

TIAGO PANSARD ALVES

**EMISSÃO DE GASES DE EFEITO ESTUFA E USO DO
EXTRATO TANÍFERO DE *ACACIA MEARNSII* PARA VACAS
LEITEIRAS EM PASTOS DE INVERNO E VERÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Henrique Mendonça
Nunes Ribeiro Filho

**Lages, SC
2016**

Pansard Alves, Tiago
EMIÇÃO DE GASES DE EFEITO ESTUFA E USO DO
EXTRATO TANÍFERO DE ACACIA MEARNsii PARA VACAS
LEITEIRAS EM PASTOS DE INVERNO E VERÃO / Tiago
Pansard Alves. Lages - 2016.
80 p.

Orientador: Henrique Mendonca Nunes Ribeiro Filho
Tese (Doutorado) - Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias,
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages,
2016.

1. Aditivos alimentares. 2. Perfil nutricional.
3. Produção de leite. 4. Taninos condensados. 5.
Vaca leiteira . I. Mendonca Nunes Ribeiro Filho,
Henrique. II. Universidade do Estado de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação. III. Título.

TIAGO PANSARD ALVES

**EMIÇÃO DE GASES DE EFEITO ESTUFA E USO DO
EXTRATO TANÍFERO DE ACACIA *MEARNSII* PARA VACAS
LEITEIRAS EM PASTOS DE INVERNO E VERÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal,
Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para
a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Banca Examinadora

Orientador:

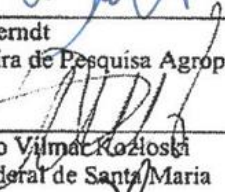


Prof. Dr. Henrique Mendonça Nunes Ribeiro Filho
Universidade do Estado de Santa Catarina

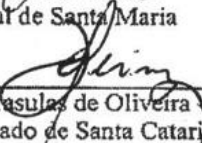
Membros



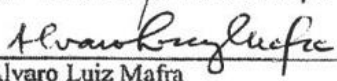
Dr. Alexandre Berndt
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária



Prof. Dr. Gilberto Vilmar Kozłowski
Universidade Federal de Santa Maria



Prof. Dr. Dimas Estrasulas de Oliveira
Universidade do Estado de Santa Catarina



Prof. Dr. Alvaro Luiz Mafra
Universidade do Estado de Santa Catarina

Lages, julho de 2006

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV/UDESC – Lages SC), por toda a estrutura física e intelectual disponibilizada aos estudantes.

A Capes pelo apoio financeiro na forma de bolsa de doutorado.

Aos professores do programa de Pós Graduação em Ciência Animal, em especial ao meu orientador de tese, professor Dr. Henrique M. N. Ribeiro Filho por todo o conhecimento compartilhado.

A equipe de pesquisa sobre produção leiteira (SysLait) do Institut National de la Recherche Agronomique (INRA-Rennes, França), e em especial a minha orientadora durante os sete meses em que trabalhei neste instituto, Dra. Nadège Edouard, e ao responsável chefe da equipe Rémy Delagarde por toda a estrutura a mim disponibilizada.

Aos meus colegas e amigos que fiz durante todo o meu doutorado, incluindo o período de estada na França, por todo o apoio técnico e emocional que recebi.

Aos meus pais e irmãos.

A minha esposa, que soube compreender as minhas ausências me apoiando durante todo o doutorado.

A minha filha que é razão que me impulsiona a ser cada dia melhor como pai e como homem.

RESUMO

ALVES, Tiago Pansard. **Emissão de gases de efeito estufa e uso do extrato tanífero de *acacia mearnsii* para vacas leiteiras em pastos de inverno e verão.** 2016. 80p Tese (Doutorado em Ciência Animal – Área: Produção Animal). Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Lages, 2016.

Com o objetivo quantificar as emissões de óxido nitroso (N_2O) advindas das fezes e urina de vacas em pastos de clima temperado e investigar alternativas para promover a eficiência da utilização do nitrogênio alimentar, bem como reduzir as emissões de metano, sem prejuízo ao potencial produtivo de vacas leiteiras foram realizados três experimentos. O primeiro experimento objetivou quantificar o potencial de emissão de N_2O do solo em função das emissões nitrogenadas advindas das fezes e urina de vacas leiteiras em pastejo. No segundo e terceiro experimentos foram realizados ensaios de desempenho de vacas leiteiras em pastagens de inverno e verão, avaliando o uso da suplementação com alimentos concentrados com ou sem a adição de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* como alternativa para promover a eficiência da utilização do nitrogênio alimentar, e reduzir as emissões de metano. Os resultados do primeiro experimento demonstraram que o fluxo de emissão de N_2O do solo é significativamente afetado pela excreção urinária de vacas leiteiras, mas não pela. Estes resultados sugerem que um manejo nutricional de vacas leiteiras que privilegie a melhor eficiência do uso do N alimentar, reduzindo a excreção urinária de N, pode contribuir na redução das emissões de N_2O . No segundo experimento foi observado que a suplementação energética é uma ferramenta para melhoria do status nutricional e do desempenho de vacas leiteiras no terço médio de lactação em pastos anuais de inverno. O extrato tanífero contribuiu para a melhoria do balanço energético, mas não apresentou efeito sobre

o desempenho produtivo. No terceiro experimento a inclusão de extrato tanífero no suplemento de vacas leiteiras em pastagem de verão resultou em importante redução na emissão de metano entérico, sem afetar o desempenho produtivo. Em ambos os ensaios de desempenho animal, não é possível afirmar que a inclusão dietética de extrato tanífero para vacas leiteiras no terço médio de lactação resulte em melhora significativa da eficiência de utilização do nitrogênio alimentar.

Palavras-chave: Aditivos alimentares, perfil nutricional, produção de leite, taninos condensados, vaca leiteira

ABSTRACT

ALVES, Tiago Pansard. **Greenhouse gas emissions and *Acacia mearnsii* tannin extract use to dairy cows grazing temperate and tropical pastures**. 2016. 80p. Tese (Doutorado em Ciência Animal – Área: Produção Animal). Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós graduação em Ciência Animal, Lages, 2016.

To quantify the emissions of nitrous oxide (N_2O) resulting from the faeces and urine of dairy cows grazing temperate grasslands and investigate alternatives to promote the efficient use of feed nitrogen and reduce emissions of methane as well without reducing the animal performance, three experiments were conducted. The first experiment aimed quantify the potential of soil (N_2O) emissions as a function of nitrogen excretions from the faeces and urine of grazing dairy cows. In the second and third experiments the effect of concentrate supplementation with or without *Acacia mearnsii* tannin extract was evaluated as an alternative to promote the efficient use of feed nitrogen in dairy cows grazing temperate or tropical pastures and reduce methane emissions in tropical pastures. The results of the first experiment showed that soil N_2O flux emission was affected by urinary excretion of dairy cows, but does not by faecal excretion.. In the second experiment was observed that energetic supplementation is a tool to improve nutritional status and animal performance of dairy cows from mid to late lactation grazing annual temperate pastures, whereas tannin extract improve the energetic balance. In the third experiment, the inclusion of tannin extract in the supplement of dairy cows reduced enteric methane emissions without decreasing the animal performance. In the last two experiments, the tannin extract supplementation did not improve the

efficiency of using the feed nitrogen to dairy cows at mid-lactation.

Key-words: Feed additives, milk production, dairy cow, nutritional profile, condensed tannins

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Esquema da disposição das câmaras estáticas, seus respectivos tratamentos e sensores de umidade e temperatura do solo.....	36
Figura 2	Fotos do modelo de câmara estática utilizada. Câmara estática fechada (A); Câmara estática sem a cobertura (B).....	37
Figura 3	Temperatura e precipitação durante o período experimental.....	39
Figura 4	Temperatura e umidade em volume relativo de água (VW) do solo durante o período experimental.....	39
Figura 5	Variação diária do fluxo de emissão de N ₂ O nos distintos tratamentos.....	42

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Caraterísticas pré-pastejo de pastos mistos de aveia (*Avena sativa*) e azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.) pastejados por vacas leiteiras não suplementada (SS) ou suplementadas com grão milho moído sem a adição de extrato tanífero de *Acacia mearnssi* (GM) ou com a adição de 80 g do extrato (ET).....54
- Tabela 2** Manejo adotado e características pós-pastejo em pastos mistos de aveia (*Avena sativa*) e azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.) pastejados por vacas leiteiras não suplementadas (SS) ou suplementadas com grão milho moído sem a adição de extrato tanífero de *Acacia mearnssi* (GM) ou com a adição de 80 g do extrato (ET).....55
- Tabela 3** Consumo, desempenho produtivo e balanço energético de vacas leiteiras em pastos mistos de aveia (*Avena sativa*) e azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.) sem suplementação (SS) ou suplementadas com grão milho moído sem a adição de extrato tanífero de *Acacia mearnssi* (GM) ou com a adição de 80 g do extrato tanífero (ET).....56
- Tabela 4** Composição química do suplemento ofertado.....70
- Tabela 5** Caraterísticas pré-pastejo e pós-pastejo de pastos de milheto (*Pennisetum glaucum* L) pastejados por vacas leiteiras suplementadas com 6 kg de concentrado (milho moído 750g kg⁻¹ e farelo de soja 250g kg⁻¹) com (T) ou sem (ST) a adição de 20g kg⁻¹ de extrato tanífero de *Acacia mearnsii*.....71

Tabela 6	Consumo, desempenho produtivo e emissão entérica de CH ₄ de vacas leiteiras em pastos de milheto (<i>Pennisetum glaucum</i> L) suplementadas com 6 kg de concentrado (milho moído 750g kg ⁻¹ e farelo de soja 250g kg ⁻¹) com (T) ou sem (ST) a adição de 20g kg ⁻¹ de extrato tanífero de <i>Acacia mearnsii</i>	72
-----------------	---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 EMISSÃO DE GASES DE EFEITO ESTUFA NA PECUÁRIA LEITEIRA.....	21
2.1.1 Produção entérica de metano.....	21
2.1.2 Emissão de óxido nitroso por vacas leiteiras em pastagens.....	23
2.2 EFEITO DOS TANINOS NA ALIMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS.....	24
2.2.1 Taninos	24
2.2.2 Potencial uso dos taninos na mitigação da emissão de metano.....	26
2.2.3 Potencial uso dos taninos na mitigação de N ₂ O e promoção da eficiência da utilização do N	27
2.3 REFERÊNCIAS	28
3 HIPÓTESES.....	32
4 ARTIGO I.....	33
4.1 IMPACTO DOS DEJETOS DE VACAS LEITEIRAS EM PASTO DE CLIMA TEMPERADO SOBRE A EMISSÃO DE ÓXIDO NITROSO	33
4.2 INTRODUÇÃO.....	33
4.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.3.1 Local, período experimental, tratamentos e medidas	34
4.3.2 Coleta de urina e fezes.....	38

4.3.3 Característica do solo e pastagem	38
4.3.4 Análise estatística.....	40
4.4 RESULTADOS	40
4.4.1 Fluxo de emissão N-N ₂ O do solo.....	40
4.5 DISCUSSÃO.....	41
4.6 CONCLUSÃO	43
4.7 REFERÊNCIAS	44
5 ARTIGO II.....	46
5.1 SUPLEMENTAÇÃO ENERGÉTICA E COM EXTRATO TANÍFERO PARA VACAS LEITEIRAS EM PASTOS ANUAIS DE INVERNO.....	46
5.2 INTRODUÇÃO	46
5.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	48
5.3.1 Tratamentos e delineamento experimental	48
5.3.2 Local, animais e área experimental.....	48
5.3.3 Medidas nos animais.....	49
5.3.4 Medidas na pastagem e suplementos	49
5.3.5 Análises laboratoriais e valor nutritivo	50
5.3.6 Análise estatística.....	51
5.4 RESULTADOS E DICUSSÃO.....	52
5.4.1 Caraterísticas da forragem e manejo do pasto	52
5.4.2 Efeito da suplementação sobre o consumo	53
5.4.3 Efeito da suplementação sobre o desempenho animal e o balanço energético	57
5.5 CONCLUSÃO	59

5.6 REFERÊNCIAS	60
6 ARTIGO III	64
6.1EXTRATO TANÍFERO COMO MITIGADOR DA EMIÇÃO DE METANO PARA VACAS LEITEIRAS EM PASTO TROPICAL	64
6.2 INTRODUÇÃO.....	64
6.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	65
6.3.1 Tratamentos e delineamento experimental	65
6.3.2 Local, animais e área experimental	66
6.3.3 Medidas nos animais	66
6.3.4 Medidas no pasto e suplementos	68
6.3.5 Análises laboratoriais	69
6.3.6 Análise estatística	69
6.4 RESULTADOS	70
6.5 DISCUSSÃO	73
6.5.1 Manejo e qualidade da pastagem.....	73
6.5.2 Consumo e desempenho produtivo	73
6.5.3 Efeito do tanino sobre a emissão de metano	74
6.6 CONCLUSÃO	75
6.7 REFERÊNCIAS	76
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
7.1REFERÊNCIAS	80

1 INTRODUÇÃO

Com o objetivo de atender as metas de redução nas emissões de gases de efeito estufa (GEE) e evitar o aquecimento da temperatura média global em 2°C acima do nível pré industrial, meta proposta pelo acordo da 21ª Conferência das Partes (COP21) do Quadro das Nações Unidas sobre Mudança do Clima (UNFCC), o Brasil comprometeu-se, segundo sua pretendida contribuição nacionalmente determinada (iNDC), em reduzir as emissões de GEE em 37% abaixo dos níveis de 2005 em 2025, e de 43% em 2030 (BRASIL, 2015).

Segundo o Ministério da Ciência e Tecnologia e Inovação (MCTI, 2014) as emissões totais de GEE em dióxido de carbono equivalente (COeq) do Brasil apresentaram uma variação negativa de 41,1% entre o ano 2005 e 2012. Portanto, atualmente o Brasil já atende a meta à que se comprometeu. No entanto, a redução das emissões ocorreram apenas devido a queda nos índices de emissões provocadas pelo desmatamento florestal (-85,1%), uma vez que neste mesmo período as emissões do setor agropecuário aumentaram em 7,4%. Juntamente com o setor energético, com 37% das emissões, o setor agropecuário tornou-se o setor com maior impacto sobre as emissões totais do Brasil (MCTI, 2014). Portanto, para que o Brasil continue a atender a meta estipulada para 2025 é necessário que tenhamos atenção às emissões do setor agropecuário, o qual tende a manter sua curva de crescimento de emissões devido a pressão por maior produção de alimento a fim de atender o crescimento populacional global.

Ainda segundo o MCTI, as emissões de metano (CH₄) oriundas da atividade leiteira representam 15% do total de CH₄ emitido pelo setor agropecuário, sendo superado apenas pela bovinocultura de corte. Além das emissões de CH₄, a bovinocultura contribui com as emissões de óxido nitroso (N₂O), principalmente pelo uso de fertilização sintética em pastagens e do efeito do nitrogênio (N) presente nos dejetos dos

animais em pastejo sobre as emissões do solo (CLARK; PINARES-PATINO; DEKLEIN, 2005; LESSCHEN et al., 2011; OENEMA et al., 1997).

