

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ENERGY PARTITION AND NITROGEN UTILIZATION BY
GROWING GOATS FED ENCAPSULATED CALCIUM
NITRATE**

Raiza Felismino Silveira

Animal Scientist

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ENERGY PARTITION AND NITROGEN UTILIZATION BY
GROWING GOATS FED ENCAPSULATED CALCIUM
NITRATE**

Raiza Felismino Silveira

Advisor: Prof. Dr. Kleber Tomás de Resende

Co-advisor: Dra. Márcia Helena Machado da Rocha Fernandes

**Thesis submitted to the Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp
Jaboticabal, as part of the requirements for
obtaining the Master degree in Animal
Science**

2017

Silveira, Raiza Felismino
S587e Energy partition and nitrogen utilization by growing goats fed
encapsulated calcium nitrate / Raiza Felismino Silveira. --
Jaboticabal, 2017
xvii, 56 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientador: Kléber Tomás de Resende
Coorientadora: Márcia Helena Machado da Rocha Fernandes
Banca examinadora: Rafael Canonenco de Araújo, Carla Härter
Bibliografia

1. Calorimetria indireta. 2. Digestibilidade. 3. Gases de efeito
estufa. 4. Respirometria. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.084.5:636.3

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ENERGY PARTITION AND NITROGEN UTILIZATION BY GROWING GOATS FED ENCAPSULATED CALCIUM NITRATE


AUTORA: RAIZA FELISMINO SILVEIRA

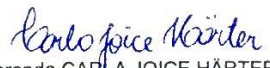
ORIENTADOR: KLEBER TOMAS DE RESENDE

COORIENTADORA: MARCIA HELENA MACHADO DA ROCHA FERNANDES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em ZOOTECNIA, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. MARCIA HELENA MACHADO DA ROCHA FERNANDES
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Pesquisador Dr. RAFAEL CANONENCO DE ARAÚJO
Divisão de Ruminantes / GRASP - Curitiba/PR


Pós-doutoranda CARLA JOICE HÄRTER
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 03 de julho de 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RAIZA FELISMINO SILVEIRA – Filha de Francisco Carlos da Silveira e Edilene Felismino Silveira, nascida em Fortaleza, Ceará, em 28 de março de 1993. Em agosto de 2010, iniciou o Curso de Graduação em Zootecnia na Universidade Federal do Ceará - UFC onde obteve o título de bacharel em Zootecnia em dezembro de 2014. Em fevereiro de 2015, ingressou no Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Unesp / FCAV), Jaboticabal - SP, sob a orientação do Prof. Dr. Kleber Tomás de Resende e coorientação da Dra. Márcia Helena Machado da Rocha Fernandes finalizando o mesmo em julho de 2017.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser mas, graças a Deus, não sou o que era antes.”
Martin Luther King

DEDICATÓRIA

À minha mãe Edilene Felismino Silveira e ao meu pai Francisco Carlos da Silveira por serem tudo que há de mais importante na minha vida e por sempre me apoiarem nas minhas escolhas.

Ao meu irmão Osmar por conseguir vencer comigo as barreiras físicas e manter uma convivência virtual muito forte.

Aos meus lindos sobrinhos Juan e Mirian: vocês são a luz da minha vida.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente, por me dar o dom da vida e renovar minhas esperanças mesmo nos dias difíceis. “Deem graças em todas as circunstâncias, pois esta é a vontade de Deus para vocês em Cristo Jesus” 1 Tessalonicences 5:18.

Aos meus pais, Carlos e Edilene e ao meu querido irmão, Osmar, que souberam entender minha ausência durante esses anos e nunca me cobraram por isso, pelo contrário, sempre foram amorosos e confiantes, muitas vezes mais do que eu mesmo, sempre torceram por mim e me amaram incondicionalmente. Agradeço também aos meus sobrinhos, Juan e Mirian, pequenas luzes da minha vida, que me ensinaram um amor puro do qual eu jamais havia experimentado. Mesmo estando sempre tão distante, eu amo vocês com todo meu coração. Essa conquista foi para vocês. “A vida de quem inventa de voar é paradoxal, todo dia. É o peito eternamente dividido. É chorar porque queria estar lá, sem deixar de querer estar aqui. É ver o céu e o inferno na partida, o pesadelo e o sonho na permanência. É se orgulhar da escolha que te ofereceu mil tesouros e se odiar pela mesma escolha que te subtraiu outras mil pedras preciosas.”

Às minhas queridas amigas de casa, Marina, Flávia, Stefany, Maria Clara e Cíntia, por todas as festas, risadas, pelo companheirismo, pela convivência. Vocês são as irmãs que a vida me permitiu escolher. Obrigada Cíntia por me tirar de casa e me levar para as festas quando tudo que eu queria era dormir; foram ótimos nossos momentos juntas. Obrigada Gari, pelas conversas, risadas, troca de experiências, por ser tão meiga e doce (quase). Obrigada Ste pelas conversas sobre livros, séries e pelas indicações; você é um amor (meio desastrada, mas um amor). Obrigada Flavinha por ser uma pessoa tão doce e com quem eu aprendo tanto, sempre disposta a ouvir, aconselhar e sempre tão empenhada em ajudar; você é uma pessoa incrível, linda por dentro e por fora. Um agradecimento especial à Marineth, que foi e é mais do que uma amiga, é uma irmã, companheira, que está pronta pra enfrentar o que der e vier do meu lado. Impossível ficar triste com você por perto, que sempre me arranca risadas nos momentos mais improváveis. Um ser humano que tem um coração gigante, que quase nem cabe dentro do corpo. Sempre pra cima, feliz, alegre, sorridente e, que quando não estava assim, era porque a situação era muito grave. Você ocupa um espaço enorme no meu coração. Aproveito para

agradecer às nossas pestinhas também, Shakira e Clara Maria, por sujarem nossa casa e preencherem nossos corações com tanto amor.

Aos professores e membros da equipe Cabritolândia, que me acompanharam durante o período do mestrado, me orientaram e me passaram ensinamentos que levarei para a vida. Um agradecimento especial ao Bruno, que estava sempre preocupado e disposto a ouvir os problemas e me aconselhar da forma mais racional. Um agradecimento especial à Márcia e Kléber, que me orientaram de forma mais próxima e me mostraram qual caminho seguir. Um agradecimento especial à professora Izabelle que me mostrou a direção em momentos turbulentos. Obrigada Leandro, Marcelo, Anaiane, Julian, Marina, Rebeca, Letícia, Amélia companheiros de sala, de estudo, de dúvidas, de bar, sempre alegres, confiantes e dispostos a ajudar.

Aos meus amigos de graduação, que até hoje divertem meus dias pelo whatsapp, Érica, Gleyson, Walisson, Theyson. Nesse momento eu preciso dedicar um agradecimento especial à minha amiga/prima/irmã Tafnes, um presente que a graduação me trouxe, que me proporcionou tantos momentos divertidos e de risadas sem fim. Eu não pensei que fosse passar um ano inteiro sem que tivéssemos nossa tradicional noite do pijama/fofocas, não pensei que pudéssemos estar mais distantes do que quando eu me mudei para São Paulo. Mas de qualquer forma, nossa amizade nunca ficou abalada pela distância, nada que horas no telefone não conseguissem resolver. Minha saudade de você, da Neném e do Gleyson (que não suportou a saudade e veio me visitar) é diária. E essa conquista eu dedico também a vocês.

A uma amiga muito querida e especial, Kamilla Maciel. Nossa amizade já ultrapassou os 15 anos e eu sei que se perpetuará por toda a vida. Nós, que éramos Batman e Robin na escola, hoje estamos tão distantes. Mas é bom saber que mesmo com toda a distância, você se faz tão presente na minha vida. Minha irmã. Obrigada por tudo.

Ao Lucas Velloso, que esteve comigo durante as análises laboratoriais, sempre me ouvindo reclamar, pois não tinham dado certo e eu teria que repeti-las. Que esteve comigo no momento da minha qualificação, em que eu achei que não suportaria tanta pressão e ansiedade. Que esteve comigo na defesa, onde eu já não

sabia mais de onde tirar forças para continuar a caminhada. Que consegue passar os finais de semana em casa, vendo séries ou filmes comigo e que ainda assim diz que não enjoa da minha cara. Que sempre me surpreende nos momentos mais inesperados. Que é meu amigo, companheiro, meu ombro para chorar quando a saudade de casa aperta o peito e que me faz rir mais do que ninguém mesmo com tanta piada sem graça. Você esteve ao meu lado dizendo que tudo daria certo. Pois deu mesmo. Obrigada por ser você. Obrigada por existir e obrigada por continuar do meu lado mesmo diante as adversidades. Obrigada por ser meu presente.

Aos meus avós, Osmar (*in memorian*), Francisca, Neusa e Estênio, por serem tão maravilhosos e, mesmo que eu passe tanto tempo sem vê-los, o espaço que vocês ocupam no meu coração nunca diminui.

Aos meus tios, Eliane e Garcez, minhas primas Adrielle, Deidy, Brenda, Rayssa e Pedro, por me receberem sempre de braços abertos durante as minhas várias estadias em São Paulo. Vocês são a família mais próxima e é muito bom saber que sou tão amada mesmo estando tão longe da minha casa. Vocês são como meus pais, minha casa longe de casa. Obrigada por tudo.

À UNESP Jaboticabal, que me acolheu e me transmitiu tantos ensinamentos pessoais e profissionais. Ao CNPq e CAPES pela concessão das bolsas durante meu período de mestrado.

Ao Laboratório de Caprinocultura, minha segunda casa durante os oito meses intensos de experimento. Aos cabritinhos que diariamente aprontavam algo diferente e, na maioria das vezes, alegravam meus dias. Aos funcionários Juninho e Carlinhos pela ajuda durante o experimento.

Ao Laboratório de Nutrição Animal, ao Sr. Orlando e Ana Paula pela ajuda durante as análises laboratoriais, pelas dicas e ensinamentos. Ao Laboratório de Forragicultura e ao Abmael pela ajuda com as análises.

A todos que direta ou indiretamente ajudaram na conclusão desse trabalho, muito obrigada.

Sumário

Capítulo 1. Considerações Gerais.....	18
1. Introdução	18
2. Objetivo	19
3. Revisão de Literatura	19
3.1 Utilização de nitrato na alimentação animal	19
3.2 Métodos de estimativa de produção de metano em ruminantes	22
3.3 Calorimetria indireta e produção de calor.....	23
3.4 Partição de energia e oxidação do substrato	25
3.5 Produção de proteína microbiana	27
4. Referências bibliográficas	28
Chapter 2: Energy partition and nitrogen utilization by growing goats fed encapsulated calcium nitrate.....	34
ABSTRACT:	34
Introduction.....	35
Material and methods.....	36
Statistical Analysis.....	41
Results	41
Discussion	45
Conclusions.....	50
References.....	51


CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "**Partição de energia, oxidação do substrato e utilização de nitrogênio por caprinos em crescimento alimentados com nitrato como um substituto do farelo de soja e ureia**", protocolo nº 22774/15, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Marcia Helena Machado da Rocha Fernandes, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 04 de dezembro de 2015.

Vigência do Projeto	01/01/2016 a 03/03/2017
Espécie / Linhagem	Caprinos
Nº de animais	Doze
Peso / Idade	25 KG / 8 meses
Sexo	Machos
Origem	Laboratório de Estudos em Caprinocultura

Jaboticabal, 04 de dezembro de 2015.


Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

Partição de energia e utilização de nitrogênio por caprinos em crescimento alimentados com nitrato de cálcio encapsulado

RESUMO

O nitrato de cálcio encapsulado (NCE) tem sido estudado nos últimos anos como uma fonte de nitrogênio não proteico (NNP) e representa uma alternativa ao uso do hidrogênio livre no ambiente ruminal, reduzindo assim a emissão de metano e possibilitando uma maior eficiência no uso da energia. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o uso do nitrato de cálcio encapsulado como substituto do farelo de soja na partição de energia, oxidação do substrato e síntese de N microbiano. Para isso, doze caprinos machos castrados em crescimento, com peso inicial de 21,95 kg \pm 3,19 kg foram usados em um quadrado latino 3 x 3 quadruplicado com três períodos de 48 dias, agrupados pelo peso corporal e distribuídos aleatoriamente em um dos três tratamentos ECN0(SBM) – controle baseado em farelo de soja; ECN1.25 – 1,25% de NCE na matéria seca; ECN2.5 – 2,5% de NCE na matéria seca. Cada período consistia de 21 dias de adaptação, 5 dias de ensaio de metabolismo e 15 dias de mensuração de gases. Entre os períodos foi feito um *washout* de 7 dias onde todos os animais recebiam a dieta controle. Os dados foram analisados usando o procedimento MIXED do SAS (versão 9.4; SAS Inst., Cary, NC, USA). O modelo usado foi $Y_{jkm} = \mu + LS_i + Period_j + Ani(LS)_{ki} + Treat_m + \epsilon_{ijkm}$. Quando significativo, o efeito de níveis de NCE foi decomposto em dois contrastes polinomiais ortogonais (linear e quadrático). A significância declarada foi de $P < 0,05$. As variáveis de produção de calor (PC) e produção de calor em jejum (PCJ) foram covariadas com a ingestão de energia metabolizável. A PC não foi influenciada pelos tratamentos ($P > 0,05$) e a PCJ mostrou uma redução de aproximadamente 22% ($P < 0,05$) entre o tratamento ECN0(SBM) e ECN2.5. A emissão de metano reduziu 0,21g pra cada grama de nitrato ingerido. A inclusão de aproximadamente 1% de NCE na material seca resultou em um máximo consumo de energia digestível e metabolizável. Além disso, a PCJ foi menor com a inclusão de NCE mostrando um efeito residual em caprinos em crescimento. Não foi observado efeito significativo na síntese de N microbiano.

