAOSTAT, 2020.

Dessa forma, é importante que se estabeleça um sistema de produção sustentável explorando estratégias práticas e significativas para mitigar esses impactos causados pela pecuária e assim gerar um equilíbrio entre estes e a crescente demanda da produção, principalmente explorando o manejo nutricional, de forma que seja possível reduzir a quantidade e melhorar a qualidade dos alimentos utilizados (Soltan e Patra, 2022); utilizar alimentos alternativos para a nutrição animal que não compitam com humanos (Mottet et al., 2017); juntamente com o manejo de pastagens, integrando sistemas mistos que combinam arbustos leguminosos em altas densidades com gramíneas, melhorando o rendimento e a qualidade da forragem e reduzindo o uso de fertilizantes, como os sistemas silvopastoris (SSP) (Solório et al., 2016); diversificar espécies e utilizar uma genética adequada dos animais (Rojas-Downing et al., 2017).

#### **4.1.1 CH<sub>4</sub> entérico**

A população microbiana presente no rúmen é constituída por bactérias, protozoários, *archeas* (microrganismos produtores de metano, ou metanogênicos) e fungos, que desempenham a síntese de enzimas responsáveis pela degradação de macromoléculas presentes na ração (Matthews et al., 2019; Greening et al., 2019). Esse processo fermentativo resulta em produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e proteína microbiana, fontes essenciais de energia e proteína para o hospedeiro. Simultaneamente, o rúmen fornece um ambiente propício para a sobrevivência e crescimento desses microrganismos. Na fermentação anaeróbica do rúmen, os AGCC produzidos são compostos por acetato, propionato e butirato (Bergman et al., 1965), e desempenham um papel fundamental como fonte primária de energia metabolizável (EM) para os animais ruminantes. Adicionalmente, durante esse processo, os microrganismos metanogênicos presentes no trato gastrointestinal produzem CH<sub>4</sub> como subproduto da fermentação anaeróbica (Tseten et al., 2022).

Os microrganismos metanogênicos podem ser categorizados com base nos substratos que utilizam: metilotróficos (metilaminas e metanol), hidrogenotróficos (H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>) e acetoclásticos (acetato) (De la Fuente et al., 2019). Na via hidrogenotrófica, o hidrogênio é utilizado principalmente para reduzir o CO<sub>2</sub> em CH<sub>4</sub> (Greening et al., 2019; Huws et al., 2018; Singh et al., 2019). Essa rota é responsável pela maior parte da síntese de CH<sub>4</sub> nesse ambiente. Dessa forma, a metanogênese é a forma mais eficiente de eliminar o hidrogênio no rúmen e permitir a continuidade do processo de fermentação. Em geral, o processo de fermentação do



rúmen é regulado pela transferência de hidrogênio entre espécies microbianas e seu fluxo intracelular em vias metabólicas concorrentes (Ungerfeld, 2020).

As liberações de CH<sub>4</sub> originadas pela metanogênese no rúmen constituem uma considerável redução na disponibilidade de energia bruta da alimentação dos ruminantes, variando de 2% a 15% (Johnson e Johnson, 1995). Estudos sugerem que essa perda pode ser ainda maior, dependendo do tamanho do animal e do consumo de matéria seca (Giamouri et al., 2023). No entanto, alguns pesquisadores relatam que a energia perdida na metanogênese não é suficiente para representar alterações significativas no desempenho do animal (Morgavi et al., 2023).

Como os ruminantes compreendem uma parcela substancial das emissões de CH<sub>4</sub>, e, considerando que o potencial de aquecimento global do CH<sub>4</sub> é 28 vezes maior que o CO<sub>2</sub> (Benchaar e Greathead 2011; Beauchemin et al., 2020), torna-se necessário discutir e desenvolver estratégias eficazes de mitigação para reduzir seu impacto ambiental (Allen et al., 2018; Morgavi et al., 2010), porém é preciso ter cautela, visto que a metanogênese é um processo importante para eliminar o H<sub>2</sub> em excesso do rúmen, evitando a inibição dos microorganismos. É possível explorar vias alternativas para a utilização desse hidrogênio, promovendo microrganismos que o utilizam para produzir outros produtos, como o acetato, em vez de CH<sub>4</sub> (Greening et al., 2019; Huws et al., 2018). Além disso, a utilização de estratégias de manejo nutricional pode redirecionar o fluxo de hidrogênio, reduzindo a produção de CH<sub>4</sub> e melhorando a eficiência de utilização dos nutrientes pelos ruminantes (Ribeiro Pereira, 2015). Ao adotar essas abordagens, é possível mitigar o impacto ambiental associado à produção de CH<sub>4</sub> sem comprometer a saúde e o desempenho dos animais.

#### **4.1.2 Técnicas *in vitro* para avaliação de produção de gases**

As metodologias de mensuração de gases *in vitro* têm sido utilizadas há décadas (Ribeiro et al., 2020) e baseiam-se em simular o ambiente ruminal em um frasco, utilizando medições de volume de gás produzido ou registrando a pressão gerada por esses gases, para avaliar parâmetros fermentativos e o potencial de produção de gases de diferentes ingredientes incubados em líquido ruminal e solução tamponante (Amanzougarene e Fondevila, 2020; Menke et al., 1979). Dessa forma, são mensuradas as quantidades de gases produzidos, e sua composição é analisada para obter informações sobre a produção *in vitro* de CH<sub>4</sub> ou CO<sub>2</sub> (Storm et al., 2012). Visto que as técnicas foram desenvolvidas com o intuito de mimetizar as condições fisiológicas do organismo do animal, as metodologias foram ajustadas para garantir

que a temperatura, a pressão osmótica, a anaerobiose e o pH correspondam aos níveis padrão do rúmen. Em relação ao pH, os métodos foram projetados para avaliar os alimentos sob condições ideais de fermentação para a degradação de fibras pelo inóculo ruminal. Com esse objetivo, os sistemas devem manter o pH de incubação entre 6,7 e 7,0, considerado a faixa fisiológica para um rúmen ativo e saudável (Mould et al., 2005).

Uma das vantagens da utilização destas técnicas é alcançar a redução do tempo e os custos experimentais. Devido ao menor custo envolvido, essas metodologias são, no geral, utilizadas em casos onde o uso *in vivo* é inapropriado, devido ao risco para os animais (Klevenhusen et al., 2021), ou como um experimento preliminar (Kent-Dennis et al., 2020), pois fornece os resultados mais rapidamente (Oliveira et al., 2014). Além disso, quando as metodologias *in vitro* são empregadas, os pesquisadores podem reduzir significativamente o número total de animais utilizados, já que apenas a coleta de inóculo é necessária, em vez de conduzir longos ensaios de digestibilidade ou produção de gases com um grande grupo para estudos *in vivo*, visto que as amostras podem ser coletadas de um pequeno número de animais canulados (Vinyard e Faciola, 2022). Existem técnicas frequentemente utilizadas, como o RUSITEC, descrito pela primeira vez em 1977 por Czerkawski & Breckenridge; que fazem uma simulação do rúmen em um sistema contínuo a longo prazo, onde utiliza amostras de alimentos dentro de um frasco contendo 1L de fluido ruminal, mantido em agitação constante, com um sistema de entrada de saliva artificial e saída por transbordamento, fornecendo informações confiáveis sobre as interações de determinados substratos com o ambiente ruminal (Deitmers et al., 2022).

Apesar da colaboração das técnicas *in vitro* relatadas na literatura, as mesmas não estão isentas de desvantagens. Alguns pesquisadores apontam que a análise realizada em condições *in vitro* não favorece a aclimatação dos microrganismos presentes no rúmen aos alimentos investigados ao longo de períodos extensos, como ressaltado por Hill et al., 2016. Além disso, ocorre a incapacidade de cultivar protozoários nos mesmos níveis relatados *in vivo*, o que poderia alterar os parâmetros de fermentação ruminal (Vinyard e Faciola, 2022).

## **4.2 Utilização de coprodutos agroindustriais em dietas de ruminantes**

Atualmente, o setor pecuário, especialmente a produção de ruminantes, desempenha um papel significativo nas questões de segurança alimentar e nos impactos ambientais, principalmente devido aos processos de criação de gado, processamento e transporte de ração

animal, produtos de origem animal e competição por alimentos comestíveis por humanos (Corredu et al., 2020; Halmemies-Beauchet-Filleau et al., 2018). Estima-se que a pecuária utiliza mais de 2 bilhões de hectares de pastagens, e destes, 700 milhões poderiam ser usados para produção de alimento humano (Mottet et al., 2017). Além disso, os autores mencionam que para produzir 1,8 kg de carne bovina, seriam necessários 2,8 kg de ração formulada com ingredientes que poderiam ser destinada os para o consumo humano (milho e soja), tornando-se necessário explorar estratégias mais sustentáveis de manejo nutricional na produção de ruminantes como alternativa para diminuir os impactos causados por essa competição.

Nesse contexto, muitos pesquisadores tem avaliado o potencial de substituição do farelo de soja e milho por coprodutos agroindustriais impróprios para consumo humano (Vastolo et al., 2022; Rakita et al., 2021; Corredu et al., 2020). Esses coprodutos derivam do tratamento de alimentos como frutas, vegetais, grãos e tubérculos empregados na produção alimentícia (Malenica et al., 2023), originando coprodutos como farelos, resíduos de moagem, sobras resultantes da higienização de grãos (incluindo grãos deteriorados, partidos e danificados), cascas de determinadas sementes, bem como resíduos fibrosos, entre diversas outras formas (Salami et al., 2019). Na maioria dos casos, os coprodutos são descartados de forma não sustentável, como aterro, queima e despejo, resultando em poluição ambiental (Sadh et al., 2018). Portanto, esses coprodutos possuem grande potencial para serem aproveitados no processamento de rações, evitando um desperdício desnecessário, dado que após a conversão desses ingredientes em proteína de boa qualidade pelos ruminantes, o alimento pode retornar para a cadeia alimentar humana (Bakshi et al., 2016).

Alguns coprodutos, tais como polpa de beterraba, casca, farelo e melaço de soja e farelo de girassol, já tem sido empregados como ração animal, proporcionando fontes de fibra, proteína e açúcar (Rakita et al., 2021; Vastolo et al., 2019). Outros autores encontraram resultados promissores ao avaliarem resíduos da indústria de cervejaria como fonte proteica em dietas de ruminantes, concluindo que estes ingredientes poderiam substituir parcial ou totalmente ingredientes convencionais da ração sem afetar negativamente a fermentação ruminal, cinética de gases e digestibilidade *in vitro* (Cherdong et al., 2018). Bizzutti et al. (2023), ao avaliarem o potencial de alguns coprodutos, relataram que o bagaço de laranja e o bagaço de mandioca são fontes energéticas para os animais, enquanto casca de soja e resíduos de feijão possuem um alto teor de proteína.

Adicionalmente, suplementar animais ruminantes com coprodutos agroindustriais pode resultar em uma diminuição na produção e conseqüentemente emissão de CH<sub>4</sub> (Malenica

et al., 2023). Por exemplo, em um estudo realizado por Koenig et al. (2018), foi demonstrado que taninos condensados presentes no bagaço de uva têm a capacidade de alterar os a microbiota do rúmen no processo de fermentação, resultando em uma diminuição das emissões de CH<sub>4</sub>. Salami et al. (2019) mencionam que coprodutos vegetais com alto teor de gordura em dietas de ruminantes pode ser uma estratégia eficaz para reduzir a produção de CH<sub>4</sub> e as perdas de nitrogênio (N) em ruminantes. Lee et al. (2003) concluíram que o potencial de produção de CH<sub>4</sub> a partir de farelos de oleaginosas tende a ser inferior ao dos farelos e cascas de grãos. Neste estudo em questão, o potencial de produção de CH<sub>4</sub> dos farelos de oleaginosas foi relatado em ordem crescente: farelo de canola < farelo de soja < farelo de coco < farelo de gérmen de milho < farelo de girassol < farelo de algodão.