As excreções de N nas fezes e na urina, bem como a produção de CH₄ entérico por animal variam com o regime alimentar e dependem da manipulação das fontes dietéticas de N e carbono (DIJKSTRA; OENEMA; BANNINK, 2011). As bactérias responsáveis pela metanogênese no rúmen necessitam do hidrogênio (H₂) liberado no processo de fermentação ruminal de carboidratos e formação dos ácidos graxos voláteis (AGVs). Portanto dietas formuladas com o objetivo de reduzir as emissões de metano entérico tendem a reduzir a extensão da fermentação ruminal e (ou) reduzir a relação de produção de acetato:propionato, uma vez que a produção de acetato resulta em liberação de H₂ ao meio ruminal em quanto que a produção de propionato utilizasse do H₂ presente no meio (BOADI et al., 2004).

A excreção de N, por sua vez, está inversamente relacionada à eficiência da utilização da proteína alimentar, e diretamente relacionada ao consumo de proteína bruta. Como fontes das perdas de N pode-se citar o consumo de proteína degradável no rúmen que excede a demanda microbiana e o desequilíbrio entre o aporte de proteína e carboidratos no rúmen (REYNAL; BRODERICK, 2005; TAMMINGA, 1996). Dessa forma, uma alternativa para reduzir a excreção de N seria fornecer dietas com menor concentração de N (TAMMINGA, 1992), aumentando o teor de carboidratos na dieta. Porém se temos como objetivo reduzir as emissões de GEE, o maior consumo de carboidratos resultaria em maior produção CH₄ (DIJKSTRA; OENEMA; BANNINK, 2011). De outra forma, a utilização de forragens com presença de compostos secundários, como os taninos (MIN et al., 2003), tem se mostrado uma alternativa viável para reduzir a degradabilidade ruminal do N e melhorar sua eficiência de utilização, além de apresentarem potencial de reduzir as emissões de CH₄ (CARULLA et al.,

2005; GRAINGER et al., 2009; SZCZECOWIAK et al., 2016).

Os taninos são polifenóis com capacidade de formar complexos principalmente com proteínas, reduzindo sua degradação no rúmen (PATRA; SAXENA, 2011). Por esta razão tem sido estudados como aditivo alimentar visando o aumento do fluxo intestinal de proteína metabolizável. Em trabalho publicado recentemente com novilhos da raça Holandês recebendo dieta composta de silagem de milho (70 %) e um concentrado proteico (30 %), Ávila *et al.* (2015) observaram que a inclusão de 15 g de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* por kg de matéria seca (MS) da dieta aumentou o fluxo duodenal de N não amoniacal sem afetar o fluxo duodenal de proteína microbiana, além de reduzir a excreção urinária de nitrogênio.

Esta tese tem como objetivos quantificar as emissões de N₂O advindas das fezes e urina de vacas em pastos de clima temperado e investigar alternativas para promover a eficiência da utilização do N alimentar, bem como reduzir as emissões de N₂O e CH₄, sem prejuízo ao potencial produtivo de vacas leiteiras. Primeiramente será apresentado um trabalho com o objetivo de quantificar o potencial das emissões de N₂O do solo em função das emissões nitrogenadas advindas das fezes e urina de vacas leiteiras em pastejo. Na sequência, foi testado o efeito da inclusão de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* na alimentação de vacas leiteiras sobre o desempenho produtivo em distintos períodos de pastejo (inverno e verão) e sobre emissão de metano durante o período de pastejo estival.

REFERÊNCIAS

ÁVILA, S. C. et al. Impact of a tannin extract on digestibility, ruminal fermentation and duodenal flow of amino acids in steers fed maize silage and concentrate containing soybean meal or canola meal as protein source. **The Journal of Agricultural Science**, v. 153, n. 05, p. 943–953, 2015.

BRASIL. Pretendida Contribuição Nacionalmente Determinada para consecução do objetivo da Convenção - Quadro das nações unidas sobre mudança do clima, 2015. Disponível em: <http://www.itamaraty.gov.br/images/ed_desenvsust/BRASIL-iNDC-portugues.pdf>

BOADI, D. et al. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: Update review. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 84, n. 3, p. 319–335, set. 2004.

CARULLA, J. E. et al. Supplementation of Acacia mearnsii tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 56, n. 9, p. 961–970, 2005.

CLARK, H.; PINARES-PATINO, C.; DEKLEIN, C. Methane and nitrous oxide emissions from grazed grasslands. **Grassland: A Global Resource**, n. May, p. 279–293, 2005.

DIJKSTRA, J.; OENEMA, O.; BANNINK, A. **Dietary strategies to reducing N excretion from cattle: Implications for methane emissions**. Current Opinion in Environmental Sustainability Elsevier B.V., , out. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cosust.2011.07.008>>

GRAINGER, C. et al. Potential use of Acacia mearnsii condensed tannins to reduce methane emissions and nitrogen excretion from grazing dairy cows. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 84, n. 2, p. 241–251, 2009.

LESSCHEN, J. P. et al. Greenhouse gas emission profiles of European livestock sectors. **Animal Feed Science and Technology**, v. 166-167, p. 16–28, jun. 2011.

MAKKAR, H. P. . Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. **Small Ruminant Research**, v. 49, n. 3, p. 241–256, set. 2003.

MCTI. **Estimativas anuais de emissões de gases de efeito estufa no Brasil**. 2. ed. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, 2014.

MIN, B. . et al. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 106, n. 1-4, p. 3–19, abr. 2003.

OENEMA, O. et al. Nitrous oxide emissions from grazed grassland. **Soil Use and Management**, v. 13, n. s4, p. 288–295, dez. 1997.

PATRA, A. K.; SAXENA, J. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 91, n. 1, p. 24–37, 2011.

REYNAL, S. M.; BRODERICK, G. A. Effect of dietary level of rumen-degraded protein on production and nitrogen metabolism in lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 88, n. 11, p. 4045–64, nov. 2005.

SZCZECOWIAK, J. et al. Rumen fermentation, methane concentration and fatty acid proportion in the rumen and milk of dairy cows fed condensed tannin and/or fish-soybean oils blend. **Animal Feed Science and Technology**, v. 216, p. 93–107, jun. 2016.

TAMMINGA, S. Nutrition Management of Dairy Cows as a

Contribution to Pollution Control. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 1, p. 345–357, 1992.

TAMMINGA, S. A review on environmental impacts of nutritional strategies in ruminants. **J. Anim Sci.**, v. 74, n. 12, p. 3112–3124, 1996.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 EMISSÃO DE GASES DE EFEITO ESTUFA NA PECUÁRIA LEITEIRA

2.1.1 Produção entérica de metano

Metano (CH_4) é um importante gás do efeito estufa (GEE), juntamente com o dióxido de carbono (CO_2) e o óxido nitroso (N_2O) formam os principais gases responsáveis pelo aumento anômalo da temperatura na superfície da terra. Apesar de estar presente na atmosfera em concentrações muito mais baixas do que o CO_2 , estima-se que o CH_4 é responsável por aproximadamente 16% do efeito de estufa (IPCC, 2014), considerando que seu potencial de aquecimento (GWP, sigla em inglês) é 21 vezes superior ao CO_2 (IPCC, 1995).

O setor agropecuário juntamente com as florestas e o uso da terra representam entre 20 a 25% das emissões globais de GEE, dos quais 32 a 40% tem origem na fermentação entérica de ruminantes (IPCC, 2014). No Brasil, segundo os dados de estimativa de emissão de GEE do MCTI, (2014) aproximadamente 20% da emissão total GEE origina-se da fermentação entérica de bovinos.

O CH_4 é um subproduto natural da fermentação microbiana dos carboidratos e em menor extensão dos aminoácidos no rúmen, produzido por procariontes estritamente especializados do domínio Archaea (HRISTOV et al., 2013). Cinco espécies ruminais foram isoladas: *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina mazei*, *Methanobacterium formicicum* e *Methanomicrobium mobile* (BOADI et al., 2004).

A produção de CH_4 é essencial para a manutenção da atividade anaeróbica fermentativa no rúmen. A digestão bacteriana dos carboidratos necessitam de coenzimas

transportadoras de elétron como a Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD/NADH), estas coenzimas estão em um número limitado na célula bacteriana, portanto se todos os NADs estiverem na forma reduzida (NADH) os processos de digestão que necessitariam de NAD seriam interrompidos (BODAS et al., 2012). As Archaeas metanógenas não permitem que o H_2 acumulem no meio ruminal, facilitando que o NADH seja reoxidado e possa ser utilizado novamente na digestão celular.

Os carboidratos são fermentados pelas bactérias ruminais a ácidos graxos voláteis (AGV). Os monossacarídeos são metabolizados principalmente pela rota glicolítica de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). Neste processo são formados 2 NADH e dois piruvatos, os piruvatos podem ser oxidados para produtos mais oxidados (acetato e butirato) ou mais reduzidos (lactato e propionato) resultando em maior ou menor liberação de H para o meio ruminal (KOZLOSKI, 2011). A formação de acetato como produto final da fermentação da glicose pode gerar 4 moles de H , enquanto que a produção de propionato consome 2 mols de H (KOZLOSKI, 2011). O principal meio de eliminação de H_2 liberado pela fermentação ruminal é a formação de CH_4 (MOSS; JOUANY; NEWBOLD, 2000). Consequentemente a produção de acetato e butirato resulta em produção de CH_4 enquanto a formação de propionato compete para o uso de H_2 no rúmen (BOADI et al., 2004).

Segundo Knapp *et al.*, (2014) podemos dividir os meios de mitigação da emissão de CH_4 por ruminantes resumidamente em três categorias:

1. Alimentos, manejo alimentar e nutrição: Alimentos de boa qualidade podem aumentar a produtividade e eficiência alimentar, e certos alimentos podem aumentar a produção de propionato ou reduzir a produção de acetato, diminuindo o H_2 que poderia ser convertido a CH_4 .

2. Modificadores ruminais: Substâncias específicas (exemplo: ionóforos) que podem direta ou indiretamente inibir a metanogênese.
3. Aumento da produção animal através da genética e outras abordagens: Aumentando a utilização de nutrientes para propósitos produtivos, incrementando a eficiência alimentar e diminuindo a emissão de CH_4 por unidade de produto (carne ou leite).

2.1.2 Emissão de óxido nitroso por vacas leiteiras em pastagens

O óxido nitroso (N_2O) é a segunda maior fonte de GEE do setor agropecuário com um GWP 310 vezes superior ao CO_2 (IPCC, 1995). Representa 38% da emissões em CO_2 equivalente, dos quais 41% são originados de animais em pasto (fezes e urina excretadas) (MCTI, 2014). A produção de N_2O no solo é um processo predominantemente biológico e ocorre através da nitrificação (oxidação da amônia) e desnitrificação (BAGGS, 2008). As fezes e urina de animais em pastejo são fontes de N que podem ser hidrolisadas para amônio, tornando-se passível aos processos de nitrificação e desnitrificação.

O impacto da produção leiteira sobre as emissões de N_2O são mais evidentes se considerarmos a baixa eficiência da utilização do N alimentar por ruminantes (em torno de 25%) (CALSAMIGLIA et al., 2010). Segundo Oenema et al., (1997), devido a concentração de N nas excretas de ruminantes e a pequena área em que são naturalmente depositadas, taxas equivalentes de até 800 e 2000 kg N ha^{-1} à cada excreção urinaria e fecal são respectivamente aplicadas ao solo a cada excreção fornecendo grande quantidade de substrato para a formação de N_2O no solo.

Medidas que visem a melhoria da eficiência da utilização do N alimentar poderiam reduzir o aporte de substrato para a produção de N_2O no solo. As principais estratégias

dietéticas para mitigar as emissões de N_2O incluem a redução na concentração de N na dieta, ou incremento no teor energético da mesma (DIJKSTRA et al., 2013). Com alternativa a estas medidas pode-se incluir a substituição de parte da proteína alimentar degradável no rumen por proteína não degradável no rumen (PNDR) reduzindo as perdas ruminais de N e aumento o aporte de proteína metabolizável.

Além de medidas dietéticas para a redução das emissões N_2O pela diminuição do aporte de N no solo, estudos com o uso de inibidores de nitrificação mostraram-se efetivos na redução das emissões de N_2O , além de promover a melhor utilização do N no solo. Os inibidores de nitrificação agem retardando temporariamente a oxidação bacteriana do amônio à nitrito pela inibição da atividade de enzimas de *Nitrosomonas* spp. no solo (Zerulla et al., 2001).

2.2 EFEITO DOS TANINOS NA ALIMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS

2.2.1 Taninos

Os taninos são um grupo muito complexo de metabólitos secundários de plantas, com variado peso molecular, que são solúveis em solução polar e se distinguem de outros compostos polifenólicos pela sua habilidade de precipitar proteínas (SILANIKOVE; PEREVOLOTSKY; PROVENZA, 2001). O fato de serem metabólitos secundários significa que não estão envolvidos em processos essenciais das plantas, como a fotossíntese, respiração e transpiração. Acredita-se que nas plantas estas moléculas estariam relacionadas a defesa contra o consumo por insetos e outros animais herbívoros. Seus múltiplos grupos hidroxila permitem a formação de complexos principalmente com proteínas, mas também em menor grau

com íons metálicos, aminoácidos e polissacarídeos (MAKKAR, 2003).

Os taninos podem ser classificados em dois grupos: os taninos condensados (polímeros de flavonóides) e os taninos hidrolisáveis, que são ésteres complexos com um poliálcool como estrutura central, com dois ou mais grupos hidroxilas esterificados com ácidos gálicos e (ou) ácidos elágicos (MCSWEENEY et al, 2001). Os dois grupos são bastante abundantes no reino vegetal, representando o segundo maior grupo de compostos fenólicos nas plantas, superado apenas pela lignina (MCSWEENEY et al, 2001). Os taninos condensados podem ser encontrados tanto em gimnospermas quanto em angiospermas. Porém, os taninos hidrolisáveis são encontrados apenas em espécies dicotiledôneas, mas ambos podem estar presentes na mesma planta (SILANIKOVE; PEREVOLOTSKY; PROVENZA, 2001). Os grupos de taninos se diferenciam por sua estrutura. Os taninos hidrolisáveis são poliésteres de ácidos fenólicos (por exemplo: ácido gálico e ácido elágico) e apresentam em sua estrutura central uma molécula de açúcar, caracterizando-se por ser passível de hidrólise em ambiente ruminal (MIN et al., 2003). Os taninos condensados são o tipo mais comum de tanino. Ao contrário dos taninos hidrolisáveis os taninos condensados não são passíveis de hidrólise em ambiente ruminal, e são definidos como polímeros de molécula de flavan-3-ols (flavanois), unidas através de ligações de carbono (MUELLER-HARVEY; MCALLAN, 1992). O grupo flavanol é a unidade básica dos taninos condensados, apresentando monômeros conhecidos como catequinas. Os flavanois apresentam três radicais ou grupos substitutos. Estes grupos podem ser H ou OH e estão diretamente relacionados com a atividade da molécula e com a capacidade de formar ligação com outras moléculas (SHOEFIELD et al., 2001). Como característica geral da estrutura de ambos os grupos de taninos, pode-se citar o fato de possuírem um grande número de grupos hidroxilas livres, o que

lhes permite formar fortes pontes de hidrogênio com diferentes moléculas.