PALAVRAS-CHAVE: calorimetria indireta, digestibilidade, gases de efeito estufa, respirometria

Energy partition and nitrogen utilization by growing goats fed encapsulated calcium nitrate

ABSTRACT:

Encapsulated calcium nitrate (ECN) has been studied in last years as a source of non-protein nitrogen (NPN) and represents an alternative to use of free hydrogen in the ruminal environment, thus reducing the emission of methane and a higher efficiency in use of energy. Thus the aim of this study was to assess the impact of the use of encapsulated calcium nitrate as a substitute for soybean meal in the energy partition, substrate oxidation, and microbial N synthesis. For this, twelve castrated male growing goats, with initial average weight of 21.95 kg \pm 3.19 kg were used in a quadruplicated 3 x 3 Latin square design with three 48-d periods, grouped by body weight (BW) and randomly assigned to three diets: ECN0(SBM) – control based on soybean meal; ECN1.25 - 1.25% of encapsulated calcium nitrate (ECN) on dry matter (DM) basis; ECN2.5 - 2.5% of ECN on DM basis. Each period comprised 21 days for adaptation, five days for metabolism trial (d22 to d26) and 15 days for gas measurements (d27 to d38). Between periods, a washout period was provided for 7 d during which the control diet was fed. The data were analyzed using MIXED procedure of SAS (version 9.4; SAS Inst., Cary, NC, USA). The model used for each treatment was the following: $Y_{ijkm}: \mu + LS_i + Period_j + Ani(LS)_{ki} + Treat_m + \epsilon_{ijkm}$. When significant, the effect of levels of ECN was decomposed into two orthogonal polynomial contrasts (linear and quadratic). Significance was declared at $P < 0.05$. The heat production (HP) and fast heat production (FHP) were covariated with the metabolizable energy intake. The HP was not influenced by treatments ($P > 0.05$) and FHP showed a reduction of approximately 22% ($P < 0.05$) between ECN0(SBM) and ECN2.5. The emission of methane reduced 0.21 g for each g of nitrate intake. The inclusion of approximately 1% of ECN on DM results in a maximum DE and ME intake. Also the FHP is lower with ECN inclusion showing a residual effect on growing goats. No effect is observed in MicN synthesis.

KEYWORDS: digestibility, greenhouse gas, indirect calorimetry, respirometry

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Table 1. Feed ingredients and chemical composition of experimental diets.....	36
Table 2. Blood effects of encapsulated calcium nitrate	41
Table 3. Effects of encapsulated calcium nitrate (ECN) on intake and total-tract apparent digestibility in growing goats.....	42
Table 4. Effects of encapsulated calcium nitrate (ECN) on N digestibility and N utilization in growing goats	43
Table 5. Effects of ECN on enteric CH ₄ emissions and CH ₄ emission per kilogram of DMI in growing goats.....	43
Table 6. Effects of ECN on energy balance in growing goats	44
Table 7. Oxidation of protein, carbohydrate and fat and non-protein respiratory quotient of growing goats	45

LISTA DE ABREVIATURAS

CAPÍTULO 1

CH ₄	Metano
CI	Calorimetria indireta
CO ₂	Gás carbônico
DP	Derivados de purina
EB	Energia bruta
ED	Energia digestível
EL	Energia líquida
GEE	Gases de efeito estufa
H ₂	Hidrogênio
NCE	Nitrato de cálcio encapsulado
NH ₄	Amônia
NNP	Nitrogênio não proteico
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
O ₂	Oxigênio
PM	Proteína metabolizável
Pmic	Proteína microbiana
PNDR	Proteína não degradável no rúmen
QR	Quociente respiratório

CAPÍTULO 2

ADF	Acid detergent fiber
ATP	Adenosine triphosphate
BW	Body weight
C	Carbon
Ca	Calcium
CP	Crude protein
DM	Dry matter
DMI	Dry matter intake
ECN	Encapsulated calcium nitrate
FHP	Fast heat production
GE	Gross energy
HCO ₃ ⁻	Bicarbonate
HP	Heat production
MetHb	Methemoglobin
MicN	Microbial nitrogen
MicP	Microbial protein
N	Nitrogen
NDF	Neutral detergent fiber
NPN	Non-protein nitrogen
OMI	Organic matter intake
OXCHO	Carbohydrate oxidation
OXF	Fat oxidation
OXP	Protein oxidation
pCO ₂	Carbon dioxide pressure

RE Retained energy
RQ Respiratory quotient

Capítulo 1. Considerações Gerais

1. Introdução

Dados do senso agropecuário (IBGE, 2015) mostram que a quantidade de cabeças de animais ruminantes é superior a 249 milhões de cabeças. Com base nesse elevado número e considerando o aumento constante da produtividade pecuária, esta vem sendo apontada como uma das principais causas do efeito estufa (GEE). A emissão global de metano advinda de processos entéricos é estimada em 80 milhões de toneladas por ano e esse valor corresponde a aproximadamente 22% do total de emissão de CH₄ provenientes de fontes antrópicas como esterco (7%), culturas de arroz (17%), tratamento de águas de esgoto (7%), combustível fóssil (28%), terras cultivadas (8%) e queimadas (11%) (USEPA, 2000). Sabendo que animais ruminantes produzem gases durante o processo de fermentação ruminal, entre eles o metano (ZOTTI E PAULINO, 2009) que está entre os gases responsáveis pelo efeito estufa, estratégias que reduzam a emissão desse gás, que representa uma menor eficiência energética e um problema para o meio ambiente, vem sendo cada vez mais buscadas (MARTIN et al.,2010).

Apesar de apresentar pontos negativos, a existência do metano no ambiente ruminal é um fator necessário para a manutenção do ambiente e do bom funcionamento dos microrganismos, uma vez que ao utilizarem o H₂ presentes no ambiente ruminal, os organismos metanogênicos regeneram cofatores como NAD⁺ e NADP⁺ que são fundamentais para a manutenção de todos os processos fermentativos no rúmen, ou seja, a pressão parcial de H₂ no rúmen deve ser mantida baixa para permitir a ação das hidrogenases. Assim, ao buscarem-se estratégias que reduzam a emissão desse gás, deve-se atentar para uma modificação na utilização do hidrogênio presente no ambiente ruminal (JOBLIN, 1999).

O nitrato vem recebendo atenção especial nos últimos anos por representar uma alternativa na utilização do H₂ que está livre no ambiente ruminal, reduzindo assim a produção de metano e funcionando também como uma fonte de nitrogênio não

proteico, podendo substituir parte da energia verdadeira da dieta. Ao chegar no ambiente ruminal, o nitrato será reduzido a nitrito e posteriormente à amônia, reação mais favorável energeticamente que a redução do CO₂ a metano e que capta H₂ do ambiente (ALLISON AND REDDY, 1984). No entanto, ainda não se sabe ao certo como o produto interfere na utilização de energia pelos animais e nem sua relação com a produção de proteína microbiana, já que o produto final da redução do nitrato é amônia e esta está diretamente relacionada à produção de proteína microbiana.

2. Objetivo

Determinar o impacto da utilização de nitrato de cálcio encapsulado como substituto do farelo de soja na partição de energia, oxidação do substrato e síntese de N microbiano.

3. Revisão de Literatura

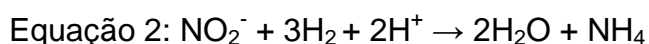
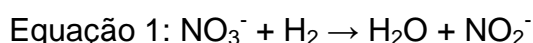
3.1 Utilização de nitrato na alimentação animal

A concentração de gases do efeito estufa (GEE) na atmosfera tem sido apontada como a principal causa do aquecimento global e poluição ambiental. O Brasil possui um amplo rebanho comercial de animais ruminantes, alimentados com forragens tropicais e esse fato tem sido apontado como importante fonte de emissão de metano (ZOTTI E PAULINO, 2009) já que esses animais produzem o gás durante o processo de utilização de energia do alimento. Devido à oscilação na disponibilidade e qualidade da forragem disponível, buscam-se cada vez mais estratégias nutricionais que possam maximizar a eficiência de utilização dos nutrientes no ambiente ruminal. O processo fermentativo que ocorre no rúmen é resultante da atividade física e microbiológica que age convertendo os componentes dietéticos a ácidos graxos de cadeia curta, proteína microbiana e vitaminas do complexo B e vitamina K, metano, dióxido de carbono, amônia, nitrato, etc. (OWENS AND GOETSCH, 1993). Os microrganismos do gênero *Archaeae*, destacando-se no rúmen as metanogênicas, utilizam o processo de formação, preferencialmente, de CH₄ para gerar energia para o crescimento, utilizando primariamente H₂, CO₂ e formato como substrato durante o processo, mantendo assim a baixa pressão de H₂

no rúmen, uma das condições que garantem o adequado funcionamento do ambiente ruminal (BOADI et al., 2004). Apesar de ser um fator importante na manutenção do ambiente ruminal, o metano pode intensificar o efeito estufa na atmosfera, considerando que sua capacidade de armazenar calor é 20 vezes superior ao CO₂ (Kurihara et al., 1999), além de representar uma redução na eficiência de utilização de energia (RUSSEL, 2002). Assim, espera-se que a utilização de vias alternativas de H₂ possa constituir uma estratégia para reduzir a produção de metano, conseqüentemente, aumentando a eficiência energética desses animais.

Algumas estratégias podem ser utilizadas na mitigação de metano entérico, desde que não prejudiquem o desempenho dos animais e objetive inibir as reações que produzam H₂ no ambiente ruminal, capturar o H₂ livre por outras vias metabólicas ou eliminar parte dos microrganismos metanogênicos. Considera-se a manipulação do H₂ no ambiente ruminal um ponto chave para a redução na produção de metano (JOBBLIN, 1999). Dentre as formas de alterar a via de utilização do H₂ livre no ambiente ruminal, podemos citar estratégias como inclusão de lipídios (MARTIN et al., 2008), leveduras (DEHORITY, 2003), ácidos orgânicos (O'MARA, 2004), ionóforos (MORAIS et al., 2006) e nitratos (VAN ZIJDERVELD et al., 2010).

Neste sentido, a suplementação com nitrato, como uma forma de reduzir a emissão de metano entérico, tem recebido recente atenção já que o nitrato é considerado um inibidor da metanogênese a partir da fermentação ruminal (HUNGATE, 1965; AKUNNA et al., 1994; LEE AND BEAUCHEMIN, 2014). A redução do nitrato a amônia é composta por duas reações distintas. Primeiro, o nitrato é reduzido a nitrito (equação 1) e posteriormente este é reduzido à amônia (equação 2). Em ambas reações ocorre utilização de H₂ ruminal como demonstrado abaixo (KOZLOSKI, 2011):



A amônia produzida ao final da reação estaria disponível e seria uma importante fonte de N em dietas pobres em proteína, podendo assim o nitrato atuar

também como fonte de nitrogênio não proteico (NNP). Quando utilizado abaixo do nível tóxico (por exemplo, não causando metahemoglobinemia) o nitrato tem um comportamento semelhante ao da ureia com relação à digestibilidade aparente de N e retenção de N (LI et al., 2012; LEE et al., 2015b). Um estudo relatou que o nitrato aumentou a síntese de N microbiano *in vitro* (GUO et al., 2009) enquanto outro encontrou um suprimento similar de N microbiano *in vivo* (LI et al., 2012), necessitando assim de mais estudos.

Estudos anteriores com bovinos e ovinos tem claramente mostrado que a adição de nitrato nas dietas de ruminantes reduz efetivamente a produção de metano (VAN ZIJDERVELD et al., 2010; HULSHOF et al., 2012; EL-ZAIAT et al., 2014; NEWBOLD et al., 2014; LEE et al., 2015). Apesar disso, o uso do nitrato de forma indevida pode levar à intoxicação dos animais, de forma que investigações das consequências metabólicas do uso de nitrato em ruminantes são essenciais para estabelecer parâmetros para o uso seguro do produto, assim como para determinar o impacto na produtividade e na redução de metano.

