

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

Simón Pérez Márquez

***Tithonia diversifolia*: uso na nutrição e potencial para redução de emissões de gases de efeito estufa em ovinos**

Belo Horizonte

2022

Simón Pérez Márquez

***Tithonia diversifolia*: uso na nutrição e potencial para redução de emissões de gases de efeito estufa em ovinos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Zootecnia

Area de concentração: Produção Animal

Orientador: Prof. Rogério Martins Maurício

Co-orientadores: Prof. Adibe Luiz Abdalla e Profª. Ângela Maria Quintão Lana

Belo Horizonte

2022

Ficha Catalográfica

M357t

Marquez, Simon Perez, 1988-

Tithonia diversifolia: uso na nutrição e potencial para redução de emissões de gases de efeito estufa em ovinos / Simon Perez Marquez . – 2022.

121f.: il.

Orientador: Rogério Martins Mauricio

Coorientadores: Adibe Luiz Abdalla

Ângela Maria Quintão Lana

Tese (Doutorado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

Área de concentração: Produção animal.

Bibliografias: f. 116 a 121.

CDD – 636.085

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais



ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
Av. Antônio Carlos 6627 - CP 567 - CEP 30123-970 - Belo Horizonte- MG
TELEFONE (31)-3 409-2173

www.vet.ufmg.br/academicos/pos-graduacao
E-mail: cpgzootec@vet.ufmg.br

ATA DE DEFESA DE TESE DO ALUNO SIMÓN PÉREZ MÁRQUEZ

As 14:00 horas do dia 23 de fevereiro de 2022, reuniu-se, remotamente, a Comissão Examinadora de Tese, indicada pelo colegiado no dia 26/11/2021, para julgar, em exame final, a defesa da tese intitulada:

Tithonia diversifolia: uso na nutrição e potencial para redução de emissões de gases de efeito estufa em ovinos

_____, como requisito final para a obtenção do Grau de **Doutor em Zootecnia, área de concentração Produção Animal**

Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Rogério Martins Mauricio, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares da Defesa de Tese, passou a palavra ao (a) candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato (a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento da tese, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

	Aprovada	Reprovada
Prof.(a)/Dr.(a) Ana Luiza Costas Cruz Borges	x	<input type="checkbox"/>
Prof.(a)/Dr.(a) Iran Borges	x	<input type="checkbox"/>
Prof.(a)/Dr.(a) Luciano Fernandes Souza	x	<input type="checkbox"/>
Prof.(a)/Dr.(a) Thierry Riberio Tomich	x	<input type="checkbox"/>
Prof.(a)/Dr.(a) Rogerio Martins Mauricio	x	<input type="checkbox"/>

Pelas indicações, o (a) candidato (a) foi considerado (a): Aprovado (a)

Reprovado (a)

Para concluir o Doutorado, o(a) candidato(a) deverá entregar 03 volumes encadernados da versão final da tese acatando, se houver, as modificações sugeridas pela banca, e a comprovação de submissão de pelo menos um artigo científico em periódico recomendado pelo Colegiado dos Cursos. Para tanto terá o prazo máximo de 60 dias a contar da data defesa.

O resultado final, foi comunicado publicamente ao (a) candidato (a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora e encaminhada juntamente com um exemplar da tese apresentada para defesa.

Belo Horizonte, 23 de fevereiro de 2022.

Assinatura dos membros da banca:

Doutorado/Atadefesa.doc

Aos meus pais, Myriam e Guillermo, pelo amor e sabedoria. A Diana, que fez tudo isto muito menos difícil.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A minha mãe (Myriam Márquez) por sempre colocar a minha educação como uma prioridade na vida dela, A meu pai (Guillermo Pérez) por me ensinar a ser como um pêndulo, tocar os extremos, mas nunca ficar neles. Ao meu irmão (Juan David Morales) quem me inspirou a seguir essa carreira. A minha namorada (Diana Gavéria) por estar ao meu lado mesmo na distância. A todos meus familiares e amigos na Colômbia pela contribuição para me tornar o que hoje eu sou.

Ao Brasil, a Universidade Federal de Minas Gerais e ao Departamento de Zootecnia por ter um sistema educativo fantástico cheio de ótimos profissionais que me acolheram.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), pela infraestrutura e apoio fornecidos para realização desta pesquisa.

A coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo e auxílio financeiro para suporte da pesquisa (Processo nº 88882.380650/2019-0).

Aos meus orientadores, Prof. Rogério Martins Maurício e Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla pela orientação, PACIÊNCIA, ensinamentos e amizade. A minha coorientadora, professora Dra. Ângela Maria Quintão Lana, por suas contribuições e ajuda durante meu breve tempo na UFMG e fora dela. Ao professor Dr. Helder Louvadini pela paciência, colaboração e disponibilização do laboratório.

A fundação CIPAV, ao Enrique Murgueitio, Fernando Uribe, Carlos Mejia, Julián Chara e Julián Giraldo, por me brindar a oportunidade de trabalhar com eles, contribuir com a pecuária sustentável na Colômbia e por ser um dos meus primeiros passos na pesquisa. A todo o pessoal do CIPAV por me brindar a sua amizade.

Ao professor Dr. Julio Ernesto Vargas da Universidade de Caldas, quem foi o meu orientador durante a graduação e me ensinou como começar a ser um pesquisador.

Aos funcionários do laboratório de nutrição animal no CENA, Maria Regina, Lécio, Karinna, Francisco pela paciência e suporte que me deram, sempre dispostos a ajudar.

Aos funcionários da pós-graduação do CENA e da UFMG.

A todos meus amigos da UFMG, Daniela, Liliana, Hebiene, Paulo, Pedro, Vanessa, a todos os membros de GPAS. A dona Neide minha mãe brasileira, quem me recebeu na sua casa quando cheguei em Brasil pela primeira vez. Ao Rafael que é o meu irmão do mesmo orientador. Ao Mauroni e o pessoal da fazenda Monalisa. Ao Vagner, Vanessa, Felipe e Alessandro os que considero a minha família aqui em Brasil. Aos meus colegas e amigos do laboratório de nutrição animal, Paulo, Ana, Beatriz, Lumena, Camila, Adibinho, Alyce, Murilo, Thiago, Patricia, Suzana.

Aos estagiários do CENA, Weidy, Mayara, Rafaela, Rebecca, Miguel, Isabela, Pedro, Vivian, Gabriela, por me ajudar durante o experimento e lavar os vidros que eu não queria lavar.

A Carolina que é quase minha irmã e aos meus amigos Colombianos em Piracicaba, que me ajudaram a matar as saudades do país.

E último, mas não menos importante, agradeço a minha própria pessoa, me agradeço por acreditar em mim, por fazer todo esse trabalho duro, por não desistir.

A todos mil gracias.

“Grande coisa...estudando qualquer um sabe.”

Roberto Gómez Bolaños

Resumo

A produção de alimento de origem animal contribui com cerca de 14,5% do total das emissões humanas; e as emissões entéricas e a produção de alimento concentrado para os animais representam o 85% da contribuição dentro do setor. A utilização de alternativas de alimentação animal que não compitam por recursos com a alimentação humana são necessárias para a sustentabilidade do setor pecuário. Objetivou-se avaliar a influência de *Tithonia diversifolia* (TD), uma forrageira arbustiva (*Asteracea*), com potencial para a alimentação de ruminantes e mitigação de emissões entéricas, nas emissões de CH₄, CO₂, N₂O, NH₃ e parâmetros fermentativos de ovinos alimentados a base de farelo de soja, grão de milho e feno de tifton 85. Primeiramente, avaliou-se *in vitro* a influência da inclusão de níveis crescentes de TD (0, 9, 27 e 45% base MS) em dietas 60:40 (volumoso:concentrado) substituindo unicamente o volumoso, sobre a produção de gases e produção de metano (CH₄), degradabilidade da matéria orgânica (OMD) síntese de biomassa microbiana e parâmetros fermentativos em cinco tempos de incubação. Não houve efeito significativo ($P > 0,05$) entre a inclusão TD e a produção de gases *in vitro* na maioria dos tempos de incubação; somente às 6h de incubação, a produção de gases tendeu a aumentar linearmente com a inclusão de TD ($p < 0,05$). Não houve efeitos da inclusão de TD na produção de CH₄ (mL/gMOD). A DMO aumentou linearmente com a inclusão de TD as 6 e 10 h. O TD45% foi mais degradável do que a dieta controle a 6 h unicamente. Houve uma regressão positiva ($p < 0,05$) entre a inclusão TD e o fator de partição (FP). O TD45% apresentou valores de FP significativamente maiores do que o controle. A biomassa microbiana (BM) também aumentou linearmente ($p < 0,05$) com a inclusão. Avaliou-se também a influência das dietas já descritas sobre as emissões de CH₄, CO₂, N₂O, NH₃, digestibilidade aparente, balanço de nitrogênio e parâmetros fermentativos ruminais de ovinos machos adultos. A inclusão de TD não alterou as emissões de gases pelos carneiros, nem o consumo de MS, MO, PB ou FDN, mas o consumo de FDA aumentou com a maior inclusão de TD. A digestibilidade da MS, MO, FDN e FDA foi significativamente inferior nas dietas com 27 e 45% de TD. Não houve efeito significativo da TD sobre a digestibilidade da proteína, o balanço do nitrogênio, nem na produção de Ácidos graxos de cadeia curta. A concentração de nitrogênio amoniacal diminuiu com a inclusão de TD e as concentrações de isovalerato e isobutirato aumentaram nos animais alimentados com o maior conteúdo de TD. Os resultados deste estudo *in vivo* corroboraram alguns dos resultados obtidos *in vitro*, porém, o poder preditivo a partir do experimento *in vitro* foi baixo. De maneira similar ao que foi encontrado no experimento *in vitro*, nas condições e proporções aqui avaliadas a inclusão de TD não teve influência sobre as emissões de CH₄, CO₂, N₂O e NH₃. Entretanto, inclusão da planta na dieta de ovinos teve efeitos positivos sobre as dinâmicas da degradação da proteína no rúmen sem efeitos relevantes sobre a excreção e emissão de nitrogênio.

Palavras-Chave: gases de efeito estufa, produção de gases *in vitro*, ovelhas

Abstract

The production of food of animal origin contributes with about 14.5% of the total antropogenic greenhouse gas emissions; with enteric emissions and the production of concentrated feed for animals representing 85% of the contribution within the sector. The use of animal feed alternatives that do not compete for resources with human food are necessary for the sustainability of the livestock sector. The objective was to evaluate the influence of *Tithonia diversifolia* (TD), a shrub forage (*Asteracea*), with potential for feeding ruminants and mitigating enteric emissions, on CH₄ CO₂, N₂O, NH₃ emissions and fermentative parameters of sheep fed of soybean meal, corn grain and tifton 85 hay. First, the *in vitro* influence of the inclusion of increasing levels of TD (0, 9, 27 and 45% DM basis) in 60:40 diets (roughage: concentrate) was evaluated on the *in vitro* gas production (IVGP), CH₄ production, degradability of organic matter (OMD), microbial biomass synthesis (MB) and fermentative parameters at five incubation times (2, 6, 10, 24 and 96 hours). There was no significant effect ($P>0.05$) between TD inclusion and IVGP at most incubation times; only at 6h of incubation, the IVGP increased linearly with the inclusion of TD ($P<0.05$). There were no effects of TD inclusion on CH₄ production (mL/gDOM). OMD increased linearly with the inclusion of TD at 6 and 10 h. The TD45% was more degradable than the control diet at 6 h alone. There was a positive regression ($p<0.05$) between the TD inclusion and the partition factor. The TD45% showed significantly higher PF values than the control. MB also increased linearly ($P<0.05$) with the TD inclusion. The influence of the diets on *in vivo* CH₄ CO₂, N₂O, NH₃ emissions, apparent digestibility, nitrogen balance and ruminal fermentation parameters of adult male sheep was also evaluated. The inclusion of TD did not influenced the gas emissions by the sheep, nor the intake of DM, MO, CP or NDF, nonetheless, the ADF intake increased ($P<0.05$) with the TD inclusion. The digestibility of DM, OM, NDF and ADF was significantly lower ($P<0.05$) in diets with 27 and 45% TD. There was no significant effect of TD on protein digestibility, nitrogen balance, or on the production of short chain fatty acids. The concentration of ammonia nitrogen decreased with the inclusion of TD and the concentrations of isovalerate and isobutyrate increased in animals fed with the highest content of TD. The results of this *in vivo* study corroborated some of the results obtained *in vitro*, however, the predictive power from the *in vitro* experiment was low. Similar to what was found in the *in vitro* experiment, the inclusion of TD had no influence on CH₄, CO₂, N₂O and NH₃ emissions. However, inclusion of the plant in the diet of sheep had positive effects on the dynamics of protein degradation in the rumen without relevant effects on nitrogen excretion and emission.

Key-words: greenhouse gas emissions, *in vitro* gas production, sheep,

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Hipóteses	15
1.2	Objetivos	15
1.3	Objetivos específicos.....	16
1.4	Referencias.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	Gases de efeito estufa na pecuária.....	20
2.2	Metano de origem entérica.....	23
2.3	Degradação do metano entérico na atmosfera.....	25
2.4	Óxido nitroso na excreta bovina.....	25
2.5	Degradação do óxido nitroso na atmosfera	26
2.6	Nitrogênio nas fezes e urina	27
2.7	Métodos para a mensuração de gases de efeito estufa em ruminantes.....	27
2.7.1	Métodos <i>in vitro</i>	28
2.7.2	Métodos <i>in vivo</i>	28
2.7.3	Uso de câmaras respirométricas	29
2.7.4	Emprego de elementos ou substâncias traçadoras.....	29
2.7.5	Método <i>Greenfeed</i> ®.....	30
2.7.6	Medições a campo aberto.....	30
2.8	Relevância da biomassa vegetal na nutrição de ruminantes.....	30
2.8.1	<i>Tithonia diversifolia</i>	32
2.8.2	<i>Tithonia diversifolia</i> e produção de metano	35
2.8.3	<i>Tithonia diversifolia</i> e emissões de óxido nitroso	40
2.9	Referências Bibliográficas	45
3	A INCLUSÃO DE <i>Tithonia diversifolia</i> PODE MELHORAR A SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA DE DIETAS PARA OVINOS?.....	56
3.1	Introdução	58
3.2	Material e métodos.....	59
3.2.1	Substratos e tratamentos.....	59
3.2.2	Ensaio <i>in vitro</i> e produção de gases	61
3.2.3	Determinação de metano.....	62
3.2.4	Degradabilidade <i>in vitro</i>	62
3.2.5	Parâmetros fermentativos.....	62
3.2.6	Seleção do modelo matemático para avaliação da cinética fermentativa.....	63
3.2.7	Avaliação e seleção dos modelos estatísticos de cinética de fermentação	64
3.2.8	Análise estatística.....	67
3.3	Resultados	68

3.3.1	Composição química	68
3.3.2	Atributos estimados da cinética de fermentação <i>in vitro</i>	69
3.3.3	Fenóis e Taninos Totais.....	70
3.3.4	Produção de gases <i>in vitro</i>	70
3.3.5	Degradabilidade <i>in vitro</i> da matéria orgânica	71
3.3.6	Produção de metano <i>in vitro</i>	71
3.3.7	Parâmetros da fermentação ruminal	72
3.4	Discussão.....	77
3.4.1	Modelos de produção de gases <i>in vitro</i>	77
3.4.2	Ações dos fenóis e taninos totais na degradação <i>in vitro</i>	78
3.4.3	Produção de gases, metano, degradabilidade e parâmetros da fermentação	79
3.4.4	Síntese de proteína microbiana.....	82
3.5	Conclusão	84
3.6	Referencias.....	84
4	EFEITOS DE NÍVEIS CRESCENTES DE <i>Tithonia diversifolia</i> , SOBRE A DIGESTIBILIDADE DOS NUTRIENTES, FERMENTAÇÃO RUMINAL E EMISSÕES DE CO ₂ , CH ₄ , N ₂ O E NH ₃ DE OVINOS.....	93
4.1	Introdução	95
4.2	Materials e métodos	96
4.2.1	Local e declaração ao comitê de ética deste estudo	96
4.2.2	Composição química e dos componentes e da dieta experimental.....	96
4.2.3	Animais	98
4.2.4	Ensaio de metabolismo.....	98
4.2.5	Coleta de urina	99
4.2.6	Balanço do nitrogênio	99
4.2.7	Câmaras respirométricas	100
4.2.8	Cálculos para determinação das emissões.....	101
4.2.9	Taxas de emissão diária de gases	102
4.2.10	Parâmetros da fermentação ruminal	102
4.2.11	Análise estatística.....	102
4.3	Resultados	103
4.3.1	Consumo e digestibilidade aparente.....	103
4.3.2	Balanço de nitrogênio.....	104
4.3.3	Parâmetros fermentativos ruminais	105
4.3.4	Emissões de CO ₂ , CH ₄ , N ₂ O e NH ₃	105
4.4	Discussão.....	109
4.4.1	Perfis temporais de emissão de gases.....	113
4.5	Conclusão.....	114

5	CONSIDERAÇÕES E IMPLICAÇÕES.....	115
5.1.1	<i>in vitro</i> vs <i>in vivo</i>	115
5.2	REFERÊNCIAS.....	117

1 INTRODUÇÃO

Os gases de efeito estufa

Os gases de efeito estufa (GEE) são aqueles que se encontram na atmosfera terrestre, e tem a capacidade de absorver e refletir a radiação infravermelha emitida pela superfície da terra. Os principais gases de efeito estufa, devido a sua maior concentração na atmosfera, são: o vapor de água (H₂O), o dióxido de carbono (CO₂), o metano (CH₄), o óxido nitroso (N₂O) e o ozônio (O₃) (van Diemen, 2019). A presença de GEE na atmosfera em concentrações adequadas é necessária para suportar a vida; eles evitam que o calor gerado pela radiação solar escape da terra e permitem que a atmosfera se mantenha em uma temperatura adequada para o desenvolvimento das atividades biológicas (IPCC, 1990; NASA, 2022). Porém, o acúmulo excessivo de GEE na atmosfera pode levar ao aumento na temperatura da terra ao longo prazo, efeito este conhecido como aquecimento global. Além de alguns halocarbonos produzidos inteiramente pelos humanos, a maioria dos GEE tem como origem fontes tanto naturais quanto antropogênicas. Dentre as principais atividades humanas, com relevância agropecuária, que contribuem para a acumulação de GEE na atmosfera merecem destaque a queima de combustíveis fósseis para produzir energia ou calor, que emitem principalmente CO₂ e CH₄. Acrescenta-se as emissões de CH₄ produto da fermentação entérica, a produção de arroz, a produção dos grandes reservatórios de água e as emissões de N₂O produto da fertilização nitrogenada de cultivos e da nitrificação e desnitrificação do nitrogênio nas fezes e urina dos animais (IPCC, 2019)

O impacto dos GEE no ambiente está definido pelo seu potencial de aquecimento global “*Global Warming Potential*” (GWP) que leva em conta tanto, a capacidade do gás de absorver a radiação, quanto o tempo de vida do gás na atmosfera (IPCC, 2019). O GWP é uma medida relativa que compara o potencial do gás em questão com a mesma quantidade de dióxido de carbono (com GWP =1). O metano tem um GWP 21 vezes maior do que o carbono para um período de 100 anos e o óxido nitroso tem um GWP de 310. O GWP é usado para converter os volumes de gás emitido para equivalentes de dióxido de carbono (CO₂e); uma medida comum para medir os efeitos climáticos dos diferentes gases. Para uma determinada quantidade de qualquer gás, o CO₂e é a quantidade de CO₂ que aqueceria a terra tanto quanto o gás em questão (IPCC, 2019).

Por que é importante avaliar os GEE na pecuária?

Um aumento de 4°C na temperatura média da terra, consequência da acumulação excessiva de GEE, poderia causar incrementos na frequência e intensidade de calores extremos, precipitações fortes, secas, ciclones tropicais, assim como reduções no gelo ártico (IPCC, 2021).

As atividades agropecuárias emitem uma parte substancial dos GEE. No mundo, o setor contribui com entre o 21 a 37 % do total de emissões antropogênicas (Gerber *et al.*, 2013; Tilman & Clark, 2014). De 9 a 14% das emissões totais são emitidas antes de chegar à propriedade agrícola, 5 a 14% das emissões totais são atribuídas pelo uso e mudanças no uso da terra e 5 a 10% das emissões globais correspondem ao emitido do limite da propriedade para fora, relacionado ao transporte e processamento dos produtos finais. Para dar um pouco de perspectiva, no mundo, as emissões provindas do setor energético estão em torno ao 25%, a indústria emite 21%, o setor de transporte 14% e o setor de construção 6,4% (IPCC, 2014).

A produção de alimento de origem animal contribui com cerca do 14,5% do total das emissões humanas; e as emissões entéricas e da produção e manufatura do concentrado para os animais representam o 85% da contribuição dentro do setor (Gerber *et al.*, 2013; GLEAM, 2018; Herrero *et al.*, 2016; Smith *et al.*, 2013) Essa contribuição acarreta que a proteína animal provinda dos ruminantes tenha uma intensidade de emissão média particularmente alta, (250 kg de CO₂e são emitidos para produzir 1 kg de proteína de carne de ruminante) se a compararmos com as emissões necessárias para produzir 1 kg de proteína de origem vegetal (20-30 kg CO₂e) ou de outros animais (55, 35 e 31 kg CO₂e para suínos, frango de corte e galinha de ovos, respectivamente) (Carlson *et al.*, 2017; GLEAM, 2018; Poore e Nemecek, 2018).

Porém, no caso da proteína de origem animal, particularmente a de ruminante, existe uma ampla brecha na intensidade de emissão entre os produtores com as maiores (~389 kg CO₂e/kg proteína) e menores emissões (~53 kg CO₂e/kg proteína) (GLEAM, 2018); o que evidência que é possível produzir proteína animal de maneira eficiente e de baixo impacto ambiental e revela que existe um grande potencial para melhorias dentro do setor.

Vários autores têm estimado que as emissões do setor pecuário reduziriam ostensivamente, sem alterar a produção, se as práticas produtivas de 10% dos produtores com as menores emissões fossem implementadas para cada região e sistema (Bajželj *et al.*, 2014; Gerber *et al.*, 2013; Poore e Nemecek, 2018). Entre as práticas identificadas como relevantes

para reduzir o impacto ambiental dos sistemas de ruminantes; usar menos alimento destinado aos humanos para alimentar animais, o aprimoramento das práticas de pastejo, e a introdução de forrageiras com sistemas radiculares profundos que permitam sequestrar carbono (Havlík *et al.*, 2014; Herrero *et al.*, 2016) são algumas selecionadas no presente estudo.

Por que avaliar novas plantas na alimentação de ruminantes?

Os ruminantes pastejam diversas forragens, podem comer feno, silagem e resíduos altamente fibrosos que não são aptos para a alimentação humana; e mesmo assim, se estima que o 214 milhões de toneladas de grãos são usadas para a alimentação de ruminantes por ano (Mottet *et al.*, 2017; Smith *et al.*, 2013). A utilização de alternativas de alimentação animal que não compitam por recursos com a alimentação humana é necessária para a sustentabilidade do setor. A introdução de forrageiras alternativas, a manipulação da dieta e o uso de aditivos têm sido identificadas como algumas das principais alternativas para a mitigação do CH₄ de origem entérico (Gerber *et al.*, 2013; Herrero *et al.*, 2016). Não só por médio da ação direta sobre a redução do metano entérico, mais também, por médios indiretos ao melhorar a eficiência alimentar e a produtividade animal. Melhorar a digestibilidade do alimento através do uso de resíduos de cultivos e pela suplementação de dietas com arbustos forrageiros e árvores localmente disponíveis, pode contribuir significativamente com a melhora do desempenho dos animais e a redução no uso de insumos externos, conseqüentemente, diminuindo a intensidade de emissão dos produtos finais (Gerber *et al.*, 2013; Herrero *et al.*, 2016).

*Porque utilizar *Tithonia diversifolia*?*

Tithonia diversifolia (TD) é uma planta (*Asteracea*) arbustiva com alto potencial para a alimentação de ruminantes. Já é usada de maneira rotineira em alguns países como Colômbia, Cuba e México e os seus efeitos positivos no desempenho animal já têm sido reportados (Mahecha *et al.*, 2008; Pazla *et al.*, 2021; Ribeiro *et al.*, 2015; Rivera *et al.*, 2016). É uma forrageira com uma ampla distribuição mundial e cresce de maneira natural no Brasil, é pouco exigente em fertilidade de solos, e tem sido reportada sua capacidade para se desenvolver em solos ácidos, acumular nutrientes, disponibilizar fósforo, reduzir o alumínio do solo e aumentar o seu pH (Adesodun *et al.*, 2010; Cong & Merckx, 2005; Ojeniyi *et al.*, 2012; Olivares *et al.*, 2002).

Vários autores têm reportado o potencial forrageiro da TD, (Mahecha & Rosales, 2005; Maurício *et al.*, 2017; Rivera *et al.*, 2016) devido ao seu valor nutricional, sua alta degradabilidade *in vitro* e sua influência no consumo de matéria seca. Assim como seu potencial para influir nas emissões de metano entéricas apesar de resultados contraditórios (Cardona-Iglesias *et al.*, 2019; Galindo *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2016; Rivera *et al.*, 2021; Terry *et al.*, 2016).

Assim, a utilização de *Tithonia diversifolia* como fonte principal de forragem ou mesmo de forma suplementar para ruminantes apresenta grande potencial para ajudar na mitigação do impacto ambiental do setor. Poucas pesquisas estão sendo desenvolvidas no Brasil com a utilização de *Tithonia diversifolia* nas emissões de metano entérico de ruminantes. Principalmente, avaliando a influência desta nas emissões de CO₂, NH₃ e N₂O de origem animal com o intuito de criar novas alternativas alimentares que promovam o equilíbrio entre a produção de ruminantes e o ambiente.

1.1 Hipóteses

A presença de TD em dietas de ovinos tem potencial para diminuir as emissões de CH₄, N₂O e NH₃ de origem animal. A presença de TD no rúmen pode reduzir a produção de metano ruminal de maneira indireta, modificando as populações de microrganismos em favor de bactérias que utilizam rotas metabólicas onde a produção de acetato e butirato seja menor e conseqüentemente a produção de CO₂ e CH₄ também.

Acrescenta-se que a presença de TD no rúmen também pode mitigar de maneira direta a produção de metano devido ao conteúdo de fenóis que reduziriam a presença de protozoários e conseqüentemente micro-organismos metanogênicos associados.

De maneira similar, a presença de TD no rúmen pode modificar as dinâmicas ruminais em favor de um uso mais eficiente do nitrogênio ruminal, reduzindo as perdas nas fezes e urina diminuindo assim as emissões de NH₃ e, por conseguinte, de N₂O.

1.2 Objetivos

Avaliar o impacto da inclusão de *Tithonia diversifolia* em dietas de ovinos sobre as emissões de GEE e sobre a dinâmica de fermentação ruminal.

1.3 Objetivos específicos

- Avaliar a influência da inclusão de TD na produção de gases, produção de metano, degradabilidade verdadeira e parâmetros fermentativos *in vitro*.
- Estimar a produção de CO₂, CH₄, N₂O, e NH₃ *in vivo* de ovinos alocados em câmaras de respiração.
- Avaliar a influência da inclusão de TD na digestibilidade aparente de ovinos.
- Avaliar a influência da inclusão de TD nos parâmetros fermentativos de ovinos (AGCC, N-NH₃ e protozoários).

1.4 Referencias

- Adesodun, J. K., Atayese, M. O., Agbaje, T. A., Osadiaye, B. A., Mafe, O. F., & Soretire, A. A. (2010). Phytoremediation Potentials of Sunflowers (*Tithonia diversifolia* and *Helianthus annuus*) for Metals in Soils Contaminated with Zinc and Lead Nitrates. *Water, Air, and Soil Pollution*, 207, 195–201. <https://doi.org/10.1007/s11270-009-0128-3>
- Bajželj, B., Richards, K. S., Allwood, J. M., Smith, P., Dennis, J. S., Curmi, E., & Gilligan, C. A. (2014). Importance of food-demand management for climate mitigation. *Nature Climate Change*, 4(10), 924–929. <https://doi.org/10.1038/nclimate2353>
- Cardona-Iglesias, J. L., Mahecha-Ledesma, L., & Angulo-Arizala, J. (2019). Methane estimation in cows grazing silvopastoral systems with *Tithonia diversifolia* a and supplemented with polyunsaturated fats. *FVC-LUZ, XXIX(2)*, 107–118.
- Carlson, K. M., Gerber, J. S., Mueller, N. D., Herrero, M., MacDonald, G. K., Brauman, K. A., Havlik, P., O’Connell, C. S., Johnson, J. A., Saatchi, S., & West, P. C. (2017). Greenhouse gas emissions intensity of global croplands. *Nature Climate Change*, 7(1), 63–68. <https://doi.org/10.1038/nclimate3158>
- Cong, P. T., & Merckx, R. (2005). Improving phosphorus availability in two upland soils of Vietnam using *Tithonia diversifolia* H. *Plant and Soil*, 269(1–2), 11–23. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-1791-1>
- Galindo, J., Gonzales, N., Sosa, A., Ruiz, T., Torres, V., Aldana, A. I., Diaz, H., Moreira, O., Sarduy, L., & Noda, A. C. (2011). Efecto de *tithonia diversifolia* (hemsl.) A. Gray (botón de oro) en la poblacion de protozoos y metanogénos ruminales en condiciones *in vitro*. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 45(1).
- Gerber, P. J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., Falcucci, A., & Tempio, G. (2013). *Tackling climate change through livestock - A global assessment of emissions and mitigation opportunities*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- GLEAM. (2018). *Global Livestock Environmental Assessment Model (GLEAM)*. <http://www.fao.org/gleam/results/en/>

- Havlík, P., Valin, H., Herrero, M., Obersteiner, M., Schmid, E., Rufino, M. C., Mosnier, A., Thornton, P. K., Böttcher, H., Conant, R. T., Frank, S., Fritz, S., Fuss, S., Kraxner, F., & Notenbaert, A. (2014). Climate change mitigation through livestock system transitions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(10), 3709–3714. <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.1308044111>
- Herrero, M., Henderson, B., Havlík, P., Thornton, P. K., Conant, R. T., Smith, P., Wirsenius, S., Hristov, A. N., Gerber, P., Gill, M., Butterbach-Bahl, K., Valin, H., Garnett, T., & Stehfest, E. (2016). Greenhouse gas mitigation potentials in the livestock sector. *Nature Climate Change*, *6*(5), 452–461. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nclimate2925>
- IPCC. (1990). *Climate Change: The IPCC Scientific Assessment* (J. T. Houghton, G. J. Jenkins, & J. J. Ephraums, Eds.). Cambridge University Press.
- IPCC. (2014). AR5 - Working Group 3, Mitigation of Climate Change - Contribution of Working Group III. In *Cambridge University Press*.
- IPCC. (2019). Climate Change and Land An IPCC Special Report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems. In P. R. Shukla, J. Skea, E. C. Buendia, V. Masson-Delmotte, H.-O. Pörtner, D. C. Roberts, P. Zhai, R. Slade, S. Connors, R. van Diemen, M. Ferrat, E. Haughey, S. Luz, S. Neogi, M. Pathak, J. Petzold, J. P. Pereira, P. Vyas, E. Huntley, ... J. Malley (Eds.), *IPCC*. www.ipcc.ch
- IPCC. (2021). *Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (V. Masson-Delmotte, P. Zhai, A. Pirani, S. L. Connors, C. Péan, S. Berger, N. Caud, Y. Chen, L. Goldfarb, M. L. Gomis, M. Huang, K. Leitzell, E. Lonnoy, J. B. R. Matthews, T. K. Maycock, T. Waterfield, O. Yelekçi, R. Yu, & B. Zhou, Eds.). Cambridge University Press.
- Mahecha, L., Escobar, J. P., Suarez, J. F., & Restrepo, L. F. (2008). Evaluación del Uso de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray ASTERACEAE, como Suplemento Forrajero de Vacas Cruzadas. In E. Murgueitio, C. A. Cuartas, & J. F. Naranjo (Eds.), *Ganadería del futuro: Investigación para el desarrollo* (p. 490). CIPAV.
- Mahecha, L., & Rosales, M. (2005). Valor nutricional del follaje de botón de oro *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray, en la producción animal en el trópico. *Livestock Research for Rural Development*, *17*. <http://www.lrrd.org/lrrd17/9/mahe17100.htm>
- Maurício, R. M., Calsavara, L. H. F., Ribeiro, R. S., Pereira, L. G. R., de Freitas, D. S., Paciullo, D. S. C., Barahona Rosales, R., Rivera, J. E., Chará, J., & Murgueitio, E. (2017). Feeding ruminants using *Tithonia diversifolia* as forage. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*, *5*(4). <https://doi.org/10.15406/jdvar.2017.05.00146>
- Mottet, A., de Haan, C., Falcucci, A., Tempio, G., Opio, C., & Gerber, P. (2017). Livestock: On our plates or eating at our table? A new analysis of the feed/food debate. *Global Food Security*, *14*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2017.01.001>
- NASA. (2022). *What is the greenhouse effect? – Climate Change: Vital Signs of the Planet*. <https://climate.nasa.gov/faq/19/what-is-the-greenhouse-effect/>

- Ojeniyi, S. O., Odedina, S. A., & Agbede, T. M. (2012). Soil productivity improving attributes of Mexican sunflower (*Tithonia diversifolia*) and siam weed (*Chromolaena odorata*). *Emirates Journal of Food and Agriculture*, *24*(3), 243–247.
- Olivares, E., Peña, E., & Aguiar, G. (2002). Metals and oxalate in *Tithonia diversifolia*(Asteraceae): concentrations in plants growing in contrasting soils, and Al induction of oxalate exudation by roots. *Journal of Plant Physiology*, *159*, 743–749. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1078/0176-1617-0751>
- Pazla, R., Adrizal, A., & Sriagtula, R. (2021). Intake, Nutrient Digestibility and Production Performance of Pesisir Cattle Fed *Tithonia diversifolia* and *Calliandra calothyrsus*-Based Rations with Different Protein and Energy Ratios. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, *9*(10), 527–534. <https://doi.org/10.17582/journal.aavs/2021/9.10.1608.1615>
- Poore, J., & Nemecek, T. (2018). Reducing food’s environmental impacts through producers and consumers. *Science*, *360*(6392), 987–992. <https://doi.org/https://doi.org/10.1126/science.aag0216>
- Ribeiro, R. S., Chaves, A. V., Terry, S. A., e Silveira, S. R., Sacramento, J. P., Delarota, G. D., de Freitas, D. S., Tomich, T. R., Ribeiro Pereira, L. G., & Maurício, R. M. (2015). The effects of *Tithonia diversifolia* on dairy cow performance. *XXIII International Grassland Congress IGC 2015.*, *973*, 24–26.
- Ribeiro, R. S., Terry, S. A., Sacramento, J. P., Silveira, S. R. E., Bento, C. B. P., da Silva, E. F., Mantovani, H. C., da Gama, M. A. S., Pereira, L. G. R., Tomich, T. R., Maurício, R. M., Chaves, A. V., Gama, M. A. S. da, Pereira, L. G. R., Tomich, T. R., Maurício, R. M., & Chaves, A. V. (2016). *Tithonia diversifolia* as a supplementary feed for dairy cows. *PLoS ONE*, *11*(12), e0165751. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165751>
- Rivera, J., Chará, J., Arango, J., & Barahona, R. (2021). Effect of different genotypes of *Tithonia diversifolia* on fermentation of feed mixtures with *Urochloa brizantha* cv. Marandú. *Crop and Pasture Science*, *72*(10), 850. <https://doi.org/10.1071/CP21102>
- Rivera, J., Chará, J., & Barahona, R. (2016). Análisis del ciclo de vida para la producción de leche bovina en un sistema silvopastoril intensivo y un sistema convencional en Colombia. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, *19*, 237–251. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93949148007>
- Smith, J., Sones, K., Grace, D., MacMillan, S., Tarawali, S., & Herrero, M. (2013). Beyond milk, meat, and eggs: Role of livestock in food and nutrition security. *Animal Frontiers*, *3*(1), 6–13. <https://doi.org/10.2527/af.2013-0002>
- Terry, S. A., Ribeiro, R. S., Freitas, D. S., Delarota, G. D., Pereira, L. G. R. R., Tomich, T. R., Maurício, R. M., & Chaves, A. v. (2016). Effects of *Tithonia diversifolia* on in vitro methane production and ruminal fermentation characteristics. *Animal Production Science*, *56*(3), 437–441. <https://doi.org/10.1071/AN15560>
- Tilman, D., & Clark, M. (2014). Global diets link environmental sustainability and human health. *Nature*, *515*(7528), 518–522. <https://doi.org/10.1038/nature13959>
- van Diemen, R. (2019). Annex I: Glossary. In P. R. Shukla, J. Skea, E. Calvo Buendia, V. Masson-Delmotte, H.-O. Pörtner, D. C. Roberts, P. Zhai, R. Slade, S. Connors, R. van

Diemen, M. Ferrat, E. Haughey, S. Luz, S. Neogi, M. Pathak, J. Petzold, J. Portugal Pereira, P. Vyas, Huntley E., ... J. Malley (Eds.), *Climate Change and Land: an IPCC special report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gases de efeito estufa na pecuária

A maior parte dos gases de efeito estufa (GEE) emitidos na pecuária tem com origem quatro fontes principais (Gerber *et al.*, 2013): fermentação entérica, esterco, produção de alimentos e uso/consumo de energia.

No caso da fermentação entérica, o principal gás emitido é metano (CH_4), subproduto da fermentação dos carboidratos no rúmen. Herrero *et al.* (2016) estimam que as emissões de CH_4 entérico representam o 39,1% do setor pecuário, entre 1,1 e 2,7 GtCO₂e. As emissões entéricas são a maior fonte de emissão pelos bovinos, representando o 46 e 43% das emissões totais da cadeia de suprimentos na bovinocultura de leite e de carne, respectivamente (Gerber *et al.*, 2013). Segundo o IPCC (2019a) para as condições regionais de América Latina, os fatores de emissão de CH_4 entérico para bovinos estão entre 55 e 103 kg de CH_4 por cabeça por ano sem diferenciar sistemas de leite ou carne de alta ou baixa produtividade e os fatores de emissão entérica para caprinos e ovinos variam de 5 a 9 kg de CH_4 por cabeça por ano.

No caso do esterco, os gases emitidos durante as diversas formas de utilização são o CH_4 e óxido nitroso (N_2O); o primeiro provém da decomposição anaeróbica da matéria orgânica e o segundo do nitrogênio presente no esterco e na urina (Gerber *et al.*, 2013; IPCC, 2019c). Herrero *et al.* (2016) estimaram que as emissões de CH_4 provindo do esterco estão em torno de 0,2 a 0,4 GtCO₂e ao ano e as emissões de N_2O da mesma fonte entre 0,2 e 0,5 GtCO₂e ao ano, isto representa entre o 7,1 a 12% das emissões do setor pecuário. Segundo estimativas do (IPCC, 2019a), para cada kg de matéria seca de esterco depositadas no solo podem ser emitidos entorno a 0,49 kg de CH_4 ; e para cada kg de nitrogênio de fezes e urina de ovelha depositado no solo, são emitidos entre 0,4 e 3,9 g de N_2O na atmosfera.