A capacidade de ligação dos taninos é variável e dependente de sua natureza (tamanho de molécula, mobilidade e solubilidade), das características químicas dos substratos a serem precipitados. A força dos complexos formados entre proteína e taninos depende de características de ambos, como, peso molecular, estrutura terciária e compatibilidade de sítios de ligação (SILANIKOVE; PEREVOLOTSKY; PROVENZA, 2001). As principais formas de ligação presentes nestes complexos são as ligações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio, ligações iônicas e ligações covalentes (CANNAS 1999).

2.2.2 Potencial uso dos taninos na mitigação da emissão de metano

Em um trabalho meta-análise Jayanegara; Leiber e Kreuzer, (2012) observaram que o aumento da concentração de tanino na dieta reduz a emissão de metano tanto por unidade de peso metabólico ($p < 0,05$, $R^2 = 0.36$), quanto por unidade de matéria seca consumida ($p < 0,01$, $R^2 = 0.47$). A extensão da degradação ruminal e o perfil de ácidos graxos voláteis (AGVs) produzidos no rúmen têm importante impacto sobre a produção entérica de CH_4 (BOADI et al., 2004). Diversos trabalhos demonstraram que a inclusão de tanino pode reduzir a degradação da MO no rúmen (ÁVILA et al., 2015; ORLANDI et al., 2015), o que reduziria o aporte de H para a produção de CH_4 . Alguns trabalhos também sugerem que os taninos podem alterar o perfil de AGV reduzindo a relação entre acetato e propionato sem, diminuir significativamente a produção total de AGVs (CARULLA et al., 2005; SZCZECHOWIAK et al., 2016). Além disso, é considerada a possibilidade dos taninos atuarem na redução da população de *Archaea* metanógenas no

rúmen, mas seu efeito depende do tipo de tanino e da dose consumida (PATRA; SAXENA, 2010)

2.2.3 Potencial uso dos taninos na mitigação de N_2O e promoção da eficiência da utilização do N

As medidas nutricionais que visam a melhoria da eficiência da utilização do N e consequentemente diminuir o potencial de emissão de N_2O geralmente estão associadas a substituição do consumo de forragens ricas em proteína degradável no rúmen (PDR) por suplementos com teor mais elevados em carboidratos. Porém o maior aporte de carboidratos poderá promover a produção de CH_4 devido a maior quantidade de H liberando em sua fermentação.

A inclusão de taninos na dieta pode vir a ser uma alternativa a simples substituição da forragem altamente proteica por uma suplementação energética uma vez que além de reduzir as emissões entéricas de CH_4 , afetam a degradação ruminal da proteína, aumentando o teor de proteína não degradável no rúmen (PNDR) e diminuindo a perda ruminal de N, promovendo maior aporte de aminoácidos ao intestino delgado (ORLANDI et al., 2015), alterando também o local de excreção do N, que com a redução das perdas ruminais de N passam a se concentrar nas fezes em detrimento da urina, como observado por Griffiths et al., (2013). Nas fezes o N geralmente se encontra na forma orgânica (OENEMA et al., 1997), o que torna mais lenta a liberação de amônio no solo, diminuindo o substrato para o processo nitrificação e formação de N_2O .

2.3 REFERÊNCIAS

ÁVILA, S. C. et al. Impact of a tannin extract on digestibility, ruminal fermentation and duodenal flow of amino acids in steers fed maize silage and concentrate containing soybean meal or canola meal as protein source. **The Journal of Agricultural Science**, v. 153, n. 05, p. 943–953, 2015.

BAGGS, E. M. A review of stable isotope techniques for N₂O source partitioning in soils: recent progress, remaining challenges and future considerations. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, n. 11, p. 1664–1672, 15 jun. 2008.

BOADI, D. et al. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: Update review. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 84, n. 3, p. 319–335, set. 2004.

BODAS, R. et al. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, n. 1-4, p. 78–93, 2012.

CALSAMIGLIA, S. et al. Strategies for optimizing nitrogen use by ruminants. **Animal**, v. 4, n. 7, p. 1184–1196, 2010.

CANNAS, A. **Tannins: fascinating but sometimes dangerous molecules**. Itaka, 1999. Disponível em:

<<http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/tannin.html>>

CARULLA, J. E. et al. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 56, n. 9, p. 961–970, 2005.

DIJKSTRA, J. et al. Diet effects on urine composition of cattle and N₂O emissions. **Animal**, v. 7, n. s2, p. 292–302, 2013.

GRIFFITHS, W. M. et al. Supplementing lactating dairy cows fed high-quality pasture with black wattle (*Acacia mearnsii*) tannin. **animal**, v. 7, n. 11, p. 1789–1795, 30 nov. 2013.

HRISTOV, A. N. et al. Special topics--Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. **Journal of animal science**, v. 91, n. 11, p. 5045–69, nov. 2013.

IPCC. Segundo Relatório de Avaliação, 1995. Disponível em: <www.ipcc.ch/pdf/climate-changes-1995/ipcc-2nd-assessment/2nd-assessment-en.pdf>

IPCC. Fifth Assessment Report, 2014. Disponível em: <<http://www.ipcc.ch/report/ar5/>>

JAYANEGARA, A.; LEIBER, F.; KREUZER, M. Meta-analysis of the relationship between dietary tannin level and methane formation in ruminants from in vivo and in vitro experiments. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 96, n. 3, p. 365–75, jun. 2012.

KNAPP, J. R. et al. Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 6, p. 3231–61, 2014.

KOZLOSKI, Gilberto Vilmar. **Bioquímica dos Ruminantes**. 3 ed. rev. ampl. Santa Maria. Ed. da UFSM, 2011. 216p

MAKKAR, H. P. . Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. **Small Ruminant Research**, v. 49, n. 3, p. 241–256, set. 2003.

MCTI. **Estimativas anuais de emissões de gases de efeito estufa no Brasil**. 2. ed. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, 2014.

MIN, B. . et al. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 106, n. 1-4, p. 3–19, abr. 2003.

MOSS, A. R.; JOUANY, J. P.; NEWBOLD, J. Review article Methane production by ruminants: its contribution to global warming. **Annales de Zootechnie**, v. 49, n. 3, p. 231–253, 2000.

MUELLER-HARVEY, I., MCALLAN, A.B., Tannins. Their biochemistry and nutritional properties. In Morrison, I.M. (Ed.) , *Advances in Plant Cell Biochemistry and Bionotechnology*. **JAI Press, London**, p151-217, 1992

OENEMA, O. et al. Nitrous oxide emissions from grazed grassland. **Soil Use and Management**, v. 13, n. s4, p. 288–295, dez. 1997.

ORLANDI, T. et al. Digestibility, ruminal fermentation and duodenal flux of amino acids in steers fed grass forage plus concentrate containing increasing levels of *Acacia mearnsii* tannin extract. **Animal Feed Science and Technology**, v. 210, p. 37–45, 2015.

PATRA, A. K.; SAXENA, J. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. **Phytochemistry**, v. 71, n. 11-12, p. 1198–1222, 2010.

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

SILANIKOVE, N.; PEREVOLOTSKY, A; PROVENZA, F. . Use of tannin-binding chemicals to assay for tannins and their negative postingestive effects in ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, n. 1-2, p. 69–81, maio 2001.

SZCZECOWIAK, J. et al. Rumen fermentation, methane concentration and fatty acid proportion in the rumen and milk of dairy cows fed condensed tannin and/or fish-soybean oils blend. **Animal Feed Science and Technology**, v. 216, p. 93–107, jun. 2016.

ZERULLA, W. et al. 3,4-Dimethylpyrazole phosphate (DMPP)

- A new nitrification inhibitor for agriculture and horticulture. An introduction. **Biology and Fertility of Soils**, v. 34, n. 2, p. 79–84, 2001.

3 HIPÓTESES

O N presente nas fezes de vacas leiteiras não afetam as emissões de N_2O do solo e o uso do inibidor de nitrificação DMPP reduzem significativamente as emissões de N_2O promovidas pela excreção urinária de N.

A inclusão de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* na dieta combinada a suplementação, melhora a eficiência do uso do nitrogênio alimentar, diminuindo o potencial de emissão de N_2O .

A inclusão do extrato tanífero de *Acacia mearnsii* na suplementação concentrada de vacas leiteiras reduz a emissão entérica de metano sem prejuízo ao desempenho produtivo.

4 ARTIGO I

4.1 IMPACTO DOS DEJETOS DE VACAS LEITEIRAS EM PASTO DE CLIMA TEMPERADO SOBRE A EMISSÃO DE ÓXIDO NITROSO

4.2 INTRODUÇÃO

A produção animal tem importante impacto sobre o aquecimento global anômalo, sendo que aproximadamente 18% das emissões antropogênicas de GEE no mundo são originadas deste setor (FAO, 2006). Dentre os principais GEE emitidos pela produção leiteira estão o CH_4 , produzido pela fermentação entérica, e o óxido nitroso, liberado pelos solos agrícolas (LESSCHEN et al., 2011).

A elevação da concentração de N_2O na atmosfera é diretamente associada à intensificação da produção agrícola para atender o crescimento da demanda por alimentos provocado pelo aumento populacional (IPCC, 2013). Espera-se um aumento na produção leiteira e de carne em 1,5 vezes até 2050 (FAO, 2011), o que resultará, provavelmente, em maiores emissões deste setor no futuro.

A principal fonte de emissão de N_2O pela produção leiteira origina-se do N excretado na urina e nas fezes. O N_2O é um produto intermediário da nitrificação e desnitrificação no solo, portanto as áreas de dejeção das vacas fornecem grande concentração de N em uma área reduzida o que propicia a maior oferta de substratos para os processos que acabam por emitir significantes volumes de N_2O (OENEMA et al., 1997). Além da concentração do N presente no solo, a forma em que o N é excretado pelo animal (fezes ou urina) tem grande relevância sobre o potencial de emissão deste dejetos. Outros fatores, como,

umidade e temperatura do solo também afetam estas emissões (BAGGS, 2008).

Uma provável alternativa para reduzir o potencial impacto da urina e das fezes de vacas leiteiras na emissão de N_2O do solo, é o uso de inibidores de nitrificação. Estas moléculas agem inibindo a síntese de enzimas bacterianas responsáveis pelo primeiro estágio da nitrificação, a oxidação do amônio (NH_4^+) para nitrito (NO_2^-) (GILSANZ et al., 2016; SUBBARAO et al., 2006). Segundo Gilsanz et al., (2016) o inibidor de nitrificação fosfato de 3,4-dimetilpirazol (DMPP), apresenta em média uma capacidade de reduzir em 40% as emissões de N_2O do solo. Mas assim como as emissões de N_2O do solo, a efetividade do DMPP também podem ser afetada pela temperatura e umidade no solo (MENÉNDEZ et al., 2012). O objetivo deste trabalho foi de medir o impacto do tipo de excreta de vacas leiteiras sobre o fluxo de emissão de N_2O em pastagem de clima temperado, bem como testar o efeito da adição do inibidor de nitrificação DMPP como agente mitigador deste impacto.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Local, período experimental, tratamentos e medidas

Para medir as emissões de N_2O das excretas e testar a capacidade de mitigação do inibidor de nitrificação DMPP, nas emissões provocadas pela presença da urina no solo, um experimento foi conduzido na fazenda experimental de Méjusseume, próximo a Rennes (INRA, Le Rheu, France - 48°07'N; 1°47'L, 60 m de altitude), durante o outono europeu (27 de outubro a 12 de Dezembro, 2014). Dezesseis câmaras estáticas com 0,25 m² de área, foram instaladas em uma área de 144 m² localizada à 250 metros de distância das edificações da fazenda. As câmaras foram divididas em 4 grupos, cada grupo com quatro tratamentos, totalizando 4 réplicas por tratamento.

Os tratamentos testados foram: controle - pasto sem adição de excreta (C); pasto com aplicação de 1,5 kg de fezes (F); pasto com aplicação de 3 L de urina (U); Pasto com a aplicação de 3 L de urina misturada a 0,0625 ml do inibidor de nitrificação (I). A urina e as fezes foram aplicadas na superfície da pastagem da parte interna das bases metálicas (Figura 2), simulando as excreções dos animais. A disposição em que as câmaras foram dispostas na pastagens estão descritas na Figura 1.

As coletas de gás foram realizadas em 9 dias de medida, tendo início em 27 de outubro, dois dias antes da aplicação da urina e das fezes. Os demais dias de medida ocorreram em 2, 6, 9, 14, 21, 29, 37, e 44 dias após a aplicação.

O método de estimativa de emissão de gases por câmaras estáticas consiste no uso de caixas fixadas no solo (a uma profundidade média de 10 cm), onde foi medido o acúmulo de gás no interior desta câmara durante 30 minutos. O acúmulo de gás no interior das câmaras foi medido através de 4 coletas em intervalos de 10 minutos entre coletas. A primeira coleta ocorreu no momento de fechamento da câmara (tempo 0), que somente voltava a ser aberta ao final da quarta coleta (tempo 30 minutos). O gás foi coletado em seringas de 35 ml e injetado em frascos previamente evacuados de 12 ml e armazenadas para posterior análise.

As amostras de ar foram analisadas por cromatografia gasosa equipado de detector de ionização de chama e detector de captura de elétrons (Aligent). As taxas de fluxo de N-N₂O foram calculadas por câmara, a partir do aumento linear da concentração de N₂O no interior da câmara ao longo do tempo de amostragem.

A temperatura em graus Celsius (°C) e umidade em razão de volume de água no solo (VW) foram medidas por sensores instalados entre 5 e 10 cm de profundidade e ligadas a um “logger” de dados contínuos (modelo Campbell). Foram utilizados 2 sensores de temperatura e 3 sensores de umidade, os

sensores de umidade foram instalados no solo das câmaras destinadas ao tratamento I.

Figura 1 – Esquema da disposição das câmaras estáticas, seus respectivos tratamentos e sensores de umidade e temperatura do solo.