O efeito tóxico do nitrato é devido à limitada capacidade dos microrganismos ruminais em converter nitrato à amônia via nitrito como intermediário, resultando em acúmulo de nitrato e nitrito no rúmen, os quais são absorvidos através da parede ruminal. Uma porção do nitrato no sangue será reciclado de volta ao intestino, excretado na urina ou pode ser incorporado no metabolismo do óxido nítrico. No entanto, o nitrito no sangue se liga às células vermelhas e muda a forma ferrosa da hemoglobina para a forma férrica, chamada de metemoglobina (LEE AND BEAUCHEMIN, 2014), impedindo a hemoglobina de carrear oxigênio e causando vários sinais clínicos. Felizmente, estudos anteriores demonstraram que a intoxicação por nitrato ou altos níveis de metemoglobina no sangue podem ser evitados por alguns fatores como adaptação estratégica (ZHOU et al., 2012), manejo alimentar (*ad libitum* no lugar de alimentação restrita) (LEE AND BEAUCHEMIN, 2014; LEE et al., 2015a) e dosagem adequada na dieta (LEE et al., 2015b).

3.2 Métodos de estimativa de produção de metano em ruminantes

Considerando o impacto ambiental causado pela produção de metano por animais ruminantes e a perda energética que esse gás representa, várias técnicas vêm sendo desenvolvidas nos últimos anos objetivando estimar e quantificar a produção de metano. Todas as técnicas apresentam vantagens e desvantagens, podendo ser realizadas em mais ou menos animais, de forma mais cara ou mais barata, em animais a pasto ou confinados. O método utilizado afetará diretamente os resultados e a forma de analisar os mesmos.

Dentre esses métodos, podemos citar:

- a) Mensuração de metano em câmaras respirométricas: vem sendo utilizadas de várias formas diferentes ao longo dos anos como forma de avaliar o metabolismo dos animais e, considerando que a produção de gás metano é uma parte importante do metabolismo energético de ruminantes, este vem sendo avaliado a partir deste método. O princípio deste método consiste em coletar todo o ar exalado pelos animais e mensurar a concentração de gás metano neste (STORM et al., 2012). Os sistemas de calorimetria, onde a composição do ar exalado é analisada, pode ser um sistema aberto ou fechado. Vários tipos de câmaras têm sido construídas com o passar do tempo, inclusive câmaras com controle de temperatura e umidade (DERNO et al., 2009).
- b) Mensuração de metano por meio do gás traçador SF₆: um método relativamente novo, descrito pela primeira vez na década de 90 e criado devido à necessidade da mensuração de metano com animais a pasto (ZIMMERMAN, 1993; JOHNSON et al., 1994). A ideia por trás do método é que a emissão de metano pode ser mensurada se a taxa de emissão do gás traçador no rúmen for conhecida (STORM et al., 2012).
- c) Mensuração de metano por meio da produção de gás *in vitro*: a técnica da produção de gases *in vitro* simula o ambiente ruminal e vem sendo utilizada por décadas pois permite a obtenção de digestibilidade dos alimentos de uma forma mais rápida, com menor quantidade de alimentos e com a possibilidade da avaliação de vários alimentos simultaneamente, além da possibilidade de

conhecer os produtos oriundos da degradação dos alimentos e de sua alta correlação com os parâmetros *in vivo* (OLIVEIRA, et al., 2014). Com o interesse crescente na produção de gases na agricultura, a técnica foi modificada para mensurar também a produção de metano (NAVARRO-VILLA et al., 2011).

- d) Mensuração de metano por meio da técnica do CO₂: técnica semelhante a do gás SF₆, mas usa o CO₂ como gás traçador (MADSEN et al., 2010).
- e) Alimentador e analisador de CH₄: uma nova técnica combina alimentadores automáticos com analisadores de CH₄, mas possui a desvantagem de só fazer a medição quando o animal está com a cabeça dentro do alimentador, ingerindo alimento (STORM et al., 2012).
- f) Modelos de predição de emissão de metano: em alguns casos onde a mensuração não é possível de ser realizada, modelos são aplicados para estimar a produção desse gás. Dentro eles, tem-se o IPCC (2006), Yan et al. (2006), Jentsch (2007) entre outros. Os parâmetros para a estimativa mudam de acordo com o modelo, alguns utilizam a relação V:C na dieta enquanto outros utilizam a quantidade dos nutrientes digeridos.

3.3 Calorimetria indireta e produção de calor

A calorimetria foi primeiramente utilizada no século XVIII quando Lavoisier e Crawford, de forma independente, fizeram seus experimentos pioneiros com respiração e perda de calor. Primeiramente Lavoisier mediu a perda de calor dos animais isolados do ambiente. Posteriormente, mediu o consumo de oxigênio e após isso classificou os componentes dos alimentos – carboidratos, gordura e proteína – como combustível para o corpo (FRENZ, 1999). Nesse aspecto Lavoisier merece uma atenção especial, pois foi o primeiro a definir a respiração como um lento processo de combustão e constatou a importância do gás oxigênio. Os estudos de Lavoisier possibilitaram a criação da calorimetria indireta e direta (KLEIBER, 1972). As leis da termodinâmica e a lei de Hess são aspectos fundamentais para o estudo da transformação da energia em sistemas biológicos, pois afirma que a energia não é criada e nem destruída, apenas transformada e que todas as formas de energia

podem ser convertidas quantitativamente em calor e esse calor gerado será independente dos caminhos de conversão (RESENDE et al, 2011).

A técnica da calorimetria indireta (CI) é baseada no fato de que, normalmente, o consumo de O_2 e a produção de CO_2 são diretamente relacionados com a produção de calor que pode ser mensurada pela relação entre CO_2 produzido e O_2 consumido. A energia contida nas ligações químicas dos carboidratos, lipídios e proteínas é liberada através da oxidação desses substratos, processo que consome oxigênio e produz água, gás carbônico, energia química armazenada nas ligações fosfato da adenosina trifosfato (ATP) e calor que é dissipado para o meio ambiente (DIENNER, 1997). Essa relação resulta no quociente respiratório (QR), relação entre CO_2 produzido e O_2 consumido, e cujo valor varia de acordo com a natureza do substrato oxidado. A calorimetria é utilizada ainda nos dias atuais, em maior parte da calorimetria indireta do que a direta. A CI teve papel fundamental no último século nos estudos de metabolismo dos seres vivos pois foi utilizada amplamente na área clínica até a década de 50 objetivando avaliar a glândula tireóide e seu estado funcional através da determinação do metabolismo basal (DIENNER, 1997). Diferente da calorimetria direta que mensura a perda de calor baseando-se na perda de calor desprendido pelo próprio animal, a calorimetria indireta avalia o gasto energético a partir das trocas gasosas e excreção de nitrogênio, resultante da oxidação dos três principais substratos (gordura, proteína e carboidrato) que compõem os alimentos, considerando sua composição química e a estequiometria de combustão, (FRENZ, 1999). Dessa forma, pode-se definir a calorimetria indireta como a dedução da produção de energia feita a partir das reações químicas que ocorrem no organismo (LAGE, 2011). Essa produção de energia é equivalente à conversão de energia química que está armazenada nos nutrientes em energia química armazenada no ATP mais a energia que é dissipada como calor durante o processo oxidativo (SIMONSON E DEFRONZO, 1990).

A CI baseia-se em alguns pressupostos (BEM-PORATI et al., 1983; LIVESY et al., 1988; SWYER, 1991):

- a) As perdas de gases através da pele são mínimas e desconsideradas e O_2 e CO_2 não são armazenados no organismo.

- b) O aporte de energia consiste somente de carboidratos, proteínas e gorduras, sendo estes com uma composição química definida.
- c) O organismo está em constante equilíbrio e a duração dos estudos é suficiente para corrigir possíveis flutuações dos gases.

3.4 Partição de energia e oxidação do substrato

As leis da termodinâmica e de Hess são indispensáveis para o estudo da energia e de sua utilização nos sistemas biológicos e esse interesse já é relatado desde o século XV com Leonardo da Vinci (1452 – 1519), Joseph Priestley (1733 – 1804) e Antonie Lavoisier (1743 – 1794). Afirmações de que a energia não é criada nem destruída apenas transformada e que todas as formas de energia podem ser transformadas em calor e que o calor gerado é independente dos caminhos de conversão, nos ajudam a compreender a importância do estudo da mesma nos sistemas biológicos. A energia não é considerada um nutriente como os demais componentes do alimento, ela é liberada através do processo oxidativo que ocorre nos mesmos. A energia química que está presente nos alimentos é denominada energia bruta (EB) e é obtida através da oxidação completa do substrato a CO_2 e H_2O . Apesar da quantidade de EB estar relacionada com a composição química do alimento, esta guarda pouca relação com a real quantidade de energia que está disponível de fato para o animal devido às perdas variáveis que ocorrem durante o processo de utilização do alimento. A primeira perda na energia corresponde à fração que é eliminada nas fezes, valor variável de acordo com a digestibilidade dos alimentos. Quando contabilizada a energia bruta das fezes e subtraída da energia bruta ingerida no alimento, tem-se então a energia digestível (ED). A segunda perda de energia ocorre na urina e gases. No caso de animais ruminantes, a perda por gases recebe uma maior atenção devido ao processo de fermentação do substrato no ambiente ruminal. Quando descontada a energia perdida na urina e nos gases, temos a energia metabolizável (EM). A última parte da perda de energia é o incremento calórico que representa a perda de energia na forma de calor durante o processo de metabolização dos nutrientes. Após esse processo, temos a energia líquida (EL) que representa a energia utilizada pelos animais para a formação do produto. O quadro de partição de energia é detalhado abaixo.

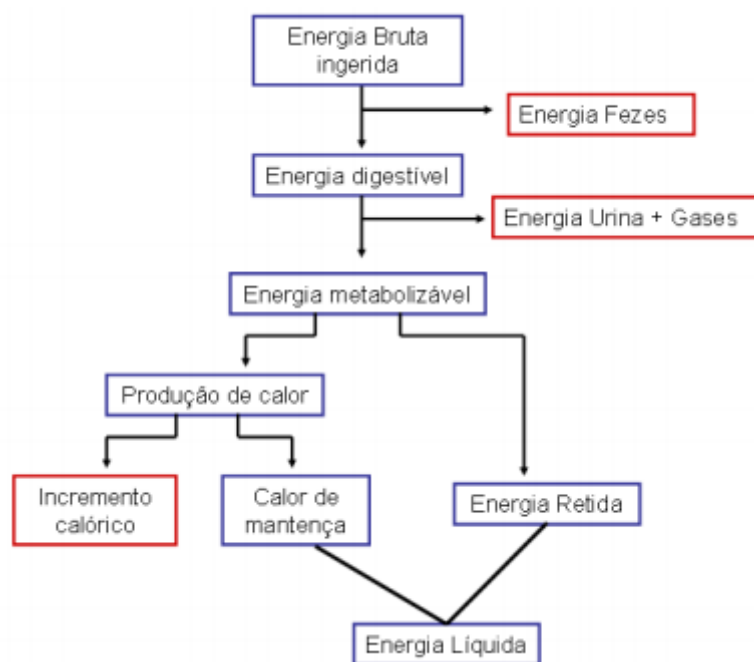


Figura 1: Partição de energia. Adaptado de Chwalibog (2004)

Do ponto de vista energético, a redução na produção de metano decorrente da utilização do nitrato pode resultar em um aumento na metabolizabilidade (EB/EM) da dieta e, conseqüentemente, mais energia ficará disponível para o animal. Recentemente, Lee and Beauchemin (2014) apresentaram uma análise de regressão e não reportaram interação entre o nível de nitrato e o consumo de matéria seca e ganho de peso corporal, indicando que os benefícios fisiológicos da redução da produção de metano em ruminantes podem não ser diretamente relacionados à produção animal. Uma possível explicação para isso, discutida pelos autores, foi o aumento da produção de hidrogênio em bovinos alimentados com dietas à base de nitrato comparadas com dietas à base de ureia reportadas no estudo de van Zijderveld et al. (2011), dado que a produção de hidrogênio entérico é outra fonte de perda de energia, o qual não é considerado na equação de Brouwer (equação amplamente aceita e utilizada para estimar a produção de calor em estudos de calorimetria indireta). Apesar da calorimetria indireta (CI) ser reconhecida como método referência para outros métodos para mensurar a produção de calor, essa técnica também pode ser verificada pela comparação com o balanço de energia e proteína, chamada técnica do balanço carbono-nitrogênio (CN) (FERNANDEZ et al., 2012; LOPEZ E FERNANDEZ, 2013). Quando se executa o

balanço de CN, o balanço de N é mensurado pela metodologia convencional e o balanço de C requer mensurações quantitativas pela metodologia convencional de todas as entradas de C (alimento) e perdas (urina, fezes, CH₄ e CO₂), usando equipamentos similares aos da calorimetria indireta. O balanço de energia e proteína pode ser estimado, e a produção de calor é o resultado da diferença entre a ingestão de energia metabolizável e a energia retida, de modo que os pressupostos subjacentes à equação de Brouwer (1965) ou equivalentes são evitados (GERRITS et al., 2013). A vantagem óbvia da CI (ou método do coeficiente respiratório) em relação ao CN é que o método de CI fornece uma boa direção para estimar a oxidação líquida do substrato.