Os gases emitidos pela produção de alimentos para ruminantes podem ser CO_2 e N_2O ; as emissões de CO_2 se originam da expansão dos cultivos e/ou das pastagens sob áreas naturais (ex. desmatamento), e do uso dos combustíveis fósseis para a fabricação, processamento e transporte de fertilizantes e alimento até a propriedade. As emissões de N_2O são produto do uso dos fertilizantes (sintéticos ou orgânicos) na produção de alimento e da deposição direta do esterco e nas pastagens ou durante sua aplicação nos cultivos agrícolas. O GLEAM (2018) estimou que no processo de produção de alimentos para animais são emitidos aproximadamente 3,18 GtCO₂e (Tabela 2.1). Quer dizer que

aproximadamente o 45% das emissões do setor vem da produção de alimento para os animais. Nessa categoria, a produção de alimento para bovinos contribui com um pouco mais da metade das emissões (53,5%), seguido pelo alimento para a produção de aves com 19%, os suínos com 15%, búfalos com 6,3 % e ovelhas e cabras com 5,4%. Para todas as espécies ruminantes a maior contribuição é aportada pelas emissões de N₂O provindas da fertilização e deposição de estrume (32%), já para os não ruminantes a maior contribuição é feita pelo CO₂ emitido ao longo do processo de produção dos alimentos (45%) (transporte, lavoura, processamento do alimento, fabricação de fertilizantes).

Por último, as emissões produto do uso de energia, ocorrem ao longo da cadeia de suprimento, emitindo CO₂. A produção de fertilizantes e o uso de máquinas no manejo, colheita, processamento e transporte das culturas são os principais fatores nessa fonte. Também é consumida energia no local de produção animal tanto diretamente durante as operações mecanizadas ou indiretamente na construção de estruturas e utilização de equipamento. Porém, as emissões de CO₂ oriundas dessas últimas são consideradas insignificantes na pecuária de corte e muito baixas na pecuária de leite (8%). As emissões oriundas do transporte e consumo de energia durante o processamento dos produtos da propriedade também são consideradas nessa categoria (Gerber *et al.*, 2013). Herrero *et al.* (2016) estimaram que o CO₂ emitido na geração e uso da energia da produção animal no mundo, estão ao redor de 0,13 GtCO₂e, e as emissões de CO₂ provindas do processamento e transporte para fora da propriedade, entorno a 0,023 GtCO₂e.

Tabela 2.1. Emissões de gases de efeito estufa provindas da produção do alimento para o setor pecuário e contribuição de cada fonte de emissão dentro de cada espécie.

Especie Animal	Fontes de emissão de GEE						Total (GtCO ₂ eq)	Proporção dentro das espécies ^D
	^A CO ₂	^B CH ₄	Fertilizante, N ₂ O	Esterco, N ₂ O	MUT*: Soja e Palma, CO ₂	MUT*: expansão pastagem CO ₂		
Bovinos	20,8%		10,2%	43,6%	2,8%	22,7%	1,70	53,5%
Búfalos	39,3%		25,5%	34,2%	1,0%		0,20	6,4%
Ovinos	21,5%		11,0%	67,1%	0,5%		0,11	3,5%
Caprinos	33,3%		15,9%	50,6%	0,2%		0,06	2,0%
Suínos	47,1%	7,0%	20,6%	7,1%	18,1%		0,49	15,3%
Aves	43,4%	0,6%	18,4%	10,6%	27,1%		0,61	19,2%
Total (GtCO ₂ eq)	0,97	0,04	0,46	1,02	0,30	0,39	3,18	
Proporção dentro das fontes ^C	30,6%	1,2%	14,5%	32,0%	9,5%	12,2%		

*MUT: Mudanças no uso da terra.

^A: Emissões de CO₂ produto do combustível e uso de energia elétrica durante o processo de produção e manufatura do alimento.

^B: Emissões de CH₄ produto do uso de arroz como insumo para alimentação de monogástricos.

^C: Contribuição das fontes para o total das emissões da produção de alimento

^D: Contribuição das espécies para o total das emissões da produção de alimento

Dados obtidos em GLEAM (2018)

2.2 Metano de origem entérica

De maneira geral a produção de CH₄ no rúmen poderia ser considerada como um subproduto da degradação anaeróbia dos carboidratos por parte dos microrganismos ali presentes, que utilizam como fonte de substrato os produtos da fermentação de outros microrganismos. De maneira mais específica, a metanogênese no rúmen é considerada como um sumidouro de hidrogênio, o qual em excesso contribui com a acidificação do médio e altera a eficiência das dinâmicas ruminais (Church, 1979). A síntese de metano contribui para a eficiência do sistema ruminal na medida em que evita aumentos na pressão parcial de H₂ a níveis que podem inibir o funcionamento normal de enzimas microbianas envolvidas em reações de transferência de elétrons e reduzir significativamente a fermentação ruminal (Morgavi *et al.*, 2010).

A metanogênese ruminal se dá por três rotas principais: (1) a rota hidrogenotrófica, (2) a metilotrófica e (3) e a acetoclástica. Dependendo da rota utilizada os organismos metanogênicos do rúmen podem utilizar CO₂, H₂, ácido metanoico, compostos metilados e/ou acetato para a síntese de metano (Huws *et al.*, 2018; Morgavi *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2019).

Os organismos que utilizam a rota hidrogenotrófica usam principalmente hidrogênio para reduzir o CO₂ em CH₄, e existe consenso em que essa via representa a fonte da maior parte do metano produzido no rúmen (Greening *et al.*, 2019; Huws *et al.*, 2018; Morgavi *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2019). O uso de ácido metanoico em lugar de hidrogênio como substrato doador de elétrons também foi descrito em organismos hidrogenotróficos, e pode contribuir com o 18% do metano produzido no rúmen (Hungate, 1975). Os substratos usados pelos hidrogenotrofos têm origem na degradação dos carboidratos, proteínas e outros polímeros orgânicos em monômeros que posteriormente são convertidos em AGV, CO₂ e H₂ por fermentadores primários e secundários. Os metanógenos estão na base dessa cadeia trófica e usam os produtos finais dessa fermentação como substratos (Morgavi *et al.*, 2010). *Methanobrevibacter* é um dos microrganismos hidrogenotróficos mais comuns, outros gêneros são *Methanosphaera*, *Methanimicrococcus* e *Methanobacterium* (Greening *et al.*, 2019; Hook *et al.*, 2010).

A rota metilotrófica usa compostos metilados como substrato para a produção de CH₄, isto é, metilaminas e metanol, ambos produtos da degradação da parede celular, e é considerada a segunda rota metanogênica de importância no rúmen (Hook *et al.*, 2010; Morgavi *et al.*, 2010). As metilaminas (mono-, di- e tri-metilaminas) usadas como

substrato para a produção de metano pelos organismos metilotrópicos são o produto final da degradação da fosfatidilcolina (Kelly *et al.*, 2019), um fosfolípido de membrana componente da lecitina vegetal.

Por outro lado, o metanol, é considerado um produto da demetoxilação das pectinas. A pectina, um heteropolisacarídeo da membrana celular vegetal, possui um radical metil na sua estrutura química, o qual, via ação enzimática de pectina metil esterase (PME) e pectina liase (PL) pode ser degradado até metanol no rúmen (Kelly *et al.*, 2019). Alguns organismos metilotropicos são *Methanosarcinales*, *Methanosphaera* e *Methanomassiliicoccaceae* (Hook *et al.*, 2010; Kelly *et al.*, 2019). Morgavi *et al.* (2010) comentaram que a contribuição desses microrganismos para a produção de metano é provavelmente baixa dado que não são membros predominantes da população metanogênica; e é uma rota que parece ser mais ativa em ruminantes novos do que em animais maduros (Huws *et al.*, 2018).

A rota acetoclástica utiliza o acetato, produto da fermentação dos carboidratos, como substrato para a produção de metano, e é uma via que parece estar limitada aos metanogênicos da ordem *Methanosarcina* (Huws *et al.*, 2018; Morgavi *et al.*, 2010). Porém, estudos *in vivo* com acetato radio-marcado indicaram que a rota acetoclástica não é muito relevante na produção de metano ruminal e estudos *in vitro* mostraram que *Methanosarcina* tinha lento crescimento, o que sugere que em condições de taxa de passagem normais *Methanosarcina* não sobreviria (Morgavi *et al.*, 2010).

Apesar do grande impacto no ambiente, a metanogênese ruminal tem também grande relevância na eliminação do H₂ fermentativo do rúmen, e dado que a sua acumulação pode inibir o metabolismo dos microrganismos, e importante tomar cuidado com as metodologias utilizadas para reduzir a produção de metano no rúmen; particularmente com aquelas que reduzem as populações de metanogênicos, pois na sua ausência deve ser fornecida outra via para o descarte do excesso de hidrogênio (Greening *et al.*, 2019; Huws *et al.*, 2018; Morgavi *et al.*, 2010). Atenção deveria ser dada a alguns microrganismos como *Eubacterium*, *Blautia*, e *Acetivomaculum* os quais também utilizam H₂ como substrato, mas diferentemente dos metanogênicos, produzem acetato como produto final. A promoção da sua presença no rúmen tem sido sugerida como uma estratégia interessante para lidar com o hidrogênio em situações onde a presença de metanogênicos tem sido inibida (Greening *et al.*, 2019).

2.3 Degradação do metano entérico na atmosfera

Uma vez fora do rúmen, na atmosfera, o metano tem um potencial de aquecimento global (GWP₂₀) de 84 IPCC (2013) isto quer dizer que, em um período de 20 anos o metano captura 84 vezes mais calor por unidade de massa do que o dióxido de carbono.

O CH₄ é predominantemente destruído na troposfera durante reações de oxidação, iniciadas pelo radical hidroxila (OH) ali presente, produzindo como subprodutos, formaldeído, CO₂ e H₂O (Wahlen, 1993). A oxidação troposférica representa o maior sumidouro de metano do planeta e o processo leva entorno de 8 a 12 anos, ou 12,4 anos de vida média IPCC (2013). Assim, o metano tem um grande efeito no aquecimento global, mas por um período relativamente curto quando comparado com a vida média do N₂O (121 anos) (IPCC, 2013) ou do CO₂ que pode permanecer na atmosfera por períodos de entre 30 até milhares de anos (Archer *et al.*, 2009).

Vale a pena mencionar que o método de GWP está sendo desafiado por alguns autores que mencionam que esta estimativa superestima os impactos climáticos do metano dado que este é um poluente climático de vida curta (SLCP) (Lynch *et al.*, 2020). Assim Liu *et al.* (2021) mencionam que tem sido proposto o método alternativo de GWP* (GWP Estrela) como uma nova forma de aplicar o GWP aos poluentes de vida curta como o metano. O GWP* então considera os efeitos climáticos causados pelas emissões atuais de metano 4 vezes mais altos do que o GWP normal, porém, considera que a maior parte do metano produzido 20 anos atrás já têm sido removido (Liu *et al.*, 2021). Liu *et al.* (2021) também mencionaram que dado que o metano é um SLCP os impactos da diminuição da sua contribuição com o aquecimento global são evidentes mais rápido do que os outros GEE e atingir a neutralidade de emissão de CH₄ seria possível daqui a 20 anos se as emissões reduzissem 3% por ano.

2.4 Óxido nítrico na excreta bovina

As emissões de N₂O provindas de ruminantes são produto principalmente da conversão do nitrogênio orgânico, presente nas fezes e na urina, em amônia (NH₃) e em N₂O. A conversão é influenciada por fatores abióticos como temperatura, aeração e a umidade do solo (Rivera & Chará, 2021).

Existem três passos bem definidos no processo de formação de N₂O a partir do nitrogênio fecal e urinário: (1) mineralização, (2) nitrificação e (3) desnitrificação (Cai *et*

al., 2017). A maior parte deste nitrogênio está na sua forma orgânica, e antes de ser usada pelas plantas e microrganismos do solo, deve passar pelo processo de mineralização, que converte o N orgânico nas suas formas inorgânicas, principalmente através de processos de amonificação (formando amônio, NH_4^+) (Cai *et al.*, 2017; J. E. Rivera & Chará, 2021). A taxa de formação de amônio a partir da urina é maior do que aquela das fezes devido a que o nitrogênio nas fezes se encontra em níveis mais estáveis, e a que a urina se integra mais rapidamente no solo do que as fezes (Dong *et al.*, 2014).

Já no solo, o processo de nitrificação se dá quando o nitrogênio em forma de NH_4^+ é oxidado a nitrito (NO_2^-) e posteriormente a nitrato (NO_3^-) produzindo N_2O como subproduto. A nitrificação é um processo mediado por *Archeas* e bactérias que atuam nos processos de oxidação da amônia e o nitrito. O nitrato (NO_3^-) é posteriormente reduzido em nitrito (NO_2^-), monóxido de nitrogênio (NO), óxido nitroso (N_2O) e gás de nitrogênio (N_2) durante o processo de desnitrificação (Cai *et al.*, 2017). O processo de desnitrificação ocorre em condições onde o oxigênio é escasso, e os microrganismos desnitrificantes utilizam NO_3^- na respiração, usando carbono orgânico como fonte de energia. Devido a isto, a deposição de urina no solo tem um impacto maior na produção de N_2O , dado que incrementa o processo de desnitrificação devido ao aumento no conteúdo de umidade, limitando a difusão do oxigênio e disponibilizando mais NO_3^- e carbono lábil (Cai *et al.*, 2017; Rivera e Chará, 2021).

2.5 Degradação do óxido nitroso na atmosfera

A maior parte do óxido nitroso atmosférico é destruída pela reação com a luz e o oxigênio na estratosfera, nesse processo é convertido em N_2 , NO e O_2 que posteriormente podem ser captados pelas plantas, bactérias e depositado no solo (Vieira, 2017). A quebra das moléculas de óxido nitroso dessa forma resulta em uma vida média atmosférica de cerca de 121 anos (IPCC, 2013). O óxido nitroso é o terceiro GEE mais abundante e apesar de sua baixa concentração na atmosfera em comparação com CH_4 e CO_2 , o N_2O tem um efeito significativo no aquecimento global, pois tem 265 vezes maior potencial de aquecimento global do que o CO_2 (IPCC, 2013).

2.6 Nitrogênio nas fezes e urina

As principais áreas em que ocorrem perdas de nitrogênio em ruminantes incluem a excreção urinária de ureia sintetizada a partir da amônia que escapou do rúmen, a proteína microbiana verdadeira não digerida excretada nas fezes, os ácidos nucléicos microbianos sintetizados no rúmen e excretados principalmente na urina, e excreção fecal e urinária resultante de secreções endógenas (Dijkstra *et al.*, 2013).

Os ruminantes são conversores fracos de nitrogênio, porque apenas 5–30% do nitrogênio ingerido é absorvido pelo animal e os 70–95% restantes são excretados pelas fezes e urina (de Azevedo *et al.*, 2021; Rivera & Chará, 2021). Portanto, as cargas de nitrogênio nas excretas dos animais, muitas vezes excedem as demandas das plantas e são vulneráveis a perdas por meio de emissões gasosas e lixiviação (Rivera & Chará, 2021). Assim, animais alimentados com dietas com um conteúdo relativamente alto de N ou com uma relação energia / N desequilibrada podem ter perdas de nitrogênio na urina e nas fezes de até 80% da ingestão de nitrogênio (Azevedo *et al.*, 2021). Reduzir a produção de nitrogênio nas excretas dos ruminantes é fundamental para reduzir a volatilização de NH_3 e a emissão de N_2O e alcançar uma produção ambientalmente sustentável (Dijkstra *et al.*, 2013; Kozloski *et al.*, 2014; Rivera e Chará, 2021). Isto, somado ao fato de que a maior retenção de N da dieta pode contribuir para melhorar o desempenho produtivo do animal, representa uma vantagem significativa da melhoria na eficiência do nitrogênio consumido pelo animal. Durango *et al.* (2021) e de Azevedo *et al.*, (2021) reportaram melhoras na retenção de nitrogênio associado a incrementos no consumo de matéria seca e Durango *et al.* (2021) atestaram que a inclusão de leguminosas na dieta de ruminantes pode ter resultados positivos em termos de atividade microbiana e produtos finais da fermentação, o que pode contribuir para a melhoria do fluxo de nitrogênio nos ruminantes. Dijkstra *et al.* (2013) concluíram que estratégias alimentares para reduzir as perdas de nitrogênio deveriam estar focadas no fornecimento de nitrogênio degradável no rúmen e na eficiência da utilização dos aminoácidos absorvidos.

2.7 Métodos para a mensuração de gases de efeito estufa em ruminantes

Dados os compromissos internacionais para reduzir as emissões, o conhecimento sobre os métodos usados na quantificação de gases de efeito estufa é relevante. Diferentes métodos de quantificação de emissões existem, todos com diferentes condições de aplicação. Tanto métodos *in vivo* quanto *in vitro* podem ser usados para quantificar, ou

estimar, as emissões de metano pelos ruminantes. É importante conhecer as vantagens e desvantagens deles para entender as limitações de cada técnica e a sua influência na interpretação dos resultados.

2.7.1 Métodos *in vitro*

É caro usar e manter animais para propósitos científicos, assim, as técnicas *in vitro* são usadas frequentemente para explorar potenciais estratégias de mitigação de metano e também para o ranqueamento de estratégias de manejo (Getachew *et al.*, 1998; Makkar, 2004).

Na técnica *in vitro*, as rações estão sujeitas a diferentes tratamentos e são incubadas a 39°C com uma mistura de fluido ruminal e solução tamponante por um período determinado de tempo, usualmente 24, 48, 72, 96, ou 144 horas (Getachew *et al.*, 1998). A quantidade dos gases produzidos durante a incubação é mensurada e a sua composição analisada para obter dados sobre a produção *in vitro* de metano ou CO₂ (Storm *et al.*, 2012). As técnicas *in vitro* são muito úteis, como primeira abordagem para testar alimentos e aditivos potenciais ou quando são necessárias condições de incubação controladas (Hill *et al.*, 2016). Os resultados dos estudos *in vitro* podem então ser usados para otimizar experimentos maiores e mais caros com animais. Dentre as desvantagens das técnicas *in vitro* é que elas apenas simulam a fermentação ruminal da ração, não as emissões e digestibilidade por todo o animal (Storm *et al.*, 2012) e apesar de que existem técnicas como RUSITEC (Czerkawski & Breckenridge, 1977); onde é possível manter uma comunidade microbiana ruminal normal por períodos estendidos de tempo (+10 dias) (Makkar, 2004), alguns autores mencionam que em condições normais, as técnicas *in vitro* não incluem a adaptação dos microrganismos ruminais aos alimentos testados a longo prazo (Hill *et al.*, 2016; Storm *et al.*, 2012).

2.7.2 Métodos *in vivo*

Os estudos *in vivo* envolvem medição de metano em condições de biotério ou de produção, usualmente os animais ou somente a cabeça deles são fechados em câmaras de respiração, onde os gases que são emitidos podem ser colhidos e analisados, ou as emissões de áreas maiores onde os animais estão presentes são mensuradas utilizando

equipamentos de espectroscopia a laser e métodos micro-meteorológicos (Makkar & Vercoe, 2007).

2.7.3 Uso de câmaras respirométricas

O princípio de funcionamento das câmaras respirométricas é coletar todo ou parte do gás produzido pelo animal para depois medir a concentração de metano ou de outros gases (dependendo do analisador de gases). As emissões são calculadas a partir do fluxo e a concentração do ar e da concentração do gás dentro da câmara (Hill *et al.*, 2016; Makkar & Vercoe, 2007; Storm *et al.*, 2012). Com este método é possível realizar avaliações ao longo do dia para obter variações circadianas. A alteração no comportamento normal do animal (e o consumo de alimento) e o curto tempo de avaliação são as maiores desvantagens (Hill *et al.*, 2016; Makkar e Vercoe, 2007; Storm *et al.*, 2012).

2.7.4 Emprego de elementos ou substâncias traçadoras

O método dos gases traçadores permite reduzir as alterações no comportamento animal produto do confinamento em câmaras, dado que o animal pode ser avaliado enquanto pasteja livremente (Makkar & Vercoe, 2007) e segundo recentes estudos, as emissões não são influenciadas pelas condições climáticas e os equipamentos não alteram o comportamento dos animais (Moate *et al.*, 2021; Pereira *et al.*, 2021). O princípio do método é que a emissão de metano pode ser calculada se a taxa de emissão de um gás traçador, desde o rúmen é conhecida. Assim, a técnica utiliza usualmente SF₆ (Hexafluoreto de enxofre) como gás traçador acondicionado em capsulas permeáveis depositadas no rúmen do animal. O animal é equipado com cangas e tubos coletores que amostram o gás a uma taxa fixa. No final, os gases coletados são analisados por cromatografia e a proporção de CH₄/SF₆ permite saber a emissão de metano (Makkar & Vercoe, 2007). É uma técnica acurada, mas menos precisa do que as câmaras de respiração (della Rosa *et al.*, 2021; Storm *et al.*, 2012) e usa SF₆ que é um potente gás de efeito estufa (Hill *et al.*, 2016).

2.7.5 Método *Greenfeed*®

Nesse método os animais entram em um sistema de alimentação automático que os reconhece e mensura as emissões de CO₂ e CH₄ enquanto se alimentam. É um procedimento portátil que não restringe o movimento do animal e permite avaliar os padrões de emissão ao longo do dia. Porém, as mensurações são imprecisas se os animais permanecem menos de três minutos no cocho e se as visitas são infrequentes (della Rosa *et al.*, 2021; Hill *et al.*, 2016; Storm *et al.*, 2012).

2.7.6 Medições a campo aberto

A medição de emissões usando modelos micro meteorológicos são usadas para estimar as emissões em áreas abertas e de um grande grupo de animais (>30 cab/ha) em condições de pastejo sem influenciar o seu comportamento (Hill *et al.*, 2016). A metodologia é baseada em medições de vento, temperatura, e concentração dos gases para estimar as emissões usando modelos como *Eddy Covariance*, *Langrangian Stochastic*, Balanço de Massas e Gradientes de Fluxo (Hill *et al.*, 2016; Storm *et al.*, 2012). As desvantagens da técnica são a susceptibilidade à influência das condições microclimáticas (direção do vento, temperatura, pressão, chuva) (Hill *et al.*, 2016), e o registro de emissões indesejáveis que não tem como origem o animal (solo, transportes, edificações) (Storm *et al.*, 2012).

2.8 Relevância da biomassa vegetal na nutrição de ruminantes

Em um mundo onde 768 milhões de pessoas sofrem de desnutrição (FAO *et al.*, 2021) a sustentabilidade da produção pecuária é uma necessidade. A pecuária fornece 58 milhões de toneladas de proteína comestível (Smith *et al.*, 2013) e os ruminantes, particularmente, podem consumir materiais fibrosos que não são comestíveis pelos humanos, convertê-los em proteína de alta qualidade e podem fazê-lo em áreas marginais onde as condições agroecológicas não permitem a realização de outras atividades agrícolas (Gerber *et al.*, 2015; Mottet *et al.*, 2017).

Entretanto, apesar de que o 95% da dieta dos ruminantes no mundo está composta por coprodutos, resíduos e principalmente pastagens (Mottet *et al.*, 2017); por ano, 242 milhões de toneladas de alimento potencialmente consumível por humanos são usados para a alimentação de ruminantes (Mottet *et al.*, 2017). Somado a isso, práticas de manejo

de pastagem inadequadas e sobrepastoreio contribuem para a degradação dos solos, perda de biodiversidade (Gerber *et al.*, 2015) e a expansão da pecuária para as florestas (Feltran-Barbieri & Féres, 2021).

Feltran-Barbieri & Féres (2021) concluíram que a degradação das pastagens está altamente correlacionada com a baixa produtividade da pecuária brasileira e Strassburg *et al.* (2014) estimaram que o Brasil estava deixando de produzir em torno de 70% do seu potencial produtivo e que com a implantação de melhores espécies de pastagens, a introdução de sistemas mistos (pecuária e lavouras) e melhorias na produtividade da pecuária, seria possível atender à demanda por alimentos em um cenário onde não haveria necessidade de expansão da fronteira pecuária em direção às florestas (Soares Filho *et al.*, 2011; Strassburg *et al.*, 2014)

Consequentemente, a intensificação produtiva sustentável tem sido descrita como uma das estratégias mais promissoras para aumentar a eficiência dos sistemas pecuários, reduzir os seus impactos ambientais sem ameaçar a segurança alimentar ou alterar os padrões culturais (Herrero *et al.*, 2016). Nesse contexto, os sistemas silvipastoris (SSP), e a utilização de forragens leguminosas e / ou arbustivas para complementar os sistemas de alimentação a pasto são considerados uma alternativa sustentável de intensificação produtiva (Mauricio *et al.*, 2019; Montagnini *et al.*, 2013; Murgueitio *et al.*, 2015). Os SSP permitem aumentar a quantidade de biomassa por unidade de área e fornecer outros serviços ecossistêmicos e biológicos (Chará *et al.*, 2017; Murgueitio *et al.*, 2011). E apesar de ter sido descritas algumas dificuldades para seu estabelecimento no Brasil (Pérez-Márquez *et al.*, 2021), também são reconhecidos pela FAO como alternativas sustentáveis para reduzir o impacto ambiental da produção animal (GASL, 2018).

Segundo Murgueitio *et al.* (2011) alguns dos sistemas silvipastoris mais comuns em todo o mundo são: árvores dispersas em piquetes, sucessão manejada de plantas, cercas vivas, quebra-ventos, bancos de árvores forrageiras, sistemas de corte e acarreo, plantações de árvores com gado pastando, pastagens entre becos de árvores e sistemas com arbustos em altas densidades (sistemas silvipastoris intensivos (SSPi)).

Os SSPi (Chará *et al.*, 2017), são arranjos agroflorestais onde árvores e pastagens altamente produtivas são combinadas com arbustos forrageiros em altas densidades (> 10.000 plantas / ha) para pastejo direto (Murgueitio *et al.*, 2011). Os SSPi são um dos exemplos mais produtivos de sistemas silvipastoris, presentes em países como Colômbia, México, Cuba, Panamá e Austrália (Calle *et al.*, 2013), e *Tithonia diversifolia* e *Leucaena*

leucocephala são as espécies mais comuns usadas em este tipo de sistemas (Chará *et al.*, 2017).

2.8.1 *Tithonia diversifolia*

A *Tithonia diversifolia* (TD), também conhecida como Margaridão, Falso Girasol, Girasol Mexicano e Botão de Ouro, é uma planta arbustiva da família *Asteraceae*, originária da América Central, distribuída pela maior parte do continente americano (Pérez *et al.*, 2009) assim como na África (Ademiluyi e Omotoso, 2007) e na Ásia (Cong e Merckx, 2005).

A TD pertence à divisão: *Spermatophyta*, Classe: *Dicotyledoneae*, Subclasse: *Metaclamideas*, ordem: *Campanuladas*, Família: *Asteraceae*, Gênero: *Tithonia* e Espécie: *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray.

Nash & Williams (1974) a descreveram como uma planta herbácea de 1,5 a 4 m, com ramos fortes e folhas alternadas pecioladas variando de 7 a 20 cm de comprimento e com 4 a 20 cm de largura. Apresentando de 3 a 5 lóbulos profundos cuneados até subtruncarem na base, decorrentes em sua maioria da base do pecíolo, bordas serradas, pedúnculos de 4,0 a 20,0 cm de comprimento, lígulas amarelas e alaranjadas de 3,0 a 6,0 cm de comprimento e corolas amarelas de 8,0 mm de comprimento. Sua inflorescência se apresenta em capítulos amarelos.

Em relação a sua adaptação, a TD pode ser encontrada em uma ampla variação de altitudes, desde o nível do mar até 2.700 metros (Murgueitio *et al.*, 2011). A planta cresce em diferentes condições agroecológicas com precipitações entre os 800 até os 5.000 mm e em diferentes tipos de solo tolerando condições de acidez e baixa fertilidade (Ríos, 1998). Essa adaptabilidade e sua ampla distribuição tem permitido que seja usada em diferentes países e para diferentes funções. Têm sido avaliadas a suas propriedades farmacológicas (Mabou Tagne *et al.*, 2018), medicinais (Ojo *et al.*, 2018), seu potencial como inseticida (Green *et al.*, 2017), como biocombustível (Dahunsi *et al.*, 2017) e pelos seus efeitos positivos para o solo sob a disponibilidade de matéria orgânica (Ojeniyi *et al.*, 2012), ciclagem de fósforo (Phiri *et al.*, 2001) incremento do pH (Cong & Merckx, 2005), diminuição do alumínio, chumbo e zinco e acumulá-los na raízes (Adesodun *et al.*, 2010; Olivares *et al.*, 2002).

Na nutrição de ruminantes a TD chama atenção como fonte de biomassa verde (R. Maurício *et al.*, 2014), mas também tem sido estudado o seu potencial para reduzir as

emissões de metano (Ribeiro *et al.*, 2016) e o seu efeito na defaunação ruminal (Galindo *et al.*, 2011). A produção de biomassa é dependente da densidade e interação de arbustos, forragens e até mesmo árvores na pastagem, além, da quantidade de horas luz disponíveis, o estado vegetativo, e a qualidade do solo (Rivera *et al.*, 2021). A variabilidade, produto de esses fatores, pode ser identificada na literatura que reporta valores heterogêneos na produção de matéria seca por hectare. Rutunga *et al.* (1999) reportaram valores de 11 t/MS/ha/ano, utilizando distancias entre plantas de 0,5 m x 0,5 m (40.000 plantas/ha), Já, Sao *et al.* (2010) reportaram quantidades de 25 t/MS/ha/ano (densidades não reportadas), Partey (2011) utilizou densidades de 1m x 1m (10.000 plantas/ha) e reportou 7,2 t/MS/ha/ano utilizando cortes bimensais; Gualberto *et al.* (2011) usando distâncias entre plantas de 1 m x 0,75 m (13.000 plantas/ha) obtiveram valores de 3,5 t/MS/ha para um único corte com 103 dias de idade. Igualmente Alonso *et al.* (2016), também para um único corte a 90 dias de idade, obtiveram valores de 3,00 Ton/MS/ha usando espaçamentos similares aos usados em sistemas de *Alley crop* (0,4 m x 3 m) (8.300 plantas/ha).

Em relação à composição bromatológica da planta, os valores mais altos de proteína (28,95%) foram reportados por Verdecia *et al.* (2011) durante a época de chuva, com aproximadamente 60 dias de idade para corte (Tabela 2.3). Em contraste, Gualberto *et al.* (2011) durante o período seco encontraram teores de proteína de 11%. O potencial nutritivo da TD também pode variar em função da parte da planta avaliada. Calsavara *et al.* (2016), evidenciaram maiores teores de PB e de FDN nas folhas (22,5% e 41%) do que no caule (7,7% e 65,2%) ou na planta inteira (16,5% e 47,6%). Em geral, os valores de matéria seca para a planta inteira estão em torno de 15 a 20%, de FDN entre 38% e 47% e de FDA entre 23% e 34% (Calsavara *et al.*, 2016; Chin e Hue, 2012; Mahecha *et al.*, 2008; Verdecia *et al.*, 2011) e os valores da degradabilidade *in vitro* da matéria seca, variam de 53% até o 83% (Tabela 2.4) sendo que a composição da fibra foi evidenciado como o principal determinante na degradabilidade *in vitro*. Quanto ao consumo de matéria seca, Chin & Hue (2012) reportam aumento de 15% quando adicionaram TD a uma dieta com *Panicum maximum*, isto contrasta com o encontrado por Ribeiro *et al.* (2016) que usando até 15% de TD como substitutivo de cana de açúcar e concentrado não encontraram diferenças significativas no CMS.

Tabela 2.3. Porcentagem de matéria seca, proteína bruta, FDN e FDA de *Tithonia diversifolia*.

Fonte	MS	PB	FDN	FDA	Observações
Calsavara <i>et al.</i> (2016)	20	16,5	47,6	33,3	Planta inteira
Calsavara <i>et al.</i> (2016)	19,5	22,5	41	26,1	Folhas
Calsavara <i>et al.</i> (2016)	24,6	6,0	60,8	46,3	Caule
Chin e Hue (2012)	14,6	23,9	38,4		
Naranjo & Cuartas (2005)	19,1	24,13	38,62	34,48	
Verdecia <i>et al.</i> (2011)	19,77	28,95	43,6	27,6	Período chuva
Verdecia <i>et al.</i> (2011)	18,22	27,49	40,44	24,1	Período seco
Lezcano <i>et al.</i> (2012)	10,13	21,93			Período chuva
Lezcano <i>et al.</i> (2012)	12,78	19,03			Período seco
Sao <i>et al.</i> (2010)	14,6	23,9	38,4		
Gualberto <i>et al.</i> (2011)		11,74	52,08		
Mahecha e Rosales (2005)	17,2	24,2	35,3	30,4	
Cardona Iglesias <i>et al.</i> (2017)		17,2	39	27,2	
Rivera <i>et al.</i> (2015)		25,4	25,2	23,5	
Durango <i>et al.</i> (2021)	21,2	18,5	46,2	34,3	
Cardona-Iglesias <i>et al.</i> (2019)	18	18,3	44,3	33,3	
Castañeda-Serrano <i>et al.</i> (2018)		17,9	44,5	40,7	
González <i>et al.</i> (2020)	30	9,36	49,17	38,17	

Em relação à produtividade em sistemas animais utilizando TD, existem estudos evidenciando que a sua inclusão na dieta não altera a produção de leite. Mahecha *et al.* (2008) utilizando bovinos F1 leiteiros, substituíram até 35% de concentrado por TD e não obtiveram diferenças significativas na produção nem na composição do leite. De forma similar Ribeiro *et al.* (2016) conseguiram substituir um 15% do concentrado e um 20% da cana de açúcar, e não tiveram reduções no consumo de matéria seca, nem na produção de leite. Pazla *et al.* (2021) reportaram como conseguiram melhorar a relação proteína:energia em dietas de bovinos, usando até 30% de TD, atribuindo o resultado do maior consumo de matéria seca, ao incremento na digestibilidade dos nutrientes e na conversão alimentar.

Tabela 2.4. Degradabilidade *in vitro* da matéria seca na *Tithonia diversifolia*

Fonte	DIVMS %	Observações
Porsavatdy <i>et al.</i> (2016)	81,7	
Mahecha e Rosales (2005)	83,3	
Cardona <i>et al.</i> (2017)	59,1	
Sao <i>et al.</i> (2010)	53,7	Digestibilidade aparente
Verdecia <i>et al.</i> (2011)	75,3	Período Chuva
Verdecia <i>et al.</i> (2011)	78,6	Período Seca
Rivera <i>et al.</i> (2015)	63,5	
Durango <i>et al.</i> (2021)	50,6	
González <i>et al.</i> (2020)	51,2	

2.8.2 *Tithonia diversifolia* e produção de metano

Existem 2 vias principais pelas quais a TD poderia interferir na produção de metano ruminal. A primeira é uma rota direta, na qual seus compostos ativos da TD (taninos, compostos fenólicos) interfeririam diretamente sobre as populações de microrganismos metanogênicos (Galindo *et al.*, 2011, 2012, 2014). A segunda são rotas indiretas, nas quais a presença da planta no rúmen interfere sobre a abundância dos substratos utilizados pelos organismos metanogênicos para a produção de metano (Ribeiro *et al.*, 2016; Terry *et al.*, 2016). Isto é, principalmente, hidrogênio e dióxido de carbono.

Já foi mencionado (seção 2.2) como o CO₂ e o H₂ são importantes substratos na produção de metano entérico (rota hidrogenotrófica). Blummel *et al.* (1997); Getachew *et al.* (1998) mencionaram como a fermentação de carboidratos à propionato não contribui com a produção direta de CO₂ e H₂, sendo estes, subprodutos unicamente da fermentação dos carboidratos em acetato e butirato. Assim rotas metabólicas que resultam na produção de maior quantidade proporcional de acetato e butirato, usualmente, produzem maior quantidade de gases e por consequência também mais metano. O oposto ocorre quando a proporção de propionato nos AGCC aumenta. Deste modo, a redução da produção de metano entérico, pode estar associada a uma diminuição na proporção de acetato:propionato; assim, componentes da dieta que alterem a microbiota do rúmen a favor desta diminuição podem resultar em uma menor produção de hidrogênio e carbono como substratos para a metanogênese (Getachew *et al.*, 1998).

Outro mecanismo indireto de mitigação de metano no qual a TD poderia ter interferência é sobre as populações de protozoários. Visto que os protozoários ruminais

estão em estreita relação com as *Archaea* metanogênicas (Hungate, 1966; Newbold *et al.*, 2015). Alguns protozoários são importantes produtores ruminais de hidrogênio, parcela que as archaea hidrogenotróficas utilizam para a síntese de metano (Morgavi *et al.*, 2012). Deste modo, alimentos com efeitos nocivos sobre as populações de protozoários apresentam um potencial interessante de mitigação de metano entérico (Hegarty, 1999). Delgado *et al.* (2012) e Galindo *et al.* (2011) encontraram menor produção de metano *in vitro* em substratos com TD, e atribuíram a redução ao efeito negativo da TD sobre as populações de protozoários produto da presença de taninos na planta.

Qualquer uma que seja a rota pela qual a TD interfere com a produção de metano, a presença de taninos na planta parece ter um papel importante (Delgado *et al.*, 2012; Fajemisin *et al.*, 2013; Galindo *et al.*, 2011, 2014; Rivera *et al.*, 2021). Os taninos atuam como modificadores da fermentação ruminal, mas o principal mecanismo pelo qual afetam a metanogênese não foi definitivamente demonstrado *in vitro* ou *in vivo* (Aboagye e Beauchemin, 2019). Aboagye e Beauchemin (2019) mencionaram algumas hipóteses de como os taninos diminuem a produção de CH₄: (1) atuando diretamente sobre os metanógenos (2) atuando sobre os protozoários associados aos metanógenos; (3) atuando sobre as bactérias fibrolíticas, e (4) atuando como sumidouros de H. Esses autores concluíram, baseados na acentuada variabilidade nos resultados com uma diminuição de CH₄, que os taninos podem funcionar por meio de todos, alguns ou qualquer um dos mecanismos propostos.

Um resumo com alguns dos resultados reportados na literatura, sobre a influência da inclusão de TD na produção de metano *in vitro* pode ser encontrado na tabela 2.5. A diferença entre as unidades de medida na que são apresentados os dados da tabela pelos distintos autores dificulta a comparação da quantidade de metano emitido entre distintas pesquisas. Porém inferências podem ser feitas levando em conta os resultados da inclusão de TD dentro de um mesmo estudo. De maneira geral os resultados são ambíguos, com mais ou menos a metade dos casos reportando uma redução no metano consequência da inclusão da TD; e a outra reportando a ausência de efeito ou aumento na produção de metano. Na grande maioria dos estudos, a inclusão de TD tem sido usada sobre substratos fibrosos (forragens), e em menor proporção tem sido estudada sua inclusão em substratos com concentrado (TMR, concentrado comercial, grãos). As inclusões mais baixas foram aquelas usadas por Cardona Iglesias *et al.* (2017), que reportaram uma menor produção de metano utilizando 3 e 5% de TD (MS) em substratos com *Cenchrus clandestinum* e

Cenchrus clandestinum mais concentrado comercial e gordura sobrepasante, respectivamente. As inclusões mais altas foram aquelas estudadas por Maurício *et al.* (2014) e Pérez-Márquez *et al.* (2019), que reportaram o uso de 75% de TD em dietas com *Urochloa brizantha*, Tifton 85 e *Penisetum purpureum*. Também tem sido usado extrato de TD sobre substratos com diferentes níveis de fibra, como foi reportado por Akanmu *et al.* (2020) com resultados positivos sobre a mitigação de metano.