Existem algumas limitações que devem ser consideradas ao decidir pela utilização dos coprodutos como alimentos alternativos para os ruminantes. A variação no teor de nutrientes pode dificultar a estabilidade do balanceamento de dietas (Bremer et al., 2011), pois estes dependem diretamente das condições técnicas empregadas durante o processamento, manuseio e armazenamento do produto primário (Salami et al., 2019). Muitas vezes, ocorre um alto teor de umidade e presença de produtos contaminantes nos compostos, incluindo pesticidas e micotoxinas (Bakshi et al., 2016), portanto, se faz necessário transportar os coprodutos com rapidez para as instalações onde serão reaproveitados, para ser realizada a secagem e tratamento dos resíduos, resultando em custos elevados de transporte. Além disso, a sazonalidade e disponibilidade dos coprodutos devem ser avaliadas, pois para a fabricação da ração, as frutas e vegetais produzidas durante todo o ano e em maior quantidade devem ser priorizadas. A baixa disponibilidade dos resíduos causada pela baixa produção de determinada matéria prima dificulta a cadeia de abastecimento (Malenica et al., 2023).

No entanto, essas limitações podem ser estudadas e melhoradas com estratégias econômicas e não devem desencorajar os produtores de reaproveitarem os diversos coprodutos agroindustriais como base ou suplementação na ração dos ruminantes, visto que há um grande potencial desta alternativa contribuir positivamente com a redução dos impactos ambientais causados pelo sistema de produção.

### **4.3 Uso de *Tithonia diversifolia* como biomassa forrageira não convencional na dieta de ruminantes**

Sabe-se que grande parte dos sistemas de monocultura são menos eficientes devido à pastagens de baixa qualidade, manejo equivocado dos recursos e associados

à altas pegadas de carbono (Carvalho et al., 2020), porém, ainda são comumente utilizados por atenderem à alta demanda dos produtores (Maurício et al., 2018). Alguns estudos sugerem que a combinação de plantas perenes, como árvores e arbustos, com forrageiras convencionais da pecuária, como gramíneas e leguminosas, em um sistema integrado denominado de sistema silvopastoril (SPS), apresenta-se como uma alternativa promissora, viável, e ecologicamente sustentável quando comparados com a monocultura (Mahecha et al., 2022, Maurício et al., 2019). Estes sistemas se destacam pelo seu potencial em armazenar consideráveis quantidades de carbono na biomassa e no solo. Isso acontece devido ao papel crucial desempenhado pelas árvores na absorção do CO<sub>2</sub> atmosférico através da fotossíntese, além do armazenamento de carbono nos tecidos vegetais vivos e nos detritos orgânicos (Manaye et al., 2021; Villanueva-López et al., 2015). Um arbusto que tem despertado interesse de alguns pesquisadores para serem usados nesse sistema (Marecha et al., 2022; Maurício et al., 2019; Rivera et al., 2023) é a *Tithonia diversifolia* (TD) devido à sua capacidade de fácil adaptação à região em que é cultivada e seu potencial de suprir as necessidades nutricionais quando utilizada em dieta de ruminantes (Rivera et al., 2022).

A TD, é popularmente conhecida como Girassol Mexicano, Margaridão, Falso Girassol e Botão de Ouro, pertencente à família *Asteraceae*, sob o gênero *Tithonia* e sua espécie é a *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray. Essa planta tem uma ampla distribuição que abrange grande parte da América, África e Ásia (Ademiluyi e Omotoso, 2007; Cong e Merckx, 2005; Pérez et al., 2009) e tem se destacado por sua acumulação de nitrogênio (N) (Ruíz et al., 2017), características nutricionais, por ser fonte de biomassa (Maurício et al., 2014), possível potencial para reduzir as emissões de CH<sub>4</sub> (Ribeiro et al., 2016), fonte de proteínas, carboidratos solúveis e metabólitos secundários, o que pode auxiliar no aporte de energia e proteína, contribuindo para o equilíbrio do ambiente ruminal, aumentando a eficiência para a transformação de amônia em proteína microbiana, conseqüentemente ocorrendo em menores gastos energéticos devido às perdas de amônia, CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>, (Galindo-Blanco et al., 2018), contribuindo para a redução das emissões de gases.

De acordo com Galindo et al. (2017), a presença de metabólitos secundários como fenóis totais, taninos e saponinas na TD é variável. Hess (2006) afirmou que os taninos estão relacionados à redução da produção de CH<sub>4</sub>. Esse achado é consistente com o estudo de Galindo et al. (2012), que observaram que a incorporação de 10% e 20% de TD em dietas resultou em redução na população dos organismos metanogênicos no rúmen. Pérez-Márquez et al. (2019), utilizando 75% de TD reportaram uma diminuição na produção de CH<sub>4</sub>, enquanto Maurício et

al. (2014) ao incluírem 25% de TD em dietas não obteve resultados significativos sobre o CH<sub>4</sub> produzido. O contrário foi observado por Rivera et al. (2021) que ao utilizarem o mesmo nível de inclusão concluíram que há redução no CH<sub>4</sub> *in vitro*. Os autores mencionam que no geral, essa variação de resultados pode ocorrer pela interferência de diferentes genótipos da planta devidas às diferenças na quantidade de compostos entre eles.

O resultados bromatológicos da TD podem variar de acordo com as partes da planta e a época do ano em que são avaliados. Os teores de proteína bruta (PB) variam de 16,5% (planta inteira) à 22,5% (folhas) (Calsavara et al., 2016). Um maior teor de PB de 28,95% foi relatado por Verdecia et al., (2011) quando avaliada em período chuvoso. Da mesma forma, os teores de FDN e FDA podem variar de 25 – 60% e 23 – 38% respectivamente de acordo com sazonalidade e partes da planta a serem consideradas (Cardona-Iglesias et al., 2019; Castañeda-Serrano et al., 2018; González et al., 2020).

Além disso, alguns autores sugerem que a TD tem efeitos positivos quando associadas à dietas fibrosas ou de qualidade inferior (Akanmu et al., 2020; Rivera et al., 2021), e possui altas taxas de sobrevivência quando utilizada em SPS, demonstrando ser uma planta altamente resiliente (Marecha et al. 2022), achados que reforçam seu potencial como alternativa promissora e sustentável.



## 5. MATERIAL E MÉTODOS

Todas as etapas deste estudo que envolviam a incorporação de animais receberam a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CEUA - CENA/USP), conforme o Protocolo 0003/2021.

### 5.1 Local

As amostras analisadas foram coletadas na região de Piracicaba (São Paulo, Brasil), durante os anos de 2021 e 2022 e encaminhadas para análises bromatológicas em duas repetições e posteriormente, para os ensaios *in vitro*. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Nutrição Animal (LANA), no Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP), no município de Piracicaba.

### 5.2 Experimento 1 – Caracterização e seleção dos coprodutos

#### 5.2.1 Preparação dos substratos e análises bromatológicas

No início do Experimento 1 foram avaliados um total de 25 coprodutos agroindustriais, sendo eles: Bagaço de cana-de-açúcar (BC), bagaço de laranja (BL), bagaço de mandioca (BM), bagaço de uva branca (BUB), bagaço de uva tinta (BUT), canola moída (CM), casca de amendoim (CA), casca de café (CC), casca de soja (CS), farelo de algodão (FA), farelo de girassol (FG), farelo de soja (FS), palha de cana-de-açúcar (PC), palhada de feijão (PF), palhada de milho (PM), resíduo de feijão (RF), rolão de milho (RM), sabugo de milho (SM), silagem de cana-de-açúcar (SC), resíduo de cervejaria – bagaço (RCB), resíduo de cervejaria - levedura (RCL), resíduo de cervejaria – TRUB (RCT), torta de macaúba (TM), torta de mamona (TMA) e torta de nabo forrageiro (TN). Como fontes de biomassa, foram avaliadas amostras de *Urochloa brizantha* (A. Rich.) Stapf. cv. Xaraes (BX), como forrageira de uso convencional e *T. diversifolia* (TD), como forrageira de uso não convencional. As amostras foram previamente secas em estufa de circulação de ar forçado (Marconi, modelo MA 037, Piracicaba, Brasil) a 55°C até peso constante e trituradas para passar em umapeneira de 1,0 mm em moíno de facas do tipo Wiley (Marconi, Piracicaba – SP, Brazil). Em seguida, os materiais foram pesados para determinação de teor de matéria seca (MS) e matéria orgânica (MO) (método 934.01), proteína bruta (PB) (método 2001.11), extrato etéreo (EE) (método 2003.5) e fração de cinzas (método 942.05), de acordo com os procedimentos estabelecidos pelas diretrizes da Association of Official Analytical Chemistry (AOAC, 2011). Para determinação de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), as



amostras foram pesadas em saquinhos modelo F57 (Ankon Technology Corp., USA), os saquinhos foram selados e lavados em aparelho determinador de fibra (modelo TE-149, Tecnal, Piracicaba – SP, Brasil) com solução detergente neutro e com solução detergente ácido, de acordo com Van Soest et al., (1991), adaptado por Mertens et al., (2002). A energia bruta foi determinada em Calorímetro (6400, Parr instruments). A composição bromatológica dos coprodutos avaliados está disponível na Tabela 5.1.

**Tabela 5.1** – Composição bromatológica dos coprodutos

Amostra	MS*	g/kg MS				FDN (%)	FDA (%)	EB**
		MM	MO	EE	PB			
BC	936,58	53,47	946,53	14,35	26,11	87,3	55,46	4724,69
BL	924,07	9,63	990,37	37,92	79,03	51,7	41,74	4854,05
BM	881,59	14,96	985,04	17,41	39,77	19,1	4,59	4173,23
BUB	944,7	42,61	957,39	126,73	146,26	52,6	45,67	5308,85
BUT	921,75	66,34	933,66	126,95	149,07	44,1	37,04	5204,21
BX	913,77	104,27	895,73	37,73	144,45	57,7	28,45	4386,19
CM	925,87	40,81	959,19	367,78	246,61	35,2	20	6535,06
CA	892,78	34,55	965,45	5,99	60,1	78,8	67,47	4788,86
CC	904,03	80,62	919,38	12,27	105,56	45,1	32,78	4379,21
CS	881,69	51,82	948,18	58,73	211,88	47	31,35	4619,98
FA	901,28	67,24	932,76	15,52	482,27	33,8	18,05	4704,88
FG	892,94	67,39	932,61	12,2	308,22	51,1	32,11	4689,83
FS	895,39	71,56	928,44	34,61	556,65	16,3	5,47	4859,09
PC	893,92	55,14	944,86	21,13	48,14	66,6	37,45	4643,52
PF	876,44	77,84	922,16	17,5	139,89	41,9	27,22	4337,29
PM	870,79	54,19	945,81	8,84	52,35	76,1	43,99	4607,65
RF	937,43	48,84	951,16	12,05	235,33	20,6	5,55	4380,32
RM	908,92	14,35	985,65	19,35	26,36	86,8	44,86	4471,55
SM	914,46	27,17	972,83	42,21	100,92	64,3	19,02	4542,44
SC	894,79	48,99	951,01	6,81	41,68	41,8	25,5	4434,91
RCB	968,27	38,76	961,24	78,71	237,96	46,6	34,09	5024,31
TD	910,22	138,17	861,83	27,73	152,81	50,8	24,74	4207,06
TM	945,74	46,34	953,66	164,73	364,08	46	35,12	5075,77
TMA	912,24	46,46	953,54	306,53	246,24	17,9	11,11	6029,44
TN	886,18	58,77	941,23	120,65	448,14	52,3	18,88	5471,29
RCT	917,87	33,16	966,84	49,60	215,54	28,3	16,07	5048,05
RCL	874,09	51,62	948,38	4,17	360,99	4,3	1,56	4710,22

\*g/kg MF; \*\*kcal/kg MS; BC = bagaço de cana-de-açúcar; BL = bagaço de laranja; BM = bagaço de mandioca; BUB = bagaço de uva branca; BUT = bagaço de uva tinto; BX = *Urochloa brizantha*, CM = canola moída; CC = casca de café; CS = casca de soja; FA = farelo de algodão; FG = farelo de girassol; FS = farelo de soja; PC = palhada de cana; PF = palhada de feijão; PM = palhada de milho; RF = resíduo de feijão; RM = resíduo de mandioca; SM = sabugo de milho; SC = silagem de cana-de-açúcar; RCB = resíduo de cervejaria (bagaço); TD = *Tithonia diversifolia*, TM = torta de mamona; TMA = torta de macaúba; TN = torta de nabo forrageiro; RCT = resíduo de cervejaria (TRUB); RCL = resíduo de cervejaria (levedura); MS = matéria seca; MM = matéria mineral; MO = matéria orgânica; EE = extrato etéreo; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; PB = proteína bruta; EB = energia bruta.