3.5 Produção de proteína microbiana

O total de proteína metabolizável (PM) que chega ao intestino de ruminantes é representado pelos aminoácidos provenientes da digestão intestinal de proteína microbiana (Pmic) metabolizável no rúmen, proteína não degradável no rúmen de origem alimentar (PNDR) e proteína endógena (SANTOS E MENDONÇA, 2011). Sabendo que a Pmic é uma importante fonte de PM para ruminantes atendendo de 60 a 85% das exigências de manutenção, crescimento, gestação e lactação (TIMMERMANS JR. et al., 2000) tem-se buscado cada vez mais métodos para otimizar a fermentação ruminal e maximizar a eficiência de síntese de proteína microbiana. A produção de Pmic está diretamente correlacionada com o teor de carboidratos fermentáveis, proteína degradada no rúmen e minerais (NRC, 2001), já que a principal fonte de nitrogênio para os microrganismos ruminais são amônia, aminoácidos e peptídeos. Dependendo da concentração de amônia ruminal, a fixação da amônia pode ocorrer com ou sem gasto de ATP, sendo que em elevada concentração de amônia ruminal, a enzima glutamato desidrogenase fixa amônia sem uso de ATP, ao passo que em baixas concentrações de amônia ruminal, a enzima glutamato sintetase utiliza 1 mol de ATP para cada mol de amônia fixada (SANTOS E MENDONÇA, 2011).

Diferentes métodos podem ser utilizados para estimativa da síntese de proteína microbiana. Broderick e Merchen (1992), utilizando a técnica de marcadores microbianos, recomendaram a utilização de bases de purinas e ¹⁵N como

indicadores, objetivando a medição de biomassa microbiana, no entanto o método possui o viés de que bactérias e protozoários possuem relação purinas:N diferentes além da necessidade da utilização de animais fistulados. Um método alternativo aos marcadores microbianos é a estimativa da produção de proteína microbiana a partir da excreção dos derivados de purina (DP) na urina que não precisaria de animais fistulados para sua estimativa, sendo, portanto uma técnica menos invasiva. Os DP podem se originar de duas formas distintas: purinas absorvidas no intestino delgado e fração endógena – DP que entram na circulação sanguínea e podem ser degradadas à ácidos nucléicos no tecido.

4. Referências bibliográficas

Allison, M. J., and C. A. Reddy. 1984. Adaptations of gastrointestinal bacteria in response to changes in dietary oxalate and nitrate. Pages 248–256 in Third Int. Symp. Microbial Ecology. K. M. J. and C. A. Reddy, ed. **American Society of Microbiology**, Washington, DC.

Boadi, D., C. Benchaar, J. Chiquette, and D. Masse. 2004. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: Update review. **Canadian Journal of Animal Science** 84: 319-335.

Ben-Porat M, Sideman S, Bursztein S. 1983. Energy metabolism rate for fasting and postabsorptive subjects. **Am J Physiol.** 244: R764-R769.

BRODERICK, G.A, MERCHEN, N.R. 1992. Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. **J. Dairy Sci.**, 75:2618.

Brouwer, E. 1965. Report of sub-committee on constants and factors. In: K. L. Blaxter (ed.) 3rd **Symposium Energy Metabolism**. No. 11. p 441-443. EAAP Publ., London, UK.

Dehority, B. A., 2003. Rumen microbiology. Nottingham: Nottingham University Press. 372 p.

Derno, M.; Elsner, H.G.; Paetow, E.A.; Scholze, H.; Schweigel, M., 2009. Technical note: A new facility for continuous respiration measurements in lactating cows. **J. Dairy Sci.**, 92, 2804–2808.

DIENER. J. R. C. 1997. Calorimetria indireta. **Rev Ass Med Brasil.** 43(3): 245-53

El-Zaiat, H. M. et al. 2014. Encapsulated nitrate and cashew nut shell liquid on blood and rumen constituents, methane emission, and growth performance of lambs. **Journal of Animal Science** 92: 2214-2224.

FAO. 2010. Greenhouse Gas Emissions from the Dairy Sector: A Life Cycle Assessment. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy.

Fernandez, C., M. G. Lopez, and M. Lachica. 2012. Heat production determined by the RQ and CN methods, fasting heat production and effect of the energy intake on substrates oxidation of indigenous Manchega sheep. **Animal Feed Science and Technology** 178: 115-119.

Guo, W. S., D. M. Schaefer, X. X. Guo, L. P. Ren, and Q. X. Meng. 2009. Use of Nitrate-nitrogen as a Sole Dietary Nitrogen Source to Inhibit Ruminal Methanogenesis and to Improve Microbial Nitrogen Synthesis In vitro. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences** 22: 542-549.

Hulshof, R. B. A. et al. 2012. Dietary nitrate supplementation reduces methane emission in beef cattle fed sugarcane-based diets. **Journal of Animal Science** 90: 2317-2323.

Ida M. L. D. Storm 1, Anne Louise F. Hellwing 2, Nicolaj I. Nielsen 3 and Jørgen Madsen 1, 2012. Methods for Measuring and Estimating Methane Emission from Ruminants. **Animals**, 2, 160-183; doi:10.3390/ani2020160

IPCC. Climate Change 2007: Mitigation of Climate Change. IPCC Fourth Assessment Report (AR4). 2007. Available online: http://www.ipcc.ch/publications_and_data/ar4/wg3/en/contents.html (accessed on 20 December 2016).

Jentsch, W.; Schweigel, M.; Weissbach, F.; Scholze, H.; Pitroff, W.; Derno, M., 2007. Methane production in cattle calculated by the nutrient composition of the diet. **Arch. Anim. Nutr.** 61, 10–19.

Joblin, K. N. 1999. Ruminal acetogens and their potential to lower ruminant methane emissions. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 50, n. 8, p. 1321-1327.

Johnson, K.; Huyler, M.; Westberg, H.; Lamb, B.; Zimmerman, P., 1994. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a SF6 tracer technique. **Environ. Sci. Technol.** 28, 359–362.

Kleiber, M. *Bioenergetica Animal: El fuego de la vida*. 1 ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 1972. 428p.

Kurihara, M.; Magner, T.; Hunter, R.A.; McCrabb, G.J., 1999. Methane production and energy partition of cattle in the tropics. **British Journal of Nutrition**, v.81, p.227-234.

Lee, C., R. C. Araujo, K. M. Koenig, and K. A. Beauchemin. 2015a. Effects of encapsulated nitrate on eating behavior, rumen fermentation, and blood profile of beef heifers fed restrictively or ad libitum. **Journal of Animal Science** 93: 2405-2418.

Lee, C., R. C. Araujo, K. M. Koenig, and K. A. K. A. Beauchemin. 2015b. Effects of encapsulated nitrate on enteric methane production and nitrogen and energy utilization in beef heifers **Journal of Animal Science**: 2391-2404.

Lee, C., and K. A. Beauchemin. 2014. A review of feeding supplementary nitrate to ruminant animals: nitrate toxicity, methane emissions, and production performance. **Canadian Journal of Animal Science** 94: 557-570.

Li, L., J. Davis, J. Nolan, and R. Hegarty. 2012. An initial investigation on rumen fermentation pattern and methane emission of sheep offered diets containing urea or nitrate as the nitrogen source. **Animal Production Science** 52: 653-658.

Livesey G, Elia M. 1988. Estimation of energy expenditure, net carbohydrate utilization, and net fat oxidation and synthesis by indirect calorimetry. **Am J Clin Nutr.** 47: 608-28.

Lopez, M. C., and C. Fernandez. 2013. Energy partitioning and substrate oxidation by Murciano-Granadina goats during mid lactation fed soy hulls and corn gluten feed blend as a replacement for corn grain. **Journal of Dairy Science** 96: 4542-4552.

Madsen, J.; Bjerg, B.S.; Hvelplund, T.; Weisbjerg, M.R.; Lund, P., 2010. Methane and carbondioxide ration in excreted air for quantification of the methane prodction from ruminants. **Livest. Sci.** 129, 223–227.

Martin, C. et al., 2008. Methane output and digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, n. 10, p. 2642 – 2650.

Martin, C., D. P. Morgavi, and M. Doreau. 2010. Methane mitigation in ruminants: From microbe to the farm scale. **Animal** 4:351–365.

Morais, J. A. S.; Berchielli, T. T.; Reis, R. A., 2006 Aditivos: In: Berchielli, T. T.; Pires, A. V.; Oliveira, S. G. Nutrição de Ruminantes. Jaboticabal: FUNEP. p. 111 – 140

Navarro-Villa, A.; O'Brien, M.; Lopez, S.; Boland, T.M.; O'Kiely, P. 2011 Modifications of a gas production technique for assessing *in vitro* rumen methane production from feedstuffs. **Anim. Feed Sci. Technol.** 166–167, 163–174.

Newbold, J. R. et al. 2014. The effect of incremental levels of dietary nitrate on methane emissions in Holstein steers and performance in Nelore bulls. **Journal of Animal Science** 92: 5032-5040.

Oliveira, V. S.; Valença, R. d. L.; Santana Neto, J. A.; Santana, J. C. S.; Santos, C. B.; Lima, I. G. S. 2014. Utilização da técnica de produção de gás *in vitro* para estimar a digestibilidade dos alimentos. **Revista Científica de Medicina Veterinária.** ISSN:1679-7353. Ano XII-Número 23

Owens, F.N.; Goetsch, A.L. Fermentación ruminal. 1993. In: CHURCH, D.C. El ruminante, fisiología digestiva y nutrición: Zaragoza: Acríbia. p.159-190

Simonson DC, DeFronzo R. 1990 Indirect calorimetry: methodological and interpretative problems. **Am J Physiol**. 258: E399-E412.

Swyer PR. 1991. Assumptions used in measurements of energy metabolism. **J Nutr**. 121: 1.891-6.

Timmermans Jr., S.J.; Johnson, L.M.; Harrison, J.H., 2000. Estimation of the flow of microbial nitrogen using milk uric acid or allantoin. **Journal of Dairy Science** , v.83, p.1286-1299.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA. 2000. Evaluating Ruminant Livestock Efficiency Projects and Programs In: PEER REVIEW DRAFT. Washington, D.C, 48p.

van Zijderveld, S. M. et al. 2010. Nitrate and sulfate: Effective alternative hydrogen sinks for mitigation of ruminal methane production in sheep. **Journal of Dairy Science** 93: 5856-5866.

van Zijderveld, S. M. et al. 2011. Persistency of methane mitigation by dietary nitrate supplementation in dairy cows. **Journal of Dairy Science** 94: 4028-4038.

Yan, T.; Mayne, C.S.; Porter, M.G., 2006. Effects of dietary and animal factors on methane production in dairy cows offered grass silage based diets. *Int. Congr. Ser.* 1293, 123–126

Zhou, Z. M., Z. T. Yu, and Q. X. Meng. 2012. Effects of nitrate on methane production, fermentation, and microbial populations in in vitro ruminal cultures. **Bioresource Technology** 103: 173-179.

Zimmerman, P.R. 1993 System for Measuring Metabolic Gas Emissions from Animals. US Patent 5,265,618.

Zotti and Paulino, 2009 Metano na produção animal: emissão e minimização de seu impacto. Ecologia de Pastagens, Curso de Pós-graduação em Produção Animal Sustentável. Instituto de Zootecnia, APTA/SAA

Chapter 2: Energy partition and nitrogen utilization by growing goats fed encapsulated calcium nitrate¹

ABSTRACT:

Encapsulated calcium nitrate (ECN) has been studied in last years as a source of non-protein nitrogen (NPN) and represents an alternative to use of free hydrogen in the ruminal environment, thus reducing the emission of methane and a higher efficiency in use of energy. Thus the aim of this study was to assess the impact of the use of encapsulated calcium nitrate as a substitute for soybean meal in the energy partition, substrate oxidation, and microbial N synthesis. For this, twelve castrated male growing goats, with initial average weight of 21.95 kg \pm 3.19 kg were used in a quadruplicated 3 x 3 Latin square design with three 48-d periods, grouped by body weight (BW) and randomly assigned to three diets: ECN0(SBM) – control based on soybean meal; ECN1.25 - 1.25% of encapsulated calcium nitrate (ECN) on dry matter (DM) basis; ECN2.5 - 2.5% of ECN on DM basis. Each period comprised 21 days for adaptation, five days for metabolism trial (d22 to d26) and 15 days for gas measurements (d27 to d38). Between periods, a washout period was provided for 7 d during which the control diet was fed. The data were analyzed using MIXED procedure of SAS (version 9.4; SAS Inst., Cary, NC, USA). The model used for each treatment was the following: $Y_{ijkm} = \mu + LS_i + Period_j + Ani(LS)_{ki} + Treat_m + \epsilon_{ijkm}$. When significant, the effect of levels of ECN was decomposed into two orthogonal polynomial contrasts (linear and quadratic). Significance was declared at $P < 0.05$. The heat production (HP) and fast heat production (FHP) were covariates with the metabolizable energy intake. The HP was not influenced by treatments ($P > 0.05$) and FHP showed a reduction of approximately 22% ($P < 0.05$) between ECN0(SBM) and ECN2.5. The emission of methane reduced 0.21 g for each g of nitrate intake. The inclusion of approximately 1% of ECN on DM results in a maximum DE and ME intake. Also the FHP is lower with ECN inclusion showing a residual effect on growing goats. No effect is observed in MicN synthesis.