Há casos em que distintos autores usando substratos similares obtiveram resultados controversos. É o caso do Holguín *et al.* (2020) e Pérez-Márquez *et al.* (2019). Os quais, usando 75% de TD com *Penisetum purpureum*, onde os primeiros reportaram ausência de efeito e os segundos uma diminuição na produção de metano. Fato similar ocorreu com Maurício *et al.* (2014) quem usando uma inclusão de 25% de TD com *U. brizantha* não obteve resultados significativos sobre o metano produzido, contrastando com os resultados do Rivera *et al.* (2021) que usando a mesma inclusão reportou uma redução no metano *in vitro*. Inclusive dentro dos distintos genótipos de TD podem existir diferenças na produção de metano; Delgado *et al.* (2012) reportaram diferenças entre diferentes tipos de TD e a sua produção de metano *in vitro* e da mesma maneira Rivera *et al.* (2021) avaliando diferentes genótipos de TD sugeriu que as diferenças entre a produção de metano eram devidas às variações na quantidade de compostos fito químicos entre alguns genótipos. Na maioria dos casos onde o substrato com TD teve menor produção de metano *in vitro*, os autores justificaram a redução devido a uma ação direta sobre os microrganismos metanogênicos produto da presença de polifenóis na TD ou devido a redução da proporção acetato:propionato consequência da inclusão (Akanmu *et al.*, 2020; Cardona-Iglesias *et al.*, 2019; Delgado *et al.*, 2012; Rivera *et al.*, 2021).

Tabela 2.5. Produção e/o rendimento de metano *in vitro*, teor de fibra, e resultados encontrados na literatura de *Tithonia diversifolia* (TD).

Tratamento	Produção de CH ₄		CH ₄ UNID	FDN (%)	FDA (%)	Proporção A:P		Resultados e discussão dos autores	Fonte
	TRAT	CON				TRAT	CON		
10% de TD com <i>Lolium perenne</i>	29,3			53,8	27,1	2,00		Comparado com o substrato sem TD. O tratamento não produz menos CH ₄ . Não há diferenças em A e P	Narvaez <i>et al.</i> (2020)
20% de TD com <i>Lolium perenne</i>	25,9	30,5	mL/gMS	52,1	28,9	1,95	2,06	Comparado com o substrato sem TD. O tratamento produz menos CH ₄ devido a presença de taninos. Não há diferenças em A e P	
33% TD com <i>Penisetum purpureum</i>	1,5	2,4	mMol/g	69,1	52,1	2,16	2,06	Comparado com o substrato sem TD, o tratamento não produz menos CH ₄ . Não há diferenças em A e P	Holguín <i>et al.</i> (2020)
75% TD com <i>Penisetum purpureum</i>	8,6	18,9	mL/gMOD	59,1	49,6	3,27	2,63	Comparado com o substrato sem TD, o tratamento produz menos CH ₄ . Acetato igual e propionato diminuiu.	Pérez-Márquez <i>et al.</i> (2019)
75% TD com Tifton 85	4	7,3	mL/gMOD	61,3	48,3	3,41	3,04	Comparado com o substrato sem TD, o tratamento não produz menos CH ₄ . Acetato aumentou e propionato igual	
Extrato de TD com concentrado comercial (TMR)	25,3	42,9		30,1	21,4	1,39	1,99	Comparado com o substrato sem TD, o tratamento produz menos CH ₄ devido a presença de taninos. Acetato diminuiu propionato igual	Akanmu <i>et al.</i> (2020)
Extrato de TD com feno Lucerna	18,2	36,8	mL/kgMOD	40,6	32,1	1,71	2,16	Comparado com o substrato sem TD, o tratamento produz menos CH ₄ devido a presença de taninos. Acetato diminuiu propionato igual	
Extrato de TD com <i>Eragostis curvula</i>	5,8	47,7		78,4	49,2	1,63	2,48	Comparado com o substrato sem TD, o tratamento produz menos CH ₄ devido a presença de taninos. Acetato diminuiu e propionato aumentou	
6,9% de TD com cana e concentrado	0,7	0,5	mL/gMSI	29,4	-	0,90	0,71	Comparado com o substrato sem TD, a inclusão de TD produz mais CH ₄ devido ao	Terry <i>et al.</i> (2016)

15,2% de TD com cana e concentrado	1,2			30,7	-	1,09		aumento na proporção A:P. Acetato aumentou e propionato diminuiu.
29,2% de TD com cana e concentrado	3,3			34,5	-	1,55		
25% de TD com <i>U. brizanta</i>	~22,96	26,2	mg/gMSI	~55,5	~38,3	2,37	3,56	Comparado com o controle sem TD, o tratamento produz menos CH ₄ devido a diminuição na proporção A:P. Acetato diminuiu e propionato aumentou.
100% de TD com <i>U. brizanta</i>	5			45	38,6	4,60		Comparado com o controle sem TD, só a inclusão 50% de TD produz menos CH ₄ . Os outros tratamentos não produzem menos metano.
75% de TD com <i>U. brizanta</i>	6,4	8,2	mg/gMSD	49,8	37,9	4,00	3,50	
50% de TD com <i>U. brizanta</i>	3			54,6	37,2	2,80		
25% de TD com <i>U. brizanta</i>	8,6			59,5	36,4	3,30		
30% TD em <i>C. nlemfuensis</i>	0,9	6,5	mL/100mL	-	-	-	-	Comparado com o controle sem TD, o tratamento produz menos CH ₄ devido a presença de taninos.
30% de TD cv 23 com <i>C. nlemfuensis</i>	9,2	65,2	uL/gMS	33,4	29,5	-	-	Comparada com o controle sem TD o tratamento produz menos CH ₄ , devido à presença de taninos.
30% de TD cv 10 com <i>C. nlemfuensis</i>	47,2			35,3	30,4	-	-	Comparado com o controle sem TD, o tratamento não produz menos CH ₄ .
100% de TD	15,7	43,4		39	27,2	-	-	Comparado com o tratamento sem TD, a inclusão de TD produz menos CH ₄ , devido a presença de taninos.
5% de TD com <i>C. clandestinum</i>	34,8	43,4	mL/gMSD	-	-	4,01	4,52	Comparado com o tratamento sem TD, a inclusão de TD produz menos CH ₄ , devido a presença de taninos. Acetato diminuiu e propionato aumentou
3% de TD com <i>C. clandestinum</i> , concentrado e gordura sobrepasante	41	60,3		-	-	3,97	4,80	Comparado com o tratamento sem TD, a inclusão de TD produz menos CH ₄ , devido a presença de taninos. Acetato igual e propionato aumentou.

TD = *Tithonia diversifolia*; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; MS = matéria seca; MSI = matéria seca incubada; MSD = matéria seca degradada; MOD = matéria orgânica degradada, CON: Controle, TRAT: Tratamento

O amplo espectro dos resultados apresentados (Tabela 2.5) sugere que o efeito da TD sobre a produção de metano está muito associado à qualidade e tipo de substrato com o que a TD é associada. Neste aspecto, Akanmu *et al.* (2020) encontraram que a inclusão de TD reduzia significativamente a produção de metano, porém, o efeito era maior nos substratos mais fibrosos de má qualidade. Na maioria dos casos onde houve redução da produção de metano *in vitro* em substratos contendo TD, a proporção de A:P do substrato tratamento foi menor do que aquela do substrato controle sem TD com o qual estava sendo comparado e todos os casos donde não houve efeito da inclusão da TD sobre o metano ou a produção de metano aumentou, a proporção de A:P foi maior do que no tratamento controle (Tabela 2.5).

Existem poucos estudos avaliando a influência da TD sobre as emissões de metano entérico *in vivo*. Cardona-Iglesias *et al.* (2019) utilizando vários modelos estimaram as emissões de CH₄ de um sistema silvipastoril com TD, comparando-as com um sistema de monocultura de gramínea, e encontraram que animais no sistema silvipastoril produziam menos metano por litro de leite e por kg de matéria seca consumida do que a sua contraparte sem TD. Por outro lado, Ribeiro *et al.* (2016), usando vacas de leite, avaliaram a inclusão de TD em dietas com cana e concentrado, substituindo 6,5 e 15,4% da matéria seca; e apesar de terem encontrado redução na proporção A:P na dieta com maior inclusão de TD (6 horas pós alimentação), e diferenças nas comunidades de *Archaeas* metanogênicas entre os tratamentos, os autores não reportaram diferenças significativas na produção de metano entérico. Mencionaram também, a pouca sensibilidade da técnica de mensuração (método de SF₆) como possível motivo para a falta de resultados significativos. Em contraste, Porsavatdy *et al.* (2016) compararam as emissões de metano de cabras alimentadas com forragem de TD *versus* cabras alimentadas com folhas de mandioca; e reportaram que os animais alimentados com TD emitiram 50% mais metano do que os alimentados com mandioca, e argumentaram que a maior produção de metano estava associada à uma maior solubilidade da proteína nas dietas com TD.

2.8.3 *Tithonia diversifolia* e emissões de óxido nitroso

Poucas pesquisas avaliaram diretamente a influência da inclusão de TD nas emissões N₂O. As emissões de N₂O são altamente influenciadas por condições ambientais, e do solo (Rivera e Chará, 2021), o que dificulta a obtenção de resultados valiosos e talvez explique a falta de informação. Chacón Góngora (2018) estudou as

emissões de N₂O das fezes e urina de vacas alimentadas com 0, 6 e 12% de TD, e não encontrou diferenças significativas nos fluxos de N₂O quando comparados com o tratamento controle. O autor justificou que a variabilidade nos resultados seria produto da dificuldade técnica da avaliação a campo pode ter influenciado a falta de efeitos significativos.

No entanto, vários pesquisadores avaliaram o efeito da inclusão de TD no balanço de nitrogênio do animal que, como já foi mencionado (seção 2.3), tem incidência direta sobre a quantidade de nitrogênio excretado e, portanto na conversão final desse nitrogênio em óxido nítrico. Um resumo dos resultados recuperados na literatura pode ser encontrado na tabela 2.6.

Durango *et al.* (2021) encontraram que a inclusão de 35% de TD em dietas com *Brachiaria decumbens* para novilhas de leite, proporcionaram maior retenção de nitrogênio (44,19 g/dia) quando comparado com as novilhas alimentadas com *B. decumbens* sem TD (9,83 g/dia). Os autores reportaram que o balanço de nitrogênio estava altamente correlacionado tanto com o consumo de matéria seca, quanto como o consumo de nitrogênio ($r=0,84$ e $0,96$ respectivamente), os quais foram também mais altos na dieta com inclusão de TD. Tanto a excreção de N na urina quanto a de fezes foram maiores naqueles animais alimentados com 35% de TD. Porém, o maior consumo de nitrogênio na dieta com TD favoreceu o seu balanço. Esses resultados coincidem com os reportados por Ramírez-Rivera *et al.* (2010) e Castañeda-Serrano *et al.* (2018) os quais também encontraram maior excreção de nitrogênio (g/dia), porém um maior balanço final devido ao aumento na ingestão de nitrogênio nas dietas com TD.

Quando expresso como porcentagem do N ingerido, a excreção fecal de nitrogênio nos animais alimentados com inclusões de TD dos estudos de Castañeda-Serrano *et al.* (2018), Chacón Góngora (2018), Durango *et al.* (2021), Ramírez-Rivera *et al.* (2010), Yousuf *et al.* (2014) (6%TD) foi menor do que os seus respectivos controles. Nesse sentido, Durango *et al.* (2021) sugeriram que o motivo se deve a que a inclusão da TD pode ter contribuído com uma maior digestibilidade dos aminoácidos no intestino e portanto reduzido a quantidade de N recuperada nas fezes. Porsavatdy *et al.* (2016) de maneira similar mencionaram que a maior solubilidade ruminal da proteína da TD reduz o escape de nitrogênio do rúmen, reduzindo a sua aparição nas fezes. Por outro lado, um aumento no nitrogênio metabolizável resulta em incrementos no nitrogênio excretado na urina, talvez isto explique os resultados de Yousuf *et al.* (2014) e Porsavatdy *et al.* (2016)

nos quais a quantidade de nitrogênio nas fezes diminuiu enquanto o da urina aumentou, no entanto, os autores não fizeram uma discussão a esse respeito.

Devido a pouca informação disponível, a qualidade de alguns dos estudos usados e a natureza contrastante dos resultados usados para esta revisão; é difícil extrair informações definitivas que permitam fazer conclusões sobre o efeito da inclusão de TD na dieta de ruminantes sobre as emissões de N₂O e metano. Porém, parece evidente que a influência da planta sobre as emissões é dependente das características das dietas às quais se associa na confecção da dieta. Com as associações com alimentos fibrosos apresentando resultados mais contundentes do que as associações com alimentos concentrados. Yousuf *et al.* (2014), Ribeiro *et al.* (2016) e Chacón Góngora (2018) usaram TD em dietas com concentrado, e não encontraram diferenças significativas na retenção de nitrogênio quando comparadas com as dietas sem TD. De maneira contrastante, Castañeda-Serrano *et al.* (2018), Durango *et al.* (2021), Fajemisin *et al.* (2019) e Ramírez-Rivera *et al.* (2010), associando a TD à dietas com forrageiras unicamente (*D. aristatum*, *B. decumbens*, *P. purpureum* e *P. maximum*, respectivamente) reportaram um aumento na retenção de nitrogênio quando comparado com as dietas sem TD. Isto parece sugerir que a *Tithonia diversifolia* tem melhores efeitos quando associada a dietas fibrosas ou de má qualidade, como já tem sido mencionado por outros autores (Akanmu *et al.*, 2020; Akanmu & Hassen, 2018; Rivera *et al.*, 2021).

Tabela 6. Balanço de nitrogênio de dietas com inclusão de *Tithonia diversifolia*

Tratamento	Consumo de Matéria seca (g/dia)	Consumo de Nitrogênio (g/dia)	Nitrogênio em Fezes (% do N consumido)	Nitrogênio em Urina (% do N consumido)	Nitrogênio Retido (% do N consumido)	Resultados e Conclusões dos autores	Referencia
0% Extrato TD + <i>Cassava</i> + Concentrado	378	6,98	39	39,8	21,2	Comparado a dieta controle, a dieta com 80% de TD resultou em menor excreção de nitrogênio nas fezes (g/dia) e maior na urina (g/dia). A retenção de nitrogênio foi igual em todos os tratamentos exceto a 80%.	Yousuf <i>et al.</i> (2014)
20% Extrato TD + <i>Cassava</i> + Concentrado	374	6,92	31,4	46,7	22		
40% Extrato TD + <i>Cassava</i> + Concentrado	371	6,87	29,7	46,4	23,9		
80% Extrato TD + <i>Cassava</i> + Concentrado	318	5,88	25,9	56,3	17,9		
0% TD + <i>D. aristatum</i>	410	9,78	24,9	12,9	62,1	Comparado a dieta controle, a inclusão de TD resultou em maior excreção de N em fezes e urina (g/dia). Porém a retenção de N foi maior na inclusão de TD.	Castañeda-Serrano <i>et al.</i> (2018)
25% TD + <i>D. aristatum</i>	704	68,93	6,8	7,3	85,9		
0% TD + <i>B. decumbens</i>	652	63,23	48	35	16	Comparado com a dieta controle, a inclusão de TD, resultou em maior excreção de N em fezes e urina (g/dia). Porém a retenção de N foi maior na inclusão de TD.	Durango <i>et al.</i> (2021)
35% TD + <i>B. decumbens</i>	840	113,48	34	26	39		
0% TD + <i>P. maximum</i>	312	7,59	31,5	14,5	54	Comparado com a dieta controle, não houve diferenças na excreção de N nas fezes (g/dia). As inclusões de 20 e 30% resultaram em menor excreção de N urinário (g/dia). A retenção de N foi menor nas dietas a 20 e 30% de inclusão de TD.	Odedire e Olodi (2014)
10% TD + <i>P. maximum</i>	311	6,84	31,9	14,8	53,4		
20% TD + <i>P. maximum</i>	306	5,83	37	11,3	51,6		
30% TD + <i>P. maximum</i>	305	5,76	42	6,3	51,7		
TD 0% + Cana + Concentrado	1860	563	34,5	11	54,6	Não houve efeitos significativos da inclusão de TD na excreção de N nem no balanço de nitrogênio.	Ribeiro <i>et al.</i> (2016)
TD 6,5% + Cana + Concentrado	1890	564,1	35,6	10	54,4		
TD 15,4% + Cana + Concentrado	1870	557,2	35,5	11,4	53,1		
0% TD + <i>P. purpureum</i> + Cana + Concentrado	1050	13,05	50,73	39,2	9	Comparado com o controle, a inclusão de TD resultou em maior excreção de N nas fezes e urina (g/dia). Só com	
20% TD + <i>P. purpureum</i> + Cana	1510	19,93	47,22	30	23,3		

35% TD + <i>P.purpureum</i> + Cana	1550	25,51	47,75	34,1	18,7	20% de inclusão houve efeitos positivos sobre a retenção de N. As outras inclusões não foram significativas.	Ramírez-Rivera <i>et al.</i> (2010)
50% TD + <i>P.purpureum</i> + Cana	1520	30,11	47,23	37,6	15,6		
0% TD + Brachiaria + Concentrado	1471	66,44	25,1	55,4	19,5	Comparado com o controle, não houve efeitos da inclusão de TD sobre a excreção de N nas fezes (g/dia). A excreção de N na urina foi menor na inclusão de TD 12%. No foram reportadas diferenças na retenção de N.	Chacón Góngora (2018)
6% TD + Brachiaria + Concentrado	1432	66,4	24,9	54,4	20,7		
12% TD + Brachiaria + Concentrado	1452	66	27,1	43,7	29,2		
0% TD + <i>P. maximum</i>	1580	30,5	-	-	76	Comparado com controle, as inclusões de TD resultaram em maior retenção de nitrogênio (g/dia).	Fajemisin <i>et al.</i> (2013)
25% TD + <i>P. maximum</i>	1970	56,6	-	-	71,9		
50% TD + <i>P. maximum</i>	2070	64,4	-	-	75		
75% TD + <i>P. maximum</i>	2130	72,8	-	-	76,7		

Para facilitar a comparação entre estudos os valores de nitrogênio nas fezes, urina e retidos foram expressadas como porcentagem do nitrogênio ingerido.

2.9 Referências Bibliográficas

- Aboagye, I. A., & Beauchemin, K. A. (2019). Potential of molecular weight and structure of tannins to reduce methane emissions from ruminants: A review. *Animals*, *9*(11), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ani9110856>
- Ademiluyi, B. O., & Omotoso, S. O. (2007). Comparative Evaluation of *Tithonia diversifolia* and NPK Fertilizer for soil improvement in maize (*Zea mays*) production in Ado Ekiti, Southwestern Nigeria. *American Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, *1*(1), 32–36. <http://www.aensiweb.net/AENSIWEB/aejsa/aejsa/2007/32-36.pdf>
- Adesodun, J. K., Atayese, M. O., Agbaje, T. A., Osadiaye, B. A., Mafe, O. F., & Soretire, A. A. (2010). Phytoremediation Potentials of Sunflowers (*Tithonia diversifolia* and *Helianthus annuus*) for Metals in Soils Contaminated with Zinc and Lead Nitrates. *Water, Air, and Soil Pollution*, *207*, 195–201. <https://doi.org/10.1007/s11270-009-0128-3>
- Akanmu, A. M., & Hassen, A. (2018). The use of certain medicinal plant extracts reduced in vitro methane production while improving in vitro organic matter digestibility. *Animal Production Science*, *58*(5), 900–908. <https://doi.org/10.1071/AN16291>
- Akanmu, A. M., Hassen, A., & Adejoro, F. A. (2020). Gas production, digestibility and efficacy of stored or fresh plant extracts to reduce methane production on different substrates. *Animals*, *10*(1). <https://doi.org/10.3390/ani10010146>
- Alonso, J., Ruiz, T., Achang, G., Sampaio, R. A., & Santos, L. D. T. (2016). Producción de biomasa y comportamiento animal en pastoreo con *Tithonia diversifolia* a diferentes distancias de plantación. *Livestock Research for Rural Development*, *24*(9), 1–11. <https://doi.org/http://www.lrrd.org/lrrd24/9/lazo24>
- Archer, D., Eby, M., Brovkin, V., Ridgwell, A., Cao, L., Mikolajewicz, U., Caldeira, K., Matsumoto, K., Munhoven, G., Montenegro, A., & Tokos, K. (2009). Atmospheric Lifetime of Fossil Fuel Carbon Dioxide. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, *37*(1), 117–134. <https://doi.org/10.1146/annurev.earth.031208.100206>
- Blummel, M., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (1997). In vitro gas production: a technique revisited. *Animal Research*, *77*, 24–34.
- Cai, Y., Chang, S. X., & Cheng, Y. (2017). Greenhouse gas emissions from excreta patches of grazing animals and their mitigation strategies. In *Earth-Science Reviews* (Vol. 171, pp. 44–57). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2017.05.013>
- Calle, Z., Murgueitio, E., Chará, J., Molina, C. H., Zuluaga, A. F., & Calle, A. (2013). A Strategy for Scaling-Up Intensive Silvopastoral Systems in Colombia. *Journal of Sustainable Forestry*, *32*(7), 677–693. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/10549811.2013.817338>
- Calsavara, L. H. F., Ribeiro, R. S., Silveira, S. R., Delarota, G., Freitas, D. S., Sacramento, J. P., Paciullo, D. S. C., & Maurício, R. M. (2016). Potencial forrageiro da *Tithonia diversifolia* para alimentação de ruminantes. *Livestock Research for Rural Development*, *28*(2), 1–9. <http://www.lrrd.org/lrrd28/2/ferr28017.html>

- Cardona Iglesias, J. L., Mahecha Ledesma, L., Angulo Arizala, J., Cardona, J. L., Mahecha, L., Angulo, J., Cardona Iglesias, J. L., Mahecha Ledesma, L., & Angulo Arizala, J. (2017). Efecto sobre la fermentación in vitro de mezclas de *Tithonia diversifolia*, *Cenchrus clandestinum* y grasas poliinsaturadas. *Agronomía Mesoamericana*, 28(2), 405. <https://doi.org/10.15517/ma.v28i2.25697>
- Leonardo Cardona-Iglesias, J., Mahecha-Ledesma, L., & Angulo-Arizala, J. (2019). Methane estimation in cows grazing silvopastoral systems with *Tithonia diversifolia* a and supplemented with polyunsaturated fats. In *FVC-LUZ: Vol. XXIX* (Issue 2, pp. 107–118).
- Castañeda-Serrano, R. D., Piñeros-Varón, R., & Vélez-Giraldo, A. (2018). Foliage of tropical arboreal species in feeding ovines (*Ovis Aries*): Intake, digestibility and balance nitrogen. *Boletín Científico Del Centro de Museos*, 22(1), 58–68. <https://doi.org/10.17151/bccm.2018.22.1.4>
- Chacón Góngora, P. A. (2018). Uso de *Tithonia diversifolia* como forraje alternativo para la reducción de emisiones de óxido nitroso en excretas de vacas. In *Dissertação (Mestrado em Agroforesteria y Agricultura)* (p. 69). Turrialba, Costa Rica.
- Chará, J., Rivera, J., Barahona, R., Murgueitio R., E., Deblitz, C., Reyes, E., Mauricio, R. M., Molina, J. J., Flores, M., & Zuluaga, A. (2017). Intensive Silvopastoral Systems: Economics and Contribution to Climate Change Mitigation and Public Policies. In F. Montagnini (Ed.), *Integrating Landscapes: Agroforestry for Biodiversity Conservation and Food Sovereignty. Advances in Agroforestry* (Vol. 12, pp. 395–416). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-69371-2_16
- Chin, N. H., & Hue, K. T. (2012). Supplementing *Tithonia diversifolia* with Guinea grass or tree foliages: effects on feed intake and live weight gain of growing goats. *Livestock Research for Rural Development*, 24. <http://www.lrrd.org/lrrd24/10/chin24188.htm>
- Church, D. C. (1979). *The Ruminant Animal. Digestive Physiology and Nutrition* (D. C. Church, Ed.; 2nd ed.). Prentice Hall.
- Cong, P. T., & Merckx, R. (2005). Improving phosphorus availability in two upland soils of Vietnam using *Tithonia diversifolia* H. *Plant and Soil*, 269(1–2), 11–23. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-1791-1>
- Czerkawski, J. W., & Breckenridge, G. (1977). Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *British Journal of Nutrition*, 38(3), 371–384. <https://doi.org/10.1079/bjn19770102>
- Dahunsi, O. S., Oranusi, S., & Efeovbokhan, E. v. (2017). Anaerobic mono-digestion of *Tithonia diversifolia* (Wild Mexican sunflower). *Energy Conversion and Management*, 148, 128–145. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.enconman.2017.05.056>
- de Azevedo, E. B., Savian, J. V., do Amaral, G. A., de David, D. B., Gere, J. I., Kohmann, M. M., Bremm, C., Jochims, F., Zubieta, A. S., Gonda, H. L., Bayer, C., & de Faccio Carvalho, P. C. (2021). Feed intake, methane yield, and efficiency of utilization of

- energy and nitrogen by sheep fed tropical grasses. *Tropical Animal Health and Production*, 53(5). <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02928-4>
- Delgado, D. C., Galindo, J., González, R., González, N., Scull, I., Dihigo, L., Cairo, J., Aldama, A. I., & Moreira, O. (2012). Feeding of tropical trees and shrub foliages as a strategy to reduce ruminal methanogenesis: Studies conducted in Cuba. *Tropical Animal Health and Production*, 44(5), 1097–1104. <https://doi.org/10.1007/s11250-011-0045-5>
- della Rosa, M. M., Jonker, A., & Waghorn, G. C. (2021). A review of technical variations and protocols used to measure methane emissions from ruminants using respiration chambers, SF6 tracer technique and GreenFeed, to facilitate global integration of published data. *Animal Feed Science and Technology*, 279, 115018. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.115018>
- Dijkstra, J., Reynolds, C. K., Kebreab, E., Bannink, A., Ellis, J. L., France, J., & van Vuuren, A. M. (2013). Challenges in ruminant nutrition: towards minimal nitrogen losses in cattle. In J. W. Oltjen, E. Kebreab, & H. Lapierre (Eds.), *Energy and protein metabolism and nutrition in sustainable animal production* (Issue 134, pp. 47–58). Wageningen Academic Publishers. https://doi.org/10.3920/978-90-8686-781-3_3
- Dong, R. L., Zhao, G. Y., Chai, L. L., & Beauchemin, K. A. (2014). Prediction of urinary and fecal nitrogen excretion by beef cattle. *Journal of Animal Science*, 92(10), 4669–4681. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8000>
- Durango, S. G., Barahona, R., Bolívar, D., Chirinda, N., & Arango, J. (2021). Feeding Strategies to Increase Nitrogen Retention and Improve Rumen Fermentation and Rumen Microbial Population in Beef Steers Fed with Tropical Forages. *Sustainability*, 13(18), 10312. <https://doi.org/10.3390/su131810312>
- Fajemisin, A. N., Salihu, T., Fadiyimu, A., & Alokun, A. (2019). Dietary effect of substituting Panicum maximum with Tithonia diversifolia forage on performance of Yankasa sheep. *XXII International Grassland Congress*, 563–564. <https://uknowledge.uky.edu/igc/22/1-8/10>
- FAO, IFAD, UNICEF, WFP, & WHO. (2021). *The State of Food Security and Nutrition in the World 2021*. FAO. <https://doi.org/10.4060/cb4474en>
- Feltran-Barbieri, R., & Féres, J. G. (2021). Degraded pastures in Brazil: Improving livestock production and forest restoration. *Royal Society Open Science*, 8(7). <https://doi.org/10.1098/rsos.201854>
- Galindo, J., Gonzales, N., Marrero, Y., Sosa, A., Ruiz, T., Febles, G., Torres, V., Aldana, A. I., Achang, G., Moreira, O., Sarduy, L., Noda, A. C., González, N., Marrero, Y., Sosa, A., Ruiz, T., Febles, G., Torres, V., Aldana, A. I., ... Noda, A. C. (2014). Effect of tropical plant foliage on the control of methane production and in vitro ruminal protozoa population. In *Cuban Journal of Agricultural Science* (Vol. 48, Issue 4).
- Galindo, J., Gonzales, N., Sosa, A., Ruiz, T., Torres, V., Aldana, A. I., Diaz, H., Moreira, O., Sarduy, L., & Noda, A. C. (2011). Efecto de tithonia diversifolia (hemsl.) A.

- Gray (botón de oro) en la población de protozoos y metanógenos ruminales en condiciones *in vitro*. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 45(1).
- Galindo, J., González, N., Scull, I., Marrero, Y., Sosa, A., Aldana, A. I., Moreira, O., Delgado, D., Ruiz, T., Febles, G., Torres, V., O La, O., Sarduy, L., Noda, A., & Achang, O. (2012). Efecto de *Samanea saman* (Jacq.) Merr., *Albizia lebbek* (L.) Benth y *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray (material vegetal 23) en la población de metanógenos y en la ecología microbiana ruminal. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 46(3), 273–278.
- GASL. (2018). *Synthesis-Livestock and the Sustainable Development Goals Global Agenda for Sustainable Livestock*. http://www.livestockdialogue.org/fileadmin/templates/res_livestock/docs/2016/Panama/FAO-AGAL_synthesis_Panama_Livestock_and_SDGs.pdf
- Gerber, P. J., Mottet, A., Opio, C. I., Falcucci, A., & Teillard, F. (2015). Environmental impacts of beef production: Review of challenges and perspectives for durability. *Meat Science*, 109, 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.05.013>
- Gerber, P. J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., Falcucci, A., & Tempio, G. (2013). *Tackling climate change through livestock - A global assessment of emissions and mitigation opportunities*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Getachew, G., Blummel, M., Makkar, H. P. S. S., Becker, K., Blümmel, M., Makkar, H. P. S. S., & Becker, K. (1998). *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 72(3–4), 261–281. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(97\)00189-2](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(97)00189-2)
- GLEAM. (2018). *Global Livestock Environmental Assessment Model (GLEAM)*. <http://www.fao.org/gleam/results/en/>
- González, M. A. H., Mogollón, O. L. M., Saavedra, Y. M. G., Castaño, V. A. H., & Mora-Delgado, J. (2020). *In vitro* methane production from silages based on *Cenchrus purpureus* mixed with *Tithonia diversifolia* in different proportions. *Acta Scientiarum - Animal Sciences*, 43(1), 1–11. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v43i1.51322>
- Green, P. W. C., Belmain, S. R., Ndakidemi, P. A., Farrell, I. W., & Stevenson, P. C. (2017). Insecticidal activity of *Tithonia diversifolia* and *Vernonia amygdalina*. *Industrial Crops and Products*, 110, 15–21. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.021>
- Greening, C., Geier, R., Wang, C., Woods, L. C., Morales, S. E., McDonald, M. J., Rushton-Green, R., Morgan, X. C., Koike, S., Leahy, S. C., Kelly, W. J., Cann, I., Attwood, G. T., Cook, G. M., & Mackie, R. I. (2019). Diverse hydrogen production and consumption pathways influence methane production in ruminants. *ISME Journal*, 13(10), 2617–2632. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0464-2>
- Gualberto, R., Souza Júnior, O. F., Costa, N. R., Bracciali, C. D., & Gaion, L. A. (2011). Influência do espaçamento e do estágio de desenvolvimento da planta na produção

- de biomassa e valor nutricional de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray. *Nucleus*, 8. <https://doi.org/DO-10.3738/nucleus.v8i1.362>
- Hegarty, R. S. (1999). Reducing rumen methane emissions through elimination of rumen protozoa. *Australian Journal of Agricultural Research*, 50(8), 1321–1328. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1071/AR99008>
- Herrero, M., Henderson, B., Havlík, P., Thornton, P. K., Conant, R. T., Smith, P., Wirsenius, S., Hristov, A. N., Gerber, P., Gill, M., Butterbach-Bahl, K., Valin, H., Garnett, T., & Stehfest, E. (2016). Greenhouse gas mitigation potentials in the livestock sector. *Nature Climate Change*, 6(5), 452–461. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nclimate2925>
- Hill, J., McSweeney, C., Wright, A. D. G., Bishop-Hurley, G., & Kalantar-zadeh, K. (2016). Measuring Methane Production from Ruminants. *Trends in Biotechnology*, 34(1), 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.10.004>
- Holguín, V. A., Cuchillo-Hilario, M., Mazabel, J., Quintero, S., & Mora-Delgado, J. (2020). Effect of a *Pennisetum purpureum* and *Tithonia diversifolia* silage mixture on in vitro ruminal fermentation and methane emission in a RUSITEC system. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 11(1), 19–37. <https://doi.org/10.22319/RMCP.V11I1.4740>
- Hook, S. E., Wright, A. D. G., & McBride, B. W. (2010). Methanogens: Methane producers of the rumen and mitigation strategies. In *Archaea* (Vol. 2010). <https://doi.org/10.1155/2010/945785>
- Hungate, R. E. (1966). The Rumen Protozoa. In *The Rumen and its Microbes* (pp. 91–147). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-1-4832-3308-6.50006-1>
- Hungate, R. E. (1975). The Rumen Microbial Ecosystem. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 6(1), 39–66. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.06.110175.000351>
- Huws, S. A., Creevey, C. J., Oyama, L. B., Mizrahi, I., Denman, S. E., Popova, M., Muñoz-Tamayo, R., Forano, E., Waters, S. M., Hess, M., Tapio, I., Smidt, H., Krizsan, S. J., Yáñez-Ruiz, D. R., Belanche, A., Guan, L., Gruninger, R. J., McAllister, T. A., Newbold, C. J., ... Morgavi, D. P. (2018). Addressing global ruminant agricultural challenges through understanding the rumen microbiome: Past, present, and future. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 9, Issue SEP). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02161>
- IPCC. (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. In T. F. Stocker, D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S. K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex, & P. M. Midgley (Eds.), *Assesment Report*. Cambridge University Press.
- IPCC. (2019a). *2019 Refinement to the 2006 IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories. Vol 4. Chapter 11: Vol. Volume 4* (E. Calvo Buendia, K. Tanabe, A. Kranjc, J. Baasansuren, M. Fukuda, S. Ngarize, A. Osako, Y. Pyrozhenko, P. Shermanau, & S. Federici, Eds.). IPCC.

- IPCC. (2019b). *2019 Refinement to the 2006 IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories.: Vol. Volume 4* (E. Calvo Buendia, K. Tanabe, A. Kranjc, J. Baasansuren, M. Fukuda, S. Ngarize, A. Osako, Y. Pyrozhenko, P. Shermanau, & S. Federici, Eds.). IPCC.
- IPCC. (2019c). Climate Change and Land: An IPCC Special Report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems. In P. R. Shukla, J. Skea, E. C. Buendia, V. Masson-Delmotte, H.-O. Pörtner, D. C. Roberts, P. Zhai, R. Slade, S. Connors, R. van Diemen, M. Ferrat, E. Haughey, S. Luz, S. Neogi, M. Pathak, J. Petzold, J. P. Pereira, P. Vyas, E. Huntley, ... J. Malley (Eds.), *IPCC*. www.ipcc.ch
- Kelly, W. J., Leahy, S. C., Kamke, J., Soni, P., Koike, S., Mackie, R., Seshadri, R., Cook, G. M., Morales, S. E., Greening, C., & Attwood, G. T. (2019). Occurrence and expression of genes encoding methyl-compound production in rumen bacteria. *Animal Microbiome*, *1*(1). <https://doi.org/10.1186/s42523-019-0016-0>
- Kozloski, G. v., Oliveira, L., Poli, C. H. E. C., Azevedo, E. B., David, D. B., Ribeiro Filho, H. M. N., & Collet, S. G. (2014). Faecal nitrogen excretion as an approach to estimate forage intake of wethers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *98*(4), 659–666. <https://doi.org/10.1111/jpn.12118>
- Lezcano, Y., Soca, M., Ojeda, F., Roque, E., Fontes, D., Montejo, I. L., Santana, H., Martínez, J., & Cubillas, N. (2012). Caracterización bromatológica de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray en dos etapas de su ciclo fisiológico. *Pastos y Forrajes*, *35*(3), 275–282.
- Liu, S., Proudman, J. & Mitloehner, F.M. (2021). Rethinking methane from animal agriculture. *CABI Agric Biosci* *2*, 22 <https://doi.org/10.1186/s43170-021-00041-y>
- Lynch, J., Cain, M., Pierrehumbert, R., & Allen, M. (2020). Demonstrating GWP*: a means of reporting warming-equivalent emissions that captures the contrasting impacts of short-and long-lived climate pollutants. *Environmental Research Letters*, *15*(4), <https://doi.org/10.1088/1748-9326/ab6d7e>.
- Mabou Tagne, A., Marino, F., & Cosentino, M. (2018). *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray as a medicinal plant: A comprehensive review of its ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacotoxicology and clinical relevance. *Journal of Ethnopharmacology*, *220*, 94–116. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.03.025>
- Mahecha, L., Escobar, J. P., Suarez, J. F., & Restrepo, L. F. (2008). Evaluación del Uso de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray ASTERACEAE, como Suplemento Forrajero de Vacas Cruzadas. In E. Murgueitio, C. A. Cuartas, & J. F. Naranjo (Eds.), *Ganadería del futuro: Investigación para el desarrollo* (p. 490). CIPAV.
- Mahecha, L., & Rosales, M. (2005). Valor nutricional del follaje de botón de oro *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray, en la producción animal en el trópico. *Livestock Research for Rural Development*, *17*. <http://www.lrrd.org/lrrd17/9/mahe17100.htm>

- Makkar, H. P. S. (2004). Recent advances in the in vitro gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources. *Assessing Quality and Safety of Animal Feeds*, 55–88.
- Makkar, H., & Vercoe, P. (2007). *Measuring Methane Production From Ruminants* (H. P. S. Makkar & P. E. Vercoe, Eds.). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6133-2>
- Mauricio, R. M., Ribeiro, R. S., Paciullo, D. S. C., Cangussú, M. A., Murgueitio, E., Chará, J., & Estrada, M. X. F. (2019). Silvopastoral Systems in Latin America for Biodiversity, Environmental, and Socioeconomic Improvements. In *Agroecosystem Diversity* (pp. 287–297). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811050-8.00018-2>
- Maurício, R., Ribeiro, R. S., Silveira, S. R., Silva, P. L., Calsavara, L., Pereira, L. G. R., & Paciullo, D. S. (2014). *Tithonia diversifolia* for ruminant nutrition. *Tropical Grasslands - Forrajes Tropicales*, 2. [https://doi.org/10.17138/TGFT\(2\)82-84](https://doi.org/10.17138/TGFT(2)82-84)
- Moate, P. J., Pryce, J. E., Maret, L. C., Garner, J. B., Deighton, M. H., Ribaux, B. E., Hannah, M. C., Wales, W. J., & Williams, S. R. O. (2021). Measurement of Enteric Methane Emissions by the SF6 Technique Is Not Affected by Ambient Weather Conditions. *Animals*, 11(2), 528. <https://doi.org/10.3390/ani11020528>
- Montagnini, F., Ibrahim, M., & Restrepo, E. M. (2013). Silvopastoral systems and climate change mitigation in Latin America. *Bois et Forêts Des Tropiques*, 316(2).
- Morgavi, D. P., Forano, E., Martin, C., & Newbold, C. J. (2010). Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal*, 4(7), 1024–1036. <https://doi.org/10.1017/S1751731110000546>
- Morgavi, D. P., Martin, C., Jouany, J. P., & Ranilla, M. J. (2012). Rumen protozoa and methanogenesis: Not a simple cause-effect relationship. *British Journal of Nutrition*, 107(3), 388–397. <https://doi.org/10.1017/S0007114511002935>
- Mottet, A., de Haan, C., Falcucci, A., Tempio, G., Opio, C., & Gerber, P. (2017). Livestock: On our plates or eating at our table? A new analysis of the feed/food debate. *Global Food Security*, 14, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2017.01.001>
- Murgueitio, E., Barahona, R., Flores, M. X., Mauricio, R. M., & Molina, J. J. (2015). The intensive silvopastoral systems in Latin America sustainable alternative to face climatic change in animal husbandry. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 49(4).
- Murgueitio, E., Calle, Z., Uribe, F., Calle, A., & Solorio, B. (2011). Native trees and shrubs for the productive rehabilitation of tropical cattle ranching lands. *Forest Ecology and Management*, 261(10), 1654–1663. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foreco.2010.09.027>
- Naranjo, J. F., & Cuartas, C. A. (2005). Nutritional characterization and ruminal degradation kinetics of some forages with potential for ruminants supplementation in the highland tropics of Colombia. *Rev CES Med Vet Zootec*, 6, 9–19.