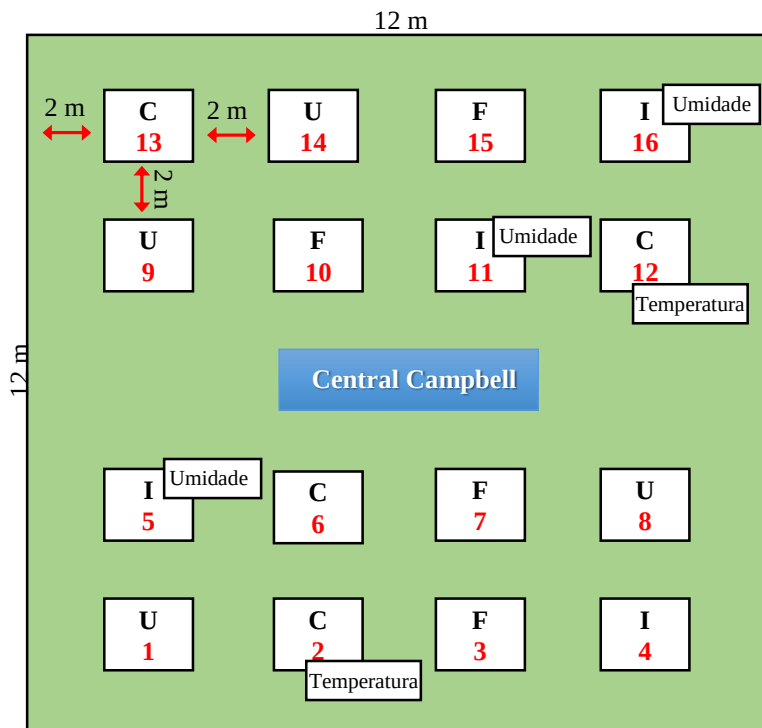


Figura 2 – Fotos do modelo de câmara estática utilizada. Câmara estática fechada (A); Câmara estática sem a cobertura (B).



4.3.2 Coleta de urina e fezes

A de urina e as fezes utilizadas no experimento foram coletadas de excreções espontâneas de vacas da raça Holandês do rebanho da fazenda experimental durante o fornecimento de suplemento, com o uso de recipientes plásticos, na manhã do dia anterior à aplicação dos dejetos no solo das respectivas câmaras. A urina coletada foi estocada em galões plásticos, e as fezes foram acondicionadas em bandejas de alumínio. Ambos os materiais foram então mantidos em ambiente resfriado a 2°C para impedir a atividades hidrolíticas até o momento da aplicação ao solo das respectivas câmaras estáticas. Subamostras da urina e fezes coletadas, foram congeladas para posterior análise das concentrações de N pelo método de Dumas (Association Française de Normalisation, 1997).

4.3.3 Característica do solo e pastagem

A área do experimento se localiza em uma pastagem de azevém perene (*Lolium perenne* L.) implantada em 2009 e atualmente representa um típico pasto temporário multiespecífico do oeste da França. O solo apresenta textura siltosa com 2,5% de matéria orgânica e pH 6,8. A última adubação desta área ocorreu em 29 de agosto de 2014, quando foram utilizadas doses de 94 kg de N por ha.

A temperatura e umidade média do solo durante o período experimental foram de $10,9 \pm 1,7^{\circ}\text{C}$ e $0,51 \pm 0,06$ VW, respectivamente. A temperatura média observada na estação ambiental localizada na fazenda experimental de Méjusseume foi de $9,7 \pm 2,6^{\circ}\text{C}$, e a precipitação total do período foi de 146 mm.

Figura 3 – Temperatura e precipitação durante o período experimental

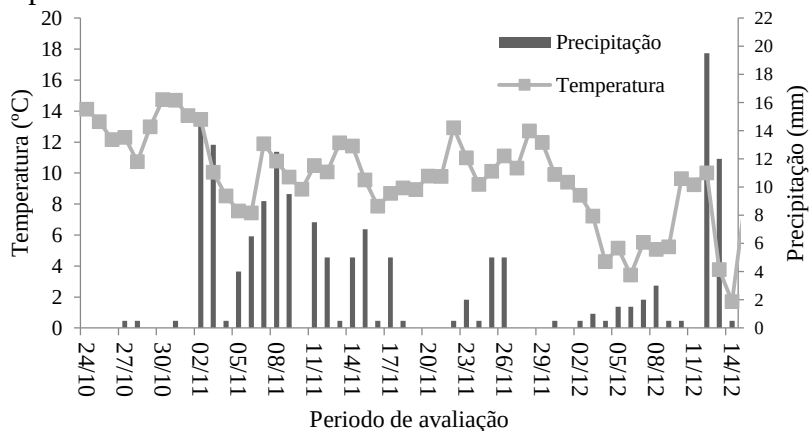
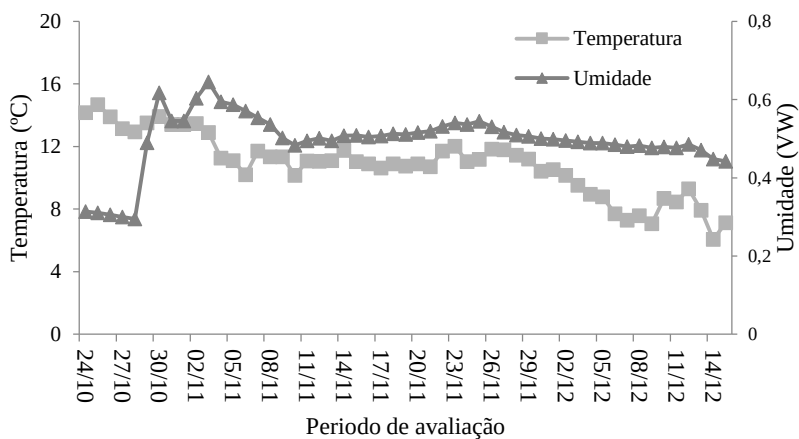


Figura 4 – Temperatura e umidade em volume relativo de água (VW) do solo durante o período experimental.



4.3.4 Análise estatística

O dados de fluxo médio diário foram analisados usando o procedimento MIXED com medidas repetidas (SAS Institute 1999). Os dados de fluxo apresentaram distribuição não normal tendo sido normalizados por meio de transformação utilizando sua raiz cubica e analisados de acordo com o modelo:

$$\gamma_{ijk} = \mu + C_i + T_j + D_k + TD_{jk} + \varepsilon_{ijk}$$

Onde γ_{ij} é o fluxo de N-N₂O em mg m⁻² h⁻¹, μ é a média das observações, C_i é o efeito aleatório da câmara estática, T_j é o efeito fixo dos tratamentos, D_k é o efeito fixo do dia de medida, TD_{jk} o efeito da interação entre os tratamentos e os dias de medida, e ε_{ijk} o erro residual. O teste t de Student foi usado para comparar as médias dos fluxos de N-N₂O dos tratamentos durante o experimento e por dia de medida.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Fluxo de emissão N-N₂O do solo

Considerando as emissões médias durante todo o experimento (Tabela 1), o fluxo de N-N₂O do tratamento controle foi de 16,5 µg m⁻² h⁻¹. A aplicação de 1,5 kg de fezes no solo não aumentou ($P > 0,05$) o fluxo de N-N₂O médio do solo (34,0 µg m⁻² h⁻¹) durante período experimental, quando comparado ao tratamento Controle. No entanto, a aplicação de 3 L de urina resultou em aumento expressivo no fluxo de N-N₂O do solo (622 µg m⁻² h⁻¹) em comparação ao tratamento Controle, considerando o mesmo período. A inclusão de DMPP na urina reduziu em 62% ($P < 0,05$) o fluxo médio de N-N₂O (233 µg m⁻² h⁻¹) durante todo o período experimental quando comparado ao tratamento U. O fluxo de N-N₂O no tratamento U superou o

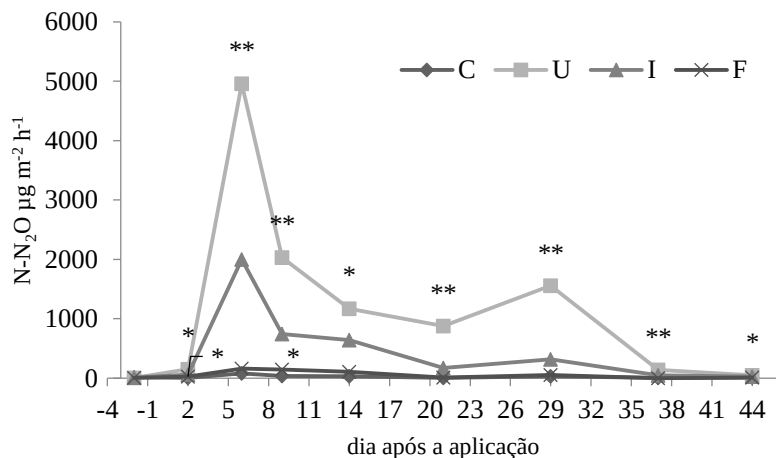
tratamento controle em todos os dias de medida após a aplicação da urina no solo ($P < 0,05$). O tratamento I apresentou fluxo de $N-N_2O$ inferior ao tratamento U em praticamente todos os dias de medida, com exceção das emissões mensuradas 14 e 44 dias após a aplicação da urina no solo. O tratamento F superou ($P < 0,05$) o tratamento controle apenas em dois dias de medida, os quais foram realizados nas duas primeiras semanas após a aplicação das fezes no solo (Figura 5).

4.5 DISCUSSÃO

Devido seu efeito sobre a oxigenação do solo e sobre os processos de nitrificação e desnitrificação no solo diversos estudos apontam a umidade do solo com um dos principais fatores de variação nas emissões de N_2O (CHADWICK et al., 2011; LUO; LINDSEY; LEDGARD, 2008). Os picos de fluxo de $N-N_2O$ observados durante os primeiros dias de medida após a aplicação de urina e fezes no solo (Figura 5) são concomitantes com as maiores concentrações de umidade no solo (Figura 4). A alta umidade no solo no início do experimento foi causada principalmente pela adição de 3 L de urina. Após este período ocorreu gradual declínio da umidade no solo que provavelmente contribuiu para a queda no fluxo de N_2O . No entanto, as precipitações relativamente constantes durante todo o período experimental (Figura 3) mantiveram a umidade em níveis superiores aos apresentados dias antes do início do experimento e da aplicação da urina e fezes no solo. A produção de N_2O no solo ocorre principalmente durante processos biológicos de nitrificação e desnitrificação (BAGGS, 2008). Estes processos sofrem efeito da disponibilidade de oxigênio (DAVIDSON et al., 2000; SUBBARAO et al., 2006). Com baixa umidade, portanto em ambiente aeróbico a produção de N_2O é baixa, mas quando a umidade no solo aumenta, a produção e emissão de N_2O se eleva, até que a umidade seja tão alto que passe a favorecer a completa redução do nitrato para N_2 o que reduz as

emissões de N_2O quando comparado a níveis menores (DEL PRADO et al., 2006; DIJKSTRA et al., 2013), o que parece não ter ocorrido neste estudo.

Figura 5 – Variação diária do fluxo de emissão de N_2O nos distintos tratamentos



*Diferenças significativas ($P < 0,05$) observada entre os tratamentos F (pasto não pastejado com inclusão de 1,5kg de fezes) ou U (pasto com inclusão de 3L de urina) com o tratamento C (pasto sem adição de excretas) no mesmo dia de medida. ** Diferenças significativas ($P < 0,05$) observada entre os tratamentos U e I (pasto com inclusão de 3 L de urina com a adição de DMPP).

As fezes de ruminantes geralmente apresentam baixo efeitos sobre as emissões de $\text{N}-\text{N}_2\text{O}$ do solo. Isto ocorre porque o N presente nas fezes está geralmente na forma orgânica (OENEMA et al., 1997), o que torna mais lenta a liberação de amônio, diminuindo o substrato para o processo nitrificação e formação de N_2O . Entretanto, o N presente na urina está em grande parte na forma de ureia, que é completamente hidrolisada em 1 ou 2 dias após a excreção (DIJKSTRA et al., 2013). Os resultados deste trabalho reforçam afirmativas anteriores, uma

vez que a aplicação da urina superou consideravelmente o fluxo de N-N₂O do tratamento controle e do tratamento com aplicação de fezes.

Neste trabalho, a adição de DMPP na urina aplicada ao solo diminuiu o fluxo de N₂O em 62% considerando o fluxo médio durante todo o período experimental em comparação ao tratamento U. Esta redução supera a efetividade média deste composto (40%) segundo meta-análise de Gilsanz et al. (2016). Esta maior efetividade deve ter relação com as baixas temperaturas médias observadas durante o experimento (MENÉNDEZ et al., 2012; ZERULLA et al., 2001), bem como com os moderados níveis de umidade no solo (MENÉNDEZ et al., 2012). O inibidor de nitrificação pode reduzir as emissões de N₂O, pois afeta tanto o processo de nitrificação quanto o processo de desnitrificação agindo na enzima responsável pelo primeiro estágio da nitrificação, a oxidação do NH₄⁺ para NO₂⁻ (GILSANZ et al., 2016; SUBBARAO et al., 2006) diminuindo a formação de N₂O via nitrificação. A ação do inibidor também reduz a formação de NO₃⁻ e NO₂⁻, que são substratos dos processos de desnitrificação, reduzindo a formação de N₂O também por esta via.

4.6 CONCLUSÃO

Nas condições de clima e solo apresentadas durante o experimento, o fluxo de emissão de N₂O é significativamente afetado pela excreção urinária de vacas leiteiras. A excreção fecal não resulta em relevante impacto sobre as emissões de N₂O. Isto possibilita que alterações no manejo alimentar com impacto sobre a excreção urinária de N possam contribuir na redução das emissões deste GEE pela atividade leiteira.

O efeito da excreção urinária sobre as emissões de N₂O pode ser mitigado com a ação do inibidor DMPP. São

necessários estudos com o objetivo de viabilizar a utilização deste inibidor em rebanhos comerciais.

4.7 REFERÊNCIAS

Association Française de Normalisation. 1997. Aliments des animaux – Dosage de l’azote – Méthode par combustion (DUMAS) – NF V18-120; Dosage des cendres brutes – NF V18-101. AFNOR Editions, Saint-Denis La Plaine, França.

BAGGS, E. M. A review of stable isotope techniques for N₂O source partitioning in soils: recent progress, remaining challenges and future considerations. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, n. 11, p. 1664–1672, 15 jun. 2008.

CHADWICK, D. et al. Manure management: Implications for greenhouse gas emissions. **Animal Feed Science and Technology**, v. 166-167, p. 514–531, jun. 2011.

FAO. 2006. **Livestock’s long shadow**: Enviromental issues and options. Rome, FAO, 2006. 390p.

FAO.2011. **World Livestock 2011**:Livestock in food security. Rome, FAO,2011. 115p.

IPCC, 2013: **Climate Change 2013**: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1535 pp.

DAVIDSON, E. A. et al. Testing a Conceptual Model of Soil Emissions of Nitrous and Nitric Oxides. **BioScience**, v. 50, n. 8, p. 667, 2000.

DEL PRADO, A. et al. N₂O and NO emissions from different N sources and under a range of soil water contents. **Nutrient**

Cycling in Agroecosystems, v. 74, n. 3, p. 229–243, 27 mar. 2006.

DIJKSTRA, J. et al. Diet effects on urine composition of cattle and N₂O emissions. **Animal**, v. 7, n. 2, p. 292–302, 2013.

GILSANZ, C. et al. Development of emission factors and efficiency of two nitrification inhibitors, DCD and DMPP. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 216, n. 2, p. 1–8, jan. 2016.

LESSCHEN, J. P. et al. Greenhouse gas emission profiles of European livestock sectors. **Animal Feed Science and Technology**, v. 166–167, p. 16–28, jun. 2011.