KEYWORDS: digestibility, greenhouse gas, indirect calorimetry, respirometry

¹ Following the guidelines of the Journal of Animal Feed Science and Technology except spaces between lines and position of tables.

Introduction

Encapsulated calcium nitrate has been used experimentally in recent years due to its role on mitigating enteric methane, a greenhouse gas (GHG). Upon ingestion by the animals, nitrate will be reduced to nitrite and then to ammonia in the ruminal environment, thus functioning as a free H_2 drain and inhibiting methanogens to use H_2 to form methane (Lee and Beauchemin, 2014). In fact, previous studies with cattle and sheep have clearly shown that the addition of nitrate in ruminant diets effectively reduces the production of methane (van Zijderveld et al., 2010; Hulshof et al., 2012; El-Zaiat et al., 2014; Newbold et al., 2014; Lee et al., 2015b). Even though the use of nitrate has been extensively studied recently, some aspects of its energy and protein metabolism in ruminants remain unknown and might prevent the establishment of optimum strategies for using nitrate supplements safely and effectively.

From energetic point of view, the decrease in methane production would result in an increased of diet metabolizability and, consequently, more energy available to the animal. However, the data are still unclear regarding energy use by animals fed with this product. On the other hand, recent studies observed that replacing urea with nitrate (NO_3) improved the rate of clean wool growth (Li et al., 2013; de Raphelis-Soissan et al., 2014), presumably because the vasodilator effect of nitrous oxide (NO) formed from reduction of absorbed nitrite (NO_2) and its conversion to NO following absorption (Vanhatalo et al., 2011). Other studies assert the NO_3 - NO_2 -NO pathway involvement in regulation of blood flow and pressure (Larsen et al., 2006), cell signaling and glucose homeostasis (Carlstrom et al., 2010) and tissue responses to hypoxia (Gladwin et al., 2005; Lundberg et al., 2008; van Faassen et al., 2009). Additionally, dietary nitrate has been reported to reduce resting metabolic rate due to an improvement in mitochondrial efficiency in humans (Larsen et al., 2011).

Therefore, we hypothesized that nitrate supplementation to ruminants could reduce basal metabolism and, consequently, spare energy to be used for weight gain or milk production. However, the residual effect of nitrate on basal metabolism of ruminants fed nitrate has not been studied yet. Hence, the aim of this study was to

assess the impact of the use of encapsulated calcium nitrate as a substitute for soybean meal in the energy partition, substrate oxidation, and microbial N synthesis.

Material and methods

This study was conducted at the Goat Laboratory of “Universidade Estadual Paulista/Jaboticabal” (UNESP, São Paulo, Brazil). All procedures were conducted in accordance with the University Animal Care Commission (Comissão de Ética e Bem-Estar Animal-CEBEA, protocol 22774/15).

Animals, diets and experimental design

Twelve castrated male growing goats, with initial average weight of 21.95 kg \pm 3.2 kg were used in a quadruplicated 3 x 3 Latin square design with three 48-d periods. Each period comprised 21 days for adaptation, five days for metabolism trial (d22 to d26) and 15 days for gas measurements (d27 to d38). Between periods, a washout period was provided for 7 d during which the control diet was fed. Goats were grouped by BW (i. e., 3 goats per group or Latin square). Goats in each group within each period were randomly assigned to three diets: ECN0 (SBM) – control diet based on soybean meal; ECN1.25 - 1.25% of encapsulated calcium nitrate (ECN) on dry matter (DM) basis; ECN2.5 - 2.5% of ECN on DM basis (Table 1). The amounts of limestone were adjusted to maintain the same Ca content for all diets due to the high content of Ca (about 20% Ca on a DM basis) of ECN.

Table 1. Feed ingredients and chemical composition of experimental diets

Item	ECN ¹		
	ECN0(SBM)	ECN1.25	ECN2.5.5
Ingredients (DM, %)			
Corn silage ²	55	55	55
Corn grain, ground	33	35.1	38
Soybean meal	7.5	4.4	1
Soybean oil	1.5	1.5	1.5
Mineral supplement	2	2	2
Limestone	1	0.7	0
ECN	0	1.25	2.5
Chemical composition (% of DM \pm SD)			
DM, % of as-fed basis	60.44 \pm 0.57	60.44 \pm 0.57	60.49 \pm 0.58
OM	91.94 \pm 0.12	91.93 \pm 0.10	92.40 \pm 0.09
CP	10.53 \pm 0.2	10.19 \pm 0.16	9.78 \pm 0.12
NDF	33.02 \pm 1.71	32.95 \pm 1.77	33.02 \pm 1.85
ADF	14.96 \pm 0.64	14.85 \pm 0.65	14.74 \pm 0.64

NO ₃ ⁻	0.055±0.001	0.94±0.003	1.83±0.003
GE, MJ/ kg DM	17.12 ± 0.07	16.83 ± 0.08	16.60 ± 0.09

¹Encapsulated calcium nitrate was manufactured by GRASP Ind. & Com. LTDA and EW|Nutrition GmbH; 85.6% DM; 17.6% N, 19.6% Ca, and 71.4% NO₃⁻ on a DM basis. The source of nitrate was the double salt of calcium ammonium nitrate decahydrate [5Ca(NO₃)₂·NH₄NO₃·10H₂O] (Lee et al., 2015); ² Chemical composition of corn silage: DM = 36.99 ± 1.03; CP = 6.99 ± 0.46; FDN = 42.21 ± 1.5; FDA = 23.77 ± 1.20; N = 1.12 ± 0.07; C = 43.73 ± 0.6.

The goats were allocated in individual pens protected from rain and wind. The animals were fed ad libitum (105% consumption) twice daily (at 8 and 16h) with free access to water. The ECN was provided in a gradual manner to adapt the rumen microorganisms and prevent potential nitrate toxicity. The ECN inclusion was 0.625% on DM basis from d 1 to 4 of the adaptation period, 1.25% on DM basis from d 5 to 8 and, then, 2.5% on DM basis from d 9 to the end of each period. On the 17th day of each period, 3 hours after the morning meal, arterial blood samples were collected to determine the methemoglobin (MetHb) and the state of oxygenation, ventilation and acid-basic conditions of the animal (Cobas b 123 Roche diagnostics Ltda, Rotkreuz, Switzerland).

Metabolism assay

After a previous adaptation, the animals were placed in individual metabolic cages for metabolism assay from d 21 to 26. Offered feed, orts, and total fecal and urinary output were recorded daily, 10%-subsampling and stored at -20 ° C until later analysis. Total urine was collected into plastic containers containing 100 mL of 10% H₂SO₄. Acidified urine was checked for pH with a strip pH indicator, and total volume was measured once daily. Urine sample was taken after passing urine through a sieve to remove large particles.

Samples of feed ingredients, orts and feces were dried at 55 °C for 72 h in a forced-air oven for DM determination and ground in a Wiley mill through a 1-mm screen. Dried and ground samples were analyzed for analytical DM by drying at 105 °C for 24 hours (method 934.01; AOAC, 1990), ash (complete combustion in muffle at 600 °C for 24 h; AOAC, 1990; Method 942.05) , total N and C content by Dumas principle (CN628, Leco Instruments Inc., St. Joseph, MI, USA), ether extract (based on weight loss of dry sample upon extraction with petroleum ether in a Soxhlet apparatus for 6h; AOAC, 1990; method number 920.39), neutral detergent fiber (NDF; Van Soest et al, 1991) using an Ankom 200 fiber Analyzer (Ankom Technology, Fairport, NY), acid detergent fiber (ADF; Goering and Van Soest, 1970),

lignin (AOAC 1990; method number 973.18), nitrite and nitrate (AOAC 1990; method number 968.07), and gross energy (GE) using bomb calorimeter (Parr Instrument Co., Moline, IL) . Urine was analyzed for DM, N, C, energy, nitrate and nitrite (AOAC 1990; method number 968.07) as previously described. Total CP content was calculated by multiplying N content by 6.25.

The microbial protein supply (MicP) was estimated based on excretion of purine derivatives in the urine. As previously mentioned, urine was acidified with sulfuric acid (H₂SO₄, 10%) to maintain pH less than 3, preventing losses of nitrogen, destruction of the bacterial purine derivatives and precipitation of uric acid. Allantoin and uric acid were quantified by a colorimetric method and xanthine and hypoxanthine via enzymatic method (Chen & Gomes, 1992). The total excretion of purine derivatives was calculated by summing the amounts of uric acid, allantoin, xanthine and hypoxanthine in the urine (mmol/d) and the amount of absorbed microbial purine (X mmol / day) was estimated from the excretory purine derivatives (Y, mmol / day) using the equation (Eq. 1) proposed by Chen & Gomes (1992) to sheep:

$$Y = 0.84X + (0.15 \times BW^{0.7} \exp^{-0.25X}) \quad (1)$$

Where Y = the rumen synthesis of nitrogenous compounds (Y, C g/day) and was calculated as a function of the absorbed purines (X mmol/day), for the equation proposed by Chen & Gomes (1992) (Eq 2)

$$Y = 70X/0.83 \times 0.116 \times 1000 \quad (2)$$

Where Y = 70 is the N content of purines (mg C/mmol), the relationship 0.116 N purine: N total in bacteria and 0.83 digestibility of the microbial purine.

Open-circuit facemask respirometry

The gas exchange was measured using an open-circuit facemask respirometry as described by Fernandes et al. (2016). The goats were conditioned to the use of the facial mask 90 days before the beginning of the experimental period. During this period of adaptation to facial mask the animals were subjected daily to the use of facial mask uninterruptedly and the respiratory rate was measured, by

counting the movements of the flank for 60 s, without using the mask, during and after its use, to monitor the stress of the animal.

Concomitantly to gas exchange measurements, the rectal and skin temperature were measured. To measure the rectal temperature (T_R), a sensor (Model MLT1407, Ad Instruments Ltda, New South Wales, AU) was inserted into the rectum of the animal. To measure skin temperature, a sensor (Model MLT22/A, Ad Instruments Ltda, New South Wales, AU) was placed on left side rib of animal. The exhaled air temperature (T_{expair}) sensor of the (Model MLT415/AL, Ad Instruments Ltda, New South Wales, AU) was placed inside the mask near to the animal's nose. Another sensor (Model MLT415/AL, Ad Instruments Ltda, New South Wales, AU) continuously measured ambient temperature (T_{air}). These sensors were connected directly to the thermistor pods (Model ML309, Ad Instruments Ltda, New South Wales, AU).

All analytical devices (gas analyzer units, flowmeter, spirometer and thermistor pods) were connected to Data acquisition system (Model PowerLab 16/30, Ad Instruments Ltda, New South Wales, AU) which was connected to a computer. The software used to operate the system was Labchart® (Ad Instruments Ltda, New South Wales, AU). The data recording was set up at 1 observation per second.

During 12 days within each period, the gas exchange were measured for 30 minutes per animal within each 1-h window (7:00 to 8:00, 8:00 to 9:00, 9:00 to 10:00, 10:00 to 11:00, 11:00 to 12:00, 12:00 to 13:00, 13:00 to 14:00, 14:00 to 15:00, 15:00 to 16:00; 16:00 to 17:00; 17:00 to 18:00, 18:00 to 19:00). Each animal was assessed in a different time each day so that by the end of the period 12th day, there was a representative sample of 12 h of measurements for each goat. After the 12th day, the animals were subjected to a fasting (no feed) of approximately 60 hours and gas exchange was measured again to estimate the fast heat production.

The O_2 consumed (VO_2) and CO_2 (VCO_2) and CH_4 (VCH_4) released in the respiratory system were estimated according to the equations below. where VO_2 and VCO_2 represent O_2 and CO_2 consumed (L/h) respectively; VE represent ventilation (L/h); $O_{2\text{EXP}}$ and $O_{2\text{ATM}}$ are the proportions of O_2 breath and inspired, respectively;

$CO_{2\text{ EXP}}$ and $CO_{2\text{ ATM}}$ are the proportions of CO_2 in exhaled air and inspired, respectively; $CH_{4\text{ EXP}}$ and $CH_{4\text{ ATM}}$ are the CH_4 ratios breath and inspired, respectively. The respiratory exchange ratio or respiratory quotient (RQ) was calculated by the VCO_2/VO_2 . Ventilation is the product of respiration rate (BPM, breaths/minute) and tidal volume (TV). Gas volumes were corrected to standard conditions of temperature, pressure and dry air (STPD).

$$VO_2 = VE \times (O_{2\text{ ATM}} - O_{2\text{ EXP}}) \quad (3)$$

$$VCO_2 = VE \times (CO_{2\text{ EXP}} - CO_{2\text{ ATM}}) \quad (4)$$

$$VCH_4 = VE \times (CH_{4\text{ EXP}} - CH_{4\text{ ATM}}), \quad (5)$$

Heat production was calculated according to Brouwer (1965).

$$HP = 16.18 \times 5.02 \times VO_2 + VCO_2 - 2.17 \times VCH_4 - 5.99 \times N_{UR} \quad (6)$$

Where HP is the production of heat (KJ), VO_2 is the oxygen consumed (L), VCO_2 is carbon dioxide produced (L) VCH_4 is the production of methane (L) and N_{UR} is urinary nitrogen (g).