### 5.2.2 Delineamento experimental

Para a avaliação *in vitro* dos coprodutos (substratos), foram conduzidos três ensaios de produção de gases (PG) com duração de 24 horas. Em cada ensaio, os 25 substratos foram incubados em triplicata (repetições), onde cada substrato incubado foi considerado como tratamento, e as observações foram analisadas como blocos ao acaso, e cada PG foi considerado um bloco.

### 5.2.3 Preparo do inóculo e ensaio de produção de gases *in vitro*

Após avaliação bromatológica, as amostras foram pesadas individualmente na quantidade de 1,0 grama em saquinhos Ankom® F57 previamente numerados, este processo foi realizado em triplicata. Cada saquinho foi selado e em seguida inserido em um frasco de vidro com capacidade para 160 mL para serem inoculados e incubados posteriormente.

Para o preparo do inóculo, foi coletado o líquido ruminal de três ovinos adultos da raça Santa Inês com fístula ruminal, em jejum de 12 horas, no período da manhã, às 6:00. Os animais possuíam peso corporal médio de  $65 \text{ kg} \pm 5,5 \text{ kg}$  e recebiam dieta a base de 60% de volumoso (feno de *Tifton 85*) e 40% de concentrado (farelo de soja e milho), com acesso a sal mineral e água *ad libitum*. Os animais foram selecionados de forma aleatória e contidos manualmente. A coleta foi realizada utilizando uma seringa acoplada a uma sonda para retirar o conteúdo líquido (acondicionado em garrafas térmicas), e a mesma quantidade do conteúdo sólido foi retirada com o auxílio de uma pinça do tipo Tenaz (armazenado em sacos plásticos e mantido sem caixa térmica). Foi preparado um inóculo utilizando a técnica descrita por Bueno et al. (2005), onde o conteúdo ruminal dos 3 animais doadores foi combinado para gerar o inóculo, utilizando a proporção de 50% de conteúdo sólido e 50% de conteúdo líquido. A mistura foi homogeneizada em um liquidificador (Hammilton, modelo 908, Washington, USA) sob fluxo de CO<sub>2</sub> e filtrada em uma camada dupla de tecido de algodão. Em seguida, o inóculo preparado foi armazenado em frascos Erlenmeyer e mantido em banho-maria a uma temperatura de 39°C sob infusão constante de CO<sub>2</sub> até ser inoculado. Em cada frasco de vidro de 160 mL foi adicionado 50 mL de meio tamponado de Menke et al., (1979) e então adicionado 25 mL do inóculo preparado.

Após esse processo, os frascos contendo o inóculo, substrato e solução tampão e nutritiva foram incubados para seguirem para a técnica *in vitro* de produção de gases, seguindo as metodologias descritas Theodorou et al. (1994) e Maurício et al. (1999), adaptadas por Bueno et al. (2005). Os frascos simulam câmaras de fermentação, com um espaço vazio de 85 mL,

conhecido como "headspace", que é o espaço reservado para o acúmulo dos gases produzidos (Abdalla et al., 2012; Longo et al., 2006). Foram incluídos no ensaio dois frascos, um contendo apenas o saquinho Ankom® F57vazio (BRANCO), cuja finalidade era medir o volume de gás produzido pelo inóculo na presença da solução de Menke; e o outro frasco contendo o saquinho com um grama de feno de *Tifton 85* (PADRÃO), utilizado para o controle de qualidade das metodologias do laboratório, totalizando 83 frascos.

Após serem vedados com tampas de borracha e agitados, os frascos foram colocados em uma estufa com circulação de ar (Marconi MA35, Piracicaba, SP, Brasil), mantida a 39°C, por um período de 24 horas.

A pressão interna dos gases foi mensurada em intervalos de 2, 4, 8, 16 e 24 horas após o momento da inoculação (0h), utilizando um transducer de pressão (Bueno et al., 2005) acoplado a um datalogger (Pressure Press 800, LANA, CENA / USP, Piracicaba, Brasil). As pressões registradas foram convertidas em volume de gás produzido através da equação (1) obtida pela regressão linear ( $R^2 = 0,991$  e  $n = 321$ ) das leituras de pressão de gás e seus volumes de gás correspondentes:

$$VGP = (6,1432 * P) + 0,0451 \quad (1)$$

onde, VGP é o volume de gás produzido expresso em mL e P é a pressão expresso em psi.

Posterior a cada coleta de gás, a pressão nos frascos foi aliviada com o auxílio de uma agulha, os frascos foram agitados manualmente devolvidos à incubadora.

#### 5.2.4 Determinação de CH<sub>4</sub>

Após cada período de mensuração interna de cada frasco, uma amostra de dois mL de gás foi coletada com o auxílio de uma seringa e transferida para um tubo de ensaio de capacidade de 10 mL vedados com uma tampa emborrachada, com vácuo de 12 mL, totalizando 10 mL de gás coletados e armazenados ao fim das 24 horas de incubação para serem conduzidos para determinação de CH<sub>4</sub> por cromatografia gasosa (Lima et al., 2018).

A análise de CH<sub>4</sub> por cromatografia gasosa (GC-2010, Shimadzu, Tóquio, Japão) é realizada em uma coluna micro empacotada Shincarbon ST 100/120 e um detector de ionização de chama (FID). O gás hélio (He) foi usado como gás de arraste sob o fluxo de 10 mL/min. Para quantificação, uma curva de calibração foi preparada utilizando gás metano (99,5%) em concentrações de 0, 3, 6, 9 e 12%.

A determinação de CH<sub>4</sub> foi realizada utilizando a equação: CH<sub>4</sub> (mL/gMS) = (HS + VGP) × CH<sub>4</sub> (%), onde: HS = headspace (85mL), VGP (volume de gases produzido (mL), CH<sub>4</sub> % = concentração de CH<sub>4</sub> (mL/mL) (Longo et al., 2006). A determinação de gás e CH<sub>4</sub> produzidos são os valores líquidos dados pela subtração dos mesmos produzidos pelo frasco contendo o saquinho vazio (BRANCO).

### 5.2.5 Degradabilidade da matéria orgânica

Após o período de incubação de 24 horas, os frascos de vidro foram retirados da estufa, abertos manualmente e colocados em água fria para interromper a atividade dos microorganismos responsáveis pela fermentação ruminal. Os saquinhos foram retirados com o auxílio de uma pinça e imersos em bandejas de água com gelo. Em seguida, foram submetidos a uma lavagem em detergente neutro, a 90°C, durante uma hora, e em seguida foram realizadas quatro lavagens utilizando somente água destilada a 90°C por 5 minutos e em seguida, uma lavagem em acetona de alta pureza (99%). Após a lavagem, os saquinhos foram submetidos a secagem em estufa a 105°C, pesados e colocados em cadinhos para serem incinerados em um forno mufla (Jung, modelo JP16590, Blumenal, Brasil) a uma temperatura de 550°C por 4 horas. A determinação da matéria orgânica verdadeiramente degradada (MOVD) foi realizada através da diferença entre a quantidade de matéria orgânica inicialmente incubada e a quantidade restante após o período de incubação, seguindo o método descrito por Blümmel, Makkar e Becker (1997).

### 5.2.6 Seleção dos coprodutos

Os coprodutos com fatores antinutricionais e com pouco potencial para constituir dieta de ruminantes foram descartados, e então foram selecionados os coprodutos mais promissores com base em sua composição química, degradabilidade e produção de CH<sub>4</sub> (Tabela 5.1), sendo eles: Bagaço de laranja (BL), bagaço de mandioca (BM), bagaço de uva tinta (BUT), canola moída (CM), farelo de algodão (FA), farelo de girassol (FG), farelo de soja (FS), palhada de milho (PM), palhada de feijão (PF), resíduo de feijão (RF), rolão de milho (RM), resíduo de cervejaria – bagaço (RCB), resíduo de cervejaria - levedura (RCL), resíduo de cervejaria – TRUB (RCT), torta de macaúba (TM), torta de nabo forrageiro (TN). Os coprodutos foram selecionados para serem incluídos juntamente com a *T. diversifolia* como ingredientes das dietas experimentais, substituindo componentes presentes em dietas convencionais à base de soja, milho e capim- xaraés (volumoso).

## **5.3 Experimento 2 – Formulação e seleção das dietas experimentais**

### **5.3.1 Formulação das dietas experimentais**

Após a seleção dos coprodutos, estes foram considerados como ingredientes para a formulação de 10 dietas experimentais, utilizando o software computacional SuperCrac 6.1 Premium.

As dietas foram balanceadas com o intuito de serem comparadas com uma dieta considerada de uso convencional (capim-xaraés + farelo de soja + grão de milho moído). Além disso, foi balanceada uma dieta considerada de uso não convencional onde 50% da capim-xaraés será substituído por *T. diversifolia* (*Urochloa brizantha* + TD + Soja + Milho), denominada de Dieta 1, e por fim, foram balanceadas 8 dietas onde 100% da soja e do milho foram substituídos pelos coprodutos avaliados. As dietas foram balanceadas para atingir os requerimentos energéticos de ovinos em manutenção, de acordo com o NRC, (2021). Como o objetivo foi avaliar o potencial de mitigação das dietas, elas foram balanceadas para serem isoproteicas, ou seja, possuindo a mesma quantidade de nitrogênio, e isofibrosas, pois tanto o nitrogênio quanto o conteúdo de fibra e poderiam influenciar nas emissões de CH<sub>4</sub> ruminal e N<sub>2</sub>O nas fezes (Rivera et al., 2021). Os ingredientes foram pesados e misturados nas proporções descritas na Tabela 5.2, de acordo com o balanceamento das dietas experimentais. Posteriormente, as dietas foram amostradas para serem submetidas a uma nova caracterização bromatológica e ensaios *in vitro*.

**Tabela 5.2** – Proporção (%) dos ingredientes nas dietas experimentais.

Ingredientes (%)	Dietas experimentais										
	DC	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10
<i>Urochloa brizantha</i>	50	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
<i>Tithonia diversifolia</i>	-	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Milho moído	30	35	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Farelo de Soja	20	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bagaço de laranja	-	-	-	3	12	16	-	-	12,5	-	-
Bagaço de mandioca	-	-	22	26	17	-	-	20	-	-	-
Bagaço de uva tinta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-
Canola moída	-	-	-	-	-	-	-	-	-	36	16
Farelo de algodão	-	-	-	21	-	-	-	-	-	-	-
Farelo de girassol	-	-	28	-	-	-	-	-	-	-	-
Palhada de milho	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-
Palhada de feijão	-	-	-	-	-	12	-	-	-	-	-
Resíduo de feijão	-	-	-	-	-	-	22	-	31	-	-
Resíduo de cervejaria (bagaço)	-	-	-	-	-	-	24	-	-	-	-
Resíduo de cervejaria (levedura)	-	-	-	-	-	22	-	-	-	-	19
Resíduo de cervejaria (TRUB)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	-
Rolão de milho	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	16
Torta de macaúba	-	-	-	-	-	-	-	27	-	-	-
Torta de nabo forrageiro	-	-	-	-	21	-	-	-	6,5	-	-
<b>Total</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

DC = Dieta Controle; D1 = Dieta 1; D2 = Dieta 2; D3 = Dieta 3; D4 = Dieta 4; D5 = Dieta 5; D6 = Dieta 6; D7 = Dieta 7; D8 = Dieta 8; D9 = Dieta 9; D10 = Dieta 10.