LUO, J.; LINDSEY, S. B.; LEDGARD, S. F. Nitrous oxide emissions from animal urine application on a New Zealand pasture. **Biology and Fertility of Soils**, v. 44, p. 463–470, 2008.

MENÉNDEZ, S. et al. Efficiency of nitrification inhibitor DMPP to reduce nitrous oxide emissions under different temperature and moisture conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 53, p. 82–89, out. 2012.

OENEMA, O. et al. Nitrous oxide emissions from grazed grassland. **Soil Use and Management**, v. 13, n. s4, p. 288–295, dez. 1997.

SUBBARAO, G. V. et al. Scope and Strategies for Regulation of Nitrification in Agricultural Systems—Challenges and Opportunities. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 25, n. 4, p. 303–335, ago. 2006.

ZERULLA, W. et al. 3,4-Dimethylpyrazole phosphate (DMPP) - a new nitrification inhibitor for agriculture and horticulture. **Biology and Fertility of Soils**, v. 34, n. 2, p. 79–84, 1 ago. 2001.

5 ARTIGO II

5.1 SUPLEMENTAÇÃO ENERGÉTICA E COM EXTRATO TANÍFERO PARA VACAS LEITEIRAS EM PASTOS ANUAIS DE INVERNO

5.2 INTRODUÇÃO

O consumo de energia metabolizável é o principal fator limitante da produção leiteira em sistemas exclusivamente em pasto (PEYRAUD; DELAGARDE, 2013), sendo a suplementação energética uma ferramenta para equilibrar a relação energia:proteína da dieta e resolver esta deficiência. Contudo, para vacas leiteiras com elevado potencial produtivo (> 35 kg leite dia^{-1} e 650 kg de peso vivo) outros fatores, como, a oferta de aminoácidos podem limitar a síntese de leite (HILLS *et al.*, 2015).

No caso de vacas com médio potencial produtivo (≈ 20 kg leite dia^{-1}), Ribeiro-Filho *et al.*, (2007) não observaram efeito do nível de suplementação com 2 ou 4 kg de grão milho moído sobre produção de leite em vacas da raça Holandês em pasto de azevém anual. Os autores atribuíram a inexistência de reposta à suplementação à qualidade da forragem utilizada e ao potencial produtivo dos animais, os quais obtiveram os nutrientes para o atendimento de suas exigências nutricionais no nível mais baixo de suplementação. Contudo, o efeito da resposta à suplementação energética para vacas leiteiras com médio potencial produtivo em comparação a animais exclusivamente em pasto anual de inverno, ainda merece ser melhor estudada.

No que diz respeito a nutrição proteica, é conhecido que pastos de inverno bem fertilizados, como a aveia (*Avena sativa* L) e o azevém anual (*Lolium multiflorum* L), apresentam altos teores de proteína degradável no rúmen, os quais geralmente excedem a demanda da flora ruminal, refletindo-se em aumentos

na excreção de N ureico no leite e na urina, com redução na eficiência do uso do N alimentar (COLMENERO; BRODERICK, 2006) e impactos ambientais negativos (DIJKSTRA *et al.*, 2013). Neste sentido, a suplementação energética visa aumentar o aporte de energia fermentável no rúmen, podendo se refletir sobre um maior crescimento microbiano (BACH; CALSAMIGLIA; STERN, 2005), bem como sobre a demanda de N pelos microrganismos, reduzindo as perdas ruminais deste elemento. De outra forma, a utilização de forragens com a presença de componentes secundários, como os taninos condensados (MIN *et al.*, 2003), tem se mostrado uma alternativa viável para reduzir a degradabilidade ruminal do N e melhorar sua eficiência de utilização.

Os taninos são polifenóis com capacidade de formar complexos principalmente com proteínas, reduzindo sua degradação no rúmen (PATRA; SAXENA, 2011) e por esta razão têm sido estudados como aditivo alimentar visando o aumento do fluxo intestinal de proteína metabolizável. Em trabalho publicado recentemente com novilhos da raça Holandês recebendo uma dieta composta de silagem de milho (70%) e concentrado proteico (30 %), Ávila *et al.* (2015) observaram que a inclusão de 15 g de extrato tanífero de *Acacia mearnssi* por kg de matéria seca (MS) da dieta aumentou o fluxo duodenal de N não amoniacal sem afetar o fluxo duodenal de proteína microbiana, além de reduzir a excreção urinária de nitrogênio. Entretanto, os efeitos da inclusão do extrato tanífero de *Acacia mearnssi* na dieta de vacas leiteiras ingerindo pastos de inverno e verão ainda não foram suficientemente estudados.

Dessa forma, objetivou-se avaliar o efeito da suplementação energética e da inclusão dietética de extrato tanífero de *Acacia mearnssi* no desempenho produtivo de vacas leiteiras em pasto de inverno. Foi testada a hipótese que a suplementação energética acrescida do extrato tanífero melhora o status nutricional energético e proteico dos animais, refletindo-

se sobre melhorias do desempenho animal e redução da excreção de N ureico no leite.

5.3 MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1 Tratamentos e delineamento experimental

Os tratamentos avaliados foram pasto de aveia + azevém sem suplementação (SS); aveia + azevém com suplementação de 4 kg de grão de milho moído (GM) e aveia + azevém com suplementação de 4 kg de grão de milho e inclusão de 80 g de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* (Weibull Black, Tanac S. A., Montenegro, Brasil) (ET). O extrato tanífero utilizado caracteriza-se por conter taninos totais em concentração de 694 g kg⁻¹ MS (Kozloski *et al.*, 2012). O estudo foi delineado em um Quadrado Latino 3 × 3, com três períodos de 28 dias, sendo 21 de adaptação e 7 de coleta.

5.3.2 Local, animais e área experimental

O experimento foi conduzido em Lages, SC, Brasil (27°47'S, 50°18'W e 920 m altitude), durante a primavera do ano de 2013. Foram utilizadas 9 vacas da raça Holandês divididas em 3 grupos homogêneos de acordo com a produção de leite ($23,4 \pm 4,2$ kg), número de partos ($3,8 \pm 1,2$), dias em lactação (150 ± 68 dias) e peso corporal (619 ± 48 kg).

A área experimental foi constituída de 6,5 ha de uma mistura azevém (*Lolium multiflorum* cv. Barjumbo) + aveia (*Avena sativa* cv. FAPA2), semeada em abril de 2013. Destes, 4,0 ha foram destinados aos períodos de adaptação e 2,3 ha aos períodos de coleta. Durante os períodos de adaptação os animais foram mantidos em um mesmo piquete, sendo separados por

tratamentos durante os períodos de coleta. A cada tratamento foi destinada uma parcela de 0,25 ha por período. O método de pastejo empregado foi o de faixas diárias, com oferta de forragem de 35 kg MS dia⁻¹.

5.3.3 Medidas nos animais

O consumo de forragem foi medido pela diferença entre a biomassa aérea antes e após o pastejo (LANTINGA; NEUTEBOOM; MEIJIS, 2004) em cada um dos últimos cinco dias de cada período experimental. A produção de leite foi medida individualmente em duas ordenhas diárias (07:00 h e 16:00 h). Amostras para determinar a composição do leite por espectrofotometria no infravermelho (International IDF Standard 141C:2000), foram coletadas nas duas ordenhas durante os últimos 4 dias de cada período experimental. O peso vivo foi medido no início do experimento e no final e início de cada período experimental. No último dia de cada período experimental 10 mL de sangue da veia jugular foram coletados em tubos sem anticoagulante, após centrifugados o plasma foi resfriado e armazenado a -80 °C para posterior análise de ácidos graxos não esterificados (AGNE).

5.3.4 Medidas na pastagem e suplementos

A massa de forragem acima do nível do solo foi estimada com o uso um prato ascendente pela relação entre a altura comprimida medida com prato ascendente (Farmworks®, F200 model, New Zealand), o qual foi calibrado levando em conta a quantidade de MS presente no diâmetro do prato (0,1 m²). Para calibração, em cada período experimental foram cortadas amostras de 15 pontos (cinco por tratamento), os quais compreendiam desde as áreas mais baixas até as áreas mais altas

da superfície total da pastagem. Em cada ponto, a totalidade da biomassa aérea foi cortada em nível do solo e seca em estufa com ventilação forçada a 60 °C por 48 h. Equações de regressão foram construídas para a estimativa da massa de forragem (MF; kg MS ha⁻¹) em função da altura comprimida (cm). Ao final do experimento as equações foram recalculadas, utilizando-se uma equação para estimativa da massa de forragem antes do pastejo (1; MF = 94,3 × altura comprimida + 78,4; r² = 0,89) e outra para a estimativa da massa de forragem após o pastejo (2; MF = 88,9 × altura comprimida + 164,5; r² = 0,79). A média da altura comprimida de cada piquete foi calculada a partir de, no mínimo, cem leituras.

A composição morfológica foi determinada por separação manual das frações folha, colmo e material morto das plantas de azevém e aveia. Para isso, antes do pastejo, em todos os períodos de avaliação em cada piquete, foram coletadas em 20 pontos aleatórios da pastagem com diâmetro de aproximadamente 10 cm, cortados com tesoura em nível do solo. Uma subamostra foi utilizada para determinação da composição morfológica e outra foi destinada à realização de análises químico bromatológicas. Esta última subamostra foi cortada na altura média dos perfilhos após o pastejo, a qual foi medida com régua graduada na razão de 300 perfilhos por piquete. A fração superior juntamente com amostras do suplemento e das sobras da suplementação foram secas em estufa com ventilação forçada a 60 °C por 48 h e armazenada para posteriores análises. A altura do perfilho estendido foi medida antes e após o pastejo nos últimos quatro dias de cada período experimental.

5.3.5 Análises laboratoriais e valor nutritivo

A determinação da composição químico-bromatológica das amostras da forragem foi realizada nas amostras secas em estufa com ventilação forçada a 60 °C por 48 h e moídas em

tamanho de 1,0mm. A MS total foi determinada por secagem a 105 °C até peso constante, e a matéria mineral (MM) pela queima em forno mufla a 550°C durante quatro horas. O teor de N total foi determinado pelo método Kjeldahl (método 984.13, AOAC, 1997). O teor de fibra em detergente neutro (FDN) foi determinado sem o uso de sulfito de sódio, conforme Mertens (2002). O teor de fibra em detergente ácido (FDA) foi determinado de acordo com o AOAC (método 973.18, AOAC, 1997), mas sem uso de amianto. A análise de AGNE no soro sanguíneo foi realizada utilizando kits comerciais (Wako NEFA-HR, Wako Chemicals EUA®, Richmond, EUA e BHBA: Ranbut, Randox® Laboratories Ltd, UK) de acordo com o método descrito por Ballou *et al.* (2009). A energia líquida de lactação (EL_l), assim com os valores de proteína verdadeira digestível no intestino, considerando a síntese microbiana no rúmen limitada pela energia (PDIE) e proteína verdadeira digestível no intestino considerando a síntese microbiana no rúmen limitada pelo nitrogênio (PDIN) foram calculadas a partir da composição química das amostras de forragem e do suplemento, utilizando as equações propostas pelo INRA (2007).

5.3.6 Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância utilizando o PROC MIXED (SAS Institute 1999). As variáveis ligadas à produção, composição de leite e componentes sanguíneos foram analisadas considerando o efeito fixo de tratamento e os efeitos aleatórios de animal e período (n = 9). Para as características do pasto e o consumo foram considerados o efeito fixo de tratamento e os efeitos aleatórios do lote e período (n = 3). Os tratamentos foram comparados por meio de contrastes ortogonais considerando o tratamento SS × a média dos suplementados (GM e ET) e o tratamento GM × o tratamento ET.

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4.1 Características da forragem e manejo do pasto

Foi objetivo deste trabalho avaliar os tratamentos experimentais em vacas leiteiras recebendo um pasto de boa qualidade e sem restrições de ordem quantitativa e estrutural. A massa de forragem pré-pastejo foi em torno de 2600 kg MS ha⁻¹ com altura média de 26,7 cm e aproximadamente 50% de lâmina folhar (Tabela 2). Os teores de proteína bruta (PB) e fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) do pasto consumido foram em média 173 e 540 g kg⁻¹ MS, respectivamente. A concentração de energia líquida de lactação (EL_l) e de proteína metabolizável no pasto foram de 6,63 MJ kg⁻¹ MS e 92 g kg⁻¹ MS, respectivamente. A oferta de MS acima do nível do solo foi de 35,3 kg vaca dia⁻¹ (Tabela 3). Pode-se dizer que as características da forragem utilizada e o manejo adotado permitiram que a premissa deste experimento, de uma oferta de pasto não restritiva fosse alcançada, permitindo que avaliação dos tratamentos utilizados. Esta afirmação está baseada no fato que a oferta de forragem apresenta um efeito curvilíneo sobre o consumo (PEYRAUD *et al.*, 1996), onde níveis acima de 35 kg MS dia⁻¹ têm pequeno impacto no consumo de MS individual, com redução significativa da produtividade por área (PÉREZ-PIETRO e DELAGARDE, 2013). A taxa de ingestão é máxima quando a altura da pastagem supera os 20 cm (DELAGARDE *et al.*, 2011) e a proporção de folhas somente afeta significativamente a velocidade de ingestão quando os valores caem abaixo de 37% da MS total (GUZATTI *et al.*, 2013). A proporção de desfolhe observada também indica a inexistência de restrição quantitativa ao consumo, uma vez que houve redução de aproximadamente 42% da altura em relação à altura de entrada, com desaparecimento de aproximadamente 41% da massa de forragem original. Geralmente, a capacidade de consumo das vacas leiteiras é potencializada quando a altura

residual de pastos de inverno é maior ou igual a 50% da altura inicial (DELAGARDE; DELABY; FAVERDIN, 2006). Neste experimento, a altura residual média foi aproximadamente 58% da altura inicial.

Qualitativamente pode-se dizer que, devido ao seu valor energético, o pasto ingerido poderia ser classificado como de média a boa qualidade, e permitiria um consumo de até 17 kg MS dia⁻¹ para vacas de elevado potencial produtivo quando não existem restrições de ordem quantitativa ou estrutural (PEYRAUD; DELAGARDE, 2013). Além disso, o teor proteico se encontra dentro da variação (168 a 196 g kg⁻¹ MS) descrita em experimentos realizados com pastos de azevém anual na mesma área experimental em anos anteriores (MIGUEL et al., 2014; RIBEIRO FILHO et al., 2007, 2009).

5.4.2 Efeito da suplementação sobre o consumo

O consumo de MS de pasto foi similar entre os tratamentos (média = 14,3 kg dia⁻¹), mas o consumo de MS do suplemento foi superior ($P < 0,05$) nos animais do tratamento GM em comparação àqueles do tratamento ET (Tabela 4). O consumo de MS total foi maior ($P < 0,001$) nos animais suplementados em comparação aos não suplementados e nos animais do tratamento ET em comparação aos do tratamento GM ($P < 0,05$). A taxa de substituição (kg de MS de forragem ingerida a menos por kg de suplemento consumido) foi de 0,45 no tratamento GM e tendeu a zero no tratamento ET, o que se refletiu em maior consumo de MS total ($P < 0,05$) dos animais suplementados com grão de milho e que receberam o extrato tanífero em comparação aos que receberam o grão sem o extrato.