The energy associated with protein oxidation (OX_P), carbohydrate (OX_{CHO}) and fat (OX_F) was calculated by the method of Chwalibog et al. (1997) for ruminants.

$$VCO_{2x} = VCO_2 - (CO_2/CH_4 \times VCH_4) \quad (7)$$

$$OX_P = 6.25 \times N_{UR} \times 18.42 \quad (8)$$

$$OX_{CHO} = (-2.968 \times VO_2 + 4.174 \times VCO_{2x} - 2.446 \times N_{ur}) \times 17.58 \quad (9)$$

$$OX_F = (1.719 \times VO_2 - 1.719 \times VCO_2 - 1.963 \times N_{ur}) \times 39.76 \quad (10)$$

Where OX_P, OX_{CHO}, OX_F are energy (kJ) associated with the oxidation of protein, carbohydrate and fat, respectively; O_2 is the oxygen consumed (L), VCO_2 is carbon dioxide produced (L) is VCO_{2x} carbon dioxide produced by oxidation; VCH_4 is the production of methane (L) and N_{ur} is urinary nitrogen (g).

Thus, heat production from the oxidation (HP_x, kJ) is:

$$HP_x = 16.18 \times O_2 + 5.02 \times CO_{2x} - 5.99 \times Nur. \quad (11)$$

Statistical Analysis

The data were analyzed in Latin square 3x3 quadruplicate using MIXED procedure of SAS (version 9.4; SAS Inst., Cary, NC, USA). The model used for each treatment was the following: $Y_{ijkm}: \mu + LS_i + Period_j + Ani(LS)_{ki} + Treat_m + \epsilon_{ijkm}$, where Y = the observation, LS = latin square as a random effect, $Period$ as a random effect, $Ani(LS)$ = random effect of animal in latin square, $Treat$ = level of inclusion of ECN, $LS \times (Treat)$ = interaction latin square and levels of ECN and ϵ = the residual as a random effect. When significant, the effect of levels of ECN was decomposed into two orthogonal polynomial contrasts (linear and quadratic). Significance was declared at $P < 0.05$ and the tendency between 0.05 and 0.1. The HP and FHP were covaried with the metabolizable energy intake.

Results

Despite the linear increase in MetHb levels ($P < 0.05$, Table 2), the animals showed no symptoms of intoxication. The other blood parameters did not differ with nitrate inclusion ($P > 0.05$).

Table 2. Blood effects of encapsulated calcium nitrate

Item	ECN ¹			SEM	P-value	
	ECN0(SBM)	ECN1.25	ECN2.5		Lin	Quad
MetHb, %	0.63	0.70	0.77	0.06	0.02	0.99
pCO ₂ , mmHg	46.8	47.0	46.8	1.6	0.90	0.80
pO ₂ , mmHg	35.8	36.9	34.9	1	0.42	0.10
cHCO ₃ ⁻ , mmol/L	27.23	27.42	27.13	0.72	0.82	0.54
Ca ₂ ⁺ , mmol/L	1.15	1.17	1.17	0.05	0.16	0.46
pH	7.4	7.4	7.4	0.009	0.17	0.42

¹Encapsulated calcium nitrate was manufactured by GRASP Ind. & Com. LTDA and EWJNutrition GmbH; 5.6% DM; 17.6% N, 19.6% Ca, and 71.4% NO₃⁻ on a DM basis. The source of nitrate was the double salt of calcium ammonium nitrate decahydrate [5Ca(NO₃)₂·NH₄NO₃·10H₂O] (Lee et al., 2015);

During the experimental period, body weight (BW) was not significantly influenced ($P > 0.05$) by the inclusion of nitrate in diets (Table 3). As a percentage of body weight, the DMI showed a quadratic effect ($P < 0.05$).

The DMI ($P = 0.0034$), organic matter intake (OMI; $P = 0.0036$), NDF intake ($P = 0.0025$), ADF intake ($P = 0.0034$) and GE intake ($P = 0.004$) showed a quadratic effect (Table 3). The relationship between DMI and ECN inclusion (Eq. (14),

P=0.023, RMSE=54.6) indicated that the maximum intake occurred with the inclusion of 0.95 % ECN.

$$\text{DMI} = 1250.1 \pm 72.7 + 133.2 \pm 52.3 \times \text{ECN} - 70.7 \pm 20.1 \times \text{ECN}^2 \quad (12)$$

Where DMI = dry matter intake, in g/d; ECN = inclusion of encapsulated calcium nitrate, in % of dry matter.

The DM, OM and GE digestibility was not different among treatments (P>0.05). The NDF and ADF digestibility increased with the inclusion of nitrate (linear effect; P≤0.05).

Table 3. Effects of encapsulated calcium nitrate (ECN) on intake and total-tract apparent digestibility in growing goats

Item	ECN ¹			SEM	P-value	
	ECN0(SBM)	ECN1.25	ECN2.5		Lin	Quad
BW, kg	30.95	31.12	30.71	3.62	0.5	0.30
DMI_BW, %	4.09	4.04	3.52	0.41	0.0002	0.03
Intake (g/d)						
DM	1250.1	1306.1	1141	72.7	0.0094	0.0034
OM	1189.4	1239.3	1080.5	69.9	0.0068	0.0034
NDF	398.18	425.3	381.37	19.7	0.15	0.0025
ADF	175.9	189.1	170.2	11.3	0.29	0.0034
GE, MJ/d	21.4	22.0	19.0	1266.3	0.0015	0.004
Digestibility						
DM	0.774	0.784	0.785	0.01	0.35	0.64
OM	0.818	0.835	0.823	0.02	0.69	0.14
NDF	0.616	0.660	0.662	0.01	0.02	0.21
ADF	0.540	0.600	0.591	0.02	0.04	0.10
GE	0.776	0.787	0.784	0.02	0.55	0.55

¹Encapsulated calcium nitrate was manufactured by GRASP Ind. & Com. LTDA and EW|Nutrition GmbH; 85.6% DM; 17.6% N, 19.6% Ca, and 71.4% NO₃⁻ on a DM basis. The source of nitrate was the double salt of calcium ammonium nitrate decahydrate [5Ca(NO₃)₂·NH₄NO₃·10H₂O] (Lee et al., 2015).

The N intake decreased linearly (P<0.05) while N as nitrate (N – NO₃⁻) consumption increased at decreasing rate (quadratic effect; P < 0.006) with the increasing inclusion of ECN (Table 5). Excretion of fecal N was not influenced by treatments as well the excretion of N – NO₃⁻ in feces (P>0.05). The total N and N – NO₃⁻ excreted in urine did not differ among treatments (P>0.05). The total N retained decreased linearly (P<0.05) with the inclusion of ECN on DM, however the ratio between N retained and N intake did not differ among treatments (P>0.05). Microbial protein synthesis did not differ between treatments (P>0.05).

Table 4. Effects of encapsulated calcium nitrate (ECN) on N digestibility and N utilization in growing goats

Item	ECN ¹			SEM	<i>P</i> -value	
	ECN0(SBM)	ECN1.25	ECN2.5		Lin	Quad
g/d						
N intake	21.17	20.48	17.00	0.97	<0.0001	0.054
N-NO ₃ intake	0.16	2.93	5.15	0.14	<0.0001	0.006
N-NO ₂ intake	0.02	0.02	0.02	0.004	0.13	0.09
N-feces	6.46	6.53	5.81	0.38	0.16	0.30
N digestibility	0.692	0.688	0.660	0.014	0.05	0.40
N-NO ₃ feces	0.038	0.045	0.04	0.004	0.65	0.09
N-urine	5.03	4.76	4.56	0.77	0.29	0.94
N-NO ₃ urine	0.002	0.002	0.002	0.001	0.36	0.09
N retained	10.11	9.01	6.66	0.77	<0.0001	0.30
N retained_N intake	0.45	0.45	0.40	0.05	0.16	0.47
MicP, g/d	127.3	136.3	132.0	15.3	0.82	0.70
MicP, g/kg DOMI	13.06	13.35	13.80	1.73	0.69	0.96

¹Encapsulated calcium nitrate was manufactured by GRASP Ind. & Com. LTDA and EW|Nutrition GmbH; 5.6% DM; 17.6% N, 19.6% Ca, and 71.4% NO₃⁻ on a DM basis. The source of nitrate was the double salt of calcium ammonium nitrate decahydrate [5Ca(NO₃)₂·NH₄NO₃·10H₂O] (Lee et al., 2015).

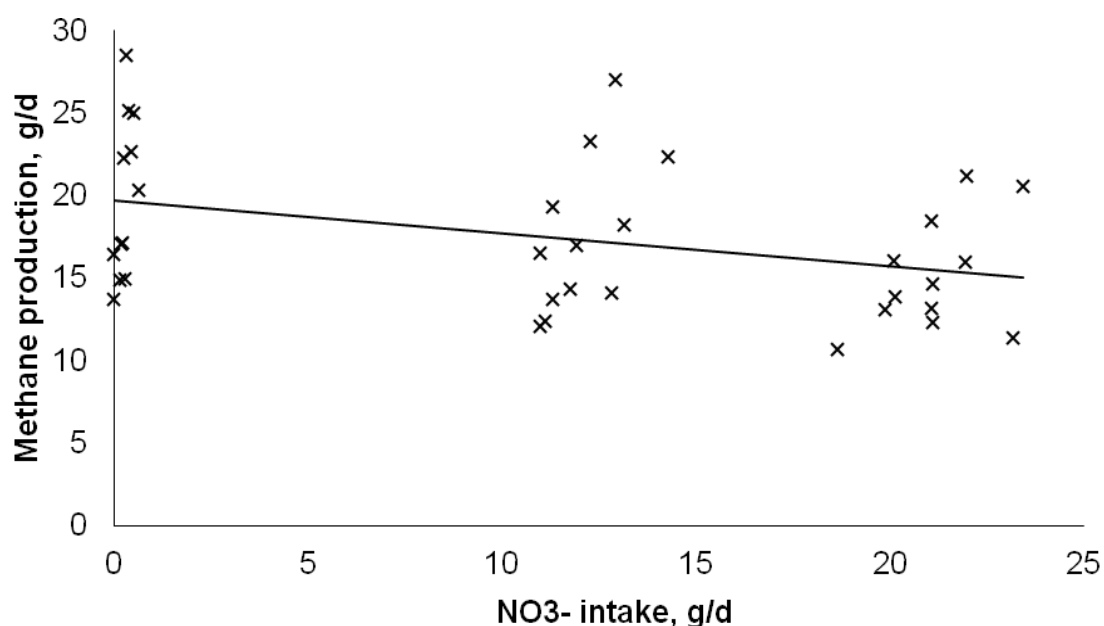
During gas exchange measurements, the DMI decreased at increasing rate (quadratic effect; $P=0.06$, Table 5). The daily enteric methane production decreased linearly ($P=0.0015$) with the inclusion of ECN on DM, and a production of methane in relation to consumption has a tendency to reduce linearly. ($P=0.06$).

Table 5. Effects of ECN on enteric CH₄ emissions and CH₄ emission per kilogram of DMI in growing goats

Item	ECN ¹			SEM	<i>P</i> -value	
	ECN0(SBM)	ECN1.25	ECN2.5		L	Q
DMI	1223	1235	1051	52.1	0.0002	0.006
CH ₄ , g/d	19.83	17.53	15.11	1.98	0.0015	0.958
CH ₄ , g/kg DMI	16.18	14.17	14.26	1.32	0.06	0.22

¹Encapsulated calcium nitrate was manufactured by GRASP Ind. & Com. LTDA and EW|Nutrition GmbH; 85.6% DM; 17.6% N, 19.6% Ca, and 71.4% NO₃⁻ on a DM basis. The source of nitrate was the double salt of calcium ammonium nitrate decahydrate [5Ca(NO₃)₂·NH₄NO₃·10H₂O] (Lee et al., 2015).

The figure 1 shows the interaction between nitrate consumption and methane production. The emission of methane reduced 0.21 g for each g of nitrate intake.



Fig

Figure 1: Relationship between nitrate intake (NO_3 , g/d) and methane production (CH_4) in growing goats fed encapsulated calcium nitrate. CH_4 , g/d = $19.82 \pm 1.98 - 0.21 \pm 0.057 \times \text{NO}_3$ intake, g/d; $P = 0.0098$, RMSE = 2.95.

The GEI, DEI and MEI showed a quadratic effect ($P < 0.05$, Table 6). The energy as methane reduced linearly ($P = 0.06$) and the urinary energy showed a quadratic effect ($P = 0.09$). The HP was not influenced by treatments ($P > 0.05$) and FHP reduced linearly with increasing of nitrate levels ($P < 0.05$).