- Narvaez, J. P., Preston, T., Apráez, J., & Riascos, A. (2020). Producción de metano en una incubación in vitro de *Cenchrus clandestinus* y *Lolium hybridum* suplementado con *Tithonia diversifolia* en el trópico alto del departamento del Putumayo, Colombia. *Livestock Research for Rural Development*, 32(9).
- Nash, D., & Williams, L. (1974). Flora of Guatemala Part XII. In *Fieldiana: Botany: Vol. v.24:pt.10*. Field Museum of Natural History. <https://www.biodiversitylibrary.org/item/19926>
- Newbold, C. J., de la Fuente, G., Belanche, A., Ramos-Morales, E., & McEwan, N. R. (2015). The role of ciliate protozoa in the rumen. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 6, Issue NOV). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01313>
- Odedire, J. A., & Olodi, F. F. (2014). Feeding Wild Sunflower (*Tithonia Diversifolia* Hemsl., A. Gray) to West African Dwarf Goats as a Dry Season Forage Supplement. *World Journal of Agricultural Research*, 2(6), 280–284. <https://doi.org/10.12691/wjar-2-6-6>
- Ojeniyi, S. O., Odedina, S. A., & Agbede, T. M. (2012). Soil productivity improving attributes of Mexican sunflower (*Tithonia diversifolia*) and siam weed (*Chromolaena odorata*). *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 24(3), 243–247.
- Ojo, O. A., Ojo, A. B., Ajiboye, B. O., Olaiya, O., Okesola, M. A., Boligon, A. A., de Campos, M. M. A., Oyinloye, B. E., & Kappo, A. P. (2018). HPLC-DAD fingerprinting analysis, antioxidant activities of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray leaves and its inhibition of key enzymes linked to Alzheimer's disease. *Toxicology Reports*, 5, 585–592. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.05.003>
- Olivares, E., Peña, E., & Aguiar, G. (2002). Metals and oxalate in *Tithonia diversifolia*(Asteraceae): concentrations in plants growing in contrasting soils, and Al induction of oxalate exudation by roots. *Journal of Plant Physiology*, 159, 743–749. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1078/0176-1617-0751>
- Partey, S. T. (2011). Effect of pruning frequency and pruning height on the biomass production of *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray. *Agroforestry Systems*, 83, 181. <https://doi.org/10.1007/s10457-010-9367-y>
- Pazla, R., Adrizal, A., & Sriagtula, R. (2021). Intake, Nutrient Digestibility and Production Performance of Pesisir Cattle Fed *Tithonia diversifolia* and *Calliandra calothyrsus*-Based Rations with Different Protein and Energy Ratios. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 9(10), 527–534. <https://doi.org/10.17582/journal.aavs/2021/9.10.1608.1615>
- Pereira, F. C., Teixeira, D. Lemos., Boyle, L. Ann., Pinheiro Machado Filho, L. Carlos., Williams, S. R. Owen., & Enriquez-Hidalgo, Daniel. (2021). The Equipment Used in the SF6 Technique to Estimate Methane Emissions Has No Major Effect on Dairy Cow Behavior. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.620810>

- Pérez, A., Montejo, I., Iglecias, J., López, O., Martín, D., García, D., Milian, I., & Hernández, A. (2009). *Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray. *Pastos y Forrajes*, 32(1), 1–5. file:///C:/Users/Simón/AppData/Local/Mendeley Ltd./Mendeley Desktop/Downloaded/Pérez et al. - 2009 - Tithonia diversifolia (Hemsley) A. Gray.pdf
- Pérez-Márquez, S., Ovani, V. S., Abdalla, A. L., & Mauricio, R. M. (2021). Why haven't silvopastoral system expanded in Brazil? *Livestock Research for Rural Development*, 33(5).
- Pérez-Márquez, S., Ribeiro, R. S., Abdalla, A. L., Lana, A. M. Q., & Mauricio, R. M. (2019). Does *Tithonia diversifolia* influences in vitro gas production parameters and nutritive value of graminous *Cynodon* spp and *Penisetum purpureum* when associated? In J. Rivera, P. Peri, J. Chará, M. Díaz, L. Colcombet, & E. Murgueitio (Eds.), *X Congreso internacional sobre sistemas silvopastoriles: por una producción sostenible* (pp. 493–495). Editorial CIPAV.
- Phiri, S., Barrios, E., Rao, I. M., & Singh, B. R. (2001). Changes in soil organic matter and phosphorus fractions under planted fallows and a crop rotation system on a Colombian volcanic-ash soil. *Plant and Soil*, 231(2), 211–223. <https://doi.org/10.1023/A:1010310300067>
- Porsavady, P., Preston, T. R., & Leng, R. A. (2016). Effect on feed intake, digestibility, N retention and methane emissions in goats of supplementing foliages of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and *Tithonia diversifolia* with water spinach (*Ipomoea aquatica*). *Livestock Research for Rural Development*, 28. <http://lrrd.cipav.org.co/lrrd28/5/phon28072.html>
- Ramírez-Rivera, U., Sanginés-García, J. R., Escobedo-Mex, J. G., Cen-Chuc, F., Rivera-Lorca, J. A., & Lara-Lara, P. E. (2010). Effect of diet inclusion of *Tithonia diversifolia* on feed intake, digestibility and nitrogen balance in tropical sheep. *Agroforestry Systems*, 80(2), 295–302. <https://doi.org/10.1007/s10457-010-9320-0>
- Ribeiro, R. S., Terry, S. A., Sacramento, J. P., Silveira, S. R. E., Bento, C. B. P., da Silva, E. F., Mantovani, H. C., da Gama, M. A. S., Pereira, L. G. R., Tomich, T. R., Mauricio, R. M., Chaves, A. V., Gama, M. A. S. da, Pereira, L. G. R., Tomich, T. R., Mauricio, R. M., & Chaves, A. V. (2016). *Tithonia diversifolia* as a supplementary feed for dairy cows. *PLoS ONE*, 11(12), e0165751. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165751>
- Ríos, C. I. K. (1998). *Tithonia diversifolia* (hemsl.) Gray, una planta con potencial para la producción sostenible en el trópico. In M. R. Méndez & M. D. Sanchez (Eds.), *Agroforestería para la producción Animal en Latinoamérica* (pp. 311–326). Estudio FAO Producción y Salud Animal, 143.
- Rivera, J. E., & Chará, J. (2021). CH₄ and N₂O Emissions From Cattle Excreta: A Review of Main Drivers and Mitigation Strategies in Grazing Systems. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.657936>

- Rivera, J., Chará, J., Arango, J., & Barahona, R. (2021). Effect of different genotypes of *Tithonia diversifolia* on fermentation of feed mixtures with *Urochloa brizantha* cv. Marandú. *Crop and Pasture Science*, 72(10), 850. <https://doi.org/10.1071/CP21102>
- Rivera, J., Chará, J., & Barahona, R. (2016). Análisis del ciclo de vida para la producción de leche bovina en un sistema silvopastoril intensivo y un sistema convencional en Colombia. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 19, 237–251. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93949148007>
- Rivera, J. E., Cuartas, C. A., Naranjo, J. F., Tafur, O., Hurtado, E. A., A, A. F., Chará, J., & Murgueitio, E. (2015). Efecto de la oferta y el consumo de *Tithonia diversifolia* en un sistema silvopastoril intensivo (SSPi), en la calidad y productividad de leche bovina en el piedemonte Amazónico colombiano. *Livestock Research for Rural Development*, 27. <http://www.lrrd.org/lrrd27/10/rive27189.html>
- Rutunga, V., Karanja, N. K., Gachene, C. K. K., & Palm, C. (1999). Biomass production and nutrient accumulation by *Tephrosia vogelii* (Hemsley) A. Gray and *Tithonia diversifolia* Hook F. fallows during the six-month growth period at Maseno, Western Kenya. *Biotechnology Agronomy Social and Environment*, 3(4), 237–246.
- Sao, N. van, Mui, N. T., & Binh, D. van. (2010). Biomass production of *Tithonia diversifolia* (Wild Sunflower), soil improvement on sloping land and use as high protein foliage for feeding goats. *Livestock Research for Rural Development*, 22(8). <http://www.lrrd.org/lrrd22/8/sao22151.htm>
- Singh, B., Mal, G., Gautam, S. K., & Mukesh, M. (2019). Gut/Rumen Microbiome—A Livestock and Industrial Perspective. In *Advances in Animal Biotechnology* (pp. 17–29). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21309-1_2
- Smith, J., Sones, K., Grace, D., MacMillan, S., Tarawali, S., & Herrero, M. (2013). Beyond milk, meat, and eggs: Role of livestock in food and nutrition security. *Animal Frontiers*, 3(1), 6–13. <https://doi.org/10.2527/af.2013-0002>
- Soares Filho, B. S. ; Hissa, L., Nassar, A., Harfuch, L., Ramalho Moreira, M. M., Chiodi Bachion, L., Barcellos Antoniazzi, L., Barioni, L. G. ;, Martha Junior, G., Sainz, R. D. ;, Alves, B. J. R. ;, de Lima, M. A. ;, Martins, O., Castelo Branco, M., Toledo, R., Regis Lima Verde Leal, M., Marques, F., Ferreira, R., Goulart, L., ... Almeida de Siqueira, R. (2011). Low carbon case study : technical synthesis report : land use, land-use change, and forestry. *World Bank*. <http://documents.worldbank.org/curated/en/753311468013874292/Brazil-Low-carbon-case-study-technical-synthesis-report-land-use-land-use-change-and-forestry>
- Storm, I. M. L. D., Hellwing, A. L. F., Nielsen, N. I., & Madsen, J. (2012). Methods for measuring and estimating methane emission from ruminants. *Animals*, 2(2), 160–183. <https://doi.org/10.3390/ani2020160>
- Strassburg, B. B. N., Latawiec, A. E., Barioni, L. G., Nobre, C. A., da Silva, V. P., Valentim, J. F., Vianna, M., & Assad, E. D. (2014). When enough should be enough: Improving the use of current agricultural lands could meet production demands and

- spare natural habitats in Brazil. *Global Environmental Change*, 28, 84–97. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2014.06.001>
- Terry, S. A., Ribeiro, R. S., Freitas, D. S., Delarota, G. D., Pereira, L. G. R. R., Tomich, T. R., Maurício, R. M., & Chaves, A. v. (2016). Effects of *Tithonia diversifolia* on in vitro methane production and ruminal fermentation characteristics. *Animal Production Science*, 56(3), 437–441. <https://doi.org/10.1071/AN15560>
- Verdecia, D. M., Ramirez, J. L., Leonard, I., Alvarez, Y., Bazán, Y., Bodas, R., Andrés, S., Alvarez, J., Giraldez, F., & Lopez, S. (2011). Nutritive value of the tithonia *diversifolia* in a location of valle del cauto. *Revista Electronica de Veterinaria*, 12.
- Vieira, R. F. (2017). *Ciclo do Nitrogênio em Sistemas Agrícolas* (1st ed.). Embrapa. www.embrapa.br/fale-conosco/sac
- Wahlen, M. (1993). THE GLOBAL METHANE CYCLE. In *Annu. Rev. Earth Planet. Sci* (Vol. 21). www.annualreviews.org
- Yousuf, M. B., Adeloye, A. A., Okukpe, K. M., Adeyemi, K. D., & Ogundun, N. J. (2014). Influence of dietary sunflower (*Tithonia Diversifolia*) leaf extracts on performance characteristics of goats fed cassava peeling wastes-based diet. *Journal of Agricultural Technology*, 10(1), 59–65.

3 A INCLUSÃO DE *Tithonia diversifolia* PODE MELHORAR A SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA DE DIETAS PARA OVINOS?

RESUMO

Dentre as alternativas apontadas como capazes de tornar a pecuária uma atividade mais eficiente e reduzir seu impacto ambiental, destacam-se o uso de alimentos de alta digestibilidade e o uso de forragens não convencionais. A *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (TD) surge como alimento para ruminantes. No entanto, pouco se tem discutido sobre os impactos dessa planta na dinâmica ruminal que levam ao melhor desempenho animal. O objetivo deste estudo foi avaliar como níveis crescentes de TD podem afetar a síntese de biomassa microbiana ruminal, degradabilidade e a produção de gases *in vitro*. Quatro dietas foram avaliadas: controle (40% de farelo de soja e milho e 60% de feno de Tifton 85 *Cynodon spp*) e três níveis crescentes de TD (9%, 27% e 45% - base em matéria seca). O ensaio de produção de gases *in vitro* de 96 h foi realizado incluindo 5 tempos de incubação (2, 4, 10, 24 e 96 h) usados para determinação da degradabilidade da matéria orgânica (DMO). O volume de gases produzidos, metano, degradabilidade da matéria orgânica, produção de AGCC (ácidos graxos de cadeia curta), fator de partição (FP) e biomassa microbiana (BM) foram também avaliados. Não houve efeito significativo ($P > 0,05$) entre a inclusão TD e a produção de gases *in vitro* na maioria dos tempos de incubação; somente às 6h de incubação, a produção de gases aumentou linearmente com a inclusão de TD ($R^2 = 0,19$ $p < 0,05$). Não houve efeitos da inclusão de TD sobre a emissão de CH_4 . A DMO aumentou linearmente com a inclusão de TD as 6 e 10 h, com TD45% sendo mais degradável do que a dieta controle a 6 h unicamente. Houve um efeito positivo linear ($R^2 = 0,20$ $p < 0,05$) entre a inclusão TD e FP. TD45% apresentou valores de FP significativamente maiores do que o controle. A BM também aumentou linearmente ($R^2 = 0,50$ $p < 0,05$) com a inclusão e todas as dietas com TD tiveram significativamente mais MB do que a dieta controle. A inclusão do TD nos níveis utilizados neste trabalho, revelou ter um impacto positivo na síntese de proteína bacteriana que pode estar relacionado a uma maior eficiência microbiana.

Palavras chave: *proteína microbiana, degradabilidade in vitro, produção de gases*

ABSTRACT

Among the alternatives pointed out as able to make livestock a more efficient activity and reduce its environmental impact, the use of feeds with a high digestibility and the use of non-conventional fodder species can be highlighted. *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (TD) has already gained attention as a feed for ruminants. Nonetheless, not so much has been discussed about the impacts of this plant on the rumen dynamics that lead to a better animal performance. The aim of this study was to assess how increasing levels of TD could affect ruminal microbial biomass synthesis, degradability and *in vitro* gas production of diets. Four diets were evaluated: a control diet (40% soybean meal and maize and 60% Tifton 85 (*Cynodon spp*) hay) and three increasing levels of TD (15, 45 and 75 % - dry matter basis) as a replacement of dietary roughage. A 96 h *in vitro* gas production assay was carried out and 5 incubation times (2, 4, 10, 24 and 96 h) were used for degradability determination. Gas produced, methane, organic matter degradability (OMD), short-chained fatty acid production (SCFA), partitioning factor (PF) and microbial biomass (MB) were evaluated among treatments. There was no significant effect ($P > 0,05$) between TD inclusion and *in vitro* gas production at most incubation times; only at 6h of incubation, gas production increased linearly with the TD inclusion ($R^2 = 0,19$ $p < 0,05$). There were no effects of TD inclusion on CH_4 . OMD increased linearly with the TD inclusion at 6 and 10 h with TD45% being more degradable than the control diet at 6h only. There was a positive linear relationship ($R^2 = 0,20$ $p < 0,05$) between TD inclusion and PF. TD45% had significantly higher PF values than the control. MB also increased linearly ($R^2 = 0,30$ $p < 0,05$) with the TD inclusion and all the diets with TD had significantly more MB than the control diet. The inclusion of TD at the levels used in this work, revealed to have a positive impact on the microbial protein synthesis that could be related to a higher microbial efficiency consequence of an increase in the quality of the substrate.

Keyword: *microbial protein, in vitro degradability*

3.1 Introdução

Dentre as atividades agrícolas a produção de ruminantes é um dos setores com maior impacto no uso da terra e dos recursos naturais (Poore e Nemecek, 2018); e a produção de concentrados para animais contribui significativamente para esses impactos (Gerber *et al.*, 2013). Portanto, as atividades pecuárias precisam ser mais eficientes no uso dos recursos naturais, e também utilizar dietas que não concorram com a alimentação humana (IPCC, 2019c) Dentre as alternativas apontadas como capazes de tornar a pecuária uma atividade mais eficiente e reduzir seu impacto ambiental, destacam-se o uso de alimentos com alta digestibilidade e o uso de espécies forrageiras não convencionais como potencial forrageiro reconhecido (Herrero *et al.*, 2016). Além disso, o uso aprimorado e eficiente de recursos alimentares não convencionais que não são utilizados por seres humanos é altamente relevante na preservação da segurança alimentar (Makkar, 2004) Nesse contexto, a seleção e estudos de forrageiras promissoras são necessários para entender os seus potenciais benefícios para a produção pecuária. *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (TD) já ganhou destaque como alimento para ruminantes, devido ao alto teor de proteína de suas folhas (Calsavara *et al.*, 2016; R. Maurício *et al.*, 2014; Rodríguez García, 2017), alta degradabilidade (Cardona Iglesias *et al.*, 2017; Mahecha & Rosales, 2005a; Porsavatdy *et al.*, 2016; Sao *et al.*, 2010; Verdecia *et al.*, 2011), produção de biomassa (Guatusmal-Gelpud *et al.*, 2020; Rutunga *et al.*, 1999; Sao *et al.*, 2010) e em geral pelo desempenho animal positivo (Cadena-Villegas *et al.*, 2020; Mahecha *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2015, 2016; Rivera *et al.*, 2015; Terry *et al.*, 2016)

No entanto, pouco se tem discutido sobre os impactos da TD na dinâmica ruminal decorrentes de sua composição química a qual pode ser fundamental para o desempenho animal. A técnica *in vitro* de produção de gases pode gerar informações relevantes sobre a cinética de fermentação e perfil de degradação dos substratos e produtos de fermentação (AGCC, CO₂, CH₄ e biomassa microbiana), bem como algumas das dinâmicas da população microbiana. Blummel *et al.* (1997) propuseram avaliar a produção de gases sempre acompanhada de um indicador de degradabilidade. Dessa forma, a degradabilidade forneceria uma indicação da quantidade de material que foi fermentado, e a produção de gases forneceria uma estimativa de quanto desse material fermentado foi utilizado para produzir ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e gases. Materiais altamente degradáveis, especialmente nos estádios iniciais de fermentação, podem ser traduzidos em melhor ingestão de matéria seca, e uma população ruminal mais eficiente pode levar mais proteína microbiana a ser enviada para o intestino posterior e, assim, estar disponível para o

ruminante (Valadares-Filho & Pina, 2006). Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar como níveis crescentes de TD podem afetar a síntese de proteína microbiana, degradabilidade da matéria orgânica, os parâmetros fermentativos ruminais a produção total de gases e de CH₄ *in vitro* de dietas para ovinos.

3.2 Material e métodos

Todos os procedimentos envolvendo a utilização de animais neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - CEUA-ESALQ / USP (Protocolo 008-2018). O experimento foi realizado no Laboratório de Nutrição Animal do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (LANA / CENA / USP), na cidade de Piracicaba, estado de São Paulo, Brasil.

3.2.1 Substratos e tratamentos

Os componentes da dieta, e suas respectivas composições químicas estão descritas na tabela 3.1.

Tabela 3.1 Composição bromatológica dos componentes das dietas (g/kg)

	Farelo de Soja	Milho	Feno Tifton 85	<i>Tithonia diversifolia</i>
MS	897,89	887,00	903,04	887,07
aFDNom	150,00	111,48	735,81	677,71
FDAom	110,96	34,20	360,23	566,62
PB	479,23	127,14	140,45	78,84
NDT	832,25	830,32	550,15	630,21
MM	69,19	12,79	98,96	111,35

MS: Matéria seca, aFDNom: Fibra em detergente neutro avaliada utilizando amilase e sulfito e expressada como livre de cinzas, FDAom: Fibra em detergente ácido expressada como livre de cinzas, PB: Proteína Bruta, NDT: Nutrientes digestíveis totais, MM; Material mineral.

Quatro simulações de dietas (Tabela 3.2) foram avaliadas, mantendo-se fixa a relação volumoso:concentrado (60:40), assim foram compostas: uma dieta controle (40% de farelo de soja e grão de milho e 60% de feno de Tifton 85 (*Cynodon spp*) e três níveis crescentes de TD (9, 27 e 45% - base de matéria seca) como uma substituição do feno de Tifton. Todas as dietas foram formuladas para os requisitos de manutenção de carneiros em manutenção (National Research Council, 2007); e foram balanceadas para serem isoprotéicas, isoenergéticas e isofibrosas, usando o *software* Supercrac® e os valores de MS, PB, FDN e NDT dos componentes.

Tabela 3.2. Composição das dietas em base matéria seca (%)

	TD0%	TD9%	TD27%	TD45%
<i>Tithonia diversifolia</i>	0,00	9,00	27,00	45,00
Tifton 85	60,00	51,00	33,00	15,00
Milho grão	26,30	25,47	24,62	23,49
Farelo de soja	13,70	14,26	15,38	16,51

Tabela 3.3. Composição química-bromatológica de dietas com níveis crescentes de *Tithonia diversifolia*

Parâmetro	0%TD	9%TD	27%TD	45%TD
MS (g/kg)	910,6	906,9	906,4	905,7
MO (g/kg MS)	938,5	928,0*	929,6	920,5
PB (g/kg MS)	163,0	158,6	156,5	156,3
aFDNom (g/kg MS) ^{ab}	409,0	396,6	393,3	392,7
FDAom (g/kg MS) ^b	299,2	300,3	312,7	345,8
Lignina (g/kg MS) ^b	75,6	83,92	98,48	129,0
EB (kcal/gMS)	3748	3713	3715	3697
EE (g/kg MS)	23,7	18,0	17,67	17,5
CNF (g/kg MS)	342,7	366,1	367,0	353,8

MS: matéria seca, MO: matéria orgânica, PB: proteína bruta, FDN: fibra em detergente neutro, FDA: fibra em detergente ácido, EE: extrato etéreo, CNF: Carboidratos no fibrosos.^a:FDN avaliado usando amilase termo estável e expressado como livre de cinzas residuais. ^b expressado como livre de cinzas residuais.

A TD foi coletada em diferentes áreas ao redor da cidade de São João del Rei no estado de Minas Gerais, Brasil. A planta inteira, (folhas e caules), em estágio de floração, foi colhida, triturada e depois seca ao sol. A TD seca foi então triturada novamente a aproximadamente 1 cm para facilitar o processo de mistura com o resto de componentes da dieta. O grão de milho e o feno de tifton foram também triturados a 1 cm. O farelo de soja foi utilizado sem processamento prévio de tritura mecânica.

Uma vez feita a mistura dos ingredientes para cada dieta, as dietas foram então moídas a 1 mm (em moinho Willey) para o ensaio *in vitro* e também para determinação da composição química. As diretrizes da AOAC, (2011) foram seguidas para determinação de teor de matéria seca (MS) (método 934.01), proteína bruta (PB) (método 2001.11), extrato etéreo (EE) (método 2003.5) e fração de cinzas (método 942.05). A fibra em detergente neutro (FDN), a fibra em detergente ácido (FDA) e a lignina foram avaliadas de acordo com (Van Soest *et al.*, 1991) adaptado por (Mertens *et al.*, 2002). Os carboidratos não fibrosos foram calculados pela equação: $NFC = 100 - (PB + FDN + EE + Cinza)$ (Sniffen *et al.*,

1992). O conteúdo de fenóis totais e taninos totais foi determinado utilizando o método de Folin-Ciocalteu (Makkar 2003) usando aroeira (*Schinus terebinthifolius*) como padrão de referência para as análises.

3.2.2 Ensaio *in vitro* e produção de gases

O conteúdo ruminal de oito carneiros Santa Inês adultos canulados no rúmen, foi coletado no dia da incubação antes da alimentação da manhã, e foi utilizado como inóculo seguindo o procedimento descrito por (Lima *et al.*, 2018) Os animais foram previamente adaptados (14 dias) às dietas experimentais descritas acima (dois animais por tratamento). Quatro inóculos foram preparados, cada um oriundo de dois animais os quais receberam a mesma dieta (tratamento); cada substrato para o ensaio *in vitro* foi incubado usando o inóculo do par de animais sob a mesma dieta do tratamento. Esse procedimento foi repetido por quatro períodos (quadrado latino), mudando a cada vez a dieta de cada par de animais.

Para a preparação do substrato, 1 g de cada dieta foi pesado dentro de sacos de fibra Ankom F57 (Ankom Technology Corp., Macedon, NY, EUA), selado a quente e colocado em frascos de vidro de 160 mL tipo penicilina preenchidas com 50 mL de meio tamponado de Menke (Menke & Steingass, 1988) e 25 mL de inóculo. A incubação foi realizada de acordo com as metodologias descritas por Maurício *et al.* (1999) e adaptadas por Bueno *et al.* (2005) e Longo *et al.* (2006)

Dois frascos por tratamento foram incubados utilizando o inóculo da dieta correspondente, e cinco tempos de incubação foram usados para avaliação da degradabilidade (2, 6, 10, 24 e 96 h). Além disso, um frasco sem substrato (branco) e um frasco com amostra padrão (padrão interno do laboratório) foram incluídos com cada inóculo e tempo de incubação, totalizando 80 frascos. Em seguida, os frascos foram fechados com tampa de borracha e colocados em estufa de ventilação forçada (incubadora) a 39°C.

À 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 19, 24, 30, 36, 48, 60, 72 e 96 h após a inoculação (0h), a pressão interna dos frascos foi medida usando um transdutor de pressão e datalogger (Pressure Press 800, LANA, CENA / USP, Piracicaba, Brasil). O volume total de gases produzido em cada frasco foi determinado seguindo a equação $V = (5,96 \times P)$ ($n = 321$, $R^2 = 0,991$) específica para este laboratório, onde: V = volume de gases (mL) e P = pressão medida (psi).

3.2.3 Determinação de metano

Após a mensuração de pressão interna de cada frasco, com a ajuda de uma seringa, uma amostra de gases de cada frasco foi coletada e armazenada em tubos de ensaio de 10 mL providos com tampa de borracha para posterior determinação de CH₄ por cromatografia gasosa (Lima *et al.*, 2018). Para a amostragem de CH₄, ao final de cada tempo de incubação, foi obtido um *pool* de 10 mL de gases, composto pelas amostras colhidas em cada medição de pressão interna. Após a coleta dos gases, a pressão dos frascos foi liberada, seu conteúdo homogeneizado e devolvidos à incubadora.

A quantidade de metano foi determinada por meio da equação: CH₄ (mL/gMS) = (HS + PG) × CH₄(%), onde: HS = headspace (85mL), PG (volume de gases produzido (mL), CH₄ % = concentração de metano (mL/mL) (Longo *et al.*, 2006).

3.2.4 Degradabilidade *in vitro*

Em cada um dos cinco tempos de incubação, posteriormente as medidas de pressão e amostragem dos gases, a incubação foi interrompida em 16 dos frascos (2 por tratamento). As garrafinhas foram suspensas em água fria e os saquinhos retirados e colocados em bandejas contendo água e gelo para interromper o processo fermentativo. Todos os saquinhos, foram tratados com solução de detergente neutro, sem adição de alfa amilase, por 1 hora a 90°C seguido de quatro lavagens de 5 minutos com água destilada a 90°C (TE-149, Tecnal, Piracicaba – SP, Brasil) e finalizando com a lavagem dos saquinhos em acetona por 5 minutos. Os saquinhos foram colocados em estufa a 105°C por 24 horas e posteriormente pesados para cálculo da degradabilidade do FDN (DFDN), sendo então reduzidos a cinzas em mufla (por 5 horas a 550°C) para determinação da degradabilidade verdadeira da matéria orgânica (DIVMO) segundo, Goering e Van Soest (1975)

3.2.5 Parâmetros fermentativos

Após o período de fermentação, de cada frasco foram coletadas amostras de conteúdo líquido para determinação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), nitrogênio amoniacal (N-NH₃), e populações de protozoários, conforme metodologia descrita por Lima *et al.* (2018). O pH foi mensurado (pH-metro modelo TEC-2, Tecnal, Piracicaba, Brazil) e as amostras foram armazenadas em frascos de vidro de 20 mL a -20°C.

O fator de particionamento (FP) e a biomassa microbiana (BM) foram calculadas seguindo as equações descritas por Blümmel *et al.* (1997):

$$FP = MOVD/GPMO \quad (1)$$

$$MB = MOVD - (GPMO \times FE) \quad (2)$$

Onde: FP = Fator de particionamento; MOVD = matéria orgânica verdadeiramente degradada (mg); GPMO = volume de gases produzido por grama de matéria orgânica degradada (mL/gMOD); MB = Massa microbiana (g); FE = Fator estequiométrico, (calculado usando o método descrito por Blümmel *et al.* (1997)).

3.2.6 Seleção do modelo matemático para avaliação da cinética fermentativa

Oito modelos matemáticos utilizados para descrever a cinética de produção de gases foram ajustados a 16 curvas de produção de gases derivadas da fermentação *in vitro* de cada dieta. Os modelos estão apresentados na tabela 3.3.

Para a avaliação de ajuste dos modelos, critérios estatísticos foram usados (de Oliveira *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2011). O critério de informação de Akaike corrigido (AICc), soma dos quadrados residual (RSS), erro de predição quadrado médio (rMSPE) e a regressão dos valores observados versus preditos (R^2) foram usados para a avaliação do ajuste dos modelos as curvas observadas. Os atributos derivados da produção de gases, i.e: volume de gases final assintótico (V_f), Tempo à metade da produção de gases total ($T_{0.5}$), volume de gases em $T_{0.5}$ ($V_{0.5}$), taxa de produção de gases, assumida como a taxa constante de degradação do substrato (k), e lagtime (L) foram comparados entre os modelos, e os valores preditos de produção de gases à 12, 24, 48, 72 e 96 horas pelos modelos foram comparados contra os valores observados. Uma vez selecionado o modelo com o melhor ajuste, baseado nos critérios estatísticos e na acurácia da predição, este foi selecionado para obter os atributos derivados da produção de gases de cada tratamento e realizar as comparações respectivas entre eles.

Tabela 3.3. Modelos matemáticos usados para o ajuste das curvas de produção de gases *in vitro*

Modelo	Equação	Referencia
Exponencial	$V = V_f(1 - \exp(-kt))$	Schofield <i>et al.</i> (1994)
Gompertz	$V = V_f \exp(-\exp(1 - k(t - L)))$	Schofield <i>et al.</i> (1994)
France	$V = V_f(1 - \exp(-k(t - L) - d(\sqrt{t} - \sqrt{L})))$	France <i>et al.</i> (1993)
Logístico	$V = \frac{V_f}{1 + \exp(2 - 4k(t - L))}$	Pitt <i>et al.</i> (1999)

Logístico-Bicompartmental	$V = \frac{V_{f1}}{1 + \exp(2 - 4k_1(L - t))} + \frac{V_{f2}}{1 + \exp(2 - 4k_2(t - L))}$	Pitt <i>et al.</i> (1999)
Logístico Exponencial	$V = V_f \frac{(1 - \exp(-kt))}{1 + \exp(\ln\left(\frac{1}{d}\right) - kt)}$	Wang <i>et al.</i> (2011)
Logístico Exponencial + Lag	$V = V_f \frac{(1 - \exp(-k(t - L)))}{1 + \exp(\ln\left(\frac{1}{d}\right) - k(t - L))}$	Wang <i>et al.</i> (2011)
Gompertz + Exponencial	$V = V_{f1}(1 - \exp(-k_1t)) + V_{f2}\exp(\exp(1 + k_2e(L - t)))$	de Oliveira <i>et al.</i> (2020)

V=volume de gases (mL), Vf= Volume de gases final assintótico, Vf1= Volume de gases produzido pela fração rapidamente degradável, Vf2= Volume de gas produzido pela fração lentamente degradável, k = taxa de produção de gas, k1=taxa de produção de gases da fração rapidamente degradável, k2= taxa de produção de gases da fração lentamente degradável, t = Tempo, L = lagtime, d = parâmetro que define a forma da curva,

3.2.7 Avaliação e seleção dos modelos estatísticos de cinética de fermentação

Os critérios estatísticos obtidos para os modelos avaliados estão apresentados na tabela 3.6. De maneira geral, o modelo Exponencial + Gompertz teve o melhor desempenho estatístico com o maior R^2 (0.999), e os menores valores de AICc (74.2) RSS (39.65) e rMSPE (1.5). Seguido pelo modelo Logístico-Exponencial + Lag, o modelo Logístico-Exponencial, o modelo de France e o modelo Exponencial. Em contraste, o modelo Logístico, teve o pior desempenho estatístico com o menor R^2 (0.970) e os maiores valores de AICc (122.1) e rMSPE (8.1), seguido pelo modelo de Gompertz, e o modelo Logístico-Bicompartmental. Por outro lado, avaliando os volumes de gases estimados pelos modelos, temos que, comparado com os valores médios observados, todos os modelos conseguiram prever com acurácia os volumes de gases produzidos à 24, e 72 horas. E com exceção dos modelos de Gompertz e Logístico, todos os modelos conseguiram estimar adequadamente os volumes de gases produzidos à 12, 48 e 96 horas. Unicamente, o modelo Logístico-Exponencial + Lag e o modelo de Gompertz não apresentaram diferenças significativas na estimativa de $T_{0.5}$ e de maneira similar o modelo Logístico-Exponencial + Lag, Logístico-Exponencial e Bicompartmental, conseguiram estimar com acurácia o volume de gases produzido à $T_{0.5}$. O tempo de lag variou com o modelo usado para sua estimativa, os valores mais altos foram estimados pelo modelo Logístico-Bicompartmental e Exponencial + Gompertz com valores de 4.6 e 4.4 horas, respectivamente. Os modelos Logístico, de France, Logístico-Exponencial + Lag e de Gompertz estimaram tempos de lag de 0.67, 0.48, 0.36 e 0.11 horas respectivamente.

A taxa de degradação também apresentou variações entre os modelos. O modelo Exponencial + Gompertz estimou uma taxa de degradação de 11,3% / h para a fração

lentamente degradável e de 2.4% / h para a fração rapidamente degradável. O contrário ocorreu com o modelo Logístico-Bicompartimental onde foi observada uma maior taxa de degradação na fração rapidamente degradável 9.6% / h e 1.8% / h para a fração lentamente degradável. Os modelos Logístico-Exponencial + Lag, Exponencial, Logístico-Exponencial, de France e Logístico estimaram taxas de degradação similares, com valores de 3.3, 3, 3.5, 2.8, e 2.5 % / h, respectivamente.

Tabela 3.4. Critérios estatísticos, volumes de gases preditos e parâmetros estimados para 8 modelos matemáticos de produção de gases *in vitro*

Modelo	AICc	RSS	R ²	rMSPE	V ₁₂	V ₂₄	V ₄₈	V ₇₂	V ₉₆	T _{0.5}	V _{0.5}	Vf	k	lag	Vf ₁	k ₁	Vf ₂	k ₂
Valores Observados					49,1	82,8	119,9	141,5	153,0	21,6 ^b	76,5 ^a							
Logístico Exponencial + Lag	83,02	79,16	0,998	2,22	47,8	82,5	123,0	141,9	150,7	22,9	79,5	159,0	3,3%	0,36				
Exponencial + Gompertz	74,22	39,65	0,999	1,57	48,8	83,4	121,0	141,5	153,0		84,4*	168,9		4,40	144,7	2,4%	24,1	11,3%
Exponencial	80,15	110,69	0,997	2,63	48,3	82,0	122,2	142,0	151,9	23,6*	81,0*	161,9	3,0%					
Logístico Exponencial	81,91	95,76	0,997	2,45	47,7	82,3	123,1	142,0	150,7	22,9*	79,3	158,6	3,5%					
France	84,31	90,09	0,997	2,37	48,5	82,2	122,1	141,9	152,0	25,9*	86,0*	163,0	2,8%	0,48				
Logístico Bicompartimental	109,08	280,82	0,993	4,19	49,9	82,5	122,7	142,9	148,3		74,9	149,7		4,68	48,1	9,6%	101,6	1,8%
Gompertz	111,58	547,85	0,985	5,85	42,4*	83,2	128,4*	140,3	143,0*	20,5	71,9*	143,8	6,8%	0,11				
Logístico	122,16	1064,52	0,972	8,16	41,3*	81,3	130,5*	138,8	139,8*	28,6*	95,7*	139,9	2,5%	0,67				
EP					2,17	4,47	6,10	6,89	7,35	0,51	1,59	3,02						
p-Valor					<0,001	0,886	<0,001	0,83	<0,001	<0,001	<0,001							

AICc = Critério de informação de Akaike corrigido, RSS = Soma dos quadrados residuais; R² = Coeficiente de determinação entre os valores preditos e observados; rMSPE = Erro de predição quadrado médio; v₁₂, v₂₄, v₄₈, v₇₂, v₉₆ = gases produzido (mL) à 12, 24, 48, 72 e 96 h, respectivamente; T_{0.5} = Tempo à metade da produção de gases máxima; V_{0.5} = gases produzido (mL) à T_{0.5}; Vf = volume de gases final assintótico (mL); k = taxa de degradação (%/h); VF1 = Gases produzidos pela fração rapidamente degradável; VF2 = gases produzidos pela fração lentamente degradável; k₁, k₂ = Taxa de degradação da fração rápida e lentamente degradável, respectivamente.

* Na mesma coluna, difere significativamente dos valores Observados pelo teste Dunnett à 0,05 confiança. EP = Erro Padrão; p-Valor = p-Valor do Anova.

^a Metade do volume final de gases; ^b Tempo médio estimado usando regressão polinomial a partir da metade do volume final de gases.

3.2.8 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando um delineamento em quadrado latino 4 x 4, com quatro períodos e quatro fontes de inóculo e quatro tratamentos (níveis de inclusão de TD). Os cinco tempos de incubação foram considerados como uma subparcela do tratamento. As médias das variáveis avaliadas foram comparadas usando contrastes ortogonais, comparando os tratamentos com inclusão de TD contra a dieta sem TD; TD0% vs TD9% (1,-1,0,0) TD0% vs TD27% (1,0,-1,0), TD0% vs TD45% (1,0,0,-1).

Foi realizada análise de regressão para avaliar o efeito das doses crescentes de TD nas variáveis avaliadas em cada tempo de incubação e teste de correlação de Pearson para avaliar a relação entre variáveis independentes. Para a análise de composição bromatológica, os dados foram avaliados como um desenho em blocos aleatorizado (DBC), usando período como bloco e contrastes ortogonais para a comparação das médias. Análise de regressão foram realizados para avaliar os efeitos das doses crescentes de TD sobre a composição bromatológica. Em todos os casos foi realizado teste de normalidade de Shapiro Wilk e de Homoscedasticidade de Bartlett. E onde necessário os dados foram transformados usando transformação exponencial, logística ou raiz quadrada. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* R (R Core Team, 2021) e os pacotes “stats”, “lmerTest”, “emmeans”, “multcomp” e “ggplot2” (Hothorn *et al.*, 2008; Kuznetsova *et al.*, 2017; Lenth, 2021; Wickham, 2016).