Tabela 1 – Características pré-pastejo de pastos mistos de aveia (*Avena sativa*) e azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.) pastejados por vacas leiteiras não suplementada (SS) ou suplementadas com grão milho moído sem a adição de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* (GM) ou com a adição de 80 g do extrato (ET)

Item	Tratamentos			EPM ¹	Contraste ($P <$)	
	SS	GM	ET		SS×S ²	GM×ET
Massa de forragem (kg MS ha ⁻¹)	2636	2693	2461	122	0,712	0,251
Altura (cm)						
Prato ascendente	27,1	27,7	25,3	1,30	0,712	0,251
Perfilho estendido	32,8	32,3	31,2	1,45	0,611	0,605
Bainha	15,4	17,2	14,5	0,46	0,460	0,014
Lâmina folhar	17,4	15,1	16,7	1,31	0,419	0,440
Composição morfológica (g kg ⁻¹ MS)						
Lâmina folhar	461	453	525	23,8	0,387	0,098
Colmo + bainha	380	417	369	14,6	0,493	0,078
Material Morto	66	45	40	11,5	0,166	0,782
Composição química (g kg ⁻¹ MS)						
MS (g kg ⁻¹ verde)	14,8	14,3	15,5	0,65	0,906	0,258
MO	910	919	920	0,54	0,256	0,938
PB	168	185	165	0,58	0,406	0,069
FDN	539	550	532	6,49	0,809	0,118
FDA	252	255	253	6,32	0,781	0,867
Valor Nutritivo						
EL _L , MJ kg ⁻¹ MS ³	6,57	6,70	6,62	0,06	0,342	0,469
PDIN, g kg ⁻¹ MS ⁴	105	115	103	3,42	0,412	0,068
PDIE, g kg ⁻¹ MS ⁵	91,8	92,1	92,0	0,36	0,590	0,889

¹Erro padrão da média; ²Animais suplementados: média dos tratamentos GM e ET; ³Energia líquida de lactação estimada de acordo com INRA (2007); ⁴Proteína verdadeira digestível no intestino considerando a síntese microbiana no rúmen limitada pelo nitrogênio (INRA, 2007); ⁵Proteína verdadeira digestível no intestino considerando a síntese microbiana no rúmen limitada pela energia (INRA, 2007).

Tabela 2 – Manejo adotado e características pós-pastejo em pastos mistos de aveia (*Avena sativa*) e azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.) pastejados por vacas leiteiras não suplementadas (SS) ou suplementadas com grão milho moído sem a adição de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* (GM) ou com a adição de 80 g do extrato (ET)

Item	Tratamento			EPM ¹ Contraste ($P <$)		
	SS	GM	ET	SS×S ²	GM×ET	
Massa de forragem (kg MS ha ⁻¹)	1550	1585	1471	27,4	0,544	0,042
Altura (cm)						
Prato ascendente	15,6	16,0	14,7	0,31	0,542	0,042
Perfilho estendido	18,3	18,8	18,9	0,97	0,654	0,983
Bainha	9,9	9,5	10,1	0,77	0,959	0,632
Lâmina folhar	8,4	9,3	8,8	0,49	0,359	0,482
Oferta (kg MS dia ⁻¹)						
MS total	35,3	35,3	35,3	0,05	0,321	0,831
Material verde	29,6	30,7	31,6	0,38	0,030	0,194
Lâmina folhar	16,2	16,0	18,5	0,82	0,364	0,096
Área oferecida (m ² vaca.dia ⁻¹)	137	144	147	9,09	0,503	0,841

¹Erro padrão da média; ²Animais suplementados: média dos tratamentos GM e ET.

Tabela 3 – Consumo, desempenho produtivo e balanço energético de vacas leiteiras em pastos mistos de aveia (*Avena sativa*) e azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.) sem suplementação (SS) ou suplementadas com grão milho moído sem a adição de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* (GM) ou com a adição de 80 g do extrato tanífero (ET)

Item	Tratamento			EPM ¹	Contraste (<i>P</i> <)	
	NS	GM	ET		SS×S ²	GM×ET
<i>Consumo (kg MS dia⁻¹)</i>						
Pasto	14,9	13,4	14,7	0,93	0,501	0,367
Suplemento	0,00	3,33	3,02	0,07	<0,001	0,013
Total	14,9	16,7	17,7	0,33	<0,001	0,044
Produção de leite (kg dia ⁻¹)	20,9	23,7	23,4	0,51	0,001	0,739
PL4 (kg/dia) ³	17,9	20,1	19,4	0,50	0,009	0,340
<i>Composição do leite</i>						
Gordura (%)	3,07	3,04	2,94	1,01	0,550	0,502
Proteína (%)	3,38	3,39	3,37	0,35	0,928	0,639
Caseína (%)	2,61	2,63	2,61	0,28	0,765	0,606
N ureico (mg 100 mL ⁻¹)	12,6	10,4	10,6	0,42	0,002	0,854
Produção de gordura (g dia ⁻¹)	635	710	670	25,2	0,095	0,273
Produção de proteína (g dia ⁻¹)	698	800	785	18,5	0,001	0,572
EL _L consumida (MJ dia ⁻¹) ⁴	96,9	113	120	2,06	<0,001	0,036
PM consumida (kg dia ⁻¹) ⁵	1,33	1,52	1,58	0,32	0,001	0,194
Balanço energético (MJ dia ⁻¹) ⁶	-2,69	6,57	15,5	2,83	0,014	0,042
Balanço proteico (kg dia ⁻¹) ⁷	-0,07	0,00	0,13	0,57	0,074	0,142
AGNE (mmol L ⁻¹) ⁸	0,37	0,29	0,27	0,02	<0,001	0,698

¹Erro padrão da média; ²Animais suplementados: média dos tratamentos GM e ET; ³Produção de leite corrigida para 4% de gordura; ⁴Energia líquida de lactação; ⁵Proteína metabolizável; ⁶Calculado pela diferença entre o consumo de EL_L menos a exigência de EL_L; ⁷Calculado pela diferença entre o consumo de PDI menos a exigência de PDI; ⁸Ácidos graxos não esterificados no sangue.

O valor de taxa de substituição observado no tratamento GM é condizente com os observados em vacas leiteiras submetidas a pastos com alta oferta (BARGO *et al.*, 2002), como as encontradas no presente estudo. De outra forma, a baixa taxa de substituição observada no tratamento ET pode ser explicada pela menor ingestão de suplemento (MCEVOY *et al.*, 2008) e/ou pela ação dos taninos condensados no ambiente ruminal. Neste sentido, a redução na ingestão do suplemento devido a inclusão de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* é um evento que já foi observado por outros autores (GRIFFITHS *et al.*, 2013), assim como, o efeito dos taninos na redução da degradação ruminal da matéria orgânica (MO) (ÁVILA *et al.*, 2015; KOZLOSKI *et al.*, 2012) , incluindo, além das proteínas, os carboidratos fibrosos (ORLANDI *et al.*, 2015). Os carboidratos fibrosos que escapam da fermentação ruminal tem baixa digestibilidade pós-ruminal, resultando em queda no consumo da MO digestível e de energia líquida por kg de MS ingerida. Dessa forma, a menor taxa de substituição no tratamento ET pode ter ocorrido como resultado de um mecanismo para manutenção do consumo diário de energia, uma vez que em alimentos com elevada digestibilidade da MO, como é o caso dos pastos utilizados neste trabalho, o enchimento ruminal tem menor importância na regulação do consumo (KETELAARS; TOLKAMP, 1992).

5.4.3 Efeito da suplementação sobre o desempenho animal e o balanço energético

A produção de leite aumentou ($P < 0,01$) 2,6 kg dia⁻¹ nos animais suplementados em comparação aos não suplementados, mas não variou com a inclusão do extrato tanífero em comparação a suplementação exclusiva com o concentrado energético (Tabela 4). Estes resultados podem ser explicados pelo aporte de energia líquida obtido exclusivamente do pasto, o

qual não foi suficiente para o atendimento das exigências nutricionais dos animais para vacas leiteiras com 620 kg de PV produzindo 21 kg leite dia^{-1} , resultando em balanço energético negativo e maior concentração sanguínea de AGNE nos animais que não receberam suplementação.

Estes resultados vão de encontro aos obtidos por Ribeiro-Filho *et al.*, (2009b), os quais observaram que vacas leiteiras em pastos de azevém anual com alta oferta foram capazes de produzir o equivalente aos animais do presente trabalho mantendo-se em balanço energético positivo. Destaca-se, contudo, que as vacas utilizadas por esses autores foram mais leves ($532 \pm 56,5$ kg) e o pasto utilizado possuía maiores teores de PB e menores teores de FDN em comparação ao presente trabalho. Além disso, as características do pasto utilizado por Ribeiro-Filho *et al.* (2009a), também contribuíram para um maior consumo diário de pasto (16,6 kg MS) naquele trabalho em comparação a este.

A oferta de suplemento promoveu o aporte energético de aproximadamente 20 MJ dia^{-1} de EL_1 , possibilitando maior produção de leite e de proteína. A eficiência média de suplementação foi aproximadamente 0,7 kg de leite kg^{-1} de concentrado oferecido. O melhor equilíbrio dietético nos tratamentos com suplementação pode ser observado tanto pela redução nos teores sanguíneos de AGNE como pela redução na concentração de N ureico no leite (NUL). A existência de correlações negativas entre a concentração de AGNE no sangue e o balanço energético de vacas leiteiras (REIST *et al.*, 2002), assim como dos teores de NUL com a eficiência da utilização da proteína consumida em proteína verdadeira no leite (NOUSIAINEN *et al.*, 2004) estão bem definidas na literatura.

A inexistência de efeito do extrato tanífero sobre a produção de leite e NUL pode ser explicada pelo teor de proteína dos pastos (≈ 160 g kg^{-1} MS) e pelo potencial produtivo dos animais. Com relação ao potencial de produção, observa-se que o balanço proteico (consumo de proteína metabolizável –

exigência em proteína metabolizável) não diferiu entre os tratamentos, apresentando valores próximos a zero (Tabela 4). Estes resultados confirmam ser desnecessário o uso da suplementação proteica para vacas leiteiras em pastos de inverno com teores de proteína em torno de 160 g kg^{-1} de MS e potencial produtivo entre 20 e 25 kg de leite dia^{-1} . Os teores de proteína do pasto estão diretamente relacionados com sua eficiência de uso, uma vez que perdas ruminais de N dependem do teor de PB da dieta. O aumento do teor da PB da dieta está associado à maior concentração de amônia no rumem e de ureia no sangue, e aumento da excreção de ureia na urina e no leite (COLMENERO; BRODERICK, 2006). No presente estudo, os maiores valores de PDIN do pasto em comparação aos valores de PDIE (Tabela 2), indicam que a quantidade de proteína degradável no rúmen ingerida pelos animais sem suplementação foi superior a disponibilidade de energia para o crescimento microbiano (INRA, 2007). Considerando que o aporte excedente de N degradável resultaria em perdas de N ureico no leite e na urina, sem ganhos sobre a ingestão, recomenda-se a busca pelo equilíbrio entre os teores de PDIE e PDIN (FAVERDIN *et al.*, 2003). Estes resultados demonstram que o uso de suplementação proteica nas condições testadas neste experimento possivelmente resultaria em diminuição da eficiência de uso do N consumido, sem que ocorressem repostas na produção leiteira em comparação a suplementação energética.

5.5 CONCLUSÃO

A suplementação energética é uma ferramenta para a melhoria do perfil nutricional de vacas leiteiras em pastos de aveia e azevém, refletindo-se em aumento no consumo total de MS e do desempenho produtivo reduções nos teores de N ureico do leite. A inclusão de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* não melhora a performance produtiva destes animais, mas contribuiu

para reduzir a taxa de substituição e melhoria do balanço energético de vacas no terço médio de lactação. Trabalhos futuros devem ser conduzidos para avaliar o efeito do extrato tanífero em animais de maior potencial produtivo, bem como sobre o perfil de ácidos graxos do leite.

5.6 REFERÊNCIAS

AOAC. **Official methods of analysis**. 16 ed. Washington: W. Horwitz, 1997. 850 p.

ÁVILA, S. C. et al. Impact of a tannin extract on digestibility, ruminal fermentation and duodenal flow of amino acids in steers fed maize silage and concentrate containing soybean meal or canola meal as protein source. **The Journal of Agricultural Science**, v. 153, n. 05, p. 943–953, 2015.

BACH, A; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M. D. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 88 Suppl 1, n. July 2004, p. E9–21, 2005.

BARGO, F. et al. Milk response to concentrate supplementation of high producing dairy cows grazing at two pasture allowances. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 7, p. 1777–1792, 2002.

COLMENERO, J. J. O.; BRODERICK, G. A. Effect of dietary crude protein concentration on milk production and nitrogen utilization in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 5, p. 1704–1712, 2006.

DELAGARDE, R. et al. GrazeIn: A model of herbage intake and milk production for grazing dairy cows. 2. Prediction of intake under rotational and continuously stocked grazing management. **Grass and Forage Science**, v. 66, n. 1, p. 45–60, 2011.

DELAGARDE, R.; DELABY, L.; FAVERDIN, P. **Diet formulation for grazing dairy cows**. Rencontres autour des 13èmes Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants. **Anais...**2006

DIJKSTRA, J. et al. Diet effects on urine composition of cattle and N₂O emissions. **Animal**, v. 7, n. s2, p. 292–302, 2013.

FAVERDIN, P. et al. La nutrition azotée influence l'ingestion chez la vache laitière. **INRA Productions Animales**, v. 16, n. 1, p. 27–37, 2003.

GRIFFITHS, W. M. et al. Supplementing lactating dairy cows fed high-quality pasture with black wattle (*Acacia mearnsii*) tannin. **Animal**, v. 7, n. 11, p. 1789–1795, 2013.

GUZATTI, G. C. **Taxa de ingestão de forragem em pastos de aveia e azevém em cultivo puro ou consorciados**. 2013. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Centro de Ciências Agroveterinárias / UDESC.

HILLS, J. L. et al. Invited review : An evaluation of the likely effects of individualized feeding of concentrate supplements to pasture-based dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 3, p. 1363–1401, 2015.

INRA (2007) 'Alimentation des bovins, ovins et caprins: Besoins des animaux—Valeurs des aliments' (French National Institute for Agricultural Research : Versailles, FR

KETELAARS, J. J. M. H.; TOLKAMP, B. J. Toward a new theory of feed intake regulation in ruminants. 1.Causes of differences in voluntary feed intake: Critique of current views. **Livestock Production Science**, v. 30, p. 269–296, 1992.

KOZLOSKI, G. V. et al. Intake, digestibility and nutrients

supply to wethers fed ryegrass and intraruminally infused with levels of *Acacia mearnsii* tannin extract. **Small Ruminant Research**, v. 106, n. 2-3, p. 125–130, 2012.