Table 6. Effects of ECN on energy balance in growing goats

Item	ECN ¹			SEM	P-value	
	ECN0(SBM)	ECN1.25	ECN2.5		Lin	Quad
Energy balance, kJ/kgBW ^{0.75}						
GEI	1734	1739	1523	158	<0.001	0.02
DEI	1352	1370	1197	144	<0.001	0.01
MEI	1206	1214	1046	120	0.001	0.01
q	0.686	0.698	0.687	0.009	0.95	0.21
GE_CH ₄	133	131	122	27	0.06	0.47
GE_feces	364	368	326	19	0.16	0.31
GE_urine	13.24	24.07	20.75	4.72	0.12	0.09
HP	519	518	513	68	0.91	0.95
FHP	245	214	191	34	<0.001	0.71
RE	1206.84	1214.94	1046.03	119.60	<0.001	0.112

¹Encapsulated calcium nitrate was manufactured by GRASP Ind. & Com. LTDA and EW|Nutrition GmbH; 85.6% DM; 17.6% N, 19.6% Ca, and 71.4% NO_3^- on a DM basis. The source of nitrate was the double salt of calcium ammonium nitrate decahydrate [$5\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{NH}_4\text{NO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$] (Lee et al., 2015).

The oxidation of protein (OXF) and fat (OXF) reduced linearly ($P < 0.05$) with treatments while the energy of carbohydrate oxidation (OXCHO) did not differ ($P > 0.05$, Table 7). As percent of heat production, the protein oxidation did not differ between treatments ($P > 0.05$), the oxidation of carbohydrate increased and fat decreased linearly ($P < 0.05$). The heat production from oxidation and non-protein respiratory quotient decreased linearly ($P < 0.05$) with treatments.

Table 7. Oxidation of protein, carbohydrate and fat and non-protein respiratory quotient of growing goats

Item	ECN ¹			SEM	P-value	
	ECN0(SBM)	ECN1.25	ECN2.5		Lin	Quad
OXF ² , kJ/kg BW ^{0.75}	42.22	42.54	34.65	3.83	0.04	0.18
OXCHO ³ , kJ/kgBW ^{0.75}	303.62	268.06	268.39	115	0.33	0.55
OXF ⁴ , kJ/kgBW ^{0.75}	217.34	191.61	157.69	23.1	0.0064	0.79
HEX ⁵ , kJ/kgBW ^{0.75}	536.33	504.70	441.71	98.90	0.003	0.44
OXF_HEX (%) ⁶	9.20	9.70	9.00	0.02	0.87	0.47
OXCHO_HEX (%) ⁷	45.30	48.50	52.10	0.14	0.009	0.91
OXF_HEX (%) ⁸	45.70	41.80	38.00	0.13	0.008	0.97
RQnpx ⁹	0.85	0.86	0.87	0.04	0.006	0.98

¹Encapsulated calcium nitrate was manufactured by GRASP Ind. & Com. LTDA and EW|Nutrition GmbH; 5.6% DM; 17.6% N, 19.6% Ca, and 71.4% NO₃⁻ on a DM basis. The source of nitrate was the double salt of calcium ammonium nitrate decahydrate [5Ca(NO₃)₂·NH₄NO₃·10H₂O] (Lee et al., 2015);^{2,3,4}Oxidation of protein, carbohydrate and fat, respectively; ⁵Heat production from oxidation covaried with metabolizable energy intake. ^{6,7,8}Oxidation of protein, carbohydrate and fat in relation to heat production, respectively; ⁹Non-protein respiratory quotient.

Discussion

Recently, encapsulated calcium nitrate has been pointed as an alternative to mitigate enteric methane, because nitrate can act as a hydrogen sink in the rumen, deviating available hydrogen from methanogens to synthesize methane (Lee and Beauchemin, 2014). Therefore, to establish optimum strategies for using nitrate supplements safely and effectively, this study evaluated the impact of feeding encapsulated calcium nitrate as a substitute for soybean meal on energy and protein metabolism of growing goats.

One of the limitations of nitrate use is its toxic effect due to limited capacity of the rumen microbes in converting the nitrate to ammonia via nitrite as an intermediate, resulting in an accumulation of nitrate and nitrite in the rumen that is absorbed through the rumen wall (Nolan et al., 2010; van Zijderveld et al., 2011; El-Zaiat et al., 2014). Consequently, nitrite in blood binds to red blood cells and changes the ferrous form of hemoglobin to the ferric form, called MetHb (Lee and

Beauchemin, 2014), preventing hemoglobin of carrying oxygen and causing various clinical symptoms. Thus, as previously reported (Lee et al., 2015; Benu et al., 2017), the blood levels of MetHb increase with the inclusion of nitrate. However, despite of the increase of MetHb levels with the augment of ECN inclusion in this study, no intoxication effect was detected since the animals were previously submitted to an adaptation period for the product (Zhou et al., 2012). Moreover, encapsulated nitrate is characterized by a slower release in the ruminal environment (El-Zaiat, 2013), which also have contributed for the lack of intoxication symptoms.

Besides MetHb, other blood parameters are also important to attest animal health. The blood pH is a factor of great biological importance as it will directly influence the enzymatic activity. For this reason, the body has lines of defense against changes in this parameter. The pH remained within normal values, as previously reported for animals fed 1% of NO_3^- of DMI (Benu et al., 2017). Both HCO_3^- and pCO_2 constitute the most important buffer system in the body since they are found in high concentrations and are regulated by the kidneys and lungs, respectively (Carlson and Bruss, 2008). In this study, the inclusion of ECN in the diet did not affect blood concentrations of HCO_3^- and pCO_2 , corroborating the results reported by Benu et al. (2017).

The lack of difference in HP between treatments was discussed in a previous study with cows fed nitrate-based diet compared with urea-based diet, in which an elevated hydrogen production was reported, given that enteric hydrogen production is another loss of energy, which is not accounting in the Brower equation (van Zijderveld et al., 2011). Moreover, the reduction in FHP might suggest a possible residual nitrate effect. Nitrate is naturally present in green vegetables and studies with humans have shown that individuals supplemented with nitrate present a reduction in mitochondrial O_2 consumption indicating a higher efficiency of conversion of O_2 and oxidized substrates to the production of ATP (Larsen et al., 2011). Nitrous oxide may indirectly optimize oxidative phosphorylation by the partial inhibition of cytochrome c oxidase which will reduce proton leakage, maintaining ATP production at a higher degree than O_2 consumption, increasing the rate of ATP produced by O_2 consumed (Larsen et al., 2012). We can conclude then that nitrate is

not limited only to ruminal performance, but also at the cellular level. In humans, dietary nitrate is absorbed at the plasma level from the stomach and small intestine and then recycled through saliva (Duncan et al., 1995; Tannenbaum et al., 1976; Spiegelhalter et al., 1976). Our hypothesis is that the nitrate ingested, after being absorbed by the ruminal wall, will be metabolized and absorbed in the tissues as nitrous oxide, which acts to increase mitochondrial energy efficiency. Future studies evaluating gas exchanges at the mitochondrial level in ruminants would be of interesting application for a better understanding of the performance of nitrous oxide.

Several studies have shown that the inclusion of nitrate in the diet of ruminants has a depreciative effect on DMI (van Zijderveld et al., 2011; Hulshof et al., 2012; El-Zaiat et al., 2014; Newbold et al., 2014; Lee et al., 2015). Corroborating with these studies, we observed that the inclusion above 9.5 g ECN/kg DM caused a reduction in nutrient intake, suggesting that the maximum inclusion level for goats is lower than the inclusion level for cattle where studies only reported reduction in consumption above 20 g NO_3^- /kg DM (Hulshof et al., 2012; Lee et al., 2015). Despite the depreciative effect of consumption, DMI proportional to BW for all treatments was slightly higher than that proposed for growing goats (AFRC, 1998; NRC, 2007), suggesting that intake was not a limiting aspect in the use of ECN in this study, irrespective of its inclusion level.

Very few studies have shown the effect of nitrate inclusion on nutrient digestibility coefficients and some of them did not observe differences (Nolan et al., 2010; Li et al., 2012). In this study, however, we reported differences in nutrient digestibility coefficients, mainly regarding nitrogen (ECN0(SBM) = 0.692; ECN1.25 = 0.688; ECN2.5 = 0.660. $P = 0.02$) and NDF (ECN0(SBM) = 0.616; ECN1.25 = 0.660; ECN2.5 = 0.662. $P = 0.05$).

On the other hand, this study agrees with others reporting that fiber apparent digestibility increased with the inclusion of non-protein nitrogen (NPN) sources (Costa et al., 2008; Detmann et al., 2011). The different N source may limit the availability of microbial fibrolytic enzymes in the rumen and therefore a nitrogen supplementation may provide a greater amount of N for the synthesis of microbial enzymes (Detmann et al., 2009). Although previous studies have reported a reduction in ammonia-N

concentration with the inclusion of nitrate (El-Zaiat et al., 2014; Lee et al., 2015), this reduction did not limit the microbial protein synthesis in the rumen as ammonia-N levels were within the range required for ruminal microorganisms. In fact, we also did not observe differences in microbial protein synthesis between diets with or without ECN. Additionally, ammonia-N is the main source of N for microorganisms that degrade structural carbohydrates (Berchielli et al., 2011), which might have contributed to the linear increase in NDF digestibility with the inclusion of ECN in this study

The lack of effect of ECN diets compared to soybean meal diets on microbial protein synthesis, even though ECN diets resulted in a decrease in CP intake might suggest that ECN was efficiently used as an N source to promote microbial growth in the rumen. Studies with sheep have shown that the N-capture efficiency is higher in animals supplemented with nitrate when compared to animals supplemented with urea (Nolan et al., 2010; Li et al., 2012). The synthesis of MicP is directly related to the synchronism between energy and protein in rumen. Oliveira et al. (2010) reported an improvement in the efficiency of microbial N (MicN) synthesis with inclusion up to 4% of NPN in DM in the diet of lactating cows and a reduction in efficiency with levels between 6 and 8% of NPN in DM. In our study, using about 2% on DM of N from ECN, the synthesis of MicN was not affected.

Although we observed a linear reduction in N retention, the ratio between Nretained and Nintake did not differ between treatments (averaging 43%) and values were close to those reported for sheep supplemented with 1.5 and 3% DM of urea and calcium nitrate, respectively (Li et al., 2005). In general, small ruminants showed higher ratio between Nretained and Nintake when compared to cattle whose reported value was 16% (Lee et al., 2015).

As previously reported (Nolan et al. 2010; van Zijderveld et al., 2010; Hulsholf et al., 2012; Li et al., 2012, 2013; El-Zaiat et al., 2014; Lee et al., 2015), nitrate supplementation reduces methane emissions. Nitrate and its reduced products, such as nitrite, nitric oxide and nitrous oxide, lead to suppression in methane production (Clarens et al., 1998; Kluber and Conrad, 1998; El-Mahrouki and Watson-Craik, 2004). According to Kaspar and Tiedje (1981), the apparent non-enzymatic

production of nitrogen oxides when nitrate metabolism occurs in the rumen implies the control of methanogenesis. Upon reaching the ruminal environment, nitrate undergoes two stages of reduction (Leng, 2008) until it is reduced to ammonia.

In this process, the use of free electrons in the ruminal environment, characterizing the nitrate as a sink of electrons. Stoichiometrically, 1 mol of NO_3 should reduce 1 mol of CH_4 . Our data showed a reduction of 0.21g of CH_4 per g of NO_3 consumed, showing an efficiency of 81% of the product. The literature reports an average efficiency of 84.5% (minimum 59%, maximum 97.5%), varying with the type of product used (Nolan et al., 2010; van Zijderveld et al., 2010; Li et al., 2012; El-Zaiat et al., 2014). It is pertinent to point out that there was a lower emission of methane with the inclusion of ECN in relation to the DMI, isolating the effect of the reduction in the DMI and evidencing the effect of the nitrate on the effective decrease of the methane emission.

As previously described, nitrate acts in the rumen as a sink of free electrons. However, other studies have pointed out that its mode of action has not been already fully defined, proposing that nitrate can also act by reducing the number of methanogenic microorganisms in the rumen due to the toxicity of its reduced elements such as nitrite, nitric oxide and nitrous oxide (Klüber and Conrad, 1998). Previous *in vitro* studies have demonstrated nitric and nitrous oxide almost completely inhibited the action of *Methanobacterium bryantii* and *Methanosarcina barkeri* (Clarens et al., 1998; Klüber and Conrad, 1998).

Similar to DMI, the DE and ME intake was maximized up the inclusion of approximately 1% ECN on DM. A previous study also reported a quadratic effect of ECN inclusion on DEI and MEI, but the intake was maximized up the inclusion of approximately 2% DM for beef heifers (Li et al., 2012), suggesting that goats are more sensitive to nitrate than cattle, as aforementioned. We can observe a reduction in the energy lost in the form of methane, although in relation to the GEI this difference was not significant - on average 7% of energy was lost in all the treatments. The energy loss as methane varied between 2 to 15% depending on the diet ingested by the animals (Harper et al., 1999; Johnson and Johnson, 1995; Crutzen, 1986; Blaxter and Clapperton, 1965).