### 5.3.2 Análises bromatológicas

A composição químico-bromatológica das dietas experimentais está listada na Tabela 5.3 e foi determinada seguindo todas as metodologias descritas no Item 5.2.1.

**Tabela 5.3** – Composição bromatológica das dietas experimentais.

Dieta	MS*	(g/kg MS)						EB**
		MM	MO	EE	FDN	FDA	PB	
DC	915,83	72,80	927,20	40,33	507,20	232,31	197,72	4371,71
D1	903,76	78,32	921,68	32,07	476,92	254,80	199,53	4306,81
D2	913,59	80,74	919,26	21,28	594,83	356,33	173,20	4256,04
D3	922,87	77,84	922,16	19,50	561,52	314,63	180,18	4250,15
D4	925,05	78,22	921,78	37,33	609,47	367,40	183,74	4484,03
D5	906,62	88,01	911,99	10,75	629,96	397,40	183,20	4309,35
D6	934,01	81,14	918,86	19,16	694,81	362,30	197,81	4496,82
D7	929,82	78,92	921,08	49,71	608,66	368,18	188,11	4523,22
D8	933,35	78,16	921,84	26,50	708,96	400,67	211,39	4379,59
D9	921,78	89,52	910,48	76,76	692,44	468,26	247,37	4722,49
D10	911,31	85,75	914,25	74,90	618,29	382,38	177,01	4712,33

\*g/kg MF; \*\*kcal/kg MS MS; DC = Dieta controle; D1 = Dieta 1; D2 = Dieta 2; D3 = Dieta 3; D4 = Dieta 4; D5 = Dieta 5; D6 = Dieta 6; D7 = Dieta 7; D8 = Dieta 8; D9 = Dieta 9; D10 = Dieta 10; MS = matéria seca; MM = matéria mineral; MO = matéria orgânica; EE = extrato etéreo; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; PB = proteína bruta; EB = energia bruta.

### 5.2.2 Delineamento experimental

Para a avaliação *in vitro* das dietas experimentais, foi conduzido um ensaio de produção de gases (PG) com duração de 24 horas. No ensaio, foram usados dois inóculos diferentes onde cada substrato foi incubado em duplicata, totalizando quatro repetições. O substrato foi considerado como tratamento, e as observações (frascos de 160 mL) foram analisadas em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) considerado o inóculo como um fator aleatório.

### 5.3.3 Preparo dos inóculos e ensaio de produção de gases *in vitro*

Após a avaliação bromatológica, as dietas experimentais foram pesadas individualmente na quantidade de 1,0 grama em saquinhos Ankon F57 previamente numerados, este processo foi realizado em quadruplicata. Cada saquinho foi selado e colocado nos frascos de vidro de 160 mL, da mesma forma realizada no Experimento 1.

Para o preparo dos inóculos, foi coletado o líquido ruminal de quatro ovinos adultos da raça Santa Inês, com média de peso vivo de 63,12 kg  $\pm$  6,07 kg, com fístula ruminal. A coleta foi realizada conforme os protocolos realizados no Experimento 1. Foram preparados dois inóculos diferentes utilizando a técnica descrita por Bueno et al. (2005), onde dois animais foram combinados para gerar duas diferentes combinações (AB e CD), utilizando a proporção de 50% de conteúdo sólido e 50% de conteúdo líquido. O restante da metodologia utilizada está descrito no Item 5.2.3.

### 5.3.4 Determinação de CH<sub>4</sub>, degradabilidade *in vitro* e parâmetros fermentativos

A determinação de CH<sub>4</sub>, avaliação da degradabilidade *in vitro* da matéria orgânica e foram realizadas seguindo os mesmos protocolos do Experimento 1, descritos nos itens 5.2.4 e 5.2.5, respectivamente.

Prévia a incineração dos saquinhos, uma amostra de 0,1 g de cada um foi retirada para determinação do teor de proteína bruta pelo método de Kjeldahl. A degradabilidade *in vitro* da proteína foi determinada pela diferença na concentração de proteína bruta no substrato incubado e no resíduo não degradado após 24 horas de incubação.

### 5.3.5 Particionamento da matéria orgânica

O fator de partição foi calculado utilizando a equação (2) descrita por Blümmel et al. (1997):

$$FP = \text{MOVD} / \text{GPMO} \quad (2)$$

onde, FP é o Fator de partição; MOVD representa a Matéria orgânica verdadeiramente degradada (mg); e GPMO é o Volume de gases produzido por grama de matéria orgânica degradada (mL/g MOD).

### 5.3.6 Modelo estatístico para avaliação da cinética fermentativa

Foram avaliados oito modelos estatísticos com o intuito de observar a dinâmica de produção de gases, os quais foram submetidos ao ajuste em curvas originadas da fermentação *in vitro* das dietas experimentais. Estes modelos estão detalhados na Tabela 5.4.

Foram empregados o critério de informação de Akaike corrigido (ACc), a soma dos quadrados dos resíduos (RSS), o erro médio quadrado de predição (rMSPE) e a análise de regressão entre os valores observados e os preditos (R<sup>2</sup>) para avaliar a aderência dos modelos aos perfis observados, conforme mencionado por Wang et al., (2011).

Após a seleção do modelo com o ajuste mais preciso, considerando os critérios estatísticos e a precisão das estimativas, esse modelo foi escolhido para determinar as variáveis resultantes da produção de gases para cada um dos tratamentos. Em seguida, procedeu-se com as comparações respectivas entre esses atributos (como o volume final assintótico de gases (VF), o tempo necessário para atingir metade da produção total de gases (T<sub>0.5</sub>), o volume de gás no tempo T<sub>0.5</sub> (V<sub>0.5</sub>) e a taxa constante de produção de gases (k)).



O modelo eleito para analisar a cinética da fermentação dos substratos, selecionado com base no melhor desempenho estatístico, foi o modelo Exponencial, introduzido por Ørskov e McDonald (1979).

**Tabela 5.4** – Modelos estatísticos para ajuste das curvas de fermentação de gases *in vitro*.

Modelo	Equação
EXP <sub>0</sub>	$V=Vf(1-\exp(-kt))$
Gompertz	$V=Vf\exp(-\exp(1-k(t-L)))$
EXP <sub>LAG</sub>	$V=Vf(1-\exp(-k(t-L)-d(\sqrt{t}-\sqrt{L})))$
Logístico	$V=Vf1+\exp(2-4k(t-L))$
Logístico-Bicompartmental	$V=Vf11+\exp(2-4k1(L-t))+Vf21+\exp(2-4k2(t-L))$
Logístico Exponencial	$V=Vf(1-\exp(-kt))1+\exp(\ln(1d)-kt)$
Logístico Exponencial + Lag	$V=Vf(1-\exp(-k(t-L)))1+\exp(\ln(1d)-k(t-L))$
Gompertz + Exponencial	$V=Vf1(1-\exp(-k1t))+Vf2\exp(\exp(1+k2e(L-t)))$

Fonte: Wang et al. (2011), adaptado por Márquez (2022); k = taxa de produção de gás; k1 = taxa de produção de gás da porção rapidamente degradada; k2 = taxa de produção de gases da porção lentamente degradada; t = Tempo; L = lagtime; d =definição do formato da curva; V = volume de gás; Vf = Volume de gás assintótico; Vf1 = Volume de gás produzido pela porção rapidamente degradada; Vf2 = Volume de gas produzido pela porção lentamente degradada.

### 5.3.7 Análise estatística

Os dados observados na avaliação das dietas experimentais foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste de Dunnet a fim de comparar cada dieta experimental com a Dieta controle, considerando um nível de significância de 0,05, utilizando o software R Studio (versão 4.3.0, RStudio Team, Boston, MA, USA), aplicando-se as funções e pacotes disponíveis na linguagem R para o modelo matemático:

$$Y_{ik} = \mu + T_i + I_k + e_{ik} \quad (3)$$

onde, Y<sub>ik</sub> são as variáveis dependentes; com uma média geral ( $\mu$ ); sob o efeito fixo dos tratamentos (T<sub>i</sub>); e sob efeito aleatório do inóculo (I<sub>k</sub>); com erro experimental (e<sub>ik</sub>).

### 5.3.8 Seleção das dietas de maior potencial

A partir da comparação realizada na análise estatística, foram selecionadas três dietas com o maior potencial nutritivo e menor emissão de CH<sub>4</sub> quando comparadas com a DC, considerando as informações obtidas de degradabilidade da matéria orgânica, degradabilidade da proteína, produção de CH<sub>4</sub> e fator de partição.



## **6. RESULTADOS**

### **6.1 Experimento 1 – Caracterização e seleção dos coprodutos**

#### **6.1.1 Ensaio *in vitro* – degradabilidade e produção de CH<sub>4</sub>**

Os coprodutos foram caracterizados de acordo com os valores de degradabilidade, produção de gases e de CH<sub>4</sub>, e estão descritos na Tabela 6.1. Com base nessas informações, somadas à composição química, foram selecionados os coprodutos mais promissores, sendo eles: Bagaço de laranja (BL), bagaço de mandioca (BM), bagaço de uva branca (BUB), bagaço de uva tinta (BUT), canola moída (CM), farelo de algodão (FA), farelo de girassol (FG), farelo de soja (FS), palhada de milho (PM), palhada de feijão (PF), resíduo de feijão (RF), rolão de milho (RM), resíduo de cervejaria – bagaço (RCB), resíduo de cervejaria - levedura (RCL), resíduo de cervejaria – TRUB (RCT), torta de macaúba (TM), torta de mamona (TMA) e torta de nabo forrageiro (TN).

**Tabela 6.1** – Caracterização dos coprodutos nos ensaios *in vitro* de degradabilidade e produção de gases

Tratamento	DMS (g/kg)	DMO (g/kg)	NET GP MO (mL/g MOD)	NET CH4 MO (mL/g MOD)	FP
Bagaço de cana-de-açúcar	141,46	143	4,52	0,22	1,84
Bagaço de laranja	446,56	450,42	42,74	1,65	3,16
Bagaço de mandioca	747,59	748,81	80,07	3,99	4,47
Bagaço de uva branca	338,65	321,95	13,56	1,34	3,64
Bagaço de uva tinta	399,62	368,21	19,35	1,2	3,49
<i>Urochloa brizantha</i>	488	459,85	36,75	3,24	3,30
Canola moída	537,28	528,17	38,85	4,06	4,34
Casca de amendoim	144,59	137,25	3,72	0,39	1,84
Casca de café	518,23	482,77	52,16	5,23	2,75
Casca de soja	512,62	495,14	42,4	3,59	3,76
Farelo de algodão	540,72	517,81	37,74	4,06	3,96
Farelo de girassol	542,32	517,45	41,46	4,03	3,72
Farelo de soja	744,45	728,51	76,04	7,11	4,17
Palha de cana-de-açúcar	240,86	221,37	8,25	0,6	2,53
Palhada de feijão	567,74	540,58	55,02	5,31	3,02
Palhada de milho	279,16	366,92	11,79	0,97	2,86
Resíduo de cervejaria (bagaço)	522,05	516,26	42,65	4,04	3,86
Resíduo de cervejaria (levedura)	983,01	982,74	153,78	17,72	4,19
Resíduo de cervejaria (TRUB)	774,57	771,92	124,75	9,87	3,44
Resíduo de feijão	633,17	619,52	68,65	5,73	3,75
Rolão de milho	208,24	202,9	10,72	0,94	2,17
Sabugo de milho	371,95	366,92	27,68	2,3	3,12
Silagem de cana-de-açúcar	428,68	407,48	32,6	3,07	2,94
<i>Tithonia diversifolia</i>	503,09	456,89	35,85	2,14	3,75
Torta de macaúba	522,72	505,58	38,75	3,08	4,07
Torta de mamona	467,79	450,33	15,92	2,41	5,39
Tortade nabo forrageiro	740,85	733,51	68,18	6,8	4,65

DMO = degradabilidade da matéria orgânica; DMS = degradabilidade da matéria seca; MOVD = matéria orgânica verdadeiramente degradada; DEGPB = degradabilidade da proteína; GP MS = produção de gases por matéria seca; CH<sub>4</sub> MS = produção de metano por matéria seca; GP MO = produção de gases por unidade de matéria orgânica; CH<sub>4</sub> MO = produção de metano por unidade de matéria orgânica; FP = fator de partição; EPM = erro padrão da média.