LANTINGA, E. A.; NEUTEBOOM, J. H.; MEIJS, J. A. C. Sward methods. In: PENNING, P. D. (Ed.). . **Herbage Intake Handbook**. 2. ed. Maidenhead, U.K.: The British Grassland Society, 2004. p.191.

MCEVOY, M. et al. The effect of herbage allowance and concentrate supplementation on milk production performance and dry matter intake of spring-calving dairy cows in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 3, p. 1258–1269, 2008.

MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylasetreated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: a collaborative study. **Journal of AOAC**, v.85, p.1217-1240, 2002.

MIGUEL, M. F. et al. Pasture intake and milk production of dairy cows grazing annual ryegrass with or without corn silage supplementation. **Animal Production Science**, v. 54, p. 1810–1816, 2014.

MIN, B. . et al. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 106, n. 1-4, p. 3–19, 2003.

NOUSIAINEN, J.; SHINGFIELD, K. J.; HUHTANEN, P. Evaluation of milk urea nitrogen as a diagnostic of protein feeding. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 386–398, 2004.

ORLANDI, T. et al. Digestibility, ruminal fermentation and duodenal flux of amino acids in steers fed grass forage plus

concentrate containing increasing levels of *Acacia mearnsii* tannin extract. **Animal Feed Science and Technology**, v. 210, p. 37–45, 2015.

PATRA, A. K.; SAXENA, J. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 1, p. 24–37, 2011.

PEYRAUD, J. L. et al. The effect of daily herbage allowance , herbage mass and animal factors upon herbage intake by grazing dairy cows. **Annales de Zootechnie**, v.45, p. 201–217, 1996.

PEYRAUD, J. L.; DELAGARDE, R. Managing variations in dairy cow nutrient supply under grazing. **Animal**, v. 7 Suppl 1, n. s1, p. 57–67, mar. 2013.

REIST, M. et al. Estimation of energy balance at the individual and herd level using blood and milk traits in high-yielding dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 12, p. 3314–3327, 2002.

RIBEIRO-FILHO, H. M. N. et al. Suplementação energética para vacas leiteiras pastejando azevém com alta oferta de forragem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 6, p. 2152–2158, 2007.

RIBEIRO-FILHO, H. M. N. et al. Farelo de glúten de milho para vacas leiteiras em pastos de azevém anual. **Ciência Rural**, v. 39, p. 1162–1168, 2009a.

RIBEIRO-FILHO, H. M. N. et al. Consumo de forragem e produção de leite de vacas em pastagem de azevém-anual com duas ofertas de forragem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 2038–2044, 2009b.

6 ARTIGO III

6.1 EXTRATO TANÍFERO COMO MITIGADOR DA EMISSÃO DE METANO PARA VACAS LEITEIRAS EM PASTO TROPICAL

6.2 INTRODUÇÃO

O acúmulo atmosférico de gases, como, dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4) e óxido nitroso (N_2O) contribui para o aquecimento global. A emissão entérica de CH_4 seguido da emissão de N_2O é a principal fonte de gases de efeito estufa (GEE) dos sistemas de produção de leite (LESSCHEN et al., 2011). Segundo o Ministério da Ciência e Tecnologia e Inovação (MCTI, 2014), as emissões de CH_4 oriundas da atividade leiteira representam 15% do total de CH_4 emitido pelo setor agropecuário no Brasil, sendo superado apenas pela bovinocultura de corte.

A produção leiteira no Brasil se baseia em grande parte em sistemas de alimentação em pasto, sendo constituídos predominantemente de gramíneas de clima tropical e subtropical. Ruminantes que consomem gramíneas tropicais geralmente emitem quantidade superior de metano por unidade de matéria seca (MS) ingerida em comparação a animais consumindo gramíneas de clima temperado (ARCHIMÈDE et al., 2011). Esta diferença ocorre principalmente em função da quantidade e do perfil estrutural dos carboidratos destas plantas. O CH_4 é formado no rúmen por bactérias metanogênicas que utilizam o hidrogênio (H_2) e o CO_2 liberado no processo de fermentação ruminal de carboidratos com formação de ácidos graxos voláteis (AGV). Portanto, as medidas de mitigação da produção de metano geralmente resultam da formulação de dietas que reduzam a extensão da fermentação ruminal ou que alteram a relação da concentração molar de acetato: propionato,

uma vez que o primeiro libera maior quantidade de H_2 ao meio ruminal (BOADI et al., 2004).

A inclusão de alimentos contendo taninos condensados apresentam potencial capacidade de mitigar as emissões de CH_4 (CARULLA et al., 2005; GRAINGER et al., 2009; SZCZECHOWIAK et al., 2016). Os taninos condensados são polifenóis com capacidade de formar complexos principalmente com proteínas, mas também, em menor grau com carboidratos, reduzindo sua degradação ruminal (PATRA; SAXENA, 2011).

Quanto à produção de CH_4 , níveis baixos de tanino na dieta ($< 20 \text{ g kg}^{-1}$ MS) mostraram ter efeito variável (JAYANEGARA; LEIBER; KREUZER, 2012) para ruminantes, enquanto a adição de níveis elevados ($> 50 \text{ g kg}^{-1}$ MS) pode levar a em prejuízos à ingestão de MS e ao desempenho produtivo de vacas leiteiras (GRAINGER et al., 2009). O objetivo deste trabalho foi avaliar se a inclusão de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* na alimentação de vacas leiteiras recebendo dietas a base de gramínea tropical pode reduzir as emissões de metano entérico sem afetar negativamente o consumo de forragem e o desempenho animal.

6.3 MATERIAL E MÉTODOS

6.3.1 Tratamentos e delineamento experimental

Os tratamentos avaliados consistiram da suplementação com 6 kg de concentrado (Tabela 5, 750 g kg^{-1} de milho moído e 250 g kg^{-1} de farelo de soja) com (T) ou sem (ST) a adição de 120 de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* (Weibull Black, Tanac S. A., Montenegro, Brazil) para vacas leiteiras em pasto de milheto (*Pennisetum glaucum* L.). O extrato tanífero utilizado caracteriza-se por conter taninos totais em uma concentração de 694 g kg^{-1} MS (KOZLOSKI et al, 2012). O estudo foi delineado

em dupla reversão, com três períodos de 28 dias, sendo 21 dias de adaptação e 7 dias de coleta.

6.3.2 Local, animais e área experimental

O experimento foi conduzido em Lages, SC, Brasil (27°47' S; 50°18'W e 920m altitude) durante o outono de 2014. Doze vacas da raça Holandês foram divididas em dois grupos homogêneos quanto a produção de leite ($20,7 \pm 5,1$ kg), número de partos ($3,7 \pm 1,7$), dias em lactação (143 ± 79 dias) e peso corporal (589 ± 36 kg).

A área experimental foi constituída de 4,5 ha de milheto semeadas em dezembro de 2013. Destes, 3,5 ha foram destinados aos períodos de adaptação e 1,0 ha foi utilizado nos períodos de coleta. Durante os períodos de adaptação os animais foram mantidos em um mesmo piquete, sendo separados por tratamentos apenas durante os períodos de coleta. A cada tratamento foi destinada uma parcela de 0,5 ha durante o período de coleta. O método de pastejo empregado foi o de pastoreio rotacionado, considerando a altura pré-pastejo não superior à 60 cm, e a altura pós-pastejo não inferior de 30 cm.

6.3.3 Medidas nos animais

O consumo individual de pasto foi medido durante os últimos cinco dias de cada período experimental pela técnica dos n-alcanos (MAYES et al. 1986). Foi considerada a relação de C₃₃ (tritriacontano) presente no pasto consumido (obtido por simulação de pastejo) com o C₃₂ (dotriacontano) dosado. Durante cada período todas as vacas foram dosificadas por 11 dias com péletes de celulose (Carl Roth, GmbH, Karlsruhe, Alemanha) contendo $243 \pm 2,5$ mg de C₃₂. Amostras fecais de cada vaca após cada ordenha, e amostras de pasto através de

simulação de pastejo foram coletadas durante os cinco últimos dias de cada período de medida. O consumo de concentrado foi medido pela diferença entre a quantidade de concentrado ofertada e as sobras deste concentrado durante os cinco dias de medida de cada período. As amostras de fezes, pasto e concentrado foram secas a 60°C por 72 horas e posteriormente moídas em peneiras de 1 mm para subsequente análise química.

A produção de leite foi medida individualmente em duas ordenhas diárias (07:00 h e 16:00 h). Amostras para determinar a composição do leite foram coletadas nas duas ordenhas durante os últimos 4 dias de cada período experimental. No último dia de cada período experimental 10 mL de sangue da veia jugular foram coletados em tubos sem anticoagulante. Após centrifugados o plasma foi resfriado e armazenado a -80 °C para posterior análise de ácidos graxos não esterificados (AGNE).

A emissão entérica diária de CH₄ foi medida individualmente no segundo e terceiro períodos experimentais, em 10 animais (5 animais por tratamento), utilizando a técnica de gás traçador hexafluoreto de enxofre (SF₆) descrito por Johnson et al. (1994). Do total de 20 medidas individuais 25% foram considerados “outliers” ou dados ou tiveram problemas de amostragem e não foram usadas na análise estatística. As capsulas de SF₆ utilizadas apresentaram taxa de permeação média de $3,96 \pm 0,57$ mg dia⁻¹ no momento de sua inserção no retículo-ruminal. A inserção das cápsulas foi realizada com auxílio de sonda oral, 21 dias antes do início das coletas de ar expirado. A taxa de permeação das cápsulas foi medida colocando-as em banho-maria à 39° C e medindo a perda de peso diário durante 6 semanas. Como dispositivo de coleta, foram utilizados cilindros de aço inoxidável (0,5 L de volume) com reguladores de ingresso de ar (GERE; GRATTON, 2010) calibrados para um período de coleta de 5 dias. Os cilindros foram limpos com gás nitrogênio de alta pureza (N₂) e pré-evacuados (< 0,5 mb) antes de cada coleta de amostra. O regulador de fluxo foi localizado logo acima das narinas e inclui

um filtro duplo para proteção contra água e poeira. Além das amostras de ar expirado, duas amostras de ar ambiental foram coletadas a cada período utilizando dispositivos instalados a 2 m de altura acima do solo nas distintas parcelas durante os períodos de coleta.

6.3.4 Medidas no pasto e suplementos

A altura do pasto, antes e após o pastejo, foi avaliada a partir de 100 medidas por parcela com o uso de régua graduada (sward stick). A massa de forragem acima do nível do solo foi estimada pela técnica de rendimento visual comparativo (HAYDOCK; SHAW, 1975), sendo realizadas 40 medidas visuais antes e após o pastejo, por tratamento. Em cada período de medida foram utilizados cinco pontos de referência (padrões) como base de comparação, os quais compreendiam desde as áreas mais baixas (classificada como padrão 1) até as áreas mais altas da superfície total da pastagem (padrão 5). Em cada ponto, a totalidade da biomassa aérea foi cortada em nível do solo e seca em estufa com ventilação forçada a 60°C por 48 h. Equações de regressão foram construídas para a estimativa da massa de forragem (MF; kg MS ha⁻¹) em função da classificação média obtida por piquete em cada período.

A composição morfológica foi determinada por separação manual das frações folha, colmo e material morto das plantas, de amostras representativas de cada piquete coletadas previamente a entrada dos animais na parcela. A composição química do pasto selecionado foi obtida pela análise de amostras de simulação de pastejo coletadas ao longo dos últimos cinco dias de cada período. As amostras foram secas em estufa com ventilação forçada a 60°C por 48 h e armazenadas.

6.3.5 Análises laboratoriais

A determinação da composição químico-bromatológica das amostras da forragem foi realizada nas amostras secas em estufa com ventilação forçada a 60°C por 48 h e moídas em tamanho de 1,0mm. A MS total foi determinada por secagem a 105°C até peso constante, e a matéria mineral (MM) pela queima em forno mufla a 550°C durante quatro horas. O teor de N total foi determinado pelo método Kjeldahl (método 984.13, AOAC, 1997). O teor de fibra em detergente neutro (FDN) foi determinado sem o uso de sulfito de sódio, conforme Mertens (2002). O teor de fibra em detergente ácido (FDA) foi determinado de acordo com o AOAC (método 973.18, AOAC, 1997), mas sem uso de amianto. A análise de AGNE no soro sanguíneo foi realizada utilizando kits comerciais (Wako NEFA-HR, Wako Chemicals EUA®, Richmond, EUA e BHBA: Ranbut, Randox® Laboratories Ltd, UK) de acordo com o método descrito por Ballou *et al.* (2009). A análise de n-alcenos foi determinada de acordo com Mayes *et al.* (1986).

6.3.6 Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância utilizando o PROC MIXED (SAS Institute 1999). As variáveis medidas nos animais (consumo, produção e composição de leite, componentes sanguíneos e emissão de metano) foram analisadas considerando o efeito fixo de tratamento e os efeitos aleatórios de animal e período. Para as características do pasto foram considerados o efeito fixo de tratamento e o efeito aleatórios de período. O efeito do tratamento foi considerado significativo quando $P \leq 0,10$.

Tabela 4 – Composição química do suplemento ofertado

Itens	Concentrado
Teor de MS g kg ⁻¹	903
<i>Composição química (g kg⁻¹ MS)</i>	
MO	945
PB	181
FDN	127
FDA	24,2

6.4 RESULTADOS

O manejo do pasto não diferiu entre os tratamentos, a massa de forragem pré-pastejo foi em torno de 3380 kg MS ha⁻¹ com altura média de 54,9 cm e aproximadamente 34% de lâmina folhar (Tabela 5). A altura residual média do pasto foi de 35 cm e assim como a massa de forragem pós pastejo não diferiu entre os tratamentos. O manejo do pasto permitiu o consumo de forragem com concentração média de 17,9% de PB e 56% de FDN. O consumo de pasto foi em média 11,8 kg de MS nos distintos tratamentos. Porém, a inclusão do extrato tanífero tendeu a reduzir ligeiramente o consumo de suplemento, mas o consumo de MS total foi similar entre tratamentos, com média de aproximadamente 17 kg de MS/dia (Tabela 6).

A adição dietética do extrato tanífero também não afetou a produção, a composição química do leite e a excreção de N ureico no leite (Tabela 6). A produção e a composição média foram de aproximadamente 19 kg de leite/dia com 3,63% de gordura e 3,33% de proteína. A concentração de N ureico foi em média 15,1 mg 100mL⁻¹.

Apesar de não apresentar efeito sobre o desempenho produtivo de vacas leiteiras, a inclusão de extrato tanífero no suplemento aumentou ligeiramente o teor de AGNE no sangue

e reduziu as emissões de CH₄ entérico por animal e por kg de MS consumida (Tabela 6).

Tabela 5 – Características pré- e pós-pastejo de pastos de milheto (*Pennisetum glaucum* L.) pastejados por vacas leiteiras suplementadas com 6 kg de concentrado (milho moído 750g kg⁻¹ e farelo de soja 250g kg⁻¹) com (T) ou sem (ST) a adição de 20g kg⁻¹ de extrato tanífero de *Acacia mearnsii*.