Os dados oriundos da produção de gases *in vitro* foram avaliados usando modelo estatístico abaixo:

$$Y_{ijklm} = \mu + t_i + l_j + c_k + e_{ijkl} + T_m + (T/t)_{im} + \varepsilon_{iml}$$

Onde: Y_{ijkl} = Observação do tratamento i na linha j na coluna k da repetição l no tempo m

μ = efeito médio geral

t_i = efeito do tratamento i (sendo i o nível de TD)

l_j = efeito da linha j (período)

c_k = efeito da coluna k (fonte do inóculo)

e_{ijkl} = erro aleatório atribuído a parcela

T_m = efeito do tempo m (tempo de incubação, 2, 6, 10, 24, 96h)

$(t/T)_{im}$ = efeito do tratamento dentro de tempo de incubação

e_{ilm} = erro aleatório atribuído a subparcela

Os dados da composição bromatológica

$$Y_{ijk} = \mu + t_i + b_j + e_{ijk}$$

Onde: Y_{ijk} = Observação do tratamento i no bloco j da repetição k

μ = efeito médio geral

t_i = efeito do tratamento i (nível de TD)

b_j = efeito da bloco j (período)

e_{ijk} = erro aleatório

Os atributos derivados da produção de gases *in vitro* das dietas para a seleção do melhor modelo de cinética ruminal, foram avaliados usando o modelo estatístico:

$$Y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$$

Onde: Y_{ij} = Observação do tratamento i da repetição j

μ = efeito médio geral

t_i = efeito do tratamento i (nível de TD)

e_{ij} = erro aleatório

3.3 Resultados

3.3.1 Composição química

A composição química dos substratos utilizados está apresentada na tabela 3.3. O conteúdo de cinzas, FDA e lignina das dietas aumentou linearmente ($R^2=0,90$; 0,23; 0,66; respectivamente) com a inclusão de TD. O conteúdo de fenóis totais e taninos totais diminuiu de maneira linear com o aumento na inclusão de TD na dieta ($R^2=0,74$; 0,80; respectivamente) e 9% de inclusão de TD foi suficiente para reduzir o conteúdo de taninos significativamente, em relação a dieta sem TD. Em contraste, o aumento de TD na dieta não conseguiu explicar de maneira significativa a variabilidade nos outros componentes bromatológicos (p-valor da regressão > 0,05). No caso das cinzas (MO – 1000), 15% de inclusão de TD foi suficiente para proporcionar diferenças ($P<0,05$) vs. o controle sem TD (TD0%), por outro lado, apesar de ter uma correlação linear, só a dieta com 45% de TD teve

maior conteúdo de FDA quando comparada com o controle. Similar foi o caso do conteúdo de lignina e de extrato etéreo nas dietas, os quais nas inclusões de 27% e 45% de TD foram significativamente diferentes do controle. Não foram observadas diferenças significativas das dietas em relação ao controle no conteúdo de PB, FDN ou CNF.

3.3.2 Atributos estimados da cinética de fermentação *in vitro*

Os parâmetros estimados da cinética de fermentação das dietas estão apresentados na tabela 3.5. O modelo selecionado para a estimação dos atributos da cinética de fermentação foi o modelo Logístico Exponencial + Lag descrito por (Wang *et al.*, 2011) de acordo com os resultados apresentados na seção 3.4.

O nível de inclusão de TD não teve efeito linear sobre os parâmetros da cinética de fermentação. Porém, o volume final assintótico de gases produzido (Vf) foi menor na dieta com a inclusão mais alta de TD quando comparada com o controle sem TD. Similar é o caso do volume de gases na metade da produção máxima ($V_{T0.5}$) onde a dieta TD45% produziu menos gases do que a dieta TD0%. A taxa de produção de gases (k) esteve em torno de 3,0 a 3,6 % por hora, sem diferenças significativas nos tratamentos, similar foi o caso do tempo de *lag* que também não variou entre os tratamentos ($P > 0,05$) com valores médios de 18 a 24 minutos.

Tabela 3.5. Parâmetros estimados da cinética de fermentação de dietas com níveis crescentes de *Tithonia diversifolia*

Parâmetro	TD0%	TD9%	TD27%	TD45%	EP	p-Valor
Vf (mL/gMS)	166,0	158,7	158,9	152,2*	4,63	0,0249
k (%/h)	3,3	3,0	3,3	3,6	0,16	0,1223
L (h)	0,4	0,3	0,4	0,4	0,20	0,0972
t0.5 (h)	22,7	23,7	23,0	22,0	0,65	0,1705
v24 (mL/gMS)	86,2	80,2*	82,3	81,4	2,21	0,0344
vt0.5 (mL/gMS)	83,0	79,4	79,4	76,1*	2,32	0,0267
u0.5 (%/h)	3,2	3,0	3,2	3,4	0,10	0,1353

* Dentro da mesma linha, difere significativamente do tratamento 0%TD usando contrastes ortogonais a $p < 0,05$; EP = Erro padrão; p-Valor = p-Valor mínimo da comparação por contrastes ortogonais; Linear = p-Valor da regressão linear.; Vf = volume de gases final assintótico; k = taxa de produção de gases; L: lag time; v24 = volume de gases produzido à 24 h; t0.5 = Tempo à metade da produção de gases máxima; vt0.5 = volume de gases produzido à t0.5; u0.5 = taxa de produção de gases à t0.5.

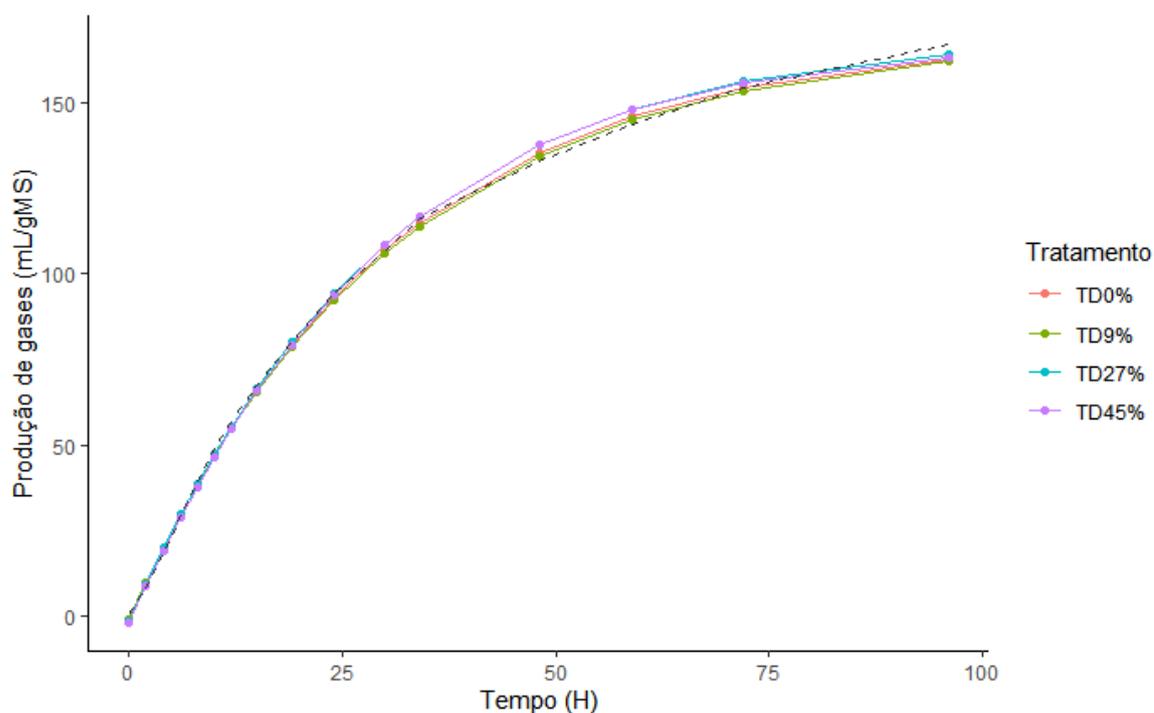


Fig. 3.1. Curvas estimadas* de produção de gases *in vitro* para 4 dietas com níveis crescentes de inclusão de TD. A linha pontuada representa os valores médios observados de produção de gases para os 4 tratamentos. *(Wang *et al.*, 2011)

3.3.3 Fenóis e Taninos Totais

Foi observada uma diminuição linear ($p < 0,001$) na concentração tanto de fenóis totais ($R^2 = 0,74$) quanto de taninos totais ($R^2 = 0,80$) como consequência da inclusão de TD nas dietas (Tabela 3.6). No caso dos fenóis totais, todas as dietas com inclusão de TD tiveram valores significativamente inferiores quando comparados contra a dieta controle. E no caso dos taninos totais unicamente a dieta com 9% de TD não apresentou diferenças significativas respeito ao controle sem TD.

Tabela 3.6. Conteúdo de fenóis totais e taninos totais de dietas com níveis crescentes de *Tithonia diversifolia*

Parâmetro	0%TD	9%TD	27%TD	45%TD	SE	p-Value	L	R ²
FT (gAT/kg MS)	7,67	6,73*	5,79*	4,81*	0,24	<0,001	<0,001	0,74
TT (gAT/kg MS)	4,30	3,66	3,02*	2,33*	0,29	<0,001	<0,001	0,80

FT: fenóis totais, TT: taninos totais (expressados como gramas de ácido tânico por kg de matéria seca).

* na mesma linha, difere significativamente do controle (TD0%) na comparação por contrastes ortogonais. EP: Erro padrão, L : p-valor da regressão linear entre o nível de TD e a quantidade do componente na dieta, R²: Coeficiente de determinação da regressão.

3.3.4 Produção de gases *in vitro*

A produção de gases acumulativa *in vitro* (mL/gMOD) das dietas com inclusão de TD está apresentada na tabela 3.6 (Fig.3.2 (a)). Não houve um efeito claro da inclusão da TD na produção de gases *in vitro*. Unicamente às 6 horas após a incubação o volume dos gases teve um leve aumento linear ($R^2 = 0,19$ $p < 0,05$) como consequência da inclusão de

TD. Porém, a quantidade de gases produzida nesse tempo pelas dietas com inclusão de TD não foi diferente da dieta controle. A 24 horas de incubação a dieta 9%TD produziu menor volume de gases ($P < 0,05$) do que a dieta sem TD.

3.3.5 Degradabilidade *in vitro* da matéria orgânica

Os resultados da degradabilidade *in vitro* da matéria orgânica (DIVMO) estão apresentados na tabela 3.7 (Fig. 3.2 (b)). A 6 horas de incubação o aumento de TD na dieta incrementou de maneira linear a DIVMO ($P < 0,05$). A 10 horas de incubação o incremento da degradabilidade em relação a inclusão de TD foi quadrático ($p < 0,05$). Apesar disso, em ambos os casos o coeficiente de determinação foi baixo (0,18 e 0,16; respectivamente). A 6 horas de incubação a degradabilidade da dieta com a maior inclusão de TD (45%) foi significativamente maior quando comparada com a dieta sem TD. Não foram observados efeitos significativos da dieta sobre a DIVMO nos demais tempos de incubação

3.3.6 Produção de metano *in vitro*

Os resultados da produção de metano *in vitro* (mL / g MOD) estão apresentados na tabela 3.7. Não foi observado um efeito significativo do nível de inclusão sobre a produção de metano (Regressão $> 0,05$) dos tempos de incubação avaliados. Entretanto a dieta com 9% de TD apresentou de maneira geral, menor produção de metano do que a dieta sem TD (Fig. 3.2 (c)) com uma produção significativamente inferior às 24 e 96 de incubação. Não foram observados efeitos da dieta sobre a produção de metano em nos demais tempos de incubação.

Tabela 3.7. Produção de gases *in vitro*, degradabilidade *in vitro* da matéria orgânica e produção de metano de quatro dietas com níveis crescentes de TD em cinco tempos de incubação.

Tempo de Incubação	0%TD	9%TD	27%TD	45%TD	EP	p - Valor	L	Q	R ²
Produção de gases <i>in vitro</i> (mL / g MOD)									
2	2,19	2,41	1,64	1,83		0,1537			
6	9,24	9,51	10,54	10,80		0,1819	0,006		0,19
10	20,79	17,94	18,49	18,53	3,011	0,1136			
24	48,33	41,71*	43,81	44,18		0,0373			
96	104,46	101,05	106,93	91,52		0,1054			
Degradabilidade <i>in vitro</i> da matéria orgânica (g / kg)									
2	341,34	323,08	329,00	368,49		0,1794			
6	370,20	380,89	398,13	426,49*	17,871	0,0198	0,009		0,18
10	448,67	417,56	437,03	470,25		0,1324	0,077	0,045	0,16

24	533,54	508,12	516,16	547,76		0,2047
96	686,77	687,56	703,20	669,55		0,3724
Produção de metano (mL / g MOD)						
2	0,054	0,029	0,056	0,049		0,9385
6	0,387	0,297	0,335	0,363		0,7855
10	1,572	0,942	1,273	1,251	0,3155	0,0928
24	4,162	2,980*	3,649	3,575		0,0096
96	5,549	4,670*	4,958	4,837		0,0317

* Dentro da mesma linha, difere significativamente do tratamento 0%TD usando contrastes ortogonais a $p < 0,05$; EP = Erro padrão; p-Valor = p-Valor mínimo da comparação por contrastes ortogonais; L, Q = p-Valor da regressão linear e quadrática, respectivamente. R^2 = Coeficiente de determinação; MOD = Materia orgânica degradada.

3.3.7 Parâmetros da fermentação ruminal

Os resultados da concentração de AGCC (umol/mol (v/v)) estão apresentados na tabela 3.8. Na figura 3.2 (d) está apresentada a concentração de AGCC através do tempo para as quatro dietas apesar de que a dieta com 45 % de TD teve uma menor concentração de AGCC totais, não foram encontradas diferenças significativas quando comparada contra a concentração de AGCC da dieta sem TD na maioria dos tempos de incubação. No entanto, às 6 horas de incubação foi observado um efeito negativo ($p < 0,05$) na concentração de AGCC, ($R^2 = 0,15$) de acordo com aumento de TD nas dietas. De maneira similar, às 10 horas de incubação a dieta TD45% apresentou menor concentração de AGCC quando comparado com a dieta sem TD.

Com excessão de 96 h, foi observada um efeito negativo na concentração de acetato ($R^2 = 0,12 - 0,19$) com o aumento do nível de inclusão de TD nas dietas. À 6, 10 e 24 h de incubação a concentração de acetato na dieta com o maior conteúdo de TD (TD 45%) foi significativamente ($p < 0,05$) inferior a aquela das dietas sem TD. Quando comparada com a dieta controle, não foram observadas diferenças na concentração de acetato à 2 e 96 horas de incubação.

À 2 e 6 horas de incubação não foram observadas diferenças na concentração de propionato em relação ao controle, nem foram observados efeitos do nível de inclusão ($p > 0,05$). Entretanto, a 10, 24 e 96 horas foi observado sim um efeito linear da inclusão de TD sobre a concentração de propionato ($R^2 = 0,24, 0,13, 0,11$, respectivamente); com valores mais baixos de propionato nas inclusões mais altas de TD. A concentração de propionato nas dietas com 45% de TD foi significativamente ($< 0,05$) menor do que a dieta sem TD nos tempos 10, 24 e 96 h (17,82 vs 21,66, 27,13 vs 31,24 e 40,9 vs 44,9 umol / mol,

respectivamente). Não foram observadas diferenças significativas na concentração de butirato em nenhum dos tempos de incubação.

Unicamente a 10 h de incubação foram observadas diferenças na proporção de acetato:propionato (A:P). Foi observado um efeito positivo ($p < 0,05$) na proporção, ($R^2 = 0,13$) associada ao aumento na inclusão de TD na dieta. Apesar disso, a proporção A:P de nenhum dos níveis de inclusão de TD diferiu significativamente do tratamento controle.

Só foram observadas diferenças nas concentrações de valerato às 96 h de incubação. Nesse tempo, foi observada uma diminuição na concentração de valerato, explicada parcialmente ($R^2 = 0,20$) pelo aumento da TD na dieta. Somente a dieta com 45% de inclusão foi significativamente diferente da dieta sem TD (4,47 vs 5,51 $\mu\text{mol} / \text{mol}$, respectivamente). Não foram observadas mudanças nas concentrações de valerato nos demais tempos de incubação. Às 2, 6 e 10 horas de incubação foi observado um efeito positivo na concentração de isovalerato ($R^2 = 0,13; 0,10; 0,09$; respectivamente) associado ao aumento na quantidade de TD na dieta. A concentração de isovalerato foi significativamente maior na dieta com 45% de TD, quando comparada contra a dieta controle, nos tempos 2, 6 e 10 h. Por outro lado, a 24 e 96 h não foram observadas diferenças nas concentrações de isovalerato. Unicamente a 2 e 6 horas de incubação foi observado um efeito linear da inclusão de TD sobre a concentração de isobutirato ($p < 0,05$; $R^2 = 0,20; 0,19$). A concentração de isobutirato aumentou com a inclusão de TD nesses tempos; e com exceção de 96 h, a concentração foi significativamente maior na dieta TD 45% quando comparada com a dieta sem TD nos demais tempos de incubação.

Os resultados de nitrogênio amoniacal (N-NH₃), fator de particionamento, biomassa microbiana, populações de protozoários e pH estão apresentados na tabela 3.9. Foi observada uma relação negativa entre o aumento do nível de TD na dieta e a concentração de nitrogênio amoniacal nos tempos de incubação 10, 24 e 96 ($R^2 = 0,42; 0,15; 0,14$; respectivamente). A 10 e 96 horas a dieta com 45% de TD teve uma concentração de N-NH₃ significativamente inferior do que a dieta controle (23,55 vs 29,24 e 50,11 vs 54,70 mg/dL, respectivamente).

O fator de particionamento (FP) incrementou linearmente com o aumento da inclusão de TD na dieta em todos os tempos de incubação com exceção do 96 h. De maneira similar, os valores de biomassa microbiana (BM) foram significativamente maiores na dieta TD45% quando comparados com a dieta controle TD0%, e foi observado uma tendencia linear associada ao aumento da inclusão de TD na dieta nos diferentes tempos.

Não foram observados efeitos da inclusão de TD nas dietas sobre as populações de protozoários. O pH entre os substratos variou entre 6.4 a 7.0, com valores mais baixos nos

tempos mais altos de incubação. Foi observado um aumento linear no pH dos substratos explicado parcialmente pelo aumento da TD nas dietas ($R^2 = 0.26 - 0.53$).

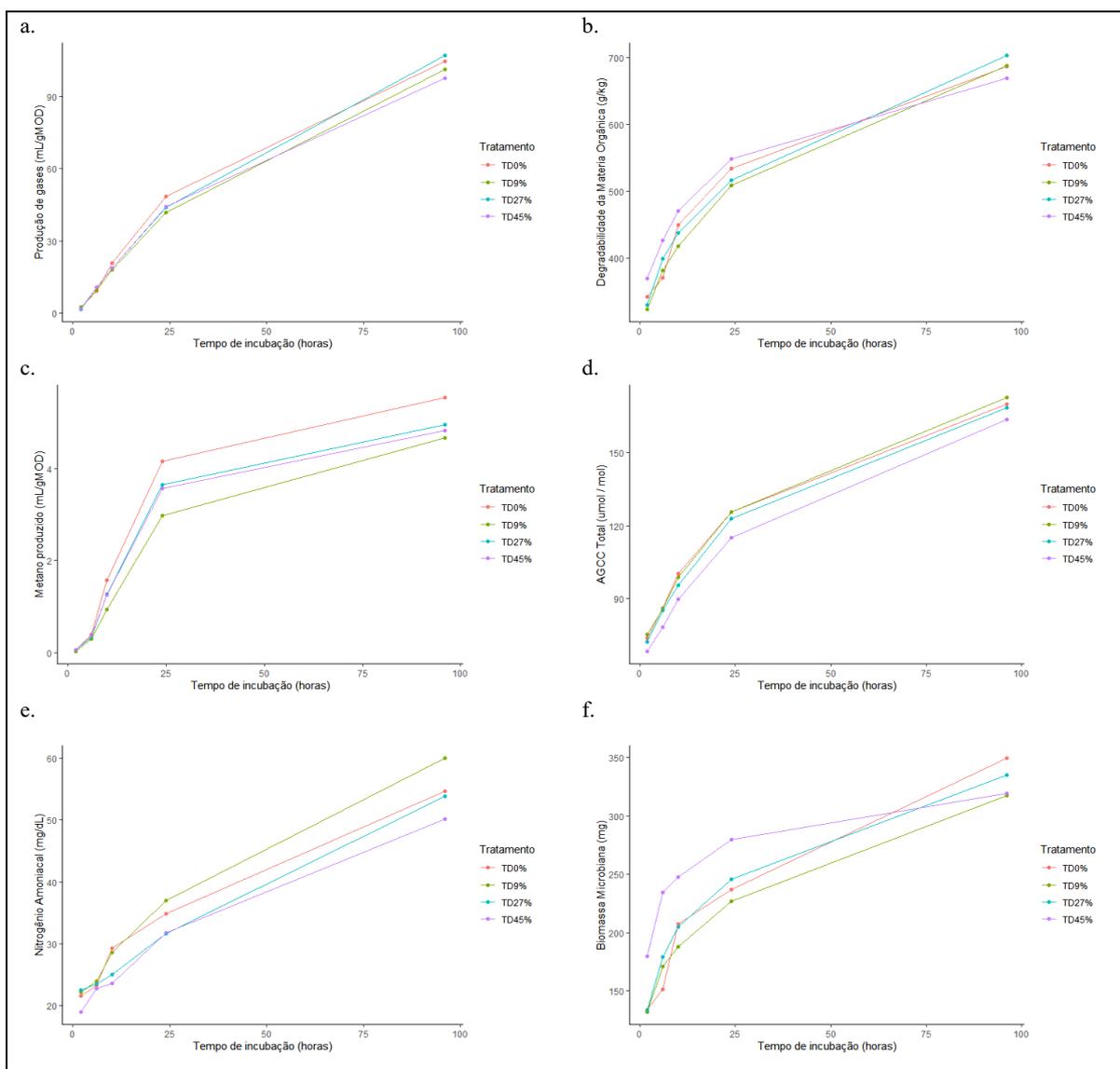


Fig 3.2. Comportamento ao longo dos tempos de incubação da produção de gases (a), DIVMO (b), Metano (c), AGCC total (d), Nitrogênio Amônia (e) e Biomassa microbiana (f).

Tabela 3.8. Concentração de AGCC (umol/mol) e pH de 4 dietas com níveis crescentes de TD em 5 tempos de incubação.

Tempo de Incubação	0%TD	9%TD	27%TD	45%TD	SE	p - Value	L	R ²
AGCC Total								
2	73,76	75,32	72,17	68,44		0,2641		
6	86,05	85,88	85,14	78,23		0,1201		
10	100,26	98,81	95,64	89,86	4,321	0,0529	0,014	0,15
24	125,78	125,73	122,95	115,33*		0,0488		
96	170,10	172,72	168,65	163,65		0,1919		
Acetato								
2	50,846	51,206	48,92	46,2		0,0738	0,0195	0,15
6	55,73	54,52	53,57	49,93*		0,0349	0,0317	0,12
10	60,23	58,45	56,78	54,15*	1,612	0,0293	0,0068	0,19
24	68,30	67,40	65,88	62,27*		0,0302	0,0217	0,13
96	84,22	84,87	83,58	82,60		0,4788		
Propionato								
2	11,82	12,47	11,54	10,27		0,358		
6	15,91	16,43	16,14	13,54		0,178		
10	21,66	21,89	20,29	17,82*	1,173	0,048	0,002	0,24
24	31,24	32,48	30,73	27,13*		0,038	0,021	0,13
96	44,9	47,08	44,60	40,9*		0,041	0,031	0,11
Butirato								
2	8,50	8,73	8,47	8,06		0,669		
6	11,11	11,16	11,30	10,10		0,348		
10	14,09	13,70	13,56	12,56	0,997	0,174		
24	19,76	18,84	19,24	18,75		0,349		
96	27,13	25,90	27,01	26,27		0,262		
A:P								
2	4,34	4,20	4,32	4,52		0,241		
6	3,52	3,4	3,36	3,69		0,257		
10	2,78	2,72	2,81	3,04	0,133	0,100	0,021	0,13
24	2,19	2,09	2,17	2,30		0,454		
96	1,88	1,81	1,87	1,97		0,509		
Valerato								
2	0,645	0,684	0,685	0,720		0,259		
6	1,05	1,07	1,07	1,04		0,817		
10	1,45	1,48	1,38	1,33	0,1652	0,236		
24	2,41	2,45	2,29	2,14		0,075		
96	5,51	5,19	4,78	4,47*		0,001	0,005	0,20
Isovalerato								
2	1,56	1,71	1,74	1,87*		0,043	0,022	0,13
6	1,92	2,08	2,12	2,29*		0,040	0,041	0,10
10	2,26	2,49	2,41	2,75*	0,193	0,031	0,048	0,09
24	3,33	3,65	3,60	3,63		0,197		
96	6,49	6,93	6,56	5,53		0,303		
Isobutirato								
2	0,37	0,51	0,78	1,27*		0,019	0,005	0,20
6	0,31	0,60	0,91*	1,31*		0,005	0,007	0,19
10	0,54	0,78	1,20	1,23*	0,430	0,022		
24	0,72	0,89	1,18	1,18*		0,049		
96	1,83	2,74	2,09	2,94		0,192		
pH								
2	6,8	6,8	6,9*	7,0*		0,005	<0,001	0,39
6	6,7	6,8	6,9*	7,0*		0,005	<0,001	0,53
10	6,7	6,8	6,7	6,9*	0,04	0,008	0,001	0,26
24	6,3	6,4	6,4	6,5		0,064		
96	6,3	6,4	6,4	6,5*		0,008	0,004	0,21

* Dentro da mesma linha, difere significativamente do tratamento 0%TD usando contrastes ortogonais a $p < 0,05$; EP = Erro padrão; p-Valor = p-Valor mínimo da comparação por contrastes ortogonais; Linear = p-Valor da regressão linear.

Tabela 3.9. Nitrogênio amoniacal, fator de particionamento, biomassa microbiana, populações de protozoários e pH de 4 dietas com níveis crescentes de TD em 5 tempos de incubação.

Tempo de incubação	0%TD	9%TD	27%TD	45%TD	SE	p - valor	L	Q	R ²
Nitrogênio amoniacal (mg / dL)									
2	21,61	22,14	22,57	19,02		0,252			
6	23,27	23,94	23,50	22,73		0,753			
10	29,24	28,61	25,06	23,55*	2,045	0,032	<0,001		0,42
24	34,80	36,99	31,67	31,81		0,193	0,014		0,15
96	54,70	54,98	53,88	50,11*		0,065	0,018		0,14
Fator de partição									
2	11,84	12,28	13,32	16,90*		<0,001	<0,001	-	0,43
6	5,69	6,06	6,16	7,58*		0,001	<0,001	-	0,32
10	4,57	4,59	4,82	5,68*	0,441	0,043	<0,001	-	0,32
24	3,21	3,68	3,45	3,89*		0,008	0,006	-	0,20
96	2,78	2,73	2,81	2,84		0,671	-	-	-
Biomassa microbiana (mg)									
2	134,03	132,26	133,26	180,02*		0,023	0,001	0,001	0,32
6	151,82	171,15	179,38	234,45*		0,001	<0,001	-	0,50
10	207,12	188,17	205,19	247,35*	15,195	0,038	<0,001	<0,001	0,37
24	236,87	226,96	245,92	279,62*		0,038	<0,001	-	0,30
96	349,24	317,01	334,85	319,26		0,078	-	-	-
Protozoários ($\times 10^5$ /mL)									
2	7,45	5,72	7,10	7,83		0,080			
6	7,46	6,54	5,82	6,67		0,093			
10	6,15	6,55	5,53	6,16	8,257	0,484			
24	2,85	2,99	2,88	1,83		0,265			
96	0,39	0,15	0,07	0,04		0,683			

* Dentro da mesma linha, difere significativamente do tratamento 0%TD usando contrastes ortogonais a $p < 0,05$; EP = Erro padrão; p-Valor = p-Valor mínimo da comparação por contrastes ortogonais; Linear = p-Valor da regressão linear.

3.4 Discussão

3.4.1 Modelos de produção de gases *in vitro*

Apesar de ter o melhor desempenho estatístico, o modelo Exponencial + Gompertz foi menos acertivo para estimar parâmetros da fermentação biologicamente razoáveis; estimando *lag* muito elevado (4,4 horas) e igualmente uma taxa de degradação para a fração lentamente degradável muito mais alta (11.3%/h) do que a taxa da fração rapidamente degradável (2,4 %/h). O similar o ocorreu para o modelo logístico Bicompartimental. Assim, dado que o desempenho estatístico foi adequado, não houve diferenças significativas entre os volumes preditos nos diferentes tempos e os parâmetros derivados foram considerados

biologicamente normais, o modelo Logístico-Exponencial + *Lag* descrito por Wang *et al.* (2011), foi selecionado como o modelo para ajustar os dados da cinética de fermentação *in vitro* das dietas experimentais.

O uso de modelos matemáticos de fermentação para prever a cinética fermentativa, é útil porque estes permitem obter dados valiosos sobre a cinética fermentativa a partir de relativamente pouca informação; como por exemplo o volume de gases produzido (Getachew *et al.*, 1998; Makkar, 2004). Dados como o volume assintótico, a taxa de produção de gases, o T0.5, o tempo de *lag* são alguns dos exemplos que em condições *in vivo* precisariam de complementos complicados para a sua obtenção (Azevedo *et al.*, 2020). No presente estudo não foram observadas maiores diferenças entre os parâmetros estimados matematicamente, porém, foi possível observar coincidências entre os valores observados e os valores estimados que permitem concluir que o modelo se ajusta bem a uma diversidade de curvas. Rivera *et al.* (2021), reportaram, ao usar o modelo de Gompertz em dietas com TD e *U. brizantha*, Vf, taxa de degradação e *lagtime* de 215 mL, 1%/h e 3,7 horas respectivamente. Entretanto, não foram encontrados trabalhos científicos sobre parâmetros estimados da cinética de fermentação em dietas com TD e concentrado que permitam uma comparação com os resultados aqui obtidos.

3.4.2 Ações dos fenóis e taninos totais na degradação *in vitro*

Delgado *et al.* (2012) e Galindo *et al.* (2011), (2012), (2014) observaram aumento na quantidade de taninos e fenóis quando usaram TD nas suas dietas, e associaram a diminuição de bactérias e protozoários a esse aumento nos taninos. No presente experimento, é pouco provável que o conteúdo de taninos na TD tenha afetado as populações de microrganismos ruminais no presente estudo, dado que o conteúdo de fenóis e taninos totais diminuiu com o aumento da inclusão de TD na dieta. É provável que o conteúdo de fenóis na TD fosse baixo comparado ao do feno de tifton, devido a secagem da amostra ou a idade avançada da planta utilizada. Makkar (2003) explicou que a perda de integridade celular produto da senescência da planta incrementa os processos de oxidação de compostos fenólicos e que a secagem ao ar durante tempos prolongados pode alterar a natureza e o conteúdo dos mesmos. No presente estudo a TD utilizada nas dietas foi coletada a partir de material ruderal de idade avançada, e foi secado ao ar durante vários dias. Esses dois fatores podem ter influenciado na perda de compostos fenólicos na planta como foi mencionado por Makkar (2003).

3.4.3 Produção de gases, metano, degradabilidade e parâmetros da fermentação

O CO₂ e o H₂ são os principais substratos utilizados pelas *archeas* metanogênicas para a produção de metano entérico (Greening *et al.*, 2019; Hill *et al.*, 2016; Morgavi *et al.*, 2010). Esses compostos também são os principais subprodutos da fermentação dos carboidratos em AGCC, e compõem a maior parte dos gases mensurados durante a produção de gases *in vitro* (Blümmel *et al.*, 1997; Getachew *et al.*, 1998). No entanto, a fermentação de carboidratos em propionato não contribui com a produção direta de CO₂ e H₂, sendo estes subprodutos unicamente da fermentação de acetato e butirato (Blümmel *et al.*, 1997; Getachew *et al.*, 1998). Dessa maneira, alimentos que favoreçam a presença de microrganismos propiogênicos produzem menor quantidade de gases *in vitro*. Usualmente o aumento na produção de acetato está associado ao aumento na proporção de volumoso na dieta (Church, 1979), e dado que no presente experimento essa proporção se manteve igual entre as dietas, não são esperadas mudanças nas concentrações de AGCC nem na produção de gases, como foi observado. Isto é consistente com a produção de gases e de metano observada no presente experimento, pois não houve diferenças atribuídas ao aumento na inclusão de TD (Tabela 3.10). Resultados similares usando TD têm sido reportados por Maurício *et al.*, (2014), Ribeiro *et al.*, (2016), Terry *et al.*, (2016).

Por outro lado, a redução na produção de AGCC totais na dieta TD45% (Fig. 4), parece ter sido consequência da diminuição tanto do acetato quanto do propionato, sem maiores alterações na proporção A:P. Tem sido reportado (Sallam *et al.*, 2007) que alimentos com alto conteúdo de FDA estão associados a uma menor produção de AGCC devido à baixa degradabilidade dos carboidratos estruturais.

Geralmente o volume de gases produzido *in vitro* está altamente correlacionado com a degradação do substrato; volumes de gases mais altos são frequentemente explicados por uma alta degradabilidade (Blümmel *et al.*, 1997). No entanto, este não parece ser o caso em todos os tempos de incubação, dado a baixa correlação ($R^2 = 0,11 - 0,39$) entre a degradabilidade do DFDN e os gases produzidos (mL/g MO degradada) nos tempos iniciais da fermentação (2, 6 h) (Fig. 2). Isto exemplifica como a produção de gases nos primeiros tempos de incubação é produto dos carboidratos rapidamente degradáveis (não FDN), enquanto o aumento da correlação nos tempos de incubação posteriores sugere que o conteúdo de celulose, hemicelulose e lignina (FDN) sejam os responsáveis pela produção de gases em tempos avançados da fermentação *in vitro* (10, 24, 96 h). Alguns autores mencionam que com a incorporação de TD em substratos *in vitro* resultou em maior degradabilidade (Jamarun *et al.*, 2019; Pazla *et al.*, 2018; Rivera *et al.*, 2021) enquanto,

outros não relataram diferenças significativas (Cardona Iglesias *et al.*, 2017; Rivera *et al.*, 2013; Terry *et al.*, 2016). Na maioria desses casos, as diferenças de degradabilidade foram explicadas por mudanças na proporção de carboidratos solúveis dentro dos substratos, mas este não parece ser o caso para o presente experimento, pois o conteúdo de CNF permaneceu inalterado entre os tratamentos. No presente estudo foi observada uma correlação moderada entre a matéria orgânica verdadeiramente degradada e a concentração de isobutirato ($R = 0.79$) e isovalerato ($R = 0.77$) (Tabela 3.10), esses isoácidos são produto da degradação ruminal de aminoácidos; o que sugere que a degradabilidade do matéria orgânica presente nas dietas estava associada mais ao conteúdo de proteína ($R = 0.56$ $p < 0.001$) do que ao conteúdo de fibra (FDN) ($R = 0.34$; $p > 0.05$) (Tabela 3.10).