## 6.2 Experimento 2 – Formulação e seleção das dietas experimentais

### 6.2.1 Ensaio *in vitro* de produção de gases

Os resultados obtidos para a produção de gases *in vitro* estão disponíveis na Tabela 6.2. A produção de gases total por matéria seca (GP MS) demonstrou diferença estatística apenas na dieta 8 (D8) com valor superior aos observados na DC ( $p < 0,05$ ), enquanto a produção de gases por matéria orgânica (GP MO) somente a dieta 1 (D1) apresentou valor superior à DC ( $p < 0,05$ ). A produção de CH<sub>4</sub> por matéria seca (mL g<sup>-1</sup> MS) e por matéria orgânica (mL/g MO) foi inferior na D2 e D3 ( $p < 0,05$ ), enquanto que na D7 somente para CH<sub>4</sub> (mL/g MO) foi observado diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Todas as dietas apresentaram valores similares para o fator de partição (FP) ( $p > 0,05$ ), com exceção da D8 que foi significativamente inferior a DC ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 6.2** – Degradabilidade e produção de gases *in vitro* das dietas experimentais

<b>Dieta experimental</b>	<b>DMO (g/kg)</b>	<b>DMS (g/kg)</b>	<b>MOVD (g/kg)</b>	<b>DGPB (g/kg)</b>	<b>pH</b>	<b>GP MS (mL/g MS)</b>	<b>CH<sub>4</sub> MS (mL/g MS)</b>	<b>GP MO (mL/g MOD)</b>	<b>CH<sub>4</sub> MO (mL/g MOD)</b>	<b>FP</b>
<b>DC</b>	469,05	487,83	0,39	67,27	6,71	93,42	6,69	44,30	3,24	3,35
<b>D1</b>	553,61*	575,82*	0,46*	51,78	6,61	103,22	5,57	57,18*	3,07	3,53
<b>D2</b>	490,31	513,87	0,41	56,96	6,63	98,34	4,67*	47,59	2,26*	3,24
<b>D3</b>	516,03	535,82	0,43	84,62	6,70	94,41	3,27*	47,30	1,63*	3,46
<b>D4</b>	469,25	492,89	0,40	51,55	6,62	102,33	6,42	47,05	2,92	3,10
<b>D5</b>	547,76*	573,56*	0,45*	113,88*	6,67	97,77	7,44	52,81	4,03	3,57
<b>D6</b>	491,40	516,59	0,42	98,41	6,67	97,95	6,16	52,47	2,94	3,41
<b>D7</b>	422,68	447,24	0,36	33,08	6,68	90,93	5,07	38,50	2,14*	3,15
<b>D8</b>	466,07	493,17	0,39	55,06	6,67	111,53*	7,16	51,88	3,31	2,95*
<b>D9</b>	463,52	496,85	0,38	54,07	6,74	97,05	7,7	46,4	3,58	3,11
<b>D10</b>	473,22	502,62	0,39	64,97	6,67	89,11	6,89	42,16	3,26	3,43
<b>EPM</b>	14,39	14,81	0,01	15,93	0,04	6,12	0,77	2,47	0,31	0,21
<b>Valor de P</b>	<.0001	<.0001	<.0001	1E-04	0.3722	3E-04	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001

\*Valor difere estatisticamente da Dieta controle pelo teste Dunnett ao nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ); DC = Dieta controle; D1 = Dieta 1; D2 = Dieta 2; D3= Dieta 3; D4= Dieta 4; D5= Dieta 5; D6 = Dieta 6; D7 = Dieta 7; D8 = Dieta 8; D9 = Dieta 9; D10 = Dieta 10; DMO = degradabilidade da matéria orgânica; DMS = degradabilidade da matéria seca; MOVD = matéria orgânica verdadeiramente degradada; DEGPB = degradabilidade da proteína; GP MS = produção de gases por matéria seca; CH<sub>4</sub> MS = produção de metano por matéria seca; GP MO = produção de gases por matéria orgânica; CH<sub>4</sub> MO = produção de metano por matéria orgânica; FP = fator de partição; EPM = erro padrão da média.

### **6.2.2 Degradabilidade *in vitro***

Houve efeito de dieta ( $p < 0,05$ ) para degradabilidade *in vitro* da matéria orgânica (DMO), matéria seca (DMS), matéria orgânica verdadeiramente degradada (MOVD) e degradabilidade da proteína (DGPB) (Tabela 6.2).

A DMO, DMS e MOVD foram superiores nas dietas D1 e D5 quando comparada com a DC. Na dieta 5 (D5), a DGPB foi 69,3% superior a DC, enquanto as demais dietas foram similares com a DC para esses parâmetros.

Para as variáveis DMO, DMS e MOVD foram observados valores elevados nas D1 e D5 quando comparadas à DC ( $p < 0,05$ ). Para a DGPB, apenas na D5 foi observado valores mais elevados em relação à DC ( $p < 0,05$ ).

### **6.2.3 Cinética de fermentação *in vitro***

Os valores calculados para os parâmetros relacionados à cinética de fermentação *in vitro* das dietas estão listados na Tabela 6.3. Para a variável VF, as dietas 2, 3, 5 e 8 (D2, D3, D5 e D8) obtiveram resultados superiores aos observados na DC ( $p < 0,05$ ). Para a variável K,  $T_{0.5}$  e  $U_{0.5}$ , somente as dietas 2 e 3 (D2 e D3) tiveram resultados significativamente diferentes da DC ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 6.3** – Parâmetros estimados para a cinética de fermentação *in vitro* das dietas experimentais.

	<b>VF</b> <b>(mL/g MS)</b>	<b>K</b> <b>(%/h)</b>	<b>T<sub>0.5</sub></b> <b>(h)</b>	<b>U<sub>0.5</sub></b> <b>(%/h)</b>
<b>DC</b>	140,36	0,07	9,92	0,07
<b>D1</b>	154,48	0,06	12,55	0,059
<b>D2</b>	176,17*	0,05*	12,88*	0,05*
<b>D3</b>	189,86*	0,04*	14,98*	0,046*
<b>D4</b>	161,18	0,057	10,48	0,057
<b>D5</b>	165,75*	0,058	11,94	0,058
<b>D6</b>	153,52	0,064	11,07	0,064
<b>D7</b>	142,2	0,063	11,01	0,063
<b>D8</b>	182,23*	0,056	13,12	0,056
<b>D9</b>	142,26	0,074	9,41	0,074
<b>D10</b>	138,2	0,067	10,38	0,067
<b>EPM</b>	5,7	0,0072	1,54	0,0072
<b>Valor de P</b>	<.0001	4E-04	0,02	4E-04

\* na mesma coluna representa diferença estatística ( $p < 0,05$ ). DC = Dieta controle; D1 = Dieta 1; D2 = Dieta 2; D3= Dieta 3; D4= Dieta 4; D5= Dieta 5; D6 = Dieta 6; D7 = Dieta 7; D8 = Dieta 8; D9 = Dieta 9; D10 = Dieta 10; VF = volume de gases final assintótico; K = taxa constante de degradação do substrato; T<sub>0.5</sub> = tempo à metade da produção total de gases; U<sub>0.5</sub> = taxa de produção de gás no T<sub>0.5</sub> (%/h); EPM = erro padrão da média.



## 7. DISCUSSÃO

### 7.1 Degradabilidade, produção de gases, CH<sub>4</sub> e parâmetros fermentativos *in vitro*

A avaliação de produção de gases *in vitro* possibilita a obtenção de dados acerca do comportamento de diferentes alimentos no contexto ruminal. Além disso, fornece informações sobre a interação com a microbiota, os padrões de fermentação e os subprodutos gerados durante esse procedimento (Getachew et al., 2005). Espera-se que os resultados de produção total de gases (GP) sejam mais altos se a degradabilidade dos compostos também for alta (Blümmel et al., 1997). Da mesma forma, foi observado que os tratamentos que apresentaram maior produção de GP também resultaram em uma produção superior de CH<sub>4</sub>. Essa observação sugere que compostos com maior degradabilidade tendem a gerar uma maior quantidade de CH<sub>4</sub>, conforme observado por Lee et al. (2011). Isso ocorre porque durante a degradabilidade da matéria orgânica (DMO), há liberação de H<sub>2</sub> como um subproduto do processo fermentativo. O H<sub>2</sub> é um subproduto gerado durante a síntese de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e desempenha um papel central na produção de CH<sub>4</sub>, especialmente através da atuação das *archeas* metanogênicas presentes no rúmen. Essas *archeas* capturam o H<sub>2</sub> liberado no ambiente, principalmente por meio da conversão do CO<sub>2</sub>. Esse processo desempenha um papel importante no equilíbrio do rúmen, garantindo a liberação contínua de íons H<sup>+</sup> (McAllister; Newbold, 2008; Huws et al., 2018).

Quando comparada com a DC, a D5 (contendo 12% de palhada de feijão e 22% de resíduo de cervejaria – levedura) apresentou uma maior degradabilidade, porém manteve níveis similares e sem diferenças estatísticas nas demais variáveis, incluindo a produção de CH<sub>4</sub>. Bryant et al. (2021) observaram que ácidos presentes especificamente na levedura de cervejas artesanais proporcionam maior potencial para reduzir a produção de CH<sub>4</sub>, o que pode estar relacionado à produção intermediária de CH<sub>4</sub> mesmo com a alta taxa de degradação observada nesse estudo. Os achados de altas taxas de degradabilidade da levedura de cerveja avaliada tanto como ingrediente na dieta, como individualmente, são corroborados pelos achados de Terefe et al. (2023). Os autores descreveram resultados semelhantes ao avaliarem a DMO e DGPB de diferentes níveis de inclusão de levedura de cerveja na dieta de ruminantes. Além disso, a palhada de feijão, presente na D5, quando avaliada individualmente, também apresentou uma alta degradabilidade, esse mesmo resultado também foi observado por Bizzuti et al. (2023). A fibra presente na palhada de feijão apresentou maior qualidade em comparação com a DC, possivelmente com menor concentração de fibra detergente ácido (FDA). No entanto, a diferença pode ser atribuída à presença da levedura, a qual demonstrou alta

concentração de proteína bruta (PB) e baixa concentração de carboidrato estrutural (FDN), indicando, assim, uma elevada concentração de carboidratos solúveis (NSC). Esses últimos constituem os dois principais fatores que influenciam a DMO. Esses fatores associados podem explicar o desempenho desta dieta em questão.

