

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

INFLUÊNCIA DE NITRATO ENCAPSULADO E ENXOFRE NA
DIETA SOBRE METABOLISMO E EMISSÃO DE METANO EM
BOVINOS

Lucas Rocha Rebelo

Zootecnista

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**INFLUÊNCIA DE NITRATO ENCAPSULADO E ENXOFRE NA
DIETA SOBRE METABOLISMO E EMISSÃO DE METANO EM
BOVINOS**

Lucas Rocha Rebelo

Orientadora: Profa Dra. Telma Teresinha Berchielli

Co-orientadora: Dra. Juliana Duarte Messana

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do Título de Mestre em Zootecnia (Nutrição e Alimentação Animal).

2017

Rebelo, Lucas Rocha
R289i Influência de nitrato encapsulado e enxofre na dieta sobre
metabolismo e emissão de metano em bovinos / Lucas Rocha Rebelo.
– – Jaboticabal, 2017
ix, 58 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade
de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017

Orientadora: Telma Teresinha Berchielli

Co-orientadora: Juliana Duarte Messana

Banca examinadora: Márcia Helena M. R. Fernandes, Rafael
Canonenco de Araujo

Bibliografia

1. Metabolismo. 2. Nitrato encapsulado-enxofre. 3. Nelore. I. Título.
II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.084.52:636.2

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: INFLUÊNCIA DE NITRATO ENCAPSULADO E ENXOFRE NA DIETA
SOBRE METABOLISMO E EMISSÃO DE METANO EM BOVINOS**

AUTOR: LUCAS ROCHA REBELO