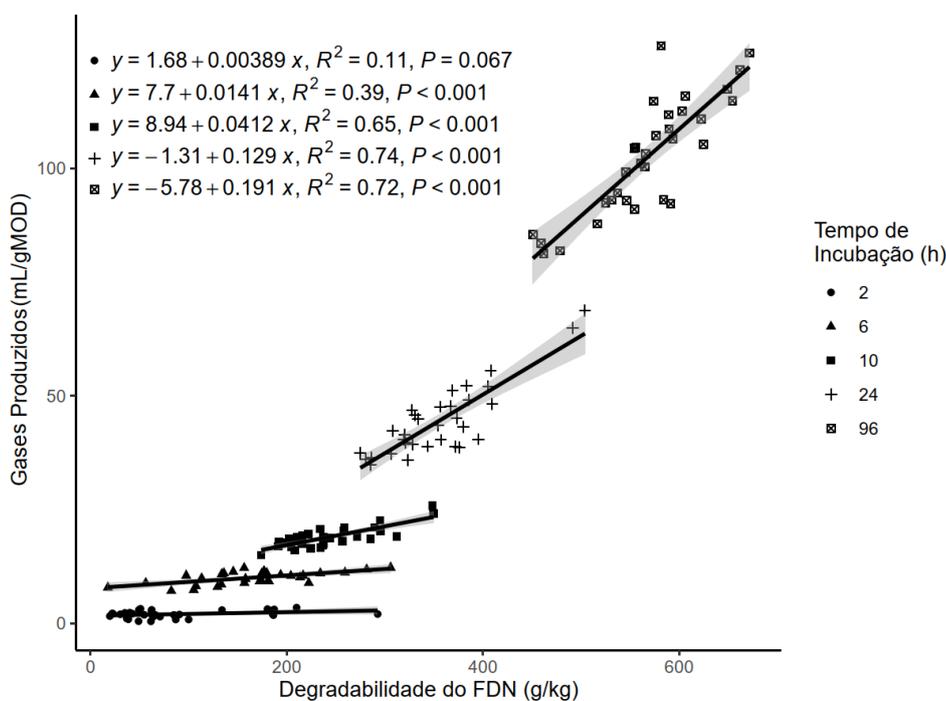


Fig. 3.3. Relação entre degradabilidade do FDN e a produção de gases *in vitro* para 5 tempos de incubação

Tabela 3.10. Matrix de correlação de Pearson para variáveis avaliadas nas dietas contendo TD.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.	20.	21.	22.	23.	
1. TD	1																							
2. MOVD	0,37 ^c	1																						
3. DMO	0,67 ^a	0,89 ^a	1																					
4. PG	-0,08	-0,39 ^c	-0,22	1																				
5. CH4	-0,15	0,19	0,09	0,3	1																			
6. pH	0,67 ^a	0,37 ^c	0,62 ^a	-0,23	-0,16	1																		
7. ACE	-0,44 ^c	0,37 ^c	-0,02	-0,38 ^c	0,25	-0,42 ^c	1																	
8. PRO	-0,44 ^c	0,33	0,01	-0,11	0,00	-0,39 ^c	0,78 ^a	1																
9. BUT	-0,19	0,17	-0,04	-0,02	0,17	-0,53 ^b	0,54 ^b	0,66 ^a	1															
10.iBUT	0,30	0,79 ^a	0,6 ^a	-0,31	0,2	0,26	0,47 ^b	0,43 ^c	0,20	1														
11. iVAL	0,23	0,77 ^a	0,61 ^a	-0,25	0,15	0,04	0,5 ^b	0,49 ^b	0,33	0,76 ^a	1													
12.VAL	-0,39 ^c	0,28	0,02	0,10	0,27	-0,38 ^c	0,54 ^b	0,85 ^a	0,66 ^a	0,37 ^c	0,4 ^c	1												
13. AGCC	-0,36 ^c	0,45 ^c	0,08	-0,26	0,19	-0,41 ^c	0,93 ^a	0,93 ^a	0,72 ^a	0,56 ^a	0,6 ^a	0,76 ^a	1											
14. A:P	0,28	-0,28	-0,08	-0,07	0,12	0,24	-0,43 ^c	-0,88 ^a	-0,61 ^a	-0,36 ^c	-0,39 ^c	-0,85 ^a	-0,7 ^a	1										
15. PTZ	-0,08	0,13	0,01	-0,59 ^a	0,04	0,02	0,32	-0,19	-0,11	-0,02	0,03	-0,38 ^c	0,05	0,48 ^b	1									
16. N-NH3	-0,69 ^a	-0,27	-0,46 ^b	-0,03	-0,07	-0,4 ^c	0,39 ^c	0,41 ^c	0,16	-0,22	0,00	0,29	0,34	-0,25	0,17	1								
17. BM	0,53 ^b	0,91 ^a	0,94 ^a	-0,33	0,10	0,56 ^a	0,00	-0,01	-0,13	0,6 ^a	0,59 ^a	0,01	0,06	-0,04	0,11	-0,45 ^c	1							
18. PB	-0,08	0,56 ^a	0,29	-0,16	0,42 ^c	-0,22	0,51 ^b	0,45 ^b	0,32	0,59 ^a	0,53 ^b	0,52 ^b	0,56 ^a	-0,34	-0,01	-0,13	0,43 ^c	1						
19. FDN	-0,32	0,34	0,11	-0,31	0,49 ^b	-0,03	0,4 ^c	0,09	0,04	0,21	0,13	0,05	0,26	0,15	0,41 ^c	0,21	0,23	0,27	1					
20. FDA	0,51 ^b	0,82 ^a	0,79 ^a	-0,30	0,22	0,42 ^c	0,30	0,32	0,27	0,71 ^a	0,63 ^a	0,32	0,42 ^c	-0,31	-0,04	-0,31	0,70 ^a	0,42 ^c	0,24	1				
21. EM	-0,10	0,69 ^a	0,39 ^c	-0,40 ^c	0,40 ^c	0,06	0,72 ^a	0,58 ^a	0,29	0,74 ^a	0,55 ^b	0,47 ^b	0,72 ^a	-0,38 ^c	0,12	0,03	0,45 ^c	0,66 ^a	0,62 ^a	0,68 ^a	1			
22. MM	0,66 ^a	-0,06	0,17	-0,21	-0,45 ^c	0,46 ^b	-0,34	-0,30	-0,20	0,06	-0,07	-0,29	-0,3	0,19	-0,14	-0,36 ^c	0,04	-0,31	-0,54 ^b	0,16	-0,30	1		
23. CNF	0,25	-0,49 ^b	-0,21	0,36 ^c	-0,54 ^b	0,06	-0,51 ^b	-0,21	-0,14	-0,41 ^c	-0,28	-0,21	-0,4 ^c	-0,02	-0,33	-0,01	-0,35	-0,56 ^a	-0,94 ^a	-0,39 ^c	-0,76 ^a	0,45 ^c	1	

TD: *Tithonia diversifolia*; MOVD: Matéria orgânica verdadeiramente degradada; DMO: Degradabilidade da matéria orgânica; PG: Produção de gases (mL/gMOD); CH₄: Produção de metano; AGCC: Concentração de ácidos graxos de cadeia curta; ACE: Acetato; PRO: Propionato; BUT: Butirato; iBUT: Isobutirato; iVAL: Isovalerato; VAL: Valerato; A:P: Proporção acetato:propionato; PTZ: Número de protozoários; N-NH₃: Nitrogênio amoniacal; BM: biomassa microbiana; PB: Proteína bruta; FDN: Fibra em detergente neutro; FDA: Fibra em detergente ácido; EM: Energia metabolizável; EE: Extrato Etéreo; MM: Matéria mineral; CNF: Carboidratos não fibrosos; Valor p da correlação: ^a: p < 0,001; ^b: p < 0,01; ^c: p < 0,05

3.4.4 Síntese de proteína microbiana

A falta de correlação entre a degradabilidade do substrato e o volume de gases produzido nos tempos iniciais da incubação (Fig 3.3), pode sugerir também que a maior parte do substrato estava sendo convertido em proteína microbiana em vez de ser fermentada em CO₂ e CH₄ (gases). Em relação a isto, Blümmel *et al.*, (1997) mostraram, com cálculos estequiométricos, como um substrato com menor produção de gases poderia ter maior quantidade de biomassa microbiana produzida do que um substrato com maior produção de gases. Segundo os autores, isto se deve a que a relação entre a eficiência microbiana e a produção de AGCC não são constantes. Este poderia ser o caso do presente estudo; sendo suportado pelos valores de fator de particionamento (FP) e biomassa microbiana (BM) (tabela 3.9). O fator de particionamento resume a relação entre os gases produzidos e o substrato degradado, sendo que valores mais altos estão relacionados à maior eficiência microbiana; e a BM estima quanto do substrato degradado foi usado para síntese microbiana (em mg) Blümmel *et al.* (1997). Nos tempos iniciais da fermentação, as dietas tenderam a apresentar maiores valores de FP e BM à medida que a inclusão de TD aumentou com a inclusão TD45% apresentando valores maiores de FP e BM quando comparados à dieta controle.

O efeito positivo nos primeiros tempos de incubação observada nos ácidos isobutírico e isovalérico (Tabela 3.8) também sugere que níveis crescentes de TD na dieta tem um efeito positivo sobre a síntese de proteína microbiana. Os iso-ácidos (valérato, isovalerato, isobutirato e 2-metilbutirato) são sintetizados no rúmen a partir de aminoácidos ramificados. O isobutirato e isovalerato são produto da de-aminação oxidativa da valina e leucina, respectivamente (Andries *et al.*, 1987). Andries *et al.*, (1987) relataram sobre o importante papel dos iso-ácidos no crescimento bacteriano através do fornecimento de esqueletos de carbono para a biossíntese de proteína microbiana. Múltiplos estudos tem reportado os benefícios da suplementação de iso-ácidos para ruminantes. Entre eles, a melhoria da digestão e estimulação dos microrganismos ruminais (Liu *et al.*, 2014; Liu, Wang, Huang, *et al.*, 2009; Liu, Wang, Yang, *et al.*, 2009), a potencialização da fermentação ruminal (Liu *et al.*, 2008, 2016; Liu, Wang, Huang, *et al.*, 2009), e o incremento da degradabilidade da celulosa e hemicelulose (Roman-Garcia, Mitchell, Denton, *et al.*, 2021; Roman-Garcia, Mitchell, Lee, *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2015). Similar ao encontrado no presente estudo, Ribeiro *et al.* (2016) reportaram maior quantidade de isoácidos nas dietas com mais TD na formulação e Akanmu *et al.* (2020) registraram maior quantidade de

isobutirato e valerato em dietas de TMR, capim Lucerna e *Eragostis* quando incluiu nelas extrato de TD.

Parece provável então que a inclusão de TD tenha efeitos benéficos sobre a síntese de proteína microbiana (Fig. 3.1 f), nos primeiros tempos de incubação. Outro fator que pode ajudar a suportar essa hipótese é que o conteúdo de N-NH₃ diminuiu com o aumento de TD nas dietas. O N-NH₃ tem sido considerado como a fonte preferida de nitrogênio para o crescimento de microrganismos fibrolíticos (Russell *et al.*, 1992)

Andries *et al.* (1987) mencionaram que diminuições na concentração da amônia no rúmen indicam que mais amônia está sendo convertida em proteína microbiana. Vários autores tem mencionado também como o aumento na quantidade de N-NH₃ é produto da degradação da proteína na dieta (Parker *et al.*, 1995; Russell *et al.*, 1992). Porém, no presente estudo não foram observadas diferenças significativas no teor de proteína entre as dietas avaliadas que justifiquem a diminuição no N-NH₃. Em condições *in vivo*, o N-NH₃ escapa do rúmen por meio da absorção na parede ruminal ou pela incorporação dessa amônia nos microrganismos (Slyter *et al.*, 1979). Dado que na produção de gases *in vitro* a absorção de amônia pela parede ruminal é inexistente, e possível afirmar que a redução de N-NH₃ no rúmen nos tempos avançados da incubação se deve a incorporação de nitrogênio pelos microrganismos ruminais. Hristov e Ropp (2003) mencionaram que entre o 32 e 66% da amônia no rúmen era incorporada para nitrogênio microbiano.

Nos tempos iniciais da fermentação (2 e 6 h) a concentração de N-NH₃ não difere entre as dietas, porém à medida que o tempo passou (10, 24 e 96 h) foi observado uma correlação negativa entre o aumento de TD na dieta e a concentração de N-NH₃, o que pode sugerir que a amônia produto da degradação da proteína da dieta estava sendo incorporada nos microrganismos.

Outros autores também encontraram resultados positivos na síntese de proteínas microbianas com o uso de TD. Galindo *et al.* (2011), (2012) reportaram que a substituição de 20% de *Cynodon nlemfuensis* por TD. aumentou a presença de bactérias celulolíticas; e Jamarun *et al.* (2019) e Pazla *et al.* (2018) também relataram maior síntese de proteína microbiana ao incluir TD em suas dietas. Esses autores apontaram o maior teor de PB de suas dietas com TD como o responsável pela melhoria na degradação da fibra consequência de maior disponibilidade de amônia para os microrganismos do rúmen. No presente estudo não houve diferença no teor de PB que pudesse ser usada como justificativa para o aumento da degradabilidade. Não obstante, baseado no aumento no isobutirato e isovalerato pode ter havido uma mudança no perfil de aminoácidos da proteína consequência da inclusão de TD

(p.ex. leucina e valina) que levou à uma melhor degradabilidade e eficiência microbiana. Mais pesquisas são necessárias para corroborar isso.

De maneira geral parece que os efeitos da TD sobre a produção de gases *in vitro* e parâmetros de fermentação ruminal sejam uma simples consequência da qualidade do substrato utilizado. Em termos gerais o nível de inclusão de TD na dieta não foi um bom preditor para nenhuma das variáveis da produção de gases *in vitro* avaliadas no presente experimento. O valor do coeficiente de determinação foi moderado ($R^2 < 0,5$) na maioria dos casos onde houve uma regressão significativa, com alguns dos valores mais altos explicando unicamente o 53, 50, 43 e 42% da variabilidade, como foi o caso do pH, Biomassa Microbiana, Fator de Particionamento e Nitrogênio Amoniacal, respectivamente. Isto sugere que a inclusão de TD talvez tenha influência sobre a variabilidade das respostas, porém não é o único fator que explica a mudanças nos valores.

3.5 Conclusão

A substituição do feno de tifton por TD alterou a degradabilidade da dieta em alguns horários, mas não teve efeito sobre a cinética de fermentação, volume de gases produzido e a produção de metano *in vitro*. A inclusão do TD revelou ter um impacto positivo na síntese de proteína microbiana que pode estar relacionado a uma maior eficiência microbiana consequência de um aumento na qualidade do substrato. Mais pesquisas são necessárias para corroborar esses resultados e entender melhor os efeitos de *Tithonia diversifolia* na dinâmica populacional ruminal.

3.6 Referencias

- Akanmu, A. M., Hassen, A., & Adejoro, F. A. (2020). Gas production, digestibility and efficacy of stored or fresh plant extracts to reduce methane production on different substrates. *Animals*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/ani10010146>
- Andries, J. I., Buysse, F. X., de Brabander, D. L., & Cottyn, B. G. (1987). Isoacids in ruminant nutrition: Their role in ruminal and intermediary metabolism and possible influences on performances — A review. *Animal Feed Science and Technology*, 18(3), 169–180. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(87\)90069-1](https://doi.org/10.1016/0377-8401(87)90069-1)
- AOAC. (2011). Official methods of analysis of AOAC International. In *W. Horwitz & G. W. Latimer (Eds.), 18th ed.*
- Azevedo, M. M. R., Vasconcelos, V. R., Abdalla, A. L., Sarmiento, J. L. R., Alves, A. A., Bueno, I. C. da S., Magalhães, A. L. R., & Lima, J. S. de. (2020). Modelos Matemáticos Para Estimativa Da Cinética De Fermentação Ruminal Do Pseudofruto Do Cajueiro Através Da Técnica in Vitro Semi-Automática De Produção De Gases / Mathematical Models To Estimate the Cashew Tree False Fruit Ruminal

- Fermentation Kinetic T. *Brazilian Journal of Development*, 6(9), 73534–73549.
<https://doi.org/10.34117/bjdv6n9-711>
- Bueno, I. C. S., Cabral Filho, S. L. S., Louvadini, H., Vitti, D. M. S., Abdalla, A. L. (2005). Influence of inoculum source in a gas production method. *Animal Feed Science and Technology*, vol 123-124, 95-105.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.05.003>
- Blummel, M., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (1997). In vitro gas production: a technique revisited. *Animal Research*, 77, 24–34.
- Blümmel, M., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (1997). In vitro gas production: A technique revisited. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 77(1), 24–34.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.1997.tb00734.x>
- Cadena-Villegas, S., Martínez-Maldonado, H. G., Sosa-Montes, E., Mendoza-Pedroza, S. I., Salinas-Rios, T., Flores-Santiago, E. J., & Fuente, J. I. A. de la. (2020). Use of *Tithonia diversifolia* (hemsl.) A. Gray in the diet of growing lambs. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 72(5), 1929–1935.
<https://doi.org/10.1590/1678-4162-11923>
- Calsavara, L. H. F., Ribeiro, R. S., Silveira, S. R., Delarota, G., Freitas, D. S., Sacramento, J. P., Paciullo, D. S. C., & Maurício, R. M. (2016). Potencial forrageiro da *Tithonia diversifolia* para alimentação de ruminantes. *Livestock Research for Rural Development*, 28(2), 1–9. <http://www.lrrd.org/lrrd28/2/ferr28017.html>
- Cardona Iglesias, J. L., Mahecha Ledesma, L., Angulo Arizala, J., Cardona, J. L., Mahecha, L., Angulo, J., Cardona Iglesias, J. L., Mahecha Ledesma, L., & Angulo Arizala, J. (2017). Efecto sobre la fermentación in vitro de mezclas de *Tithonia diversifolia*, *Cenchrus clandestinum* y grasas poliinsaturadas. *Agronomía Mesoamericana*, 28(2), 405. <https://doi.org/10.15517/ma.v28i2.25697>
- Church, D. C. (1979). *The Ruminant Animal. Digestive Physiology and Nutrition* (D. C. Church, Ed.; 2nd ed.). Prentice Hall.
- de Oliveira, J. G., Henrique, D. S., Abreu, M. L. C., Fluck, A. C., Mayer, L. R. R., Costa, O. A. D., Atoji-Henrique, K., Oliveira, J. G., Henrique, D. S., Abreu, M. L. C., Fluck, A. C., Mayer, L. R. R., Costa, O. A. D., & Atoji-Henrique, K. (2020). Evaluation of mathematical models to describe gas production kinetics of some tropical and temperate forages. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 49(1994).
<https://doi.org/10.37496/rbz4920190197>
- Delgado, D. C., Galindo, J., González, R., González, N., Scull, I., Dihigo, L., Cairo, J., Aldama, A. I., & Moreira, O. (2012). Feeding of tropical trees and shrub foliages as a strategy to reduce ruminal methanogenesis: Studies conducted in Cuba. *Tropical Animal Health and Production*, 44(5), 1097–1104. <https://doi.org/10.1007/s11250-011-0045-5>
- France, J., Dhanoa, M. S., Theodorou, M. K., Lister, S. J., Davies, D. R., & Isac, D. (1993). A Model to Interpret Gas Accumulation Profiles Associated with In Vitro

- Degradation of Ruminant Feeds. *Journal of Theoretical Biology*, 163(1), 99–111. <https://doi.org/10.1006/jtbi.1993.1109>
- Galindo, J., Gonzales, N., Marrero, Y., Sosa, A., Ruiz, T., Febles, G., Torres, V., Aldana, A. I., Achang, G., Moreira, O., Sarduy, L., Noda, A. C., González, N., Marrero, Y., Sosa, A., Ruiz, T., Febles, G., Torres, V., Aldana, A. I., ... Noda, A. C. (2014). Effect of tropical plant foliage on the control of methane production and in vitro ruminal protozoa population. In *Cuban Journal of Agricultural Science* (Vol. 48, Issue 4).
- Galindo, J., Gonzales, N., Sosa, A., Ruiz, T., Torres, V., Aldana, A. I., Diaz, H., Moreira, O., Sarduy, L., & Noda, A. C. (2011). Efecto de tithonia diversifolia (hemsl.) A. Gray (botón de oro) en la poblacion de protozoos y metanogénos ruminales en condiciones in vitro. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 45(1).
- Galindo, J., González, N., Scull, I., Marrero, Y., Sosa, A., Aldana, A. I., Moreira, O., Delgado, D., Ruiz, T., Febles, G., Torres, V., O La, O., Sarduy, L., Noda, A., & Achang, O. (2012). Efecto de Samanea saman (Jacq .) Merr ., Albizia lebbeck (L .) Benth y Tithonia diversifolia (Hemsl .) Gray (material vegetal 23) en la población de metanógenos y en la ecología microbiana ruminal. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 46(3), 273–278.
- Gerber, P. J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., Falcucci, A., & Tempio, G. (2013). *Tackling climate change through livestock - A global assessment of emissions and mitigation opportunities*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Getachew, G., Blummel, M., Makkar, H. P. S. S., Becker, K., Blümmel, M., Makkar, H. P. S. S., & Becker, K. (1998). In vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 72(3–4), 261–281. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(97\)00189-2](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(97)00189-2)
- Goering, H. K., & van Soest, P. J. (1975). Forage fiber analyses. *U.S. Department of Agriculture*, 379, 387–598.
- Greening, C., Geier, R., Wang, C., Woods, L. C., Morales, S. E., McDonald, M. J., Rushton-Green, R., Morgan, X. C., Koike, S., Leahy, S. C., Kelly, W. J., Cann, I., Attwood, G. T., Cook, G. M., & Mackie, R. I. (2019). Diverse hydrogen production and consumption pathways influence methane production in ruminants. *ISME Journal*, 13(10), 2617–2632. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0464-2>
- Guatusmal-Gelpud, C., Escobar-Pachajoa, L. D., Meneses-Buitrago, D. H., Cardona-Iglesias, J. L., & Castro-Rincón, E. (2020). Producción y calidad de Tithonia diversifolia y Sambucus nigra en trópico altoandino colombiano. *Agronomía Mesoamericana*, 193–208. <https://doi.org/10.15517/am.v31i1.36677>
- Herrero, M., Henderson, B., Havlík, P., Thornton, P. K., Conant, R. T., Smith, P., Wiersenius, S., Hristov, A. N., Gerber, P., Gill, M., Butterbach-Bahl, K., Valin, H., Garnett, T., & Stehfest, E. (2016). Greenhouse gas mitigation potentials in the livestock sector. *Nature Climate Change*, 6(5), 452–461. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nclimate2925>

- Hill, J., McSweeney, C., Wright, A. D. G., Bishop-Hurley, G., & Kalantar-zadeh, K. (2016). Measuring Methane Production from Ruminants. *Trends in Biotechnology*, 34(1), 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.10.004>
- Hothorn, T., Bretz, F., & Westfall, P. (2008). Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biometrical Journal*, 50(3), 346–363. <https://doi.org/10.1002/bimj.200810425>
- Hristov, A. N., & Ropp, J. K. (2003). Effect of Dietary Carbohydrate Composition and Availability on Utilization of Ruminant Ammonia Nitrogen for Milk Protein Synthesis in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 86(7), 2416–2427. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73836-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73836-3)
- IPCC. (2019). Climate Change and Land: An IPCC Special Report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems. In P. R. Shukla, J. Skea, E. C. Buendia, V. Masson-Delmotte, H.-O. Pörtner, D. C. Roberts, P. Zhai, R. Slade, S. Connors, R. van Diemen, M. Ferrat, E. Haughey, S. Luz, S. Neogi, M. Pathak, J. Petzold, J. P. Pereira, P. Vyas, E. Huntley, ... J. Malley (Eds.), *IPCC*. www.ipcc.ch
- Jamarun, N., Pazla, R., Zain, M., & Arief. (2019). Comparison of in vitro digestibility and rumen fluid characteristics between the tithonia (*Tithonia diversifolia*) with elephant grass (*Pennisetum purpureum*). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 287(1), 0–5. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/287/1/012019>
- Kuznetsova, A., Brockhoff, P. B., & Christensen, R. H. B. (2017). lmerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models. *Journal of Statistical Software*, 82(13), 1–26. <https://doi.org/10.18637/jss.v082.i13>
- Lenth, R. v. (2021). *emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means* (R package version 1.6.0). <https://cran.r-project.org/package=emmeans>
- Lima, P. M. T., Moreira, G. D., Sakita, G. Z., Natel, A. S., Mattos, W. T., Gimenes, F. M. A., Gerdes, L., McManus, C., Abdalla, A. L., & Louvandini, H. (2018). Nutritional evaluation of the legume *Macrotyloma axillare* using in vitro and in vivo bioassays in sheep. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102(2), e669–e676. <https://doi.org/10.1111/jpn.12810>
- Liu, Q., Wang, C., Huang, Y., Dong, K., Wang, H., & Yang, W. (2008). Effects of isobutyrate on rumen fermentation, urinary excretion of purine derivatives and digestibility in steers. *Archives of Animal Nutrition*, 62(5), 377–388. <https://doi.org/10.1080/17450390802327761>
- Liu, Q., Wang, C., Huang, Y. X., Dong, K. H., Yang, W. Z., Zhang, S. L., & Wang, H. (2009). Effects of isovalerate on ruminal fermentation, urinary excretion of purine derivatives and digestibility in steers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 93(6), 716–725. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2008.00861.x>
- Liu, Q., Wang, C., Pei, C. X., Li, H. Y., Wang, Y. X., Zhang, S. L., Zhang, Y. L., He, J. P., Wang, H., Yang, W. Z., Bai, Y. S., Shi, Z. G., & Liu, X. N. (2014). Effects of isovalerate supplementation on microbial status and rumen enzyme profile in steers

- fed on corn stover based diet. *Livestock Science*, 161, 60–68.
<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2013.12.034>
- Liu, Q., Wang, C., Yang, W. Z., Zhang, B., Yang, X. M., He, D. C., Zhang, P., Dong, K. H., & Huang, Y. X. (2009). Effects of isobutyrate on rumen fermentation, lactation performance and plasma characteristics in dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 154(1–2), 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2009.08.001>
- Liu, Q., Wang, C., Zhang, Y. L., Pei, C. X., Zhang, S. L., Wang, Y. X., Zhang, Z. W., Yang, W. Z., Wang, H., Guo, G., & Huo, W. J. (2016). Effects of isovalerate supplementation on growth performance and ruminal fermentation in pre- and post-weaning dairy calves. *The Journal of Agricultural Science*, 154(8), 1499–1508.
<https://doi.org/10.1017/S0021859616000630>
- Longo, C., Bueno, I. C. S., Nozella, E. F., Goddoy, P. B., Cabral Filho, S. L. S., & Abdalla, A. L. (2006). The influence of head-space and inoculum dilution on in vitro ruminal methane measurements. *International Congress Series*, 1293, 62–65.
<https://doi.org/10.1016/j.ics.2006.03.017>
- Mahecha, L., Escobar, J. P., Suarez, J. F., & Restrepo, L. F. (2008). Evaluación del Uso de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray ASTERACEAE, como Suplemento Forrajero de Vacas Cruzadas. In E. Murgueitio, C. A. Cuartas, & J. F. Naranjo (Eds.), *Ganadería del futuro: Investigación para el desarrollo* (p. 490). CIPAV.
- Mahecha, L., & Rosales, M. (2005). Valor nutricional del follaje de botón de oro *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray, en la producción animal en el trópico. *Livestock Research for Rural Development*, 17. <http://www.lrrd.org/lrrd17/9/mahe17100.htm>
- Makkar, H. P. S. (2003). Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage. In *Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage*. Springer Netherlands.
<https://doi.org/10.1007/978-94-017-0273-7>
- Makkar, H. P. S. (2004). Recent advances in the in vitro gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources. *Assessing Quality and Safety of Animal Feeds*, 55–88.
- Maurício, R., Mould, F., Dhanoa, M., Owen, E., Kulwat, S., Theodorou, M. (1999). A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Animal Feed Science and Technology*, 79 (4), 321-330.
[https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(99\)00033-4](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(99)00033-4)
- Maurício, R., Ribeiro, R. S., Silveira, S. R., Silva, P. L., Calsavara, L., Pereira, L. G. R., & Paciullo, D. S. (2014). *Tithonia diversifolia* for ruminant nutrition. *Tropical Grasslands - Forrajes Tropicales*, 2. [https://doi.org/10.17138/TGFT\(2\)82-84](https://doi.org/10.17138/TGFT(2)82-84)
- Menke, K. H., & Steingass, H. (1988). In vitro gas production technique description of solutions required for the gas technique analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, 6–7.
- Mertens, D. R., Allen, M., Carmany, J., Clegg, J., Davidowicz, A., Drouches, M., Frank, K., Gambin, D., Garkie, M., Gildemeister, B., Jeffress, D., Jeon, C. S., Jones, D., Kaplan, D., Kim, G. N., Kobata, S., Main, D., Moua, X., Paul, B., ... Wolf, M.

- (2002). Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 85(6), 1217–1240.
<https://doi.org/https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12477183/>
- Morgavi, D. P., Forano, E., Martin, C., & Newbold, C. J. (2010). Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal*, 4(7), 1024–1036.
<https://doi.org/10.1017/S1751731110000546>
- National Research Council. (2007). *Nutrient Requirements of Small Ruminants*. National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/11654>
- Parker, D. S., Lomax, M. A., Seal, C. J., & Wilton, J. C. (1995). Metabolic implications of ammonia production in the ruminant. *Proceedings of the Nutrition Society*, 54(2), 549–563. <https://doi.org/10.1079/PNS19950023>
- Pazla, R., Jamarun, N., Zain, M., & Arief. (2018). Microbial protein synthesis and in vitro fermentability of fermented oil palm fronds by phanerochaete chrysosporium in combination with tithonia (*Tithonia diversifolia*) and elephant grass (*pennisetum purpureum*). *Pakistan Journal of Nutrition*, 17(10), 462–470.
<https://doi.org/10.3923/pjn.2018.462.470>
- Pitt, R. E., Cross, T. L., Pell, A. N., Schofield, P., & Doane, P. H. (1999). Use of in vitro gas production models in ruminal kinetics. *Mathematical Biosciences*, 159(2), 145–163. [https://doi.org/10.1016/S0025-5564\(99\)00020-6](https://doi.org/10.1016/S0025-5564(99)00020-6)
- Poore, J., & Nemecek, T. (2018). Reducing food's environmental impacts through producers and consumers. *Science*, 360(6392), 987–992.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1126/science.aag0216>
- Porsavatdy, P., Preston, T. R., & Leng, R. A. (2016). Effect on feed intake, digestibility, N retention and methane emissions in goats of supplementing foliages of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and *Tithonia diversifolia* with water spinach (*Ipomoea aquatica*). *Livestock Research for Rural Development*, 28.
<http://lrrd.cipav.org.co/lrrd28/5/phon28072.html>
- R Core Team. (2021). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>
- Ribeiro, R. S., Chaves, A. V., Terry, S. A., e Silveira, S. R., Sacramento, J. P., Delarota, G. D., de Freitas, D. S., Tomich, T. R., Ribeiro Pereira, L. G., & Mauricio, R. M. (2015). The effects of *Tithonia diversifolia* on dairy cow performance. *XXIII International Grassland Congress IGC 2015.*, 973, 24–26.
- Ribeiro, R. S., Terry, S. A., Sacramento, J. P., Silveira, S. R. E., Bento, C. B. P., da Silva, E. F., Mantovani, H. C., da Gama, M. A. S., Pereira, L. G. R., Tomich, T. R., Mauricio, R. M., Chaves, A. V., Gama, M. A. S. da, Pereira, L. G. R., Tomich, T. R., Mauricio, R. M., & Chaves, A. V. (2016). *Tithonia diversifolia* as a supplementary feed for dairy cows. *PLoS ONE*, 11(12), e0165751.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165751>

- Rivera, J., Chará, J., Arango, J., & Barahona, R. (2021). Effect of different genotypes of *Tithonia diversifolia* on fermentation of feed mixtures with *Urochloa brizantha* cv. Marandú. *Crop and Pasture Science*, 72(10), 850. <https://doi.org/10.1071/CP21102>
- Rivera, J. E., Cuartas, C. A., Naranjo, J. F., Tafur, O., Hurtado, E. A., A, A. F., Chará, J., & Murgueitio, E. (2015). Efecto de la oferta y el consumo de *Tithonia diversifolia* en un sistema silvopastoril intensivo (SSPi), en la calidad y productividad de leche bovina en el piedemonte Amazónico colombiano. *Livestock Research for Rural Development*, 27. <http://www.lrrd.org/lrrd27/10/rive27189.html>
- Rivera, J. E., Naranjo, J. F., Cuartas, C. A., & Arenas, F. A. (2013). Fermentación in vitro y composición química de algunos forrajes y dietas ofrecidas bajo un Sistema Silvopastoril en el trópico de altura. *Livestock Research for Rural Development*, 25. <http://www.lrrd.org/lrrd25/10/rive25174.htm>
- Rodríguez García, I. (2017). Potencialidades de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray en la alimentación animal. *Livestock Research for Rural Development*, 29(4), 1–11. <http://www.lrrd.org/lrrd29/4/idal29063.html>
- Roman-Garcia, Y., Mitchell, K. E., Denton, B. L., Lee, C., Socha, M. T., Wenner, B. A., & Firkins, J. L. (2021). Conditions stimulating neutral detergent fiber degradation by dosing branched-chain volatile fatty acids. II: Relation with solid passage rate and pH on neutral detergent fiber degradation and microbial function in continuous culture. *Journal of Dairy Science*, 104(9), 9853–9867. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20335>
- Roman-Garcia, Y., Mitchell, K. E., Lee, C., Socha, M. T., Park, T., Wenner, B. A., & Firkins, J. L. (2021). Conditions stimulating neutral detergent fiber degradation by dosing branched-chain volatile fatty acids. III: Relation with solid passage rate and pH on prokaryotic fatty acid profile and community in continuous culture. *Journal of Dairy Science*, 104(9), 9868–9885. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20336>
- Russell, J. B., O'Connor, J. D., Fox, D. G., van Soest, P. J., & Sniffen, C. J. (1992). A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. *Journal of Animal Science*, 70(11), 3551–3561. <https://doi.org/10.2527/1992.70113551x>
- Rutungu, V., Karanja, N. K., Gachene, C. K. K., & Palm, C. (1999). Biomass production and nutrient accumulation by *Tephrosia vogelii* (Hemsl.) A. Gray and *Tithonia diversifolia* Hook F. fallows during the six-month growth period at Maseno, Western Kenya. *Biotechnology Agronomy Social and Environment*, 3(4), 237–246.
- Sallam, S. M. A., Nasser, M. E. A., El-Waziry, A. M., Bueno, I. C. S., & Abdalla, A. L. (2007). Use of an in vitro rumen gas production technique to evaluate microbial fermentation of ruminant feeds and its i... Use of an in vitro Rumen Gas Production Technique to Evaluate Some Ruminant Feedstuffs. *Journal of Applied Sciences Research*, 3(1), 34–41.
- Sao, N. van, Mui, N. T., & Binh, D. van. (2010). Biomass production of *Tithonia diversifolia* (Wild Sunflower), soil improvement on sloping land and use as high protein foliage for feeding goats. *Livestock Research for Rural Development*, 22(8). <http://www.lrrd.org/lrrd22/8/sao22151.htm>

- Schofield, P., Pitt, R. E., & Pell, A. N. (1994). Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. *Journal of Animal Science*, 72(11), 2980–2991. <https://doi.org/10.2527/1994.72112980x>
- Slyter, L. L., Satter, L. D., & Dinius, D. A. (1979). Effect of Ruminant Ammonia Concentration on Nitrogen Utilization by Steers. *Journal of Animal Science*, 48(4), 906–912. <https://doi.org/10.2527/jas1979.484906x>
- Sniffen, C. J., O'Connor, J. D., Van Soest, P. J., Fox, D. G., & Russell, J. B. (1992). A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *Journal of Animal Science*, 70(11), 3562–3577. <https://doi.org/10.2527/1992.70113562x>
- Terry, S. A., Ribeiro, R. S., Freitas, D. S., Delarota, G. D., Pereira, L. G. R. R., Tomich, T. R., Maurício, R. M., & Chaves, A. v. (2016). Effects of *Tithonia diversifolia* on in vitro methane production and ruminal fermentation characteristics. *Animal Production Science*, 56(3), 437–441. <https://doi.org/10.1071/AN15560>
- Valadares-Filho, S. C., & Pina, D. S. (2006). Fermentação Ruminant. In T. T. Berchielli, A. Pires, & S. Oliveira (Eds.), *Nutrição de Ruminantes*. Funep.
- van Soest, P. J. J., Robertson, J. B. B., & Lewis, B. A. A. (1991). Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74(10), 3583–3597. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Verdecia, D. M., Ramirez, J. L., Leonard, I., Alvarez, Y., Bazán, Y., Bodas, R., Andrés, S., Alvarez, J., Giraldez, F., & Lopez, S. (2011). Nutritive value of the *tithonia diversifolia* in a location of valle del cauto. *Revista Electronica de Veterinaria*, 12.
- Wang, C., Liu, Q., Zhang, Y. L., Pei, C. X., Zhang, S. L., Guo, G., Huo, W. J., Yang, W. Z., & Wang, H. (2017). Effects of isobutyrate supplementation in pre- and post-weaned dairy calves diet on growth performance, rumen development, blood metabolites and hormone secretion. *Animal*, 11(5), 794–801. <https://doi.org/10.1017/S1751731116002093>
- Wang, C., Liu, Q., Zhang, Y. L., Pei, C. X., Zhang, S. L., Wang, Y. X., Yang, W. Z., Bai, Y. S., Shi, Z. G., & Liu, X. N. (2015). Effects of isobutyrate supplementation on ruminal microflora, rumen enzyme activities and methane emissions in Simmental steers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 99(1), 123–131. <https://doi.org/10.1111/jpn.12191>
- Wang, M., Tang, S. X., & Tan, Z. L. (2011). Modeling in vitro gas production kinetics: Derivation of Logistic-Exponential (LE) equations and comparison of models. *Animal Feed Science and Technology*, 165(3–4), 137–150. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.09.016>
- Wickham, H. (2016). *ggplot2*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4>

4 EFEITOS DE NÍVEIS CRESCENTES DE *Tithonia diversifolia*, SOBRE A DIGESTIBILIDADE DOS NUTRIENTES, FERMENTAÇÃO RUMINAL E EMISSÕES DE CO₂, CH₄, N₂O E NH₃ DE OVINOS

Resumo

O uso de alimentos com o potencial para reduzir as emissões de metano entérico, melhorar a digestibilidade, e minimizar as perdas de nitrogênio da dieta são algumas das intervenções que têm sido mencionadas com potencial para mitigação do impacto do setor pecuário nas emissões de efeito estufa. Apesar do seu potencial e relativamente abundante informação de experimentos *in vitro* envolvendo animais alimentados com *Tithonia diversifolia* (TD), existem poucos estudos avaliando as emissões de GEE e NH₃ em estudos *in vivo*. Assim, foram utilizados oito carneiros adultos castrados providos de fistula ruminal em um arranjo experimental em quadrado latino 4 x 4 (4 períodos x 8 unidades experimentais) para avaliar os efeitos de dietas com quatro níveis crescentes de TD sobre as emissões de CO₂, CH₄, N₂O e NH₃, a digestibilidade aparente dos nutrientes e parâmetros fermentativos ruminais. Os animais receberam quatro níveis crescentes de TD (0, 9, 27 e 45%, base matéria seca) incluídos em dieta a base de Tifton 85, soja e milho (60:40 relação volumoso:concentrado). Durante cinco dias os animais foram alocados em gaiolas metabólicas para avaliação de digestibilidade. Posteriormente, durante dois dias os animais foram alocados em câmaras respirométricas para avaliação das emissões de CO₂, CH₄, N₂O e NH₃. O líquido ruminal dos animais foi coletado em cada período para determinação dos parâmetros fermentativos. A inclusão de TD não afetou as emissões de gases dos carneiros, nem sobre o consumo de MS, MO, PB ou FDN, mas para o consumo de FDA houve um aumento com a maior inclusão de TD. As digestibilidades da MS, MO, FDN e FDA foram significativamente inferiores nas dietas com 27 e 45% de TD. Não houve efeito significativo da TD sobre a digestibilidade da proteína, o balanço do nitrogênio, nem na produção AGCC. A concentração de nitrogênio amoniacal diminuiu com a inclusão de TD e as concentrações de isovalerato e isobutirato aumentaram nos animais alimentados com o maior conteúdo de TD. Os atuais resultados corroboraram alguns dos resultados obtidos *in vitro* no capítulo anterior, porém, o poder preditivo a partir do experimento *in vitro* foi baixo. De maneira similar à o que foi encontrado no experimento *in vitro*, nas condições e proporções aqui avaliadas a TD não parece ter influência sobre as emissões de metano e demais gases (CO₂, N₂O e NH₃). Entretanto, o fornecimento da planta parece ter efeitos positivos sobre as dinâmicas da degradação da proteína no rúmen sem efeitos relevantes sobre a excreção e emissão de nitrogênio.

Palavras-chave: gases de efeito estufa, emissões *in vivo*, perfis temporais de emissão

Abstract

The use of feed with the potential to reduce enteric methane emissions, improve digestibility, and reduce nitrogen losses are some of the interventions that have been mentioned with potential for mitigating the livestock sector's impact on greenhouse emissions. Despite its potential and relatively abundant information *in vitro*, there are few studies evaluating the *in vivo* GHG emissions from animals fed with *Tithonia diversifolia* (TD). Thus, 8 adult rams with rumen fistula were used in a 4 x 4 Latin square arrangement (4 periods x 4 experimental units) to evaluate the effects of diets with 4 increasing levels of TD on CO₂, CH₄, N₂O and NH₃ emissions, apparent digestibility and fermentation parameters. The animals received four increasing levels of TD (0, 9, 27 and 45%) included in a diet based on Tifton 85, soybean meal and ground corn. During 5 days the animals were placed in metabolic cages for apparent digestibility evaluation; and feed consumption, feces and urine excretion were controlled daily and sampled for nutrient analysis. Subsequently, for 2 days, the animals were placed in respiration chambers to CO₂, CH₄, N₂O and NH₃ emissions. Both mean daily concentrations and temporal emission profiles (area under the curve) were compared between treatments for all gases. Ruminal fluid was also collected at the end of each period for fermentative parameters determination. The TD inclusion had no effect on the sheep's GHG emissions, nor on the consumption of DM, MO, CP or NDF, but the consumption of ADF tended to increase with the higher inclusions of TD. DM, OM, NDF and ADF digestibility was significantly lower in the diets with 27 and 45% TD. There was no significant effect of TD on protein digestibility, nitrogen balance, or SCFA production. The concentration of ammonia nitrogen decreased with the inclusion of TD and the concentrations of isovalerate and isobutyrate increased in animals fed with the highest content of TD. The results of this experiment corroborated some of the results previously obtained *in vitro*, however, the *in vitro* experiment had a lower predictive power when most variables were regressed against its *in vivo* counterparts. Under the conditions and proportions evaluated here, TD does not seem to have an influence on methane emissions and neither on CO₂, N₂O and NH₃ emissions. However, the plant appears to have positive effects on the dynamics of protein degradation in the rumen without relevant effects on nitrogen excretion and emission.

Key-words: greenhouse gases, *in vivo* emissions, temporal emission profiles

4.1 Introdução

O aumento da temperatura terrestre, consequência do acúmulo excessivo de GEE na atmosfera, está associado ao incremento de eventos climáticos extremos (IPCC, 2019c). O setor pecuário contribui com a emissão de cerca de 4,5 GtCO₂e por ano (IPCC, 2019c) sendo que os ruminantes contribuem com aproximadamente 2,2 GtCO₂e por ano deste total. As emissões entéricas de CH₄ são os principais contribuidores para esse número, seguido das emissões de N₂O oriundas do manejo do esterco e as fezes depositadas no solo (Herrero *et al.*, 2013).