Houve um evidente aumento nos valores observados de degradabilidade e consequentemente de produção total de gases na D1 (dieta que mantém os mesmos ingredientes da DC, porém possui a inclusão de TD) quando comparada com a DC. Resultados similares foram observados em estudos anteriores, quando Pazla et al. (2018), Jamarun et al. (2019), e Rivera et al. (2021) relataram que a inclusão de TD a substratos *in vitro* resultou em uma maior degradabilidade. Além disso, esses resultados encontrados após a substituição da BX pela TD, indica que a TD tem valor nutritivo superior à BX (Tabela 5.1). Apesar dos valores de degradabilidade observados para essa dieta no presente estudo, a produção de CH<sub>4</sub> da D1 não diferiu estatisticamente da DC, demonstrando que a somente a inclusão de TD em dietas de ruminantes já pode apresentar um potencial interessante, antes mesmo de ser associada aos coprodutos. Além disso, a produção total de gases (GP) elevada da dieta em questão também pode ser explicada pelo processo de fermentação dos compostos, visto que em sua composição houve um aumento da inclusão de milho (5%) e uma maior degradabilidade da matéria orgânica em relação à DC, o que também pode estar relacionado ao teor de fibra inferior nesse material, pois, no geral, alimentos concentrados e menos fibrosos fornecem mais carboidratos solúveis para a fermentação (Lagrange; Lobón; Villalba, 2019).

As dietas 2, 3 e 7 (D2, D3 e D7) apresentaram valores consideravelmente menores para produção de CH<sub>4</sub> quando comparadas a DC (Tabela 6.2). Isso pode ser atribuído à inclusão do bagaço de mandioca, que é um ingrediente comum entre essas três dietas, e sua interação com os demais compostos presentes, dado que quando avaliado individualmente, o desempenho deste ingrediente para essa variável foi similar. Bizzuti et al., (2021), observaram uma síntese microbiana mais eficiente por meio do fator de partição (FP) nos substratos contendo bagaço de mandioca, esses autores relatam que isso provavelmente levou a uma menor produção de CH<sub>4</sub> entérico por unidade de nutriente produzido pela fermentação ruminal. O FP nos permite estabelecer a relação entre a produção de gases total e a DMO. Esse fator é utilizado para determinar a qualidade da fermentação, onde valores mais altos indicam uma maior degradabilidade, com menor produção de gases. Além disso, o FP também está relacionado à eficiência da comunidade ruminal na formação de massa microbiana. Estudos indicam uma relação entre a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e essa

eficiência, ou seja, quando os valores são altos, ocorre maior transformação da matéria orgânica degradada em biomassa microbiana e AGCC, em vez de serem perdidos na forma de gases (Blümmel; Makkar; Becker, 1997).

## 7.2 Cinética de fermentação *in vitro*

Os modelos matemáticos descrevem a dinâmica que ocorre na produção de gases, definindo o período de fermentação e a taxa de produção ao longo do tempo, bem como o intervalo de colonização da fibra (*lag time*) e o aumento exponencial nas fases iniciais da fermentação (*log time*) (France et al., 2000; Dijkstra et al., 2005; Wang et al., 2011). O modelo EXP<sub>0</sub>, selecionado pelo seu desempenho estatístico para avaliar a cinética fermentativa dos substratos, foi proposto por Ørskov e McDonald (1979). Esse modelo indica que algumas versões de um modelo exponencial simples sem *lag time* podem ser adequadas para descrever a cinética de produção de gás.

O Vf (volume final assintótico de produção de gases) foi mais alto para as dietas 2, 5 e 8 em relação à DC, enquanto o valor de K (taxa constante de degradação do substrato), expresso em %/h foi inferior somente nas dietas 2 e 3, o que significa que a porcentagem de degradação para essas dietas foi mais lenta nas primeiras 24 horas. A variável T<sub>0.5</sub> nos permite prever o tempo à metade da produção de gases de um substrato, enquanto o U<sub>0.5</sub> se refere à taxa (%/h) de produção de gases no momento T<sub>0.5</sub>. Para essas duas variáveis, as dietas 2 e 3 apresentaram valores estatisticamente diferentes em relação à DC. Esses resultados reforçamos valores de K, uma vez que a taxa de degradação para as dietas em questão foi mais lenta em comparação com a dieta controle (DC). O tempo necessário para degradar metade do substrato (T<sub>0.5</sub>) também foi maior, variando entre 12 e 14 horas, enquanto que para a DC, esse processo levou apenas 9 horas. Nota-se ainda que a porcentagem de degradação é bastante similar tanto no final quanto na meia vida, o que indica uma degradação constante. O parâmetro U<sub>0.5</sub> é útil para avaliar esse aspecto, sendo que alguns materiais com alta concentração de carboidratos solúveis tendem a apresentar um U<sub>0.5</sub> significativamente maior que o K. Essa maior concentração de carboidratos solúveis pode promover um pico de fermentação nas primeiras horas, afetando o valor de K e o tempo T<sub>0.5</sub>.

Apesar dos valores encontrados nesse estudo nos fornecerem informações importantes para entender a cinética fermentativa das dietas, não foram encontrados trabalhos na literatura que utilizaram o mesmo modelo matemático para avaliar dietas associadas à TD que permitam uma comparação a estes resultados.



## 8. CONCLUSÃO

Conclui-se que dietas à base de coprodutos agroindustriais e associadas a uma fonte de biomassa não convencional, como a *Tithonia diversifolia*, tem grande potencial de substituição parcial ou total de ingredientes convencionais em dietas de ruminantes sem causar impactos adversos na atividade microbiana e no processo de fermentação *in vitro*.

No presente estudo, foram selecionadas três dietas promissoras e com valores nutricionais interessantes, com base nos resultados de bromatologia, produção de CH<sub>4</sub> e degradabilidade, sendo elas: Dieta 2 (composta por 25% de *Urochloa brizantha*, 25% de TD, 22% de bagaço de mandioca e 28% de farelo de girassol), Dieta 3 (25% de *Urochloa brizantha*, 25% de TD, 3% de bagaço de laranja, 26% de bagaço de mandioca e 21% de farelo de algodão) e Dieta 5 (25% de *Urochloa brizantha*, 25% de TD, 16% de bagaço de laranja, 12% de palhada de feijão e 22% de resíduo de cervejaria – levedura), que poderão ser utilizadas e melhor exploradas em estudos futuros *in vivo*. Além disso, a produção de CH<sub>4</sub> da D1 (composta por 25% de *Urochloa brizantha*, 25% de TD, 35% de milho moído e 15% de farelo de soja) não diferiu estatisticamente da DC, o que demonstra que a somente a inclusão de TD em dietas de ruminantes já pode apresentar um potencial interessante, antes mesmo de ser associada aos coprodutos.

Ao utilizar os coprodutos como fonte suplementar ou base em dietas, deve-se considerar condições e custos de produção, transporte, processamento e tratamento, além da disponibilidade desses ingredientes. No entanto, salienta-se o impacto positivo da associação desses compostos com forrageiras não convencionais em sistemas silvopastoris, possuindo grande potencial para contribuir com a necessidade de sustentabilidade do setor pecuário.



## REFERÊNCIAS

- Halmemies-Beauchet-Filleau et al., (2018). Review: Alternative and novel feeds for ruminants: nutritive value, product quality and environmental aspects. *Animal*, v. 12, Suppl. 2, p. s295-s309. DOI: 10.1017/S1751731118002252.
- Abdalla et al., (2023). *In Vitro* Degradability and Methane Production from By-Products Fed to Ruminants. *Agronomy*, v. 13, n. 4, p. 1043. DOI: 10.3390/agronomy13041043.
- Ademiluyi, B. O., & Omotoso, S. O. (2007). Comparative Evaluation of *Tithonia diversifolia* and NPK Fertilizer for soil improvement in maize (*Zea mays*) production in Ado Ekiti, Southwestern Nigeria. *American Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 1(1), 32–36. <http://www.aensiweb.net/AENSIWEB/aejsa/aejsa/2007/32-36.pdf>
- Akanmu, A. M., Hassen, A., & Adejoro, F. A. (2020). Gas production, digestibility and efficacy of stored or fresh plant extracts to reduce methane production on different substrates. *Animals*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/ani10010146>
- Amanzougarene, Z.; Fondevila, M. Fitting of the *In Vitro* Gas Production Technique to the Study of High Concentrate Diets. *Animals* 2020, 10, 1935. <https://doi.org/10.3390/ani10101935>
- Anusorn, C., Rittikeard, P., Chanadol, S., Benjamad, K., Metha, W., Suban, F., Nipa, M., Nirawan, G., Pongsatorn, G., Pin, C., & Sineenart, P. (2019). Inclusion of yeast waste as a protein source to replace soybean meal in concentrate mixture on ruminal fermentation and gas kinetics using *in vitro* gas production technique. *Animal Production Science*, 59, 1682-1688.
- As per the ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) guidelines, I have standardized the references in alphabetical order and without numbering:
- Association of Official Analytical Chemistry - AOAC. Official methods of analysis of AOAC International. Gaithersburg: AOAC International, 2011.
- Bakshi, M. P. S., Wadhwa, M., & Makkar, H. P. S. (2016). Waste to worth: vegetable wastes as animal feed. *CABI Reviews*.
- Balcombe, P., Speirs, J. F., Brandon, N. P., & Hawkes, A. D. (2018). Methane emissions: choosing the right climate metric and time horizon. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 20, 1323. <https://doi.org/10.1039/c8em00414e>
- Beauchemin K, Kreuzer M, O'mara F, and McAllister T, (2008) Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Aust J Exp Agric* 48(2):21–27. <https://doi.org/10.1071/EA07199>
- Benchaar, C., & Greathead, H. (2011). Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 166, 338–355. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.04.024>
- Bergman EN, Reid RS, Murray MG, Brockway JM, Whitelaw FG. 1965. Interconversions and production of volatile fatty acids in the sheep rumen. *Biochem. J.* 97: 53-55.

- Bogunovic, I. et al. Grassland Management Impact on Soil Degradation and Herbage Nutritional Value in a Temperate Humid Environment. *Agriculture*, v. 12, n. 7, p. 921, 2022. DOI: 10.3390/agriculture12070921.
- Bremer, V. R., Watson, A. K., Liska, A. J., Erickson, G. E., Cassman, K. G., Hanford, K. J., & Klopfenstein, T. J. (2011). Effect of distillers grains moisture and inclusion level in livestock diets on greenhouse gas emissions in the corn-ethanol-livestock life cycle. *The Professional Animal Scientist*, 27(5), 449-455. [https://doi.org/10.15232/S1080-7446\(15\)30517-9](https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)30517-9)
- Bryant, R. W. et al. Spent Craft Brewer's Yeast Reduces Production of Methane and Ammonia by Bovine Rumen Microbes. *Frontiers in Animal Science*, v. 2, 2021. DOI: 10.3389/fanim.2021.720646.
- Bueno, I. C. S. et al. Influence of inoculum source in a gas production method. *Animal Feed Science and Technology*, v. 123-124, p. 95-105, 2005.
- Calabró, S., Vastolo, A., & Cutrignelli, M. I. (2022). A review on the use of agro-industrial co-products in animals' diets. *Italian Journal of Animal Science*, 21(1), 577-594. DOI: 10.1080/1828051X.2022.2039562
- Calsavara, L. H. F., Ribeiro, R. S., Silveira, S. R., Delarota, G., Freitas, D. S., Sacramento, J. P., Paciullo, D. S. C., & Maurício, R. M. (2016). Potencial forrageiro da *Tithonia diversifolia* para alimentação de ruminantes. *Livestock Research for Rural Development*, 28(2), 1–9. <http://www.lrrd.org/lrrd28/2/ferr28017.html>
- Cardona Iglesias, J. L., Mahecha Ledesma, L., Angulo Arizala, J., Cardona, J. L., Mahecha, L., Angulo, J., Cardona Iglesias, J. L., Mahecha Ledesma, L., & Angulo Arizala, J. (2017). Efecto sobre la fermentación *in vitro* de mezclas de *Tithonia diversifolia*, *Cenchrus clandestinum* y grasas poliinsaturadas. *Agronomía Mesoamericana*, 28(2), 405. <https://doi.org/10.15517/ma.v28i2.25697>
- Castañeda-Serrano, R. D., Piñeros-Varón, R., & Vélez-Giraldo, A. (2018). Foliage of tropical arboreal species in feeding ovines (*Ovis Aries*): Intake, digestibility and balance nitrogen. *Boletín Científico Del Centro de Museos*, 22(1), 58–68. <https://doi.org/10.17151/bccm.2018.22.1.4>
- Cherdthong, A., Rittikeard, P., Chanadol, S., Benjamad, K., Metha, W., Suban, F., Nipa, M., Nirawan, G., Pongsatorn, G., Pin, C., & Sineenart, P. (2019). Inclusion of yeast waste as a protein source to replace soybean meal in concentrate mixture on ruminal fermentation and gas kinetics using *in vitro* gas production technique. *Animal Production Science*, 59, 1682-1688.
- Cong, P. T., & Merckx, R. (2005). Improving phosphorus availability in two upland soils of Vietnam using *Tithonia diversifolia* H. *Plant and Soil*, 269(1–2), 11–23. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-1791-1>
- Correddu, F., Lunesu, M. F., Buffa, G., Atzori, A. S., Nudda, A., Battacone, G., & Pulina, G. (2020). Can Agro-Industrial By-Products Rich in Polyphenols be Advantageously Used in the Feeding and Nutrition of Dairy Small Ruminants. *Animals*, 10, 131.