In ruminants, the total CO₂ production comes from the oxidation of the nutrients and the fermentation process, so that a separation is necessary in order to calculate the energy coming from the oxidation of the substrates (Chwalibog et al., 1997). The OXP is directly related to diet. It is observed that with the increase in nitrate levels, there was a reduction in the true protein supply of the diet and therefore a reduction in OXP. The OXCHO and OXF values are linked to the level of fermentation. With the reduction in fermentation, evidenced by the lower values of methane produced with the increase in nitrate content in the diet, a greater amount of glucose will be oxidized as OXCHO while a smaller amount of carbohydrate will be converted to SCFA and oxidized as OXF, as we can observe with highest OXCHO and lowest OXF in relation to HEx. The results in the oxidation values reiterate the results related to a lower emission of methane with the addition of nitrate.

The effect of nitrate in reducing methane emission in ruminants is visible regardless of animal species. In addition, considering protein as a high-cost nutrient in diets, the use of encapsulated calcium nitrate was beneficial because despite the reduction of true protein in the diet no effects were observed on the synthesis of microbial N. The effect of the inclusion of encapsulated calcium nitrate in fasting heat production opens the door for future studies to evaluate the inclusion of the product in the reduction of basal metabolism and consequently reduce the maintenance requirements of the animals.

Conclusions

The inclusion of approximately 1% of ECN on DM results in a maximum DE and ME intake. Also the FHP is lower with ECN inclusion showing a residual effect on growing goats. No effect is observed in MicN synthesis. Moreover, the substrate oxidation shows a lower concentration of SCFA being oxidized with ECN supplementation.

References

- AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL - AFRC. 1998. Technical Committee on Responses to Nutrients, Report 10. **The nutrition of goats**. Aberdeen: Agricultural Food Research Council. v.67, n.11.
- AOAC. 1990. Official methods of analysis. 15th ed. **Association of Official American Chemistry**, Arlington, VA
- Blaxter, K. L.; Clapperton, J. L. 1965. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. **British Journal Nutrition**. v. 19, n. 1, p. 511.
- Benu, I.; Fizpatrick, L. A.; Callaghanc, M. J.; Tomkis, N.; and Parker, A. J. 2017. The effect of nitrate supplementation on arterial blood gases, haemoglobin fractions and heart rate in *Bos indicus* cattle after exercise **Animal Productin Science**. <http://dx.doi.org/10.1071/AN16162>
- Berchielli, T. T; Messana, J. D.; Canesin, R. C.; 2012. Produção de metano entérico em pastagens tropicais. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.**, Salvador, v.13, n.4, p.954-968 out./dez., 2012 <http://www.rbspa.ufba.br> ISSN 1519 9940
- Berchielli, T. .; Pires, A. V.; Oliveira, S. G.de; 2011. Nutrição de Ruminantes. 2ed. Jaboticabal: Funep. p. 193 – 234, 265 – 292, 323 – 344.
- Brouwer, E. 1965. Report of sub-committee on constants and factors. In: K. L. Blaxter (ed.) 3rd **Symposium Energy Metabolism**. No. 11. p 441-443. EAAP Publ., London, UK.
- Carlson G.P. & Bruss M. 2008. Fluid, electrolyte and acid-base balance, p.529-559. In: Kaneko J.J. (Ed.), *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6th ed. Academic Press, San Diego.
- Carlstrom, M., Larsen, F.J., Nystrom, T., Hezel, M., Borniquel, S., Weitzberg, E., and Lundberg, J.O. 2010. Dietary inorganic nitrate reverses features of metabolic syndrome in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 107, 17716–17720.

Chen, X. B., Gomes, M. J. 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives - an overview of the technical details. Rowett Research Institute, Bucksburn, Aberdeen AB2 9SB, UK.

Chwalibog, A., A. H. Tauson, and G. Thorbek. 1997. Quantitative oxidation of nutrients in growing calves. *Zeitschrift Fur Ernährungswissenschaft* 36: 313-316.

Clarens, M., Bernet, N., Delgenès, J.-P. and Moletta, R. 1998. Effects of nitrogen oxides and denitrification by *Pseudomonas stutzeri* on acetotrophic methanogenesis by *Methanosarcina mazei*. *FEMS Microbiology Ecology*, 25: 271–276. doi:10.1111/j.1574-6941.1998.tb00479.x

Costa, V.A.C.; Detmann, E.; Valadares Filho, S.C. 2008. Degradação in vitro da fibra em detergente neutro de forragem tropical de baixa qualidade em função de suplementação com proteína e/ou carboidratos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.494-503.

Crutzen, P. J.; Aselmann, I.; Seiler, W. 1986. Methane production by domestic animals, wild ruminants, other herbivorous fauna, and humans. *Tellus*, Hoboken, v. 388, n. 3-4, p. 271-284.

de Raphelis-Soissan, V. et al. 2014. Use of nitrate and *Propionibacterium acidipropionici* to reduce methane emissions and increase wool growth of Merino sheep. **Animal Production Science** 54: 1860-1866.

Detmann, E.; Queiroz, A. C. de; Zorzi, K.; Mantovani, H. C.; Bayão, G. F. V.; Gomes, M. P. C. 2011. Degradação *in vitro* da fibra em detergente neutro de forragem tropical de baixa qualidade em função da suplementação com proteína verdadeira e/ou nitrogênio não proteico. **R. Bras. Zootec.**, v.40, n.6, p.1272-1279.

Detmann, E.; Paulino, M.F.; Mantovani, H.C. 2009. Parameterization of ruminal fibre degradation in low-quality tropical forage using Michaelis-Menten kinetics. **Livestock Science**, v.126, p.136-146.

Diener. J. R. C. 1997. Calorimetria indireta. **Rev Ass Med Brasil**. 43(3): 245-53

Duncan C, Dougall H, Johnston P, Green S, Brogan R, Leifert C, Smith LM, Golden M, Benjamin N (1995) Chemical generation of nitric oxide in the mouth from the enterosalivary circulation of dietary nitrate. **Nat Med** 1:546–551

El-Mahrouki, IML, Watson-Craik IA (2004) The effects of nitrate and nitrate-supplemented leachate addition on methanogenesis from municipal solid waste. **J Chem Technol Biotechnol** 79:842-850

El-Zaiat, H. M. M. et al. 2014. Encapsulated nitrate and cashew nut shell liquid on blood and rumen constituents, methane emission, and growth performance of lambs. **Journal of Animal Science** 92: 2214-2224.

El-Zaiat, H. M. M. 2013. Efeito da inclusão de nitrato na dieta sobre a fermentação ruminal, emissão de metano entérico e o desempenho de ovinos. 2013. 126f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.

Fernandes, M. H. M. da; Lima, A. R. C.; Almeida, A. K.; Borghi, T. H.; Teixeira, I. A. M. A.; Resende, K. T. 2016. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. DOI: 10.1111/jpn.12512

Gladwin, M.T., Schechter, A.N., Kim-Shapiro, D.B., Patel, R.P., Hogg, N., Shiva, S., Cannon, R.O., 3rd, Kelm, M., Wink, D.A., Espey, M.G., et al. 2005. The emerging biology of the nitrite anion. **Nat. Chem. Biol.** 1, 308–314.

Goering, H.K.; Van Soest, P.J. 1970. Forage fiber analysis (Apparatus, reagents, procedures and some applications). Washington, DC: USDA. (Agricultural Handbook, 379).

Harper, L. A.; Denmead, O. T.; Freney, J. R.; Byers, F. M. 1999. Direct measurements of methane emissions from grazing and feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 77, p. 1392-1401.

Hulshof, R. B. A., A. Berndt, W. J. J. Gerrits, J. Dijkstra, S. M. van Zijderveld, J. R. Newbold, and H. B. Perdok. 2012. Dietary nitrate supplementation reduces methane

emission in beef cattle fed sugarcane based diets. **Journal of Animal Science** 90:2317–2323.

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

Kaspar, H. F., & Tiedje, J. M. 1981. Dissimilatory reduction of nitrate and nitrite in the bovine rumen: Nitrous oxide production and effect of acetylene. **Applied and Environmental Microbiology**, 41(3), 705-709.

Klüber HD, Conrad R 1998. Inhibitory effects of nitrate, nitrite, NO, and N₂O on methanogenesis by *Methanosarcina barkeri* and *Methanobacterium bryantii*. **FEMS Microbiol Ecol** 25:331-339.

Larsen, F.J., Ekblom, B., Sahlin, K., Lundberg, J.O., and Weitzberg, E. 2006. Effects of dietary nitrate on blood pressure in healthy volunteers. **N. Engl. J. Med.** 355, 2792–2793.

Larsen, F. J.; Schiffer, T. A.; Borniquel, S.; Sahlin, K.; Ekblom, B.; Lundberg, J. O.; and Weitzberg, E. 2011. Dietary Inorganic Nitrate Improves Mitochondrial Efficiency in Humans. **Cell Metabolism** 13, 149–159, February 2.

Larsen S.; Nielsen, J.; Hansen, C. N.; Nielsen, L. B.; Wibrand, F.; Stride, N.; Schroder, H. D.; Boushel, R.; Wulff, J.; Dela, F.; Hey-Mogensen, M. 2012. Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. **Journal of physiology.** 590:3349–3360. doi: 10.1113/jphysiol.2012.230185

Lee, C and Beauchemin, K. A. 2014. A review of feeding supplementary nitrate to ruminant animals: nitrate toxicity, methane emissions, and production performance. **Canadian Journal of Animal Science**, 2014, 94(4): 557-570, 10.4141/cjas-2014-069

Lee, C., R. C. Araujo, K. M. Koenig, and K. A. Beauchemin. 2015a. Effects of feed consumption rate of beef cattle offered a diet supplemented with nitrate ad libitum or restrictively on potential toxicity of nitrate. **Journal of Animal Science** 93: 9435

Lee, C., R. C. Araujo, K. M. Koenig, and K. A. K. A. Beauchemin. 2015b. Effects of encapsulated nitrate on enteric methane production and nitrogen and energy utilization in beef heifers **Journal of Animal Science**: 2391-2404

Leng R. A. 2008. The potential of feeding nitrate to reduce enteric methane production in ruminants. Report to Department of Climate Change, Commonwealth Government, Canberra. 82 pp.

Li, L., J. Davis, J. Nolan, and R. Hegarty. 2012. An initial investigation on rumen fermentation pattern and methane emission of sheep offered diets containing urea or nitrate as the nitrogen source. **Animal Production Science** 52:653–658.

Li, L. et al. 2013. Effect of added dietary nitrate and elemental sulfur on wool growth and methane emission of Merino lambs. **Animal Production Science** 53: 1195-1201.

Lundberg, J.O., Weitzberg, E., and Gladwin, M.T. 2008. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nat. Rev. Drug Discov.** 7, 156–167.

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

McLean, J. A., and G. Tobin. 2007. *Animal and Human Calorimetry*. Cambridge University Press.

Newbold, J. R. et al. 2014. The effect of incremental levels of dietary nitrate on methane emissions in Holstein steers and performance in Nelore bulls. **Journal of Animal Science** 92: 5032-5040.

Nolan, J. V., R. S. Hegarty, J. Hegarty, I. R. Godwin, and R. Woodgate. 2010. Effects of dietary nitrate on fermentation, methane production, and digesta kinetics in sheep. **Animal Production Science** 50:801–806.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. Nutrient requirements of small ruminants. 2007, 362p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. Nutrient requirements of dairy cattle. 1989. 6.rev.ed. Washinton, D.C. 157p.

Oliveira, L.O.F.; Saliba, E.O.S.; Gonçalves, L.C. 2010.. Digestibilidade *in situ* e cinética ruminal de bovinos de corte a pasto sob suplementação com proteinados. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v.39, n.6, p.1328-1335.

Spiegelhalter B, Eisenbrand G, Preussmann R. 1976. Influence of dietary nitrate on nitrite content of human saliva: possible relevance to *in vivo* formation of N-nitroso compounds. **Food Cosm Toxicol** 14:545–548

Tannenbaum SR, Weisman M, Fett D. 1976. The effect of nitrate intake on nitrite formation in human saliva. **Food and Cosm Toxicol** 14:549–552

van Faassen, E.E., Bahrami, S., Feelisch, M., Hogg, N., Kelm, M., Kim-Shapiro, D.B., Kozlov, A.V., Li, H., Lundberg, J.O., Mason, R., et al. 2009. Nitrite as regulator of hypoxic signaling in mammalian physiology. **Med. Res. Rev.** 29, 683–741.

van Zijderveld, S. M. 2011. Dietary strategies to reduce methane emissions from ruminants. PhD Thesis. Wageningen Univ., Wageningen, the Netherlands.

Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science** 74.

Zhou, Z. M., Z. T. Yu, and Q. X. Meng. 2012. Effects of nitrate on methane production, fermentation, and microbial populations in *in vitro* ruminal cultures. **Bioresource Technology** 103: 173-179.