O uso de alimentos com o potencial para reduzir as emissões de metano entérico, melhorar a digestibilidade, e reduzir as perdas de nitrogênio (Herrero *et al.*, 2016) são algumas das intervenções que têm sido mencionadas com potencial para mitigação do impacto do setor nas emissões de efeito estufa. A avaliação destes alimentos é essencial para determinar o seu potencial de mitigação.

Existe na literatura uma quantidade razoável de estudos avaliando a influência de *Tithonia diversifolia* (TD) sobre as emissões de metano. Com vários deles mostrando um potencial promissor de mitigação de metano *in vitro* (Ver Tabela 2.5). Porém, também são conhecidas as dificuldades dos estudos *in vitro* na predição de respostas *in vivo* (Danielsson *et al.*, 2017; Dijkstra *et al.*, 2005; Rymer *et al.*, 2005), dado que não levam em consideração fatores como o fluxo de material não fermentado fora do rúmen, e mudanças no pH e na capacidade de tamponamento que ocorrem nas condições *in vivo* e tem influência sobre a produção de metano (Danielsson *et al.*, 2017).

Assim, apesar dos estudos *in vitro* ter um imenso valor em termos de repetibilidade, descrição da cinética fermentativa e triagem de potenciais substratos (Getachew *et al.*, 1998; Makkar, 2004), os resultados *in vivo* são os que realmente oferecem uma visão real do impacto das variáveis avaliadas (Rymer *et al.*, 2005). Contudo, os estudos *in vivo* avaliando a influência de TD nas emissões de metano são escassos (Porsavatdy *et al.*, 2016; Ribeiro *et al.*, 2016) e ainda mais reduzidos avaliando as emissões de óxido nitroso (Chacón Góngora, 2018), dióxido de carbono (Porsavatdy *et al.*, 2016) e amônia. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar as emissões de CO₂, CH₄, N₂O e NH₃ em carneiros, utilizando dietas com níveis crescentes de *Tithonia diversifolia* além de discutir sobre a relação dos resultados *in vivo* com os resultados *in vitro*.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Local e declaração ao comitê de ética deste estudo

Todos os procedimentos envolvendo a utilização de animais neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - CEUA-ESALQ / USP (Protocolo 008-2018). O experimento foi realizado no Laboratório de Nutrição Animal do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (LANA / CENA / USP), na cidade de Piracicaba, estado de São Paulo, Brasil.

4.2.2 Composição química e dos componentes e da dieta experimental

A composição química (tabela 3.1) dos componentes e das dietas (tabela 3.2) foram avaliadas. Uma dieta controle (40% de farelo de soja e grão de milho e 60% de feno de Tifton 85 (*Cynodon* spp) e três níveis crescentes de feno de TD (9, 27 e 45% - base de matéria seca) como uma substituição do feno de Tifton. As dietas foram formuladas para os requisitos de manutenção de carneiros (National Research Council, 2007) com 2,5% de consumo de matéria seca; e foram balanceadas para serem isoprotéicas, isoenergéticas e isofibrosas, usando os valores de MS, PB, FDN e NDT dos componentes.

Tabela 4.1 Composição bromatológica dos componentes das dietas (g/kg)

	Farelo de Soja	Milho	Feno Tifton 85	<i>Tithonia diversifolia</i>
MS	897,89	887,00	903,04	887,07
aFDNom	150,00	111,48	735,81	677,71
FDAom	110,96	34,20	360,23	566,62
PB	479,23	127,14	140,45	78,84
NDT	832,25	830,32	550,15	630,21
MM	69,19	12,79	98,96	111,35

MS: Matéria seca, aFDNom: Fibra em detergente neutro avaliada utilizando amilase e sulfito e expressada como libre de cinzas, FDAom: Fibra em detergente ácido expressada como libre de cinzas, PB: Proteína Bruta, NDT: Nutrientes digestíveis totais, MM; Material mineral.

Tabela 4.2. Composição das dietas em base matéria seca (%)

	TD0%	TD9%	TD27%	TD45%
<i>Tithonia diversifolia</i>	0,00	9,00	27,00	45,00
Tifton 85	60,00	51,00	33,00	15,00
Milho grão	26,30	25,47	24,62	23,49
Farelo de Soja	13,70	14,26	15,38	16,51

Tabela 4.3. Composição química bromatológica de dietas com níveis crescentes de *Tithonia diversifolia*

Parâmetro	0%TD	9%TD	27%TD	45%TD
MS (g/kg)	910,6	906,9	906,4	905,7
MO (g/kg MS)	938,5	928,0*	929,6	920,5
PB (g/kg MS)	163,0	158,6	156,5	156,3
aFDNom (g/kg MS) ^{ab}	409,0	396,6	393,3	392,7
FDAom (g/kg MS) ^b	299,2	300,3	312,7	345,8
Lignina (g/kg MS) ^b	75,6	83,92	98,48	129,0
EB (kcal/gMS)	3748	3713	3715	3697
EE (g/kg MS)	23,7	18,0	17,67	17,5
CNF (g/kg MS)	342,7	366,1	367,0	353,8

MS: matéria seca, MO: matéria orgânica, PB: proteína bruta, FDN: fibra em detergente neutro, FDA: fibra em detergente ácido, EE: extrato etéreo, CNF: Carboidratos no fibrosos. ^a:FDN avaliado usando amilase termo estável e expressado como livre de cinzas residuais. ^b expressado como livre de cinzas residuais.

A TD em estágio de floração, foi coletada em diferentes áreas ao redor da cidade de São João del Rei no estado de Minas Gerais, Brasil. A planta inteira (folhas e caules) foi colhida, triturada e depois seca ao sol até estar seca ao tato. A TD seca foi então triturada novamente (Triturador Nogueira DPM2 – Nogueira S/A Máquinas Agrícolas, São Joao de Boa Vista – SP, Brasil) utilizando peneira de 1 cm para facilitar o processo de mistura com o resto de componentes da dieta. O Feno de Tifton-85 foi inicialmente picado em partículas de 3 cm (Triturador Charger 15.0 – Menxon Máquinas Agrícolas, Cajuru – SP, Brasil) e depois triturado de novo a 1 cm no triturador Nogueira. O grão de milho também foi quebrado em triturador sem uso de peneira. O farelo de soja foi

utilizado sem processamento prévio de trituração mecânica. Os ingredientes foram misturados com auxílio de um misturador com capacidade de 500 kg (M.A.P Equipamentos Agropecuários e Industriais LTDA., Londrina – PR, Brasil) por 15 minutos para a formação das dietas completas, posteriormente armazenadas em bombonas plásticas de 200 litros em local seco e sem exposição solar.

Após a mistura dos ingredientes para cada dieta, essas foram então moídas a 1 mm (em moinho Willey) para determinação da composição química. As diretrizes da AOAC, (2011) foram seguidas para determinação de teor de matéria seca (MS) (método 934.01), proteína bruta (PB) (método 2001.11), extrato etéreo (EE) (método 2003.5) e fração de cinzas (método 942.05). A fibra em detergente neutro (aFDNom) (avaliada usando amilase termo estável e sulfito e expressa como libres de cinzas residuais), a fibra em detergente ácido (FDAom) (expressada como livre de cinzas residuais) e a lignina foram avaliadas de acordo com Van Soest *et al.* (1991) adaptado por Mertens *et al.* (2002). Os carboidratos não fibrosos foram calculados pela equação: $CNF = 100 - (PB + FDNom + EE + cinza)$ (Sniffen *et al.*, 1992).

4.2.3 Animais

Foram utilizados oito ovinos Santa Inês, machos castrados, adultos, de peso corporal médio $70 \pm 13,4$ kg, providos de cânula ruminal, provenientes do plantel do Biotério do Laboratório de Nutrição Animal – CENA/USP. Os animais foram pareados segundo o peso corporal para constituir uma unidade experimental e distribuídos aleatoriamente em um dos quatro tratamentos, mudando o tratamento para cada um dos quatro períodos avaliados. Para cada um dos quatro períodos, os animais foram adaptados por 14 dias às dietas avaliadas. Água e mistura mineral foram fornecidas *ad libitum* durante o período experimental.

4.2.4 Ensaio de metabolismo

Os animais foram alojados em gaiolas metabólicas (0,8 x 1,2 m) providas de comedouro, bebedouro e cocho para sal mineral, providas de bandejas coletoras de fezes e urina. Os animais foram mantidos por um período de sete dias, sendo dois dias para adaptação dos animais as gaiolas e cinco dias de colheita de amostras. A dieta foi fornecida à vontade em duas refeições oferecidas as 8 e as 16 horas, em proporções iguais

(50% manhã e 50% tarde). O consumo foi ajustado para garantir sobras de 10%. Amostras das dietas fornecidas foram coletadas para cada um dos períodos de avaliação. As amostras de sobras e de fezes de cada animal foram coletadas diariamente antes do fornecimento da primeira refeição diária, pesadas em balança eletrônica (precisão de 5 gramas), amostrados 10% (formação de um *pool* de sobras e um *pool* de fezes de cada animal) e armazenadas em freezer a -20° C para posterior avaliação bromatológica empregando as metodologias de análise descritas.

A digestibilidade de cada nutriente foi calculada de acordo com a equação (4.1) descrita por McDonald *et al.* (2011).

$$DA \text{ de } X = \frac{X_{consumido} - X_{excretado}}{X_{consumido}} \quad \text{eq. 4.1}$$

Onde: DA = Digestibilidade aparente (g/g); X = nutriente avaliado.

Ao final dos quatro períodos experimentais as amostras de ofertado, sobras e fezes foram descongeladas (até temperatura ambiente), pesadas e secas em estufa de circulação forçada de ar a 55°C até peso constante. As amostras foram moídas a 1 mm para determinação de MS, MO, PB e FDN, FDA e Lignina seguindo os procedimentos já descritos.

4.2.5 Coleta de urina

Antes do fornecimento da primeira refeição diária, a coleta de urina foi realizada usando baldes plásticos contendo 100 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 10% para acidificar a urina e evitar a volatilização da amônia. O volume total foi mensurado e uma alíquota de 10% foi amostrada para a formação de um *pool* de urina por animal por período de avaliação. As amostras de urina foram armazenadas em *freezer* a -20°C para posterior análise de nitrogênio total.

4.2.6 Balanço do nitrogênio

O cálculo de balanço de nitrogênio foi realizado após a determinação do nitrogênio total presente nas amostras de ofertado e excretas utilizando a metodologia da

AOAC (2011) (método 954.01) para determinação de N e seguindo a equação descrita a seguir:

$$N_{retido} (g/dia) = N_{ingerido} - N_{excretado} \quad \text{Eq. 4.2}$$

Onde: N_{retido} = quantidade média de nitrogênio retido pelo animal; $N_{ingerido}$ = quantidade média de nitrogênio ingerido pelo animal; $N_{excretado}$ = quantidade média de nitrogênio excretado na urina mais a quantidade média de nitrogênio excretado nas fezes.

4.2.7 Câmaras respirométricas

Posterior ao ensaio de digestibilidade, os oito animais foram alocados em câmaras de respiração adaptadas com sistema de ventilação para a mensuração de gases segundo a metodologia descrita por Abdalla *et al.* (2012; 2008). A avaliação da emissão de gases foi feita em um período de três dias, sendo um para adaptação e dois para coleta. A alimentação foi fornecida para os animais às 8 e 16 horas, e a temperatura e umidade interna e fluxo de saída de ar (m/s) de cada câmara foi mensurado durante o dia nos horários 8, 11, 14, 17 e 20h.

Dez câmaras metálicas (157 x 71 x 167 cm – volume 1,9 m³) descritas por Abdalla *et al.* (2012; 2008) foram usadas para realização do ensaio. As câmaras foram conectadas por meio de tubulações a um coletor de distribuição de 16 portas (A0311, 16-Port distribution manifold, Picarro, INC., Santa Clara, CA – USA) que permitia selecionar as emissões de cada câmara (uma por vez) e enviá-las em tempo real para um analisador de concentração de gases (G2508 Picarro Inc, Santa Clara, California - USA) de tecnologia CRDS (espectroscopia de cavidade ring-down) para a determinação simultânea da concentração de CO₂, CH₄, N₂O (ppm - μmol/mol (v/v)) e NH₃ (ppb - nmol / mol (v/v)) em uma frequência aproximada de uma mensuração por segundo. Duas das câmaras de respiração foram deixadas vazias e uma tubulação extra mensurava a concentração dos gases da sala onde as câmaras se encontravam alocadas para posteriores correções de emissões em relação ao branco e ambiente, assim em total eram mensuradas oito câmaras com animais, duas câmaras vazias e um ambiente (11 câmaras).

Durante os dois dias de avaliação das emissões, as mensurações foram realizadas em uma câmara por vez, onde para cada uma das câmaras as concentrações de gases

foram mensuradas durante três minutos ininterruptos. As mensurações foram realizadas de maneira sequencial da câmara 1 até a câmara 11, em ciclos de 33 minutos ($3 \text{ min} \times 11$ câmaras), iniciando as 8 e terminando as 6 h do dia seguinte (22 horas aprox.). Antes do fornecimento da alimentação da manhã do segundo dia, as fezes e urina das câmaras foram removidas e as sobras de alimento retiradas e pesadas. Após as câmaras serem limpas, a mensuração era retomada de mesma maneira que no primeiro dia.

4.2.8 Cálculos para determinação das emissões

Os dados brutos providos do analisador de gases dos quatro períodos de mensuração foram avaliados usando *software* R Studio (R Core Team, 2021). Os primeiros 60 segundos de cada mensuração de 3 minutos, por câmara, foram removidos para evitar a contaminação das mensurações com gases residuais provindas da mensuração da câmara anterior. Usando as concentrações dos 2 minutos restantes foram calculadas as médias móveis para cada câmara. Assim, foi obtido um ponto de concentração média (de cada um dos gases) a cada 33 minutos para cada câmara durante os dois dias de mensuração (44 horas) (perfil de concentração no tempo). Isto é, 76 pontos de concentração para cada um dos quatro períodos de avaliação de cada câmara.

Uma vez obtido o perfil de concentração no tempo de cada gás, foi utilizada a área abaixo da curva, para comparar os perfis gerados pelos diferentes animais alimentados com a diferentes dietas. A área abaixo da curva é expressa utilizando a integral definida (equação 4.3):

$$A = \int_a^b f(x)dx \quad \text{Eq. 4.3}$$

Onde a área abaixo da curva “A” é a integral definida de “f(x)” com respeito a “dx” desde “a” até “b”.

Uma aproximação da integral definida é dada pela regra trapezoidal (Eq. 4.4); onde a área abaixo da curva é a somatória da área dos trapézios formados entre a concentração de cada ponto de mensuração desde 1 (0h) até 76 (44h).

$$AAC = \sum_{i=1}^{76} b \frac{(h_1 + h_2)}{2} \quad \text{Eq. 4.4}$$

AAC = Area abaixo da curva, b = base do trapézio (*ponto i - 1*), h_1 = concentração do gás no ponto $i - 1$; h_2 = concentração do gás no tempo i .

4.2.9 Taxas de emissão diária de gases

A partir do volume diário de gás emitido, e utilizando os dados obtidos no ensaio de digestibilidade para cada animal, as emissões foram expressas em g de gás por dia (gGAS/d), g de gás por kg de peso vivo (gGAS/kgPV), g de gás por kg de matéria seca ingerida (gGAS/kgMSI). As emissões de N_2O e NH_3 foram também expressadas como g de gás por kg de nitrogênio excretado (gGAS/kg N excretado) utilizando os valores do balanço de nitrogênio.

4.2.10 Parâmetros da fermentação ruminal

No último dia de ensaio de quantificação das emissões de gases foi coletada através de sonda esofágica uma amostra do líquido ruminal dos animais experimentais. Cada amostra foi dividida em três alíquotas para determinação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), nitrogênio amoniacal (N- NH_3) e populações de protozoários. A determinação de AGCC foi realizada usando cromatografia gasosa conforme a metodologias descrita por Lima *et al.* (2018). A concentração de N- NH_3 foi determinada usando o método de micro *Kjedahl*, com destilação de vapor usando solução de tetraborato de sódio 5% para reação e condensação do N- NH_3 , ácido bórico como solução receptora e ácido sulfúrico 0,01 N para a titulação. A determinação de populações de protozoários foi feita por visualização em microscópio de luz usando câmara de Neubauer, e seguindo as metodologias de Dehority (1993), Goçmen *et al.* (2001) e Ogimoto e Imai (1981)

4.2.11 Análise estatística

Os dados foram analisados como delineamento em quadrado latino 4 x 4, com 4 períodos e 4 unidades experimentais cada uma composta por 2 animais e 4 tratamentos

(nível de inclusão de TD). As médias dos tratamentos foram comparadas usando contrastes ortogonais, comparando os tratamentos com inclusão de TD contra a dieta sem TD; TD0% vs TD9% (1,-1,0,0) TD0% vs TD27% (1,0,-1,0), TD0% vs TD45% (1,0,0,-1).

Testes de correlação de Pearson, e análise de regressão foram realizados para avaliar o efeito das inclusões crescentes de TD nas variáveis avaliadas. Em todos os casos foi realizado teste de normalidade de Shapiro Wilk e de Homoscedasticidade de Bartlett. E onde necessário os dados foram transformados, usando transformação exponencial, logística ou raiz quadrada. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* R (R Core Team, 2021) e os pacotes “stats”, “lmerTest”, “emmeans”, “multcomp” e “ggplot2” (Hothorn *et al.*, 2008; Kuznetsova *et al.*, 2017; Lenth, 2021; Wickham, 2016).

O modelo estatístico usado foi o seguinte:

$$Y_{ijkl} = \mu + t_i + l_j + c_k + e_{ijkl}$$

Onde: Y_{ijkl} = Observação do tratamento i na linha j na coluna k da repetição l

μ = efeito médio geral

t_i = efeito do tratamento i

l_j = efeito do período j

c_k = efeito da unidade experimental k

e_{ijkl} = erro experimental para $ijkl$

4.3 Resultados

4.3.1 Consumo e digestibilidade aparente

Os resultados referentes ao consumo e digestibilidade dos nutrientes dos animais alimentados com as diferentes inclusões de TD, estão apresentados na Tabela 4.3. O nível de inclusão de TD na dieta não teve efeitos significativos (regressão > 0.05) sobre o consumo de matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta ou fibra de detergente neutro. Foi observado um efeito linear crescente no consumo de FDA dos animais com a maior inclusão de TD nas dietas ($R^2 = 0,19$; $p=0,007$). Comparados com os animais na dieta sem TD, o consumo de FDA foi 31,5% superior na dieta com a maior inclusão de TD.

Foi observada uma redução na digestibilidade dos nutrientes quando o nível de TD aumentou na dieta. Com exceto da digestibilidade da proteína bruta (DPB), foi observado um efeito linear decrescente na digestibilidade de MS ($R^2=0,42$), MO ($R^2=0,47$), FDN ($R^2=0,51$) e FDA ($R^2=0,27$); com valores significativamente mais baixos ($p < 0,05$) sendo observados nas inclusões mais altas de TD (TD27 e TD45%) (Tabela 4.3). A digestibilidade da proteína não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos.

Tabela 4.3. Consumo e digestibilidade aparente de carneiros alimentados com níveis crescentes de TD.

	0%TD	9%TD	27%TD	45%TD	SE	p - Valor	L	R ²
Consumo								
Matéria seca (g/dia)	1668,2	1744,3	1676,8	1805,4	164,90	0,414	-	ns
Matéria seca (%PV)	2,42	2,59	2,56	2,65	0,318	0,485	-	ns
Matéria orgânica (g/dia)	1566,6	1607,2	1544,1	1638,6	149,06	0,633	-	ns
Proteína bruta (g/dia)	322,2	307,6	300,9	332,3	32,87	0,760	-	ns
Fibra detergente neutro (g/dia)	857,5	845,1	792,5	877,7	74,97	0,233	-	ns
Fibra detergente ácido (g/dia)	602,7	633,4	627,5	792,7*	64,33	0,007	0,006	0,19
Coeficientes de digestibilidade aparente								
Matéria seca	0,683	0,693	0,637*	0,607*	0,0160	0,008	<0,001	0,42
Matéria orgânica	0,709	0,714	0,656*	0,625*	0,0150	0,002	<0,001	0,47
Proteína bruta	0,738	0,728	0,699	0,711	0,0269	0,160	-	-
Fibra detergente neutro	0,623	0,598	0,494*	0,480*	0,0246	<0,001	<0,001	0,51
Fibra detergente ácido	0,502	0,519	0,380*	0,392*	0,0389	0,009	0,001	0,27

* Na mesma linha, indica diferenças significativas versus o tratamento sem TD (TD0%); p-Valor = p-valor do contraste; L = p-Valor da regressão linear; R² = Coeficiente de determinação

4.3.2 Balanço de nitrogênio

Não foram observadas alterações ($p>0,05$) no consumo de nitrogênio, no nitrogênio excretado e nem no nitrogênio retido entre as dietas (Tabela 4.4). Também não foram observados efeitos do aumento de TD na dieta sobre os parâmetros do balanço de nitrogênio (regressão $> 0,05$).

Tabela 4.4. Balanço de nitrogênio de ovinos alimentados com níveis crescentes de TD.

	0%TD	9%TD	27%TD	45%TD	EP	p - Valor
N Ingerido (g/dia)	51,5	49,2	48,1	53,1	3,71	0,246
N Excretado (g/dia)	26,4	25,8	27,0	26,8	2,35	0,809
N Fezes (g/dia)	13,3	13,6	14,4	15,2	2,14	0,380
N Urina (g/dia)	13,0	12,2	12,6	11,5	1,21	0,340
N Retido (g/dia)	25,14	23,3	21,0	26,3	4,14	0,339
N Retido / N ingerido (%)	47,5	47,2	42,9	48,0	4,29	0,297
N Fezes / N ingerido (%)	26,1	27,1	30,0	28,8	2,69	0,160

N Urina / N ingerido (%)	26,3	25,6	26,9	23,1	3,82	0,410
EP: Erro padrão da média; p – Valor: valor p do contraste						

4.3.3 Parâmetros fermentativos ruminais

Os resultados dos parâmetros de fermentação ruminal estão apresentados na tabela 4.5. Não foram observados efeitos da inclusão de TD sobre as populações de protozoários ($p > 0,05$). O aumento na inclusão de TD não teve efeitos significativos (p -valor da regressão $> 0,05$) sobre a produção de acetato, propionato, butirato, relação acetato:propionato nem a produção de AGCC total. Entretanto, foi observada uma relação linear positiva ($p < 0,05$) na concentração de valerato, isovalerato, e isobutirato associada a inclusão de TD ($R^2 = 0,14$ e $0,15$ e $0,25$, respectivamente). Comparados com os animais alimentados sem TD, os animais alimentados com 45% de TD apresentaram maior concentração de valerato (1,48 vs 1,79 mmol/L), isovalerato (3,77 vs 4,71 mmol/L) e isobutirato (1,32 vs 2,31 mmol/L).

Houve uma relação linear negativa na concentração de N-NH₃ produto do aumento na inclusão de TD na dieta ($p = 0,011$, $R^2 = 0,17$). Os animais alimentados com o maior nível de TD (TD45%) apresentaram menor concentração ($p < 0,05$) de N-NH₃ (18,9 mg/dL) do que os animais alimentados com a dieta sem TD (23,8 mg/dL). Não foram observados efeitos da inclusão de TD sobre as populações de protozoários ($p > 0,05$).

Tabela 4.5. Parâmetros da fermentação ruminal para animais com níveis crescentes de TD.

	0%TD	9%TD	27%TD	45%TD	SE	p-Valor	L	R ²
Protozoários ($\times 10^5$ / mL)	4,92	4,76	5,45	3,54	0,814	0,103		
N-NH ₃	23,83	24,34	21,29	18,9*	1,87	0,0151	0,011	0,17
AGCC Total (mmol/L)	136,2	135,1	137,7	130,2	6,55	0,368		
Acetato (mmol/L)	93,5	93,3	93,1	87,4	3,73	0,116		
Propionato (mmol/L)	23,7	23,7	24,6	23,0	1,93	0,654		
Butirato (mmol/L)	18,9	17,9	19,9	19,7	1,73	0,580		
Proporção A:P	3,9	4,0	3,8	3,8	0,18	0,345		
Valerato (mmol/L)	1,48	1,48	1,71	1,79*	0,124	0,020	0,016	0,15
Iso-valerato (mmol/L)	3,77	3,84	4,40	4,71*	0,372	0,020	0,018	0,14
Iso-butirato (mmol/L)	1,32	1,73	1,97*	2,30*	0,264	0,022	0,001	0,25

* Na mesma linha, difere significativamente do tratamento TD0% usando contrastes ortogonais a $p < 0,05$. p-Valor = valor p do contraste; L = valor p da regressão linear; R² = Coeficiente de determinação.

4.3.4 Emissões de CO₂, CH₄, N₂O e NH₃

Os resultados das taxas de emissão de CH₄, CO₂, N₂O, NH₃ e emissão total estão apresentados na tabela 4.6. Não foram observadas diferenças entre as taxas de emissões

de nenhum dos gases avaliados entre os animais alimentados com os diferentes níveis de TD. As emissões de metano para os animais alimentados com TD variaram em torno a 9,3 g CH₄/ kg de matéria seca ingerida. As de dióxido de carbono, estiveram próximas a 101 gCO₂/ kg de matéria seca ingerida. Em relação às emissões de N₂O e NH₃ para cada quilograma de nitrogênio excretada (fezes + urina), os animais alimentados com TD emitiram em média 2,62 g N₂O e 37,4 g NH₃. Considerando o potencial de aquecimento global para CO₂, CH₄ e N₂O (Krey *et al.*, 2014) as emissões médias dos animais alimentados com TD, estiveram em torno a 153 kg de CO₂ equivalentes por animal ao ano.

Tabela 4.6. Taxas de emissão média de CH₄, CO₂, N₂O e NH₃ para carneiros alimentados com níveis crescentes de TD.

	0%TD	9%TD	27%TD	45%TD	SE	p - Valor
Metano						
gCH ₄ / dia	12,41	12,55	13,17	12,25	1,209	0,534
gCH ₄ / kgPV	0,51	0,52	0,55	0,51	0,043	0,335
gCH ₄ / kgMSI	8,52	8,76	10,28	9,05	0,958	0,079
Dióxido de carbono						
gCO ₂ / dia	128,59	126,21	138,14	140,10	13,42	0,400
gCO ₂ / kgPV	5,40	5,39	5,92	5,90	0,592	0,394
gCO ₂ / kgMSI	87,86	89,83	109,22	105,30	12,82	0,110
Oxido nitroso						
gN ₂ O / dia	0,064	0,065	0,070	0,063	0,0052	0,211
gN ₂ O / kgMSI	0,05	0,05	0,04	0,06	0,009	0,257
gN ₂ O / kg N excretado	2,55	2,62	2,58	2,47	0,217	0,6888
Amônia						
gNH ₃ /dia	1,00	0,98	1,05	0,91	0,207	0,6823
gNH ₃ /kgMSI	0,67	0,75	0,90	0,68	0,209	0,280
gNH ₃ /kg N excretado	39,0	39,1	37,3	35,8	7,54	0,700
Emissão total (kg CO ₂ e/ ano) ¹	149,4	149,6	159,3	152,2	13,77	0,478

¹ Calculo utilizando a equação 10.21A do IPCC, (2019b) e o potencial de aquecimento global em 100 anos (GWP₁₀₀), para CO₂ (1), CH₄ (21), e N₂O (310) (Krey *et al.*, 2014); MSI = Matéria seca ingerida; N = Nitrogênio; PV = Peso vivo.

Os perfis de produção de CO₂, CH₄, N₂O e NH₃ no tempo estão apresentados nas figuras Fig. 4.1 até 4.4. No eixo 'y' está a concentração do gás em μmol/mol, e no eixo 'x' o tempo transcorrido desde o começo da mensuração (0h = 8h aprox.). A alimentação dos animais foi fornecida nos tempos 0, 8, 24, e 32 horas. A área abaixo da curva foi utilizada para comparar os perfis de concentração entre as dietas, dado que foi considerado que a média da produção diária não representava completamente a dinâmica

variável das emissões ao longo do dia. Não foram observados efeitos do aumento da inclusão de TD sobre os valores da área abaixo da curva (AAC) dos perfis de emissão de gases das diferentes dietas (Tabela 4.7.).

No caso dos perfis de CO₂ e CH₄. As emissões parecem seguir um padrão diurno e noturno. A concentração desses gases é maior durante o dia (0 - 12 e 24 - 36 horas) e parece estar influenciada pelo horário de alimentação mostrando picos de concentração nesses horários. Em contraste, a produção destes gases é menor durante o período da noite (12 - 20 e 36 - 44 horas). Durante a noite as curvas de produção médias ajustadas (linhas ponteadas) estão numa proximidade maior, entretanto, durante o período diurno, e particularmente perto dos horários de alimentação as curvas parecem estar mais separadas o que poderia sugerir diferenças na produção dos CO₂ e CH₄ nesses horários. Porém, essas diferenças não foram observadas na comparação da área abaixo da curva.

Os perfis temporais de N₂O e NH₃ seguiram um padrão similar entre eles (Fig. 4.3 e 4.4). Não parece existir uma variação diurna-noturna como ocorreu com os perfis de CO₂ e CH₄. Entretanto, em ambos os casos, o perfil de concentração parece estar influenciado pelo dia de avaliação. Tanto os perfis de N₂O quanto de NH₃ foram maiores no segundo dia (24 – 44 h). Parece possível que este aumento esteja associado com a presença de resíduos de fezes e de urina que permaneciam nas gaiolas depois da limpeza do dia. Não são observáveis maiores diferenças entre os perfis de concentração dos tratamentos.

Tabela 4.7. Área abaixo da curva (AAC)^a dos perfis temporais de concentração de GEE de carneiros alimentados com níveis crescentes de TD

	0%TD	9%TD	27%TD	45%TD	SE	p - Valor
CO ₂	25777	25231	26187	26973	980,7	0,238
CH ₄	1712	1658	1733	1696	113,3	0,643
N ₂ O	8,2	8,10	8,85	7,9	0,58	0,483
NH ₃	153759	146145	172984	139684	25481,4	0,460

^a A unidade da área abaixo da curva não tem significado biológico e está definida como a unidade do eixo Y (umol / mol) vezes a unidade do eixo X (tempo em horas). (umol / mol / 44 horas)

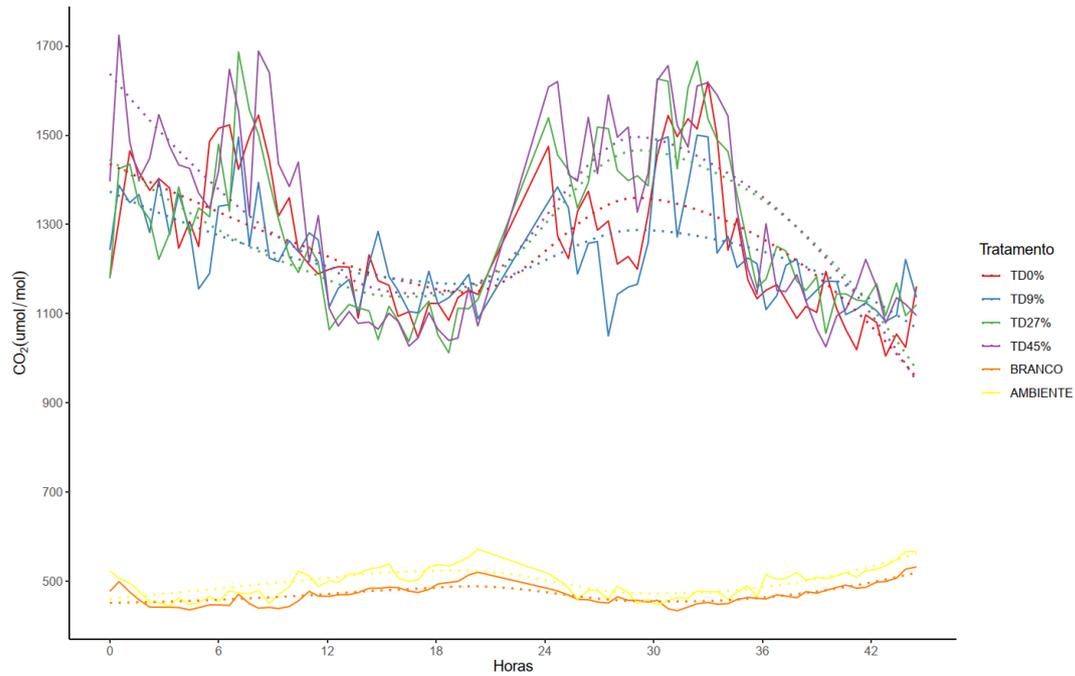


Fig. 4.1. Perfil de emissão temporal de CO₂ de carneiros alimentados com 4 níveis crescentes de TD na dieta. Linha pontuada: Média suavizada usando o método LOESS de regressão local. Alimentação fornecida as 0, 8, 24, e 32 h.

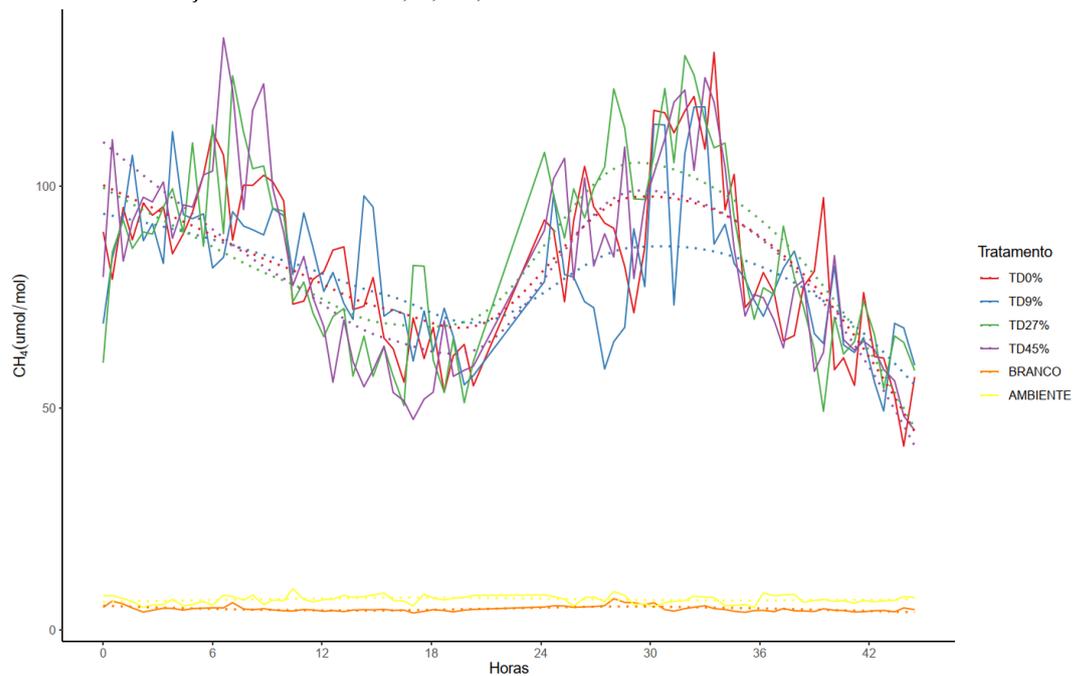


Fig. 4.2. Perfil de emissão temporal de CH₄ de carneiros alimentados com 4 níveis crescentes de TD na dieta. Linha pontuada: Média suavizada usando o método LOESS de regressão local. Alimentação fornecida as 0, 8, 24, e 32 h.

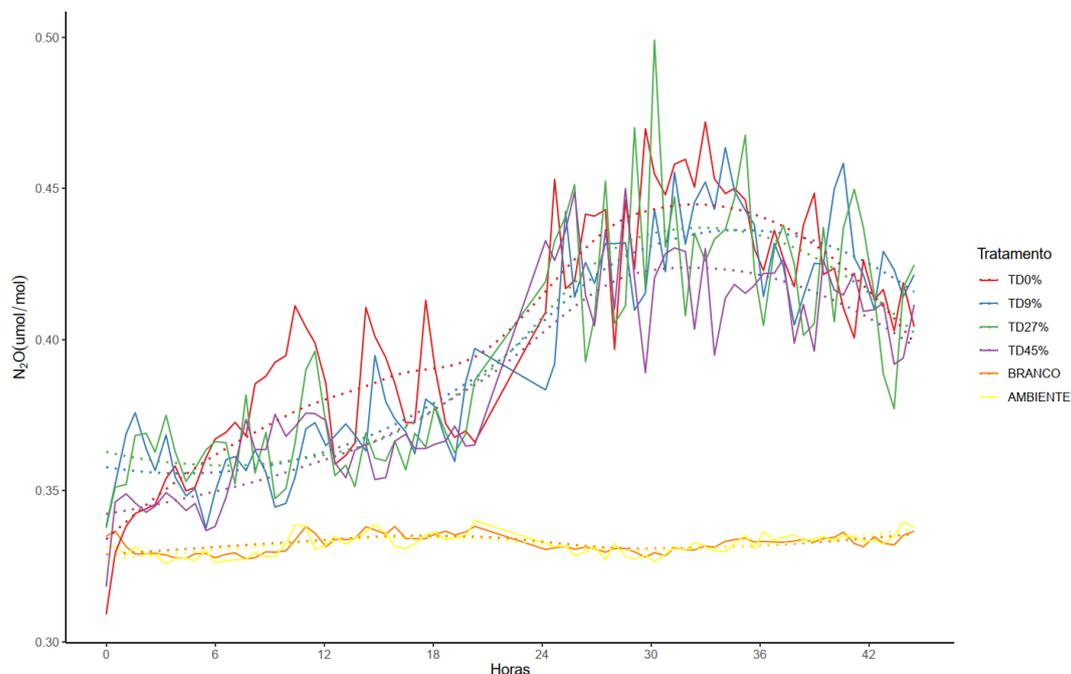


Fig. 4.3. Perfil de emissão temporal de N₂O de carneiros alimentados com 4 níveis crescentes de TD na dieta. Linha pontuada: Média suavizada usando o método LOESS de regressão local. Alimentação fornecida as 0, 8, 24, e 32 h.

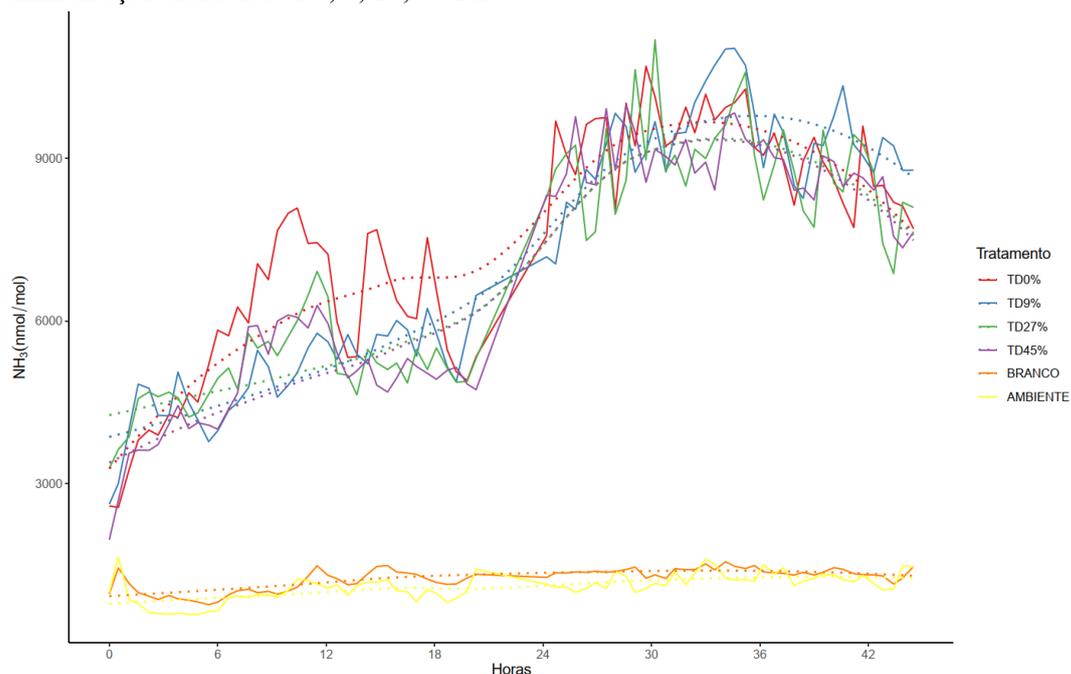


Fig. 4.4. Perfil de emissão temporal de NH₃ de carneiros alimentados com 4 níveis crescentes de TD na dieta. Linha pontuada: Média suavizada usando o método LOESS de regressão local. Alimentação fornecida as 0, 8, 24, e 32 h.