	Tratamentos		EPM	P > F ¹
Itens	ST	T		
<i>Massa de forragem (kg MS ha⁻¹)</i>				
Pré-pastejo	3315	3460	207	0,671
Pós-pastejo	1969	2290	127	0,216
<i>Altura da pastagem (cm)</i>				
Pré-pastejo	54,0	55,8	0,74	0,231
Pós-pastejo	34,0	36,3	0,85	0,200
<i>Composição morfológica (g kg⁻¹ MS)</i>				
Lâmina folhar	355	330	34,6	0,656
Colmo + bainha	548	596	26,7	0,335
Material Morto	44,0	48,2	5,56	0,652
<i>Composição química (g kg⁻¹ MS)</i>				
MS (g kg ⁻¹ verde)	17,7	16,7	0,14	0,037
MO	911	910	1,31	0,657
PB	17,7	18,1	0,18	0,225
FDN	56,0	55,9	0,17	0,820
FDA	26,0	27,2	0,47	0,225

¹Probabilidade de efeito significativo dos tratamentos

Tabela 6 – Consumo, desempenho produtivo e emissão entérica de CH₄ de vacas leiteiras em pastos de milheto (*Pennisetum glaucum* L) suplementadas com 6 kg de concentrado (milho moído 750g kg⁻¹ e farelo de soja 250g kg⁻¹) com (T) ou sem (ST) a adição de 20g kg⁻¹ de extrato tanífero de *Acacia mearnsii*.

Itens	Tratamentos		EPM	P > F ¹
	ST	T		
<i>Consumo (kg MS dia⁻¹)</i>				
Pasto	11,8	11,8	0,22	0,987
Suplemento	5,38	5,30	0,07	0,060
Total	17,2	17,1	0,23	0,852
Produção de leite (kg dia ⁻¹)	19,2	19,3	0,37	0,808
PL4 (kg dia ⁻¹) ³	17,8	18,1	0,32	0,541
<i>Composição do leite</i>				
Gordura (%)	3,59	3,67	0,03	0,157
Proteína (%)	3,35	3,32	0,02	0,471
Caseína (%)	2,65	2,64	0,02	0,476
N ureico (mg 100 mL ⁻¹)	14,9	15,4	0,20	0,167
Produção de gordura (g dia ⁻¹)	677	694	12,6	0,370
Produção de proteína (g dia ⁻¹)	633	634	10,9	0,934
AGNE, mmol/l	0,23	0,25	0,00	0,012
<i>Emissões de CH₄</i>				
g vaca ⁻¹ dia ⁻¹	517	340	50,8	0,082
g kg ⁻¹ MS Consumida	31,4	21,9	2,67	0,078

¹Probabilidade de efeito significante dos tratamentos

6.5 DISCUSSÃO

6.5.1 Manejo e qualidade da pastagem

Para avaliar o impacto da inclusão de extrato tanífero na dieta de vacas leiteiras em pastagem tropical seria necessário que não houvesse restrição de ordem quantitativa na oferta do pasto, de forma que este fator não afetasse o resultado do estudo. As características da pastagem de milheto apresentadas na Tabela 6, demonstram que esta premissa foi alcançada. Segundo Fonseca *et al.*, (2012) a taxa de ingestão de pastos de clima tropical passa a ser afetada quando a altura residual do pasto é inferior a 60% da altura pré-pastejo. No presente estudo, a altura residual de ambos os tratamentos supera o nível indicado por Fonseca *et al.* (2012), o que indica uma oferta de pasto não restritiva. Além disso, a composição química da forragem consumida, foi superior à qualidade média esperada para este tipo de pasto (VALADARES *et al.*, 2016), uma vez que apresentou elevado teor de proteína (17,8%) e valor relativamente baixo de FDN (56%). A qualidade da pastagem consumida sugere que devido a não restrição quantitativa de pasto, os animais tiveram possibilidade de seleção das frações mais nutritivas das plantas.

6.5.2 Consumo e desempenho produtivo

Dietas ricas em taninos geralmente reduzem o consumo e a taxa de digestão ruminal (PATRA; SAXENA, 2011; WAGHORN, 2008). Porém, quando consumido em concentrações moderadas (< 4% MS) pode resultar em melhoria no desempenho produtivo (MIN *et al.*, 2003). A melhora do desempenho produtivo geralmente é atribuída a capacidade dos taninos em modular a fermentação ruminal, promovendo um

maior aporte de aminoácidos ao intestino delgado, devido a redução da degradação ruminal de proteína e menor perda ruminal de amônia (ORLANDI *et al.*, 2015; WAGHORN *et al.*, 1987), bem como pela melhor eficiência na utilização do N alimentar.

Apesar de estatisticamente significativa a ligeira redução do consumo de suplemento no tratamento com a inclusão do extrato tanífero, resultado também observado por outros autores (GRIFFITHS *et al.*, 2013), não foi suficiente para afetar o consumo de MS total, uma vez que o consumo do pasto não foi afetado.

As variáveis estudadas neste trabalho não demonstram qualquer efeito da inclusão do extrato tanífero no desempenho produtivo de vacas leiteiras em pasto de clima tropical. Tampouco a concentração de N ureico no leite foi afetada, o que indica que a inclusão de extrato tanífero neste estudo não resultou em alteração na eficiência da utilização da proteína alimentar (NOUSIAINEN *et al.*, 2004).

Apesar de permanecerem em níveis condizentes com um estado nutricional não restritivo, os teores de AGNE no sangue foram levemente superiores nos animais que estavam recebendo suplementação contendo extrato tanífero. A concentração sanguínea de AGNE reflete a magnitude da mobilização do tecido adiposo, e pode ser usado como indicador do balanço energético de vacas leiteiras (REIST *et al.*, 2002). No entanto, um período experimental mais longo é necessário para determinar se a diferença na concentração de AGNE encontrada, resultaria em um menor desempenho produtivo ou reprodutivo.

6.5.3 Efeito do tanino sobre a emissão de metano

A inclusão de taninos na dieta de ruminantes tem potencial capacidade de mitigar as emissões entéricas de CH₄, no entanto em níveis de inclusão baixos (< 20g kg⁻¹ MS) os resultados são incertos (JAYANEGARA; LEIBER; KREUZER, 2012). Neste trabalho o consumo médio de MS foi na ordem de 17 kg/dia.

Considerando que os animais tivessem consumido todo o suplemento, a concentração de extrato tanífero na dieta seria de 7g kg^{-1} MS, dos quais 69,4% são taninos (KOZLOSKI et al., 2012). Contudo, no presente estudo, a inclusão de extrato tanífero na suplementação de vacas leiteiras em pastagem de milho reduziu em 34% a emissão de metano por animal ($P = 0,082$) e 30% a emissão de CH_4 entérico por kg de MS consumida ($P = 0,078$). Outros autores também observaram o efeito da inclusão do extrato tanífero de *Acacia mearnsii* sobre a emissão entérica de CH_4 em ovinos (CARULLA et al., 2005) e em vacas leiteiras (GRAINGER et al., 2009).

A menor emissão entérica de CH_4 dos animais quando recebendo dietas com inclusão de taninos pode ser explicada por uma provável redução da degradação ruminal da MO (ÁVILA et al., 2015; ORLANDI et al., 2015), o que resultaria na diminuição da liberação de H_2 no meio ruminal, que por sua vez afetaria a produção de CH_4 . Por outro lado, alguns trabalhos demonstram que os taninos também podem agir alterando o perfil de ácidos graxos voláteis produzidos no rúmen, diminuindo a relação acetato: propionato (CARULLA et al., 2005; SZCZECOWIAK et al., 2016), e diminuindo a quantidade de H_2 liberada ao meio ruminal e disponível às bactérias metanogênicas (BOADI et al., 2004). No entanto a mudança do perfil de ácidos graxos voláteis poderia afetar a produção e composição de leite, em especial o teor de gordura. Porém não foi constatado nenhuma alteração de produção ou composição do leite neste trabalho.

6.6 CONCLUSÃO

Vacas leiteiras recebendo 120 g por dia de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* podem reduzir a emissão de metano entérico sem afetar negativamente a performance produtiva. Futuros estudos são necessários para confirmar se os resultados

obtidos neste trabalho se estendem ao longo de um período de lactação.

6.7 REFERÊNCIAS

AOAC. **Official methods of analysis**. 16 ed. Washington: W. Horwitz, 1997. 850 p.

ARCHIMÈDE, H. et al. Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and legumes. **Animal Feed Science and Technology**, v. 166-167, p. 59–64, 2011.

ÁVILA, S. C. et al. Impact of a tannin extract on digestibility, ruminal fermentation and duodenal flow of amino acids in steers fed maize silage and concentrate containing soybean meal or canola meal as protein source. **The Journal of Agricultural Science**, v. 153, n. 05, p. 943–953, 2015.

BOADI, D. et al. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: Update review. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 84, n. 3, p. 319–335, set. 2004.

CARULLA, J. E. et al. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 56, n. 9, p. 961–970, 2005.

FONSECA, L. et al. Management targets for maximising the short-term herbage intake rate of cattle grazing in *Sorghum bicolor*. **Livestock Science**, v. 145, n. 1-3, p. 205–211, maio 2012.

GRAINGER, C. et al. Potential use of *Acacia mearnsii* condensed tannins to reduce methane emissions and nitrogen excretion from grazing dairy cows. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 84, n. 2, p. 241–251, 2009.

GRIFFITHS, W. M. et al. Supplementing lactating dairy cows fed high-quality pasture with black wattle (*Acacia mearnsii*) tannin. **Animal**, v. 7, n. 11, p. 1789–1795, 30 nov. 2013.

JAYANEGARA, A.; LEIBER, F.; KREUZER, M. Meta-analysis of the relationship between dietary tannin level and methane formation in ruminants from in vivo and in vitro experiments. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 96, n. 3, p. 365–75, jun. 2012.

LESSCHEN, J. P. et al. Greenhouse gas emission profiles of European livestock sectors. **Animal Feed Science and Technology**, v. 166-167, p. 16–28, jun. 2011.

MAYES, R. W.; LAMB, C. S.; COLGROVE, P. M. The use of dosed an herbage n-alkanes as markers for determination of herbage intake. **Journal of Agriculture Science**, v.107, p.161-170, 1986.

MCTI. **Estimativas anuais de emissões de gases de efeito estufa no Brasil**. 2. ed. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, 2014.

NOUSIAINEN, J.; SHINGFIELD, K. J.; HUHTANEN, P. Evaluation of milk urea nitrogen as a diagnostic of protein feeding. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 386–398, 2004.

ORLANDI, T. et al. Digestibility, ruminal fermentation and duodenal flux of amino acids in steers fed grass forage plus concentrate containing increasing levels of *Acacia mearnsii* tannin extract. **Animal Feed Science and Technology**, v. 210, p. 37–45, 2015.

PATRA, A. K.; SAXENA, J. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 1, p. 24–37, 15 jan. 2011.

REIST, M. et al. Estimation of energy balance at the individual

and herd level using blood and milk traits in high-yielding dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 12, p. 3314–3327, 2002.

SZCZECOWIAK, J. et al. Rumen fermentation, methane concentration and fatty acid proportion in the rumen and milk of dairy cows fed condensed tannin and/or fish-soybean oils blend. **Animal Feed Science and Technology**, v. 216, p. 93–107, jun. 2016.

VALADARES FILHO, S.C., et al. **CQBAL 3.0**. Tabelas Brasileiras de Composição de Alimentos para Bovinos. Disponível em www.ufv.br/cqbal. Acesso em Junho de 2016..

WAGHORN, G. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production—Progress and challenges. **Animal Feed Science and Technology**, v. 147, n. 1-3, p. 116–139, nov. 2008.

WAGHORN, G. C. et al. The effect of condensed tannins on the site of digestion of amino acids and other nutrients in sheep fed on *Lotus corniculatus* L. **The British journal of nutrition**, v. 57, n. 1, p. 115–26, jan. 1987.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta tese tem como objetivos quantificar as emissões de N_2O advindas das fezes e urina de vacas em pastos de clima temperado e investigar alternativas para promover o desempenho animal, bem como reduzir as emissões de N_2O e CH_4 , sem prejuízo ao potencial produtivo de vacas leiteiras.

Os resultados do primeiro artigo sugerem que o manejo nutricional de vacas leiteiras com o objetivo de aumentar a eficiência do uso do N alimentar, reduzindo a excreção urinária de N, pode contribuir na redução das emissões de N_2O . Uma das principais estratégias nutricionais para reduzir a emissão de N_2O por bovinos seria a melhoria na relação N: energia (DIJKSTRA et al., 2013). Além disso, também são citadas como alternativas a redução da degradação ruminal da proteína alimentar e o aumento na concentração mineral da dieta para aumentar o volume urinário. Estas estratégias nutricionais diminuem a concentração de N na urina o que reduziria o potencial de emissão de N_2O . Os resultados apresentados ao longo da tese demonstram que vacas com potencial médio de produção (≈ 20 kg leite dia^{-1}) em pastagem de boa qualidade, podem melhorar seu desempenho produtivo e reduzir a excreção de ureia no leite com a oferta de suplementação energética.

Recentes trabalhos utilizando extrato tanífero de *Acacia mearnsii* na dieta de novilhos da raça Holandês, demonstraram que a inclusão de baixos níveis de tanino na dieta pode reduzir as excreções de N na urina e maior eficiência da utilização do N alimentar (ÁVILA et al., 2015; ORLANDI et al., 2015). Porém, os valores de N ureico no leite, bem como os de produção e composição do leite observados nos experimentos conduzidos nesta tese, não indicam que a inclusão do extrato tanífero de *Acacia mearnsii* tenha afetado o desempenho produtivo ou eficiência da utilização do N alimentar. Quanto a emissão de CH_4 , os resultados da tese demonstram que a inclusão de extrato tanífero de *Acacia mearnsii* na dieta de vacas leiteiras, mesmo

que em níveis baixos ($< 20\text{g kg}^{-1}\text{MS}$), tem importante potencial mitigador da emissão de metano sem deprimir o consumo e o desempenho produtivo dos animais.

7.1 REFERÊNCIAS

ÁVILA, S. C. et al. Impact of a tannin extract on digestibility, ruminal fermentation and duodenal flow of amino acids in steers fed maize silage and concentrate containing soybean meal or canola meal as protein source. **The Journal of Agricultural Science**, v. 153, n. 05, p. 943–953, 2015.

CLARK, H.; PINARES-PATINO, C.; DEKLEIN, C. Methane and nitrous oxide emissions from grazed grasslands. **Grassland: A Global Resource**, n. May, p. 279–293, 2005.

DIJKSTRA, J. et al. Diet effects on urine composition of cattle and N_2O emissions. **Animal**, v. 7, n. 2, p. 292–302, 2013.

ORLANDI, T. et al. Digestibility, ruminal fermentation and duodenal flux of amino acids in steers fed grass forage plus concentrate containing increasing levels of *Acacia mearnsii* tannin extract. **Animal Feed Science and Technology**, v. 210, p. 37–45, 2015.