- Czerkawski, J. W., & Breckenridge, G. (1977). Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *British Journal of Nutrition*, 38(3), 371–384. <https://doi.org/10.1079/bjn19770102>
- De la Fuente G, Yañez-Ruiz DR, Seradj AR, Balcells J, Belanche A. 2019. Methanogenesis in animals with foregut and hindgut fermentation: a review. *Anim. Prod. Sci.* 59: 2109-2122
- Dijkstra, J. et al. Application of the gas production technique to feed evaluation systems for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, v. 123-124, Part 2, p. 561-578, 2005. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2005.04.048.
- FAO. (2023). FAOSTAT: Climate Change – Agrifood systems emissions. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA>>. Acesso em: 15 Julho 2023.
- Fellner V (2009) Reactions in the rumen—limits and potential for improved animal production efficiency. Paper presented at the Proceedings of The Southwest Nutrition and Management Conference., Tucson
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT analytical briefs. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2020. Disponível em: <https://www.fao.org/home/en/>. Acesso em: jun 2023.
- France, J. et al. Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed *in vitro*: derivation of models and other mathematical considerations. *British Journal of Nutrition*, v. 83, n. 2, p. 143-150, 2000.
- Galindo, Juana; González, Niurca; Scull, Idania; Marrero, Yoandra; Sosa, Areadne; Aldana, Ana I. et al. Effect of Samanea saman (Jacq.) Merr. Albizia lebbeck Benth and *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray (plant material 23) on the methanogen population and on the ruminal microbial ecology. *Cuban J. Agric. Sci.* 46 (3):273-278, 2012.
- Galindo-Blanco, J., et al. "Silvopastoral system with *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray: effect on the rumen microbial population of cows." *Pastos y forrajes* 41.4 (2018): 273-280.
- Gava, C. A. T. et al. Land-use change alters the stocks of carbon, nitrogen, and phosphorus in a Haplic Cambisol in the Brazilian semi-arid region. *Soil Use Manage*, v. 38, n. 2, p. 1237-1249, 2022. DOI: 10.1111/sum.12716.
- Getachew, G. et al. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: A review. *Animal Feed Science and Technology*, v. 72, n. 3-4, p. 261-281, 1998. DOI: 10.1016/S0377-8401(97)00189-2.
- Getachew, G.; Blümmel, M.; Makkar, H.P.S.; Becker, K. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 1998, 72, 261–281.
- Giamouri, E., Zisis, F., Mitsiopolou, C., Christodoulou, C., Pappas, A. C., Simitzis, P. E., Kamilaris, C., Galliou, F., Manios, T., Mavrommatis, A., & outros. (2023). Estratégias Sustentáveis para Redução de Emissões de Gases de Efeito Estufa na Produção de Pequenos Ruminantes. *Sustentabilidade*, 15, 4118. <https://doi.org/10.3390/su15054118>

González, M. A. H., Mogollón, O. L. M., Saavedra, Y. M. G., Castaño, V. A. H., & Mora-Delgado, J. (2020). *In vitro* methane production from silages based on *Cenchrus purpureus* mixed with *Tithonia diversifolia* in different proportions. *Acta Scientiarum - Animal Sciences*, 43(1), 1–11. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v43i1.51322>

Greening, C., Geier, R., Wang, C., Woods, L. C., Morales, S. E., McDonald, M. J., Rushton-Green, R., Morgan, X. C., Koike, S., Leahy, S. C., Kelly, W. J., Cann, I., Attwood, G. T., Cook, G. M., & Mackie, R. I. (2019). Diverse hydrogen production and consumption pathways influence methane production in ruminants. *ISME Journal*, 13(10), 2617–2632. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0464-2>

Gutiérrez-Gómez, C. et al. The tension between global GHG emissions of animal source foods, sustainability, and food security in Latin America and the Caribbean. *CABI Reviews*, 2021. DOI: 10.1079/PAVSNR202116057.

Halmemies-Beauchet-Filleau, A. et al. Review: Alternative and novel feeds for ruminants: nutritive value, product quality and environmental aspects. *Animal*, v. 12, Suppl. 2, p. s295-s309, 2018.

Hess, H. D.; Gómez, J. & Lascano, C. E. Producción de leche de vacas en pastoreo suplementadas con mezclas de leguminosas con y sin taninos. Segundo taller taninos en la nutrición de rumiantes en Colombia. Publ. CIAT 352. Palmira, Colombia: Centro internacional de Agricultura Tropical, 2006

Hill, J., McSweeney, C., Wright, A. D. G., Bishop-Hurley, G., & Kalantar-zadeh, K. (2016). Measuring Methane Production from Ruminants. *Trends in Biotechnology*, 34(1), 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.10.004>

Hou, D. Gestão sustentável dos solos e mitigação das alterações climáticas. *Uso e Manejo do Solo*, v. 37, p. 220-223, 2021. DOI: 10.1111/sum.12718.

Huws, S. A. et al. Addressing global ruminant agricultural challenges through understanding the rumen microbiome: Past, present, and future. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02161.

Huws, S. A., Creevey, C. J., Oyama, L. B., Mizrahi, I., Denman, S. E., Popova, M., Muñoz-Tamayo, R., Forano, E., Waters, S. M., Hess, M., Tapio, I., Smidt, H., Krizsan, S. J., Yáñez-Ruiz, D. R., Belanche, A., Guan, L., Gruninger, R. J., McAllister, T. A., Newbold, C. J., Morgavi, D. P. (2018). Addressing global ruminant agricultural challenges through understanding the rumen microbiome: Past, present, and future. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 9, Issue SEP). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02161>

IPCC. (2019). Climate Change and Land An IPCC Special Report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems. In P. R. Shukla, J. Skea, E. C. Buendia, V. Masson-Delmotte, H.-O. Pörtner, D. C. Roberts, P. Zhai, R. Slade, S. Connors, R. van Diemen, M. Ferrat, E. Haughey, S. Luz, S. Neogi, M. Pathak, J. Petzold, J. P. Pereira, P. Vyas, E. Huntley, ... J. Malley (Eds.), IPCC. [www.ipcc.ch](http://www.ipcc.ch)

Jamarun, N., Pazla, R., Zain, M., & Arief. Comparison of *in vitro* digestibility and rumen fluid characteristics between the *Tithonia diversifolia* with elephant grass

(*Pennisetum purpureum*). IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, v. 287, n. 1, p. 012019, 2019. DOI: 10.1088/1755-1315/287/1/012019.

James R Vinyard, Antonio P Faciola, Unraveling the pros and cons of various *in vitro* methodologies for ruminant nutrition: a review, Translational Animal Science, Volume 6, Issue 4, October 2022, txac130, <https://doi.org/10.1093/tas/txac130>

Jan-Helge Deitmers, Nina Gresner, Karl-Heinz Südekum. Opportunities and limitations of a standardisation of the rumen simulation technique (RUSITEC) for analyses of ruminal nutrient degradation and fermentation and on microbial community characteristics. Animal Feed Science and Technology. V.289. (2022),115325,ISSN 0377-8401, <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.115325>.

K. A. Johnson, D. E. Johnson, Methane emissions from cattle, Journal of Animal Science, Volume 73, Issue 8, August 1995, Pages 2483–2492, <https://doi.org/10.2527/1995.7382483x>

Kent-Dennis, C., J. R. Aschenbach, P. J. Griebel, and G. B. Penner. 2020. Effects of lipopolysaccharide exposure in primary bovine ruminal epithelial cells. J. Dairy Sci. 103:9587–9603. doi:10.3168/jds.2020-18652.

Klevenhusen, F., Südekum, K.-H., Breves, G., Kolrep, F., Kietzmann, M., Gerletti, P., Numata, J., Spolders, M., Pieper, R., Kowalczyk, J., 2021. Predicting the transfer of contaminants in ruminants by models – potentials and challenges. ALTEX 38, 398–418. <https://doi.org/10.14573/altex.2007081>.

Koenig, K. M., & Beauchemin, K. A. (2018). Efeito da alimentação com taninos condensados em dietas de alta proteína contendo grãos de destilaria de milho na fermentação ruminal, digestibilidade de nutrientes e via de excreção de nitrogênio em bovinos de corte. J. Anim. ciência, 96, 4398–4413.

Lagrange, S., Lobón, S., & Villalba, J. J. Gas production kinetics and *in vitro* degradability of tannin-containing legumes, alfalfa and their mixtures. Animal Feed Science and Technology, v. 253, p. 56-64, 2019.

Lee, H. J., Lee, S. C., Kim, J. D., Oh, Y. G., Kim, B. K., Kim, C. W., Kim, K. J. (2003). Methane production potential of feed ingredients as measured by *in vitro* gas test. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 16(8), 1143 – 1150. DOI: 10.5713/ajas.2003.1143

Lima, P. M. T. et al. Nutritional evaluation of the legume *Macrotyloma axillare* using *in vitro* and *in vivo* bioassays in sheep. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, v. 102, n. 2, p. e669-e676, 2018.

Longo, C. et al. The influence of head-space and inoculum dilution on *in vitro* ruminal methane measurements. International Congress Series, v. 1293, p. 62-65, 2006.

Lynch, J., Cain, M., Pierrehumbert, R., & Allen, M. (2020). Demonstrating GWP: a means of reporting warming-equivalent emissions that captures the contrasting impacts of short- and long-lived climate pollutants. Environmental Research Letters, 15, 044023.

M.R. Allen, K.P. Shine, J.S. Fuglestedt, R.J. Millar, M. Cain, D.J. Frame, A.H. Macey. A solution to the misrepresentations of CO<sub>2</sub>-equivalent emissions of short-lived climate pollutants under ambitious mitigation. *Clim Atmos. Sci.*, 1 (2018), p. 16, 10.1038/s41612-018-0026-8

Mahecha, L., Londoño, J.D. & Angulo, J. Agronomic and Nutritional Assessment of an Intensive Silvopastoral System: *Tithonia Diversifolia*, *Sambucus nigra*, *Cynodon nlemfuensis*, and *Urochloa plantaginea*. *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.* 92, 37–47 (2022). <https://doi.org/10.1007/s40011-021-01282-7>

Malenica, D., Kass, M., & Bhat, R. (2023). Sustainable Management and Valorization of Agri-Food Industrial Wastes and By-Products as Animal Feed: For Ruminants, Non-Ruminants and as Poultry Feed. *Sustainability*, 15, 117. <https://doi.org/10.3390/su15010117>

Manaye, A., Tesfamariam, B., Tesfaye, M., Worku, A., & Gufi, Y. (2021). Tree diversity and carbon stocks in agroforestry systems in northern Ethiopia. *Carbon Balance and Management*, 16, 1– 10. <https://doi.org/10.1186/s13021-021-00174-7>

Marquez, S. P. *Tithonia diversifolia*: uso na nutrição e potencial para redução de emissões de gases de efeito estufa em ovinos. 2022. 121f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2022.