4.4 Discussão

Não é possível afirmar que as emissões de GEE de ovinos sejam dependentes do nível de TD incluído na dieta, já que não foi encontrada uma relação significativa entre o nível de inclusão e os gases aqui mensurados. Foi teorizado previamente que o efeito

indireto da TD sobre os mecanismos ruminais que fornecem hidrogênio como substrato para a metanogênese, era um dos meios pelos quais a planta poderia mitigar a produção de metano entérico. A fermentação dos carboidratos em acetato é uma rota conhecida de produção de hidrogênio enquanto a fermentação para propionato é considerada um sumidouro ruminal do mesmo (Danielsson *et al.*, 2017; Getachew *et al.*, 1998). A similaridade das concentrações de AGCC entre as dietas e particularmente na proporção A:P são consistentes e, portanto, congruentes com a ausência de diferenças significativas nas emissões de CH₄ e CO₂ encontradas no presente estudo. Frequentemente, a produção de metano está positivamente associada à proporção A:P (Greening *et al.*, 2019). Desta forma, os resultados observados, coincidem com os encontrados por Ribeiro *et al.* (2016), que usando inclusões de até 15% de TD na dieta de vacas leiteiras também não encontraram diferenças nas emissões de metano produzido, porém ressaltaram que a proporção de A:P entre os tratamentos foi menor com a inclusão de TD. As emissões médias de CH₄ aqui encontradas para os animais na dieta sem TD (12,59 gCH₄/dia) são similares aquelas reportadas por Lima *et al.* (2020); Lima *et al.* (2018) para ovinos Santa Inês (14,14 gCH₄/dia) e pelos reportados pelo MAPA (2020), a pesar disso, esses valores são inferiores a os fatores de emissão padrão para ovinos reportados pelas metodologias do IPCC (2019b) de 5 a 9 kg de CH₄ por cabeça por ano versus 4,60 kg CH₄ por cabeça ano observados no presente estudo. Importante ressaltar que o próprio IPCC menciona que a incerteza nesses valores pode ser elevada (50% de variação).

Tem sido mencionado que a deposição de excretas incrementa as emissões de N₂O devido a intensificação dos processos a mineralização, nitrificação e desnitrificação do nitrogênio (Cai *et al.*, 2017) e que a decomposição da ureia e as proteínas não digeridas presentes nas fezes e urina dos animais são fontes potenciais de NH₃ (Behera *et al.*, 2013). Assim, é esperado que a falta diferenças nas emissões de N₂O e NH₃ entre os tratamentos seja consistente com a similitude entre o nitrogênio excretado pelos animais nas diferentes dietas (Tabela 4.4). As emissões de N₂O aqui observadas estão dentro dos intervalos reportados pelo IPCC (2019a); para ovinos (0,4 – 3,9 g de N₂O por kg de N excretado). Segundo o IPCC (2019a) em média 0,197 kg de NH₃ são volatilizados para cada kg de N depositado na excreta. Os resultados encontrados em esse estudo são menores (0,039 kg de NH₃), porém, a incerteza reportada por essa organização inclui um intervalo de 0 até 0,295 kg de NH₃ por kg de N aplicado no solo.

Normalmente, dietas com maior conteúdo de fibra estrutural (FDA) desaparecem mais lentamente do rúmen o que incrementa o tempo que permanece esse material no rúmen (menor taxa de passagem) reduzindo o consumo de matéria seca do animal dado que a sensação de saciedade física é mais prolongada (Silva, 2006). No presente experimento, apesar de os animais nas dietas com 45%TD apresentaram maior consumo de FDA, consequência da maior proporção no material ofertado, não foram observadas diferenças no consumo de matéria seca nem matéria orgânica nesse tratamento em comparação com os animais alimentados com menos TD. É possível que apesar de ter um maior conteúdo de FDA, o tamanho de partícula da ração ofertada (1 cm) não fosse um impedimento para a retenção do material no rúmen. O tamanho e a densidade de partícula são conhecidos determinantes da taxa de passagem (Church, 1988; S. C. Valadares-Filho & Pina, 2006). Valadares-Filho & Pina (2006) descreveram que a produção de gases das bactérias aderidas às partículas de alimento faz que estas se mantenham flutuantes no líquido ruminal, mas, uma vez a fermentação diminui, consequência da degradação da partícula, a sua densidade específica aumenta, fazendo que o material se coloque nas partes ventrais do rúmen, onde é susceptível aos movimentos ruminais e escape do rúmen. Assim, no presente experimento é possível que o material com um tamanho de partícula pequeno, fracionado durante a mastigação, menos fermentável produto do alto conteúdo de FDA e por tanto com uma maior densidade específica se precipitaria no rúmen perto do orifício reticulo-omasal e escaparia do rúmen mais facilmente aumentando a sua quantidade nas fezes. Isto é consistente com as menores digestibilidades aparentes observadas.

Similar ao encontrado no presente experimento, Mahecha *et al.* (2008); Pazla *et al.* (2021) e Ribeiro *et al.* (2016) não reportaram diferenças no consumo de matéria seca de vacas alimentadas com níveis crescentes de TD e Odedire & Olodi (2014) não reportaram diferenças no consumo de matéria seca produto da inclusão de TD em dietas de cabras. Entretanto, Castañeda-Serrano *et al.* (2018) e Fajemisin *et al.* (2019), reportaram aumentos no consumo de matéria seca em dietas com TD quando comparado contra os controles sem a planta. O conteúdo de FDN na dieta é um fator que define a influência da forrageira sobre o consumo de matéria seca. A inclusão de TD nas dietas usadas por Castañeda-Serrano *et al.* (2018) e Fajemisin *et al.* (2019), diminuiu significativamente o conteúdo de fibra, comparado contra o controle sem TD (559 vs 707 g/kg de FDN no estudo de Castañeda-Serrano *et al.* (2018) e 12.96 vs 25.98% de fibra

crua no estudo de Fajemisin *et al.* (2013). Em contraste, o conteúdo de FDN nas dietas de Mahecha *et al.* (2008); Pazla *et al.* (2021) e Ribeiro *et al.* (2016) não diferiram significativamente dos seus respectivos controles.

A falta de influência da TD no balanço de nitrogênio é consistente com a falta de diferenças no consumo e digestibilidade aparente da proteína. A proteína, foi o único nutriente que não se viu alterado na sua digestibilidade aparente em relação ao aumento da TD e do consumo de FDA. Entretanto, diferente do achado no presente estudo, Castañeda-Serrano *et al.* (2018), Chacón Góngora (2018), Durango *et al.* (2021), Ramírez-Rivera *et al.* (2010) e Yousuf *et al.* (2014) reportaram menor excreção fecal de nitrogênio produto da inclusão de TD nas dietas. Durango *et al.* (2021) e Porsavady *et al.* (2016) mencionaram que a diminuição na quantidade de nitrogênio excretada nas fezes (em relação a suas dietas controle) era devida a uma maior de digestibilidade intestinal dos aminoácidos e maior solubilidade ruminal da proteína.

A aparente falta de relação entre o conteúdo de FDA e o consumo e digestibilidade da proteína obtidos no presente estudo, pode estar relacionado as diferenças nas sub-frações proteicas que compõem as dietas. A proteína bruta contida nos alimentos pode ser dividida de acordo com a sua degradabilidade ruminal, nas sub-frações A, B e C. A fração A é 100% degradável, a fração B tem degradabilidade variável (B1 = 120 – 400%/h; B2 = 3 a 16%/h e B3 = 0,06 a 0,55%/h) e a fração C não é degradável no rúmen nem no intestino (Krishnamoorthy *et al.*, 1982; Licitra *et al.*, 1996; Santos, 2006).

Se assumimos que com a inclusão de TD na dieta, só a fração B da proteína das dietas aumentou, que a fração C se manteve relativamente similar e que a fração A diminuiu, isto seria consistente com a quantidade de nitrogênio nas fezes sem diferenças significativas entre os animais alimentados com as distintas dietas. Isto seria também consistente com a maior concentração de N-NH₃ nas dietas sem inclusão de TD. A maior quantidade de NNP (fração A) nas dietas sem TD seria degradada rapidamente em N-NH₃ (Church, 1979), uma parte escaparia do rúmen e terminaria como ureia na urina (McDonald *et al.*, 2011; Santos, 2006). Isto não coincide com o conteúdo de N na urina, que apesar de ser numericamente superior nas dietas sem TD, não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($P > 0,05$). A maior proporção de proteína potencialmente degradável (fração B1, B2) nas dietas com maior inclusão de TD é consistente com o aumento na quantidade de iso-ácidos (iso-valérico e iso-butírico) nas dietas ($p < 0,05$). Já foi mencionado como os isoácidos são produto da degradação dos

aminoácidos e são fonte de substrato para a síntese de proteína microbiana (Andries *et al.*, 1987; Slyter *et al.*, 1979). Se este for o caso, ou seja, se houve uma mudança nas sub-frações proteicas entre as dietas, isto também ajudaria a explicar porque no experimento *in vitro*, a degradabilidade da matéria orgânica aumentou nas dietas com o maior conteúdo de FDA e porque a produção de gases não foi alterada. Porque não eram os carboidratos que estavam sendo degradados no início das fermentações e sim a proteína que produz menos gás (Getachew *et al.*, 1998).

Isto também é consistente com os resultados mostrados no experimento *in vitro* onde a degradabilidade do FDN não se correlacionou com a DIVMO (Fig. 3.3). A informação sobre o fracionamento proteico de TD na literatura é escassa. Mahecha & Rosales (2005) mencionaram que o 71% do nitrogênio da TD era proteína verdadeira (B) e que 17,3 % correspondia a fração associada a fibra indigestível (C). Em comparação, os valores reportados nas tabelas CQBAL (S. Valadares-Filho *et al.*, 2018) para a fração A, B e C do feno de Tifton 85, estão em média de 23, 64 e 15%, respectivamente.

Entretanto, os resultados aqui obtidos permanecem meramente especulativos dado que não foi possível obter dados sobre o fracionamento proteico das dietas ou da síntese de proteína microbiana dos animais.

4.4.1 Perfis temporais de emissão de gases

As referências na literatura sobre a avaliação de perfis temporais de emissão de gases de animais são escassas, e usualmente são de natureza exploratória e não comparativa (Curial *et al.*, 2007; Dumortier *et al.*, 2013, 2017; van der Weerden *et al.*, 2014). Isto dificulta a comparação dos resultados deste estudo com os encontrados na literatura. Griffith *et al.* (2008) e Leytem *et al.* (2011) usando técnicas micro meteorológicas para mensuração de emissões a campo, reportaram perfis de produção de CH₄ e de CO₂, com variações diurnas e noturnas similares aos encontrados no presente estudo. Leytem *et al.* (2011) associaram as variações diurnas a interferências do vento e temperatura durante as medições a ao comportamento dos animais, mais ativos durante o período diurno. No presente estudo é pouco provável que as condições de vento e temperatura influenciaram de maneira significativa as emissões de CO₂ e CH₄ dado que os animais se encontravam alojados em câmaras de respiração; entretanto, é provável variações entre os tratamentos estejam associadas ao comportamento natural dos animais

durante o dia e ao período durante o qual a alimentação foi fornecida que pode gerar excitação nos animais, aumento na frequência respiratória e assim maiores emissões de CO₂ e CH₄. Isto, pode ser evidenciado pela maior variabilidade nas emissões de previa e durante os horários de alimentação (Fig. 4.1 e 4.2.)

Por outro lado, os perfis de emissão de NH₃ reportados por Leytem *et al.* (2011) também apresentam um padrão diurno e noturno enquanto os resultados do presente estudo não. Flesch *et al.* (2009), usando métodos micro-meteorológicos destacaram que as emissões de NH₃ durante o dia eram três vezes maiores do que durante a noite e justificaram também baseados nas alterações diárias nas condições micro-meteorológicas. Leytem *et al.* (2011) por outro lado justifica essas variações mencionando de novo o comportamento animal; durante o dia os atos de defecar e urinar aumentam as emissões. Leytem *et al.* (2011), similar ao encontrado nesse estudo, não reportou padrões diurnos de emissão de N₂O, e argumentou que os animais não são fonte desse gás. Porém, no presente estudo, se bem as emissões de N₂O observadas durante o primeiro dia são próximas as mensurados no branco e ambiente (Fig 4.3), durante o segundo dia as emissões foram visualmente superiores. Um comportamento similar do N₂O foi também observado por Parker *et al.* (2018) nos primeiros dois dias de avaliação em câmaras de respiração, com emissões de N₂O baixas no primeiro dia seguidas de emissões mais altas no segundo dia. Esses autores se propuseram avaliar as emissões entéricas de N₂O, e utilizaram equipamentos para evitar que as fezes e urina do animal influenciaram os resultados, porém, teorizaram que maiores emissões eram devidas a pequenas, mas ainda mensuráveis quantidades de N₂O provindas das fezes e urina. Contudo, os resultados aqui obtidos para os perfis de emissão de N₂O e NH₃, são inconclusos, dada que não é possível saber com certeza se as emissões continuariam aumentando em períodos mais prolongados de avaliação ou se se estabilizariam ou reduziriam.

4.5 Conclusão

Conclui-se que a substituição de feno de tifton por feno *Tithonia diversifolia* em dietas com concentrado a base de soja e milho, não tem influência sobre as emissões de CO₂, CH₄, N₂O e NH₃ de ovinos adultos.

O alto conteúdo de fibra estrutural na TD influencia de maneira negativa a digestibilidade da matéria seca e não teve efeitos sobre a digestibilidade da proteína.

5 CONSIDERAÇÕES E IMPLICAÇÕES

5.1.1 *in vitro* vs *in vivo*

Em termos gerais, o experimento *in vivo* permitiu corroborar alguns dos achados do experimento *in vitro* (Tabela 4.9). A maioria das relações estatisticamente significativas teve uma correlação moderada; com os coeficientes de correlação mais altos observados em A:P (0,64), NNH₃ (0,60) e Isobutirato (0,60). Butirato, AGCC, valerato e isovalerato apresentaram correlações não significativas com baixos coeficientes de determinação (0,4; 0,1; 0,2 e 0,4 respectivamente).

De maneira similar ao encontrado no resultado *in vitro*, houve um leve aumento na concentração de iso-ácidos (isobutirato) e uma redução no nitrogênio amoniacal no líquido ruminal, produto da inclusão de TD nas dietas. Em ambos os experimentos a dieta com 45%TD apresentou as maiores diferenças. Os isoácidos e o N-NH₃ são produtos da degradação ruminal da proteína, e também usados como substrato para a síntese de proteína bacteriana (Andries *et al.*, 1987; Santos, 2006; Slyter *et al.*, 1979). O que sugere que a TD tem um potencial em termos de incremento da eficiência microbiana.

A degradabilidade *in vitro* da matéria orgânica (24h) e a digestibilidade aparente da matéria orgânica apresentaram resultados contraditórios. No estudo *in vitro* não houve diferenças, e no estudo *in vivo* foi observada uma redução associada o aumento de TD na dieta, como foi explorado na seção anterior essas diferenças *in vivo* poderiam estar explicadas pela influência da taxa de passagem, do tamanho e a densidade específica de partículas de alimento; fatores que não são relevantes durante a avaliação *in vitro*.

Em ambos os experimentos a produção de metano não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, e quando expressos em mL de CH₄ por grama de matéria orgânica incubada e ingerida (*in vitro* vs *in vivo*, respectivamente) não foi observada uma correlação significativa ($p = 0,1795$; $R = 0,30$). Porém, quando a produção de metano foi expressa por grama de matéria orgânica degradada (*in vitro*) e digerida (*in vivo*) os resultados da correlação revelaram um coeficiente de correlação de 0,57. Contudo, o poder preditivo da emissão de metano *in vivo* a partir do ensaio *in vitro* foi baixo ($R^2 = 0,31$); para cada mL de CH₄ produzido *in vitro* (por g de MO degradada) são produzidos 3,04 mL de CH₄ *in vivo* (por g de MO aparentemente digerida), mas, existem 5,23 mL de metano que não são explicados pela produção *in vitro* (Fig.4.6). É provável que a discrepâncias entre os experimentos se devam a influência da dinâmica fermentativa

in vivo (taxa de passagem, absorção na parede ruminal). Hatew *et al.* (2015) obtiveram resultados similares, onde a produção de metano *in vitro* não correlacionou-se com a emissão *in vivo* (quando expressa por unidade de MO ingerida), e argumentaram que a digestão da matéria orgânica *in vivo* inclui os efeitos da fermentação ruminal e intestinal e a produção *in vitro* não leva em conta essa última, também mencionou que o fluxo de material fora do rúmen, mudanças no pH e na capacidade de tamponamento ruminal podem ter influenciado as inconsistências entre os dois métodos.

Tabela 4.8. Correlação entre os parâmetros da fermentação *in vivo* e os parâmetros da fermentação *in vitro* a 24 horas de incubação

Resposta	r	p-valor
Metano ^a	0,57	0,0249
Acetato	0,58	0,0188
Propionato	0,57	0,0218
Butirato	0,10	0,7031
Iso-Butirato	0,60	0,0143
Iso-Valerato	0,41	0,1173
Valerato	0,21	0,4397
AGCC	0,41	0,1155
AP	0,64	0,0076
NNH ₃	0,60	0,0144
Protozoários	0,47	0,0654

^aMetano correlacionado: mL/g MO degradada (*in vitro*) vs mL/g de MO digerida (*in vivo*); AGCC = Ácidos graxos de cadeia curta; AP = Proporção acetato:propionato; r = Coeficiente de correlação de Pearson; p-Valor= p-Valor da correlação

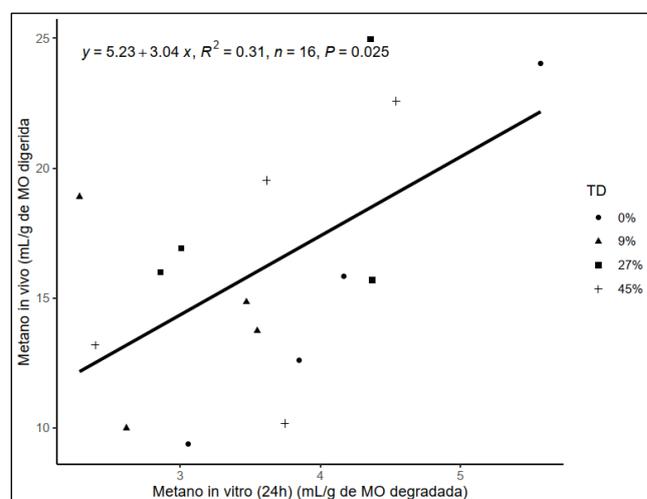
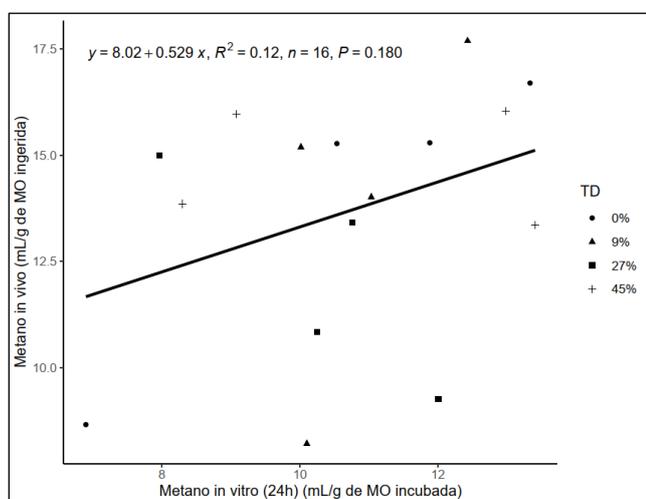


Fig. 4.5. Relação entre metano produzido *in vitro* à 24 h (mL/g MO incubada) e *in vivo* (mL/g MO ingerida).

Fig. 4.6 Relação entre metano produzido *in vitro* à 24 h (mL/g MO degradada) e *in vivo* (mL/g MO digerida).

As inclusões de *Tithonia diversifolia* utilizada no presente estudo demonstraram não ter influência sobre as emissões de metano *in vitro* nem as emissões de metano, dióxido de carbono, óxido nítrico e amônia *in vivo* de carneiros adultos.

A inclusão da planta demonstrou ter influência positiva sobre síntese de proteína microbiana *in vitro* que parece também estar presente no estudo *in vivo*. A exploração de estudos sobre a degradabilidade da proteína e síntese de proteína microbiana *in vivo*, acompanhados da utilização de material vegetal de melhor qualidade ajudariam a corroborar alguns dos resultados aqui obtidos.

Há necessidade pela avaliação de alimentos não convencionais que consigam ser utilizados na alimentação animal, permitam reduzir o impacto ambiental do sector sem sacrificar a produtividade. Nesse contexto, é claro que as técnicas *in vitro* são ainda uma ferramenta relevante que permitem obter informações valiosas (a um baixo custo) sobre os alimentos avaliados.

A avaliação de emissões em câmaras de respiração permite avaliar parcialmente o potencial impacto ambiental de diferentes alternativas alimentares, entretanto é importante entender que são uma aproximação da realidade e os animais a campo poderiam se comportar de maneira diferente.

5.2 REFERÊNCIAS

- Abdalla, A. L., Louvandini, H., Sallam, S. M. A. H., da Bueno, I. C. S., Tsai, S. M., & de Figueira, A. V. O. (2012). *In vitro* evaluation, *in vivo* quantification, and microbial diversity studies of nutritional strategies for reducing enteric methane production. *Tropical Animal Health and Production*, 44(5), 953–964. <https://doi.org/10.1007/s11250-011-9992-0>
- Andries, J. I., Buysse, F. X., de Brabander, D. L., & Cottyn, B. G. (1987). Isoacids in ruminant nutrition: Their role in ruminal and intermediary metabolism and possible influences on performances — A review. *Animal Feed Science and Technology*, 18(3), 169–180. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(87\)90069-1](https://doi.org/10.1016/0377-8401(87)90069-1)
- AOAC. (2011). Official methods of analysis of AOAC International. In *W. Horwitz & G. W. Latimer (Eds.), 18th ed. (.).*
- Behera, S. N., Sharma, M., Aneja, V. P., & Balasubramanian, R. (2013). Ammonia in the atmosphere: a review on emission sources, atmospheric chemistry and deposition on terrestrial bodies. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(11), 8092–8131. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2051-9>

- Cai, Y., Chang, S. X., & Cheng, Y. (2017). Greenhouse gas emissions from excreta patches of grazing animals and their mitigation strategies. In *Earth-Science Reviews* (Vol. 171, pp. 44–57). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2017.05.013>
- Castañeda-Serrano, R. D., Piñeros-Varón, R., & Vélez-Giraldo, A. (2018). Foliage of tropical arboreal species in feeding ovines (*Ovis Aries*): Intake, digestibility and balance nitrogen. *Boletín Científico Del Centro de Museos*, 22(1), 58–68. <https://doi.org/10.17151/bccm.2018.22.1.4>
- Chacón Góngora, P. A. (2018). Uso de *Tithonia diversifolia* como forraje alternativo para la reducción de emisiones de óxido nitroso en excretas de vacas. In *Dissertação (Mestrado em Agroforesteria y Agricultura)* (p. 69). Turrialba, Costa Rica.
- Church, D. C. (1979). *The Ruminant Animal. Digestive Physiology and Nutrition* (D. C. Church, Ed.; 2nd ed.). Prentice Hall.
- Church, D. C. (1988). *The Ruminant Animal* (D. C. Church, Ed.; 2nd ed.). Prentice Hall.
- Curial, S., Overbeke, P., Brusselman, E., Demeyer, P., Goossens, K., Vandaele, L., Vangeyte, J., & Campeneere, S. (2007). Assessing ammonia reducing techniques in beef cattle by the use of an emission barn. *Emissions of Gas and Dust from Livestock*.
- Danielsson, R., Ramin, M., Bertilsson, J., Lund, P., & Huhtanen, P. (2017). Evaluation of a gas in vitro system for predicting methane production in vivo. *Journal of Dairy Science*, 100(11), 8881–8894. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12675>
- Dehority, B. A. (1993). *Laboratory Manual for Classification and Morphology of Rumen Ciliate Protozoa*. CRC Press, Inc. <https://doi.org/10.1201/9781351073912>
- Dijkstra, J., Kebreab, E., Bannink, A., France, J., & López, S. (2005). Application of the gas production technique to feed evaluation systems for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124 Pa, 561–578. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.04.048>
- Dumortier, P., Aubinet, M., Beckers, Y., Chopin, H., Debaq, A., Gourlez de la Motte, L., Jérôme, E., Wilmus, F., & Heinesch, B. (2017). Methane balance of an intensively grazed pasture and estimation of the enteric methane emissions from cattle. *Agricultural and Forest Meteorology*, 232, 527–535. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2016.09.010>
- Dumortier, P., Aubinet, M., Chopin, H., Debaq, A., Jérôme, E., Beckers, Y., & Heinesch, B. (2013). Initiation of methane turbulent flux measurements over a grazed grassland in Belgium. In *Geophysical Research Abstracts* (Vol. 15).
- Durango, S. G., Barahona, R., Bolívar, D., Chirinda, N., & Arango, J. (2021). Feeding Strategies to Increase Nitrogen Retention and Improve Rumen Fermentation and Rumen Microbial Population in Beef Steers Fed with Tropical Forages. *Sustainability*, 13(18), 10312. <https://doi.org/10.3390/su131810312>
- Fajemisin, A. N., Salihu, T., Fadiyimu, A., & Alokun, A. (2013). Dietary effect of substituting *Panicum maximum* with *Tithonia diversifolia* forage on performance of Yankasa sheep. In D. L. Michalk, G. D. Millar, W. B. Badgery, & K. M. Broadfoot

- (Eds.), *XXII International Grassland Congress* (pp. 563–564). New South Wales Department of Primary Industry. <https://uknowledge.uky.edu/igc/22/1-8/10>
- Flesch, T. K., Harper, L. A., Desjardins, R. L., Gao, Z., & Crenna, B. P. (2009). Multi-Source emission determination using an inverse-dispersion technique. *Boundary-Layer Meteorology*, *132*(1), 11–30. <https://doi.org/10.1007/s10546-009-9387-1>
- Getachew, G., Blummel, M., Makkar, H. P. S. S., Becker, K., Blümmel, M., Makkar, H. P. S. S., & Becker, K. (1998). In vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: A review. *Animal Feed Science and Technology*, *72*(3–4), 261–281. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(97\)00189-2](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(97)00189-2)
- Goçmen, B., Dehority, B. A., Talu, G. H., & Rastgeldy, S. (2001). *The Rumen Ciliate Fauna of Domestic Sheep*. *4*, 455–459.
- Greening, C., Geier, R., Wang, C., Woods, L. C., Morales, S. E., McDonald, M. J., Rushton-Green, R., Morgan, X. C., Koike, S., Leahy, S. C., Kelly, W. J., Cann, I., Attwood, G. T., Cook, G. M., & Mackie, R. I. (2019). Diverse hydrogen production and consumption pathways influence methane production in ruminants. *ISME Journal*, *13*(10), 2617–2632. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0464-2>
- Griffith, D. W. T., Bryant, G. R., Hsu, D., & Reisinger, A. R. (2008). Methane emissions from free-ranging cattle: Comparison of tracer and integrated horizontal flux techniques. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, *48*(1–2). <https://doi.org/10.2134/jeq2006.0426>
- Hatew, B., Cone, J. W., Pellikaan, W. F., Podesta, S. C., Bannink, A., Hendriks, W. H., & Dijkstra, J. (2015). Relationship between in vitro and in vivo methane production measured simultaneously with different dietary starch sources and starch levels in dairy cattle. *Animal Feed Science and Technology*, *202*, 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.01.012>
- Herrero, M., Havlík, P., Valin, H., Notenbaert, A., Rufino, M. C., Thornton, P. K., Blümmel, M., Weiss, F., Grace, D., & Obersteiner, M. (2013). Biomass use, production, feed efficiencies, and greenhouse gas emissions from global livestock systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(52), 20888–20893. <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.1308149110>
- Herrero, M., Henderson, B., Havlík, P., Thornton, P. K., Conant, R. T., Smith, P., Wiersenius, S., Hristov, A. N., Gerber, P., Gill, M., Butterbach-Bahl, K., Valin, H., Garnett, T., & Stehfest, E. (2016). Greenhouse gas mitigation potentials in the livestock sector. *Nature Climate Change*, *6*(5), 452–461. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nclimate2925>
- Hothorn, T., Bretz, F., & Westfall, P. (2008). Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biometrical Journal*, *50*(3), 346–363. <https://doi.org/10.1002/bimj.200810425>
- IPCC. (2019a). *2019 Refinement to the 2006 IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories. Vol 4. Chapter 11: Vol. Volume 4* (E. Calvo Buendia, K. Tanabe,

- A. Kranjc, J. Baasansuren, M. Fukuda, S. Ngarize, A. Osako, Y. Pyrozhenko, P. Shermanau, & S. Federici, Eds.). IPCC.
- IPCC. (2019b). *2019 Refinement to the 2006 IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories.: Vol. Volume 4* (E. Calvo Buendia, K. Tanabe, A. Kranjc, J. Baasansuren, M. Fukuda, S. Ngarize, A. Osako, Y. Pyrozhenko, P. Shermanau, & S. Federici, Eds.). IPCC.
- IPCC. (2019c). *Climate Change and Land: An IPCC Special Report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems*. In P. R. Shukla, J. Skea, E. C. Buendia, V. Masson-Delmotte, H.-O. Pörtner, D. C. Roberts, P. Zhai, R. Slade, S. Connors, R. van Diemen, M. Ferrat, E. Haughey, S. Luz, S. Neogi, M. Pathak, J. Petzold, J. P. Pereira, P. Vyas, E. Huntley, ... J. Malley (Eds.), *IPCC*. www.ipcc.ch
- Krey, V., Masera, O., Blanford, G., Bruckner, T., Cooke, R., Fisher-Vanden, K., Haberl, H., Hertwich, E., Kriegler, E., Mueller, D., Paltsev, S., Price, L., Schlömer, S., Ürges-Vorsatz, D., van Vuuren, D., & Zwickel, T. (2014). Annex II: Metrics & Methodology. In O. Edenhofer, R. Pichs-Madruga, Y. Sokona, E. Farahani, S. Kadner, K. Seyboth, A. Adler, I. Baum, S. Brunner, P. Eickemeier, B. Kriemann, J. Savolainen, S. Schlömer, C. von Stechow, T. Zwickel, & J. C. Minx (Eds.), *Climate Change 2014: Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press.
- Krishnamoorthy, U., Muscato, T. v., Sniffen, C. J., & van Soest, P. J. (1982). Nitrogen Fractions in Selected Feedstuffs. *Journal of Dairy Science*, *65*(2), 217–225. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(82\)82180-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82180-2)
- Kuznetsova, A., Brockhoff, P. B., & Christensen, R. H. B. (2017). lmerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models. *Journal of Statistical Software*, *82*(13), 1–26. <https://doi.org/10.18637/jss.v082.i13>
- Lenth, R. v. (2021). *emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means* (R package version 1.6.0). <https://cran.r-project.org/package=emmeans>
- Leytem, A. B., Dungan, R. S., Bjerneberg, D. L., & Koehn, A. C. (2011). Emissions of Ammonia, Methane, Carbon Dioxide, and Nitrous Oxide from Dairy Cattle Housing and Manure Management Systems. *Journal of Environmental Quality*, *40*(5), 1383–1394. <https://doi.org/10.2134/jeq2009.0515>
- Licitra, G., Hernandez, T. M., & van Soest, P. J. (1996). Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. In *Animal Feed Science Technology* (Vol. 57).
- Lima, P. de M. T., Filho, A. L. A., Issakowicz, J., Ieda, E. H., Corrêa, P. S., de Mattos, W. T., Gerdes, L., McManus, C., Abdalla, A. L., & Louvandini, H. (2020). Methane emission, ruminal fermentation parameters and fatty acid profile of meat in Santa Inês lambs fed the legume macrotiloma. *Animal Production Science*, *60*(5), 665. <https://doi.org/10.1071/AN19127>

- Lima, P. M. T., Moreira, G. D., Sakita, G. Z., Natel, A. S., Mattos, W. T., Gimenes, F. M. A., Gerdes, L., McManus, C., Abdalla, A. L., & Louvandini, H. (2018). Nutritional evaluation of the legume *Macrotyloma axillare* using in vitro and in vivo bioassays in sheep. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *102*(2), e669–e676. <https://doi.org/10.1111/jpn.12810>
- Mahecha, L., Escobar, J. P., Suarez, J. F., & Restrepo, L. F. (2008). Evaluación del Uso de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray ASTERACEAE, como Suplemento Forrajero de Vacas Cruzadas. In E. Murgueitio, C. A. Cuartas, & J. F. Naranjo (Eds.), *Ganadería del futuro: Investigación para el desarrollo* (p. 490). CIPAV.
- Mahecha, L., & Rosales, M. (2005). Valor nutricional del follaje de Botón de Oro (*Tithonia diversifolia* [Hemsl.] Gray), en la producción animal en el trópico. *Livestock Research For Rural Development*, *17*(9).
- Makkar, H. P. S. (2004). Recent advances in the in vitro gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources. *Assessing Quality and Safety of Animal Feeds*, 55–88.
- MAPA. (2020). *Coletânea de fatores de emissão e remoção de gases de efeito estufa da pecuária brasileira* (E. D. Sotta, F. G. Sampaio, & M. S. N. Costa, Eds.). MAPA/SENAR.
- McDonald, P., Edwards, R. A., Greenhalgh, J. F. D., Morgan, C. A., Sinclair, L. A., & Wilkinson, R. G. (2011). *Animal Nutrition* (7th ed.). Prentice Hall/Pearson.
- National Research Council. (2007). *Nutrient Requirements of Small Ruminants*. National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/11654>
- Odedire, J. A., & Oloidi, F. F. (2014). Feeding Wild Sunflower (*Tithonia Diversifolia* Hemsl., A. Gray) to West African Dwarf Goats as a Dry Season Forage Supplement. *World Journal of Agricultural Research*, *2*(6), 280–284. <https://doi.org/10.12691/wjar-2-6-6>
- Ogimoto, K., & Imai, S. (1981). *Atlas of rumen microbiology*. Japan Scientific Societies Press. <https://books.google.com.br/books?id=JlsTAQAAMAAJ>
- Parker, D. B., Meyer, B., Jennings, T., Jennings, J., Dougherty, H., Cole, N. A., & Casey, K. (2018). Enteric nitrous oxide emissions from beef cattle. *The Professional Animal Scientist*, *34*(6), 594–607. <https://doi.org/10.15232/pas.2018-01769>
- Pazla, R., Adrizal, A., & Sriagtula, R. (2021). Intake, Nutrient Digestibility and Production Performance of Pesisir Cattle Fed *Tithonia diversifolia* and *Calliandra calothyrsus*-Based Rations with Different Protein and Energy Ratios. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, *9*(10), 527–534. <https://doi.org/10.17582/journal.aavs/2021/9.10.1608.1615>
- Porsavady, P., Preston, T. R., & Leng, R. A. (2016). Effect on feed intake, digestibility, N retention and methane emissions in goats of supplementing foliages of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and *Tithonia diversifolia* with water spinach (*Ipomoea aquatica*). *Livestock Research for Rural Development*, 28. <http://lrrd.cipav.org.co/lrrd28/5/phon28072.html>

- R Core Team. (2021). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>
- Ramírez-Rivera, U., Sanginés-García, J. R., Escobedo-Mex, J. G., Cen-Chuc, F., Rivera-Lorca, J. A., & Lara-Lara, P. E. (2010). Effect of diet inclusion of *Tithonia diversifolia* on feed intake, digestibility and nitrogen balance in tropical sheep. *Agroforestry Systems*, *80*(2), 295–302. <https://doi.org/10.1007/s10457-010-9320-0>
- Ribeiro, R. S., Terry, S. A., Sacramento, J. P., Silveira, S. R. E., Bento, C. B. P., da Silva, E. F., Mantovani, H. C., da Gama, M. A. S., Pereira, L. G. R., Tomich, T. R., Maurício, R. M., Chaves, A. V., Gama, M. A. S. da, Pereira, L. G. R., Tomich, T. R., Maurício, R. M., & Chaves, A. V. (2016). *Tithonia diversifolia* as a supplementary feed for dairy cows. *PLoS ONE*, *11*(12), e0165751. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165751>
- Rymer, C., Huntington, J. A., Williams, B. A., & Givens, D. I. (2005). In vitro cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Animal Feed Science and Technology*, *123-124* Pa, 9–30. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.04.055>
- Santos, F. A. P. (2006). Metabolismo de Proteínas. In T. Berchielli, A. Pires, & S. Oliveira (Eds.), *Nutrição de Ruminantes*. Funep.
- Silva, J. F. C. (2006). Mecanismos reguladores de consumo. In T. T. Berchielli, A. v Pires, & S. G. Oliveira (Eds.), *Nutrição de Ruminantes*. Funep.
- Slyter, L. L., Satter, L. D., & Dinius, D. A. (1979). Effect of Ruminant Ammonia Concentration on Nitrogen Utilization by Steers. *Journal of Animal Science*, *48*(4), 906–912. <https://doi.org/10.2527/jas1979.484906x>
- Sniffen, C. J., O'Connor, J. D., Van Soest, P. J., Fox, D. G., & Russell, J. B. (1992). A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *Journal of Animal Science*, *70*(11), 3562–3577. <https://doi.org/10.2527/1992.70113562x>
- Valadares-Filho, S. C., & Pina, D. S. (2006). Fermentação Ruminal. In T. T. Berchielli, A. Pires, & S. Oliveira (Eds.), *Nutrição de Ruminantes*. Funep.
- Valadares-Filho, S., Lopes, S., Silva, B., Chizzoti, M., & Bissaro, L. (2018). *CQBAL 4.0. Tabelas Brasileiras de Composição de Alimentos para Ruminantes*. CQBAL 4.0. <https://cqbal.com.br/#!/>
- van der Weerden, T. J., Manderson, A., Kelliher, F. M., & de Klein, C. A. M. (2014). Spatial and temporal nitrous oxide emissions from dairy cattle urine deposited onto grazed pastures across New Zealand based on soil water balance modelling. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *189*, 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2014.03.018>
- Wickham, H. (2016). *ggplot2*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4>

Yousuf, M. B., Adeloje, A. A., Okukpe, K. M., Adeyemi, K. D., & Ogundun, N. J. (2014). Influence of dietary sunflower (*Tithonia Diversifolia*) leaf extracts on performance characteristics of goats fed cassava peeling wastes-based diet. *Journal of Agricultural Technology*, *10*(1), 59–65.