Matthews C., Crispie F., Lewis E., Reid M., O'Toole P. W., Cotter P. D.. 2019. The rumen microbiome: a crucial consideration when optimising milk and meat production and nitrogen utilisation efficiency. *Gut Microbes* 10: 115-132.

Mauricio R. M., Ribeiro R. S., Paciullo D. S. C., Alves M., Murgueitio E., Chará J., Flores M. X. (2018) Silvopastoral systems in Latin America for biodiversity, environmental, and socioeconomic improvements. In: Lemaire G, Carvalho PCF, Kronberg S, Recous S (eds) *Agroecosystem diversity reconciling contemporary agriculture and environmental quality*. Academic Press, Cambridge, pp 287–297

Maurício, R., Ribeiro, R. S., Silveira, S. R., Silva, P. L., Calsavara, L., Pereira, L. G. R., & Paciullo, D. S. (2014). *Tithonia diversifolia* for ruminant nutrition. *Tropical Grasslands - Forrajes Tropicales*, 2. [https://doi.org/10.17138/TGFT\(2\)82-84](https://doi.org/10.17138/TGFT(2)82-84)

Menke, K.H.; Raab, L.; Salewski, A.; Steingass, H.; Fritz, D.; Schneider, W. The estimation of digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *J. Agric. Sci.* 1979, 193, 217–225

Mertens, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. *Journal of AOAC International*, v. 85, n. 6, p. 1217-1240, 2003.

Mlambo, V., & Mnisi, C. (2019). Optimizing ruminant production systems for sustainable intensification, human health, food security, and environmental stewardship. *Outlook on Agriculture*, 48(2), 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.011>

Morgavi, D. P., Forano, E., Martin, C., & Newbold, C. J. (2010). Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal*, 4(7), 1024–1036.  
<https://doi.org/10.1017/S1751731110000546>

Morgavi, D.P., Cantalapiedra-Hijar, G., Eugène, M., Martin, C., Noziere, P., Popova M., Ortigues-Marty, I., Muñoz-Tamayo, R., Ungerfeld, E.M. (2023). Review: Reducing enteric methane emissions improves energy metabolism in livestock: is the tenet right?, *Animal*. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100830>.

Mould, F.L.; Morgan, R.; Kliem, K.E.; Krystallidou, E. A review and simplification of the *in vitro* incubation medium. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2005, 123, 155–172.

National Research Council. 2021. *Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids*. Washington, DC: The National Academies Press.

Oliveira, V. S., Valença, R. L., Santana Neto, J. A., Santana, J. C. S., Santos, C. B. & Lima, I. G. S. (2014). Utilização da técnica de produção de gás “*in vitro*” para estimar a digestibilidade dos alimentos. *Revista Científica de Medicina Veterinária*, 2(23).

Orskov, E.R. and McDonald, I. (1979) The Estimation of Protein Degradability in the Rumen from Incubation Measurements Weighed According to Rate of Passage. *The Journal of Agricultural Science*, 92, 499. <https://doi.org/10.1017/S0021859600063048>

Pazla, R., Adrizal, A., & Sriagtula, R. Intake, Nutrient Digestibility and Production Performance of Pesisir Cattle Fed *Tithonia diversifolia* and *Calliandra calothyrsus*-Based Rations with Different Protein and Energy Ratios. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, v. 9, n. 10, p. 527-534, 2021. DOI: 0.17582/journal.aavs/2021/9.10.1608.1615.

Pérez, A.; Montejo, I.; Iglesias, J.M.; López, O.; Martín, G.J.; García, D.E.; Milián, Idolkis; Hernández, A. *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. *Pastos y Forrajes*, vol. 32, núm. 1, marzo, 2009, pp. 1-15. Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=269119696001>

Pérez-Márquez, S., Ribeiro, R. S., Abdalla, A. L., Lana, A. M. Q., & Maurício, R. M. (2019). Does *Tithonia diversifolia* influences *in vitro* gas production parameters and nutritive value of graminous *Cynodon* spp and *Penisetum purpureum* when associated? In J. Rivera, P. Peri, J. Chará, M. Díaz, L. Colcombet, & E. Murgueitio (Eds.), *X Congreso internacional sobre sistemas silvopastoriles: por una producción sostenible* (pp. 493–495). Editorial CIPAV.

Rakita, S., Banjac, V., Djuragic, O., Cheli, F., & Pinotti, L. (2021). Soybean molasses in animal nutrition. *Animals*, 11(2), 514.

Ribeiro Pereira LG, Machado FS, Campos MM, Guimaraes Júnior R, Tomich TR, Reis LG, et al. 2015. Enteric methane mitigation strategies in ruminants: a review. *Rev. Colom. Cienc. Pecu.* 28: 124-143

Ribeiro, A. A.; Pinedo, L. A.; Codognoto, L. da C. .; Cavali, J. .; Porto, M. O.; Santos, B. R. C. dos .; Oliveira, P. V. C. de .; Amorim, D. S. .; Chacón, S. A. R. G. .; Firmino, S. S. . Comparison of methods to measure enteric methane emissions from ruminants: an integrative review. *Research, Society and Development*, [S. l.], v. 9, n. 11, p. e8259118143, 2020. DOI: 10.33448/rsd-v9i11.8143. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/8143>.

- Ribeiro, R. S., Terry, S. A., Sacramento, J. P., Silveira, S. R. E., Bento, C. B. P., da Silva, E. F., Mantovani, H. C., da Gama, M. A. S., Pereira, L. G. R., Tomich, T. R., Maurício, R. M., Chaves, A. V., Gama, M. A. S. da, Pereira, L. G. R., Tomich, T. R., Maurício, R. M., & Chaves, A. V. (2016). *Tithonia diversifolia* as a supplementary feed for dairy cows. *PLoS ONE*, 11(12), e0165751. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165751>
- Rivera, J. E., & Chará, J. CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O Emissions From Cattle Excreta: A Review of Main Drivers and Mitigation Strategies in Grazing Systems. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, v. 5, 2021. DOI: 10.3389/fsufs.2021.657936.
- Rivera, J., Chará, J., Arango, J., & Barahona, R. (2021). Effect of different genotypes of *Tithonia diversifolia* on fermentation of feed mixtures with *Urochloa brizantha* cv. Marandú. *Crop and Pasture Science*, 72(10), 850. <https://doi.org/10.1071/CP21102>
- Rogério Martins Mauricio et al. Chapter 18 - Silvopastoral Systems in Latin America for Biodiversity, Environmental, and Socioeconomic Improvements. *Agroecosystem Diversity*, p. 287-297, 2019. DOI: 10.1016/B978-0-12-811050-8.00018-2.
- Rojas-Downing, M. M., Nejadhashemi, A. P., Harrigan, T., & Woznicki, S. A. (2017). Climate change and livestock: Impacts, adaptation, and mitigation. *Climate Risk Management*, 16, 145–163.
- Rugoho I, Gibbs J, Edwards G (2019) Rumen function and foraging behaviour of non-lactating, pregnant dairy cows wintered on kale or grass. *New Zealand J Agric Res* 62(1):96–111. <https://doi.org/10.1080/00288233.2018.1461116>
- Ruíz, T. E.; Alonso, J.; Febles, G. J.; Galindo, Juana; Savón, Lourdes; Chongo, Bertha. Evaluación de materiales recolectados de *Tithonia diversifolia* en Cuba. *Memorias del XI Congreso Internacional Silvopastoril. Aportes a los objetivos del desarrollo sostenible*. Manizales, Colombia: FEDEGAN, CIPAV, 2017.
- Sadh, P. K., Duhan, S., & Duhan, J. S. (2018). Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresour. Bioprocess.*, 5(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0187-z>
- Salami, S. A. et al. Sustainability of feeding plant by-products: A review of the implications for ruminant meat production. *Animal Feed Science and Technology*, v. 251, p. 37-55, 2019.
- Scholtz, M. M., Neser, F. W. C., & Makgahlela, M. L. (2020). A balanced perspective on the importance of extensive ruminant production for human nutrition and livelihoods and its contribution to greenhouse gas emissions. *South African Journal of Science*, 116(9/10). <https://doi.org/10.17159/sajs.2020/8192>
- Singh, B., Mal, G., Gautam, S. K., & Mukesh, M. (2019). Gut/Rumen Microbiome—A Livestock and Industrial Perspective. In *Advances in Animal Biotechnology* (pp. 17–29). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-21309-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-21309-1_2)
- Soltan, Y., & Patra, A. K. (2022). Sustainable mitigation of greenhouse gas emissions in small-scale ruminant production systems. *Indian Journal of Animal Health*, 61(Special Issue), 33–40. <https://doi.org/10.36062/ijah.2022.spl.03322>

- Terefe, G. et al. Effect of sun dry brewer spent yeast on chemical composition, *in vitro* digestibility, and ruminal degradation kinetics of wheat straw. *Agriculture and Bioscience*, v. 4, p. 20, 2023. DOI: 10.1186/s43170-023-00164-4.
- Theodorou, M. K. et al. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, v. 48, n. 3-4, p. 185-197, 1994.
- Tseten T, Sanjorjo RA, Kwon M, Kim S. Strategies to Mitigate Enteric Methane Emissions from Ruminant Animals. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2022; 32:269-277. <https://doi.org/10.4014/jmb.2202.02019>
- Ungerfeld EM. 2020. Metabolic hydrogen flows in rumen fermentation: principles and possibilities of interventions. *Front. Microbiol.* 11: 589.
- United Nations News. (2022, July 20). Global Perspective Human Stories. Disponível em: <https://news.un.org/en/story/2022/07/1122272> (acesso em 20 Julho 2023).
- Valenzuela Que, F. G. et al. Silvopastoral systems improve carbon stocks at livestock ranches in Tabasco, Mexico. *Soil Use and Management*, v. 38, n. 2, p. 1237-1249, 2022.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science*, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991.
- Vastolo, A., Calabró, S., Liotta, L., Musco, N., Di Rosa, A. R., Cutrignelli, M. I., & Chiofalo, B. (2019). *In vitro* fermentation and chemical characteristics of Mediterranean by-products for swine nutrition. *Animals*, 9(8), 556–512.
- Verdecia, D. M., Ramirez, J. L., Leonard, I., Alvarez, Y., Bazán, Y., Bodas, R., Andrés, S., Alvarez, J., Giraldez, F., & Lopez, S. (2011). Nutritive value of the tithonia diversifolia in a location of valle del cauto. *Revista Electronica de Veterinaria*, 12.
- Villanueva-López, G., Martínez-Zurimendi, P., Casanova-Lugo, F., Ramírez-Avilés, L., & Montañez-Escalante, P. I. (2015). Carbon storage in livestock systems with and without live fences of *Gliricidia sepium* in the humid tropics of Mexico. *Agroforestry Systems*, 89, 1083–1096. <https://doi.org/10.1007/s10457-015-9836-4>
- Wijerathna-Yapa, A., & Pathirana, R. Sustainable Agro-Food Systems for Addressing Climate Change and Food Security. *Agriculture*, v. 12, n. 10, p. 1554, 2022. DOI: 10.3390/agriculture12101554.
- Zhang, S. J., Chaudhry, A. S., Ramdani, D., Osman, A., Guo, X. F., & outros. (2016). Chemical composition and *in vitro* fermentation characteristics of high sugar forage sorghum as an alternative to forage maize for silage making in Tarim Basin, China. *Journal of Integrative Agriculture*, 15, 175–182. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(14\)60939-4](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60939-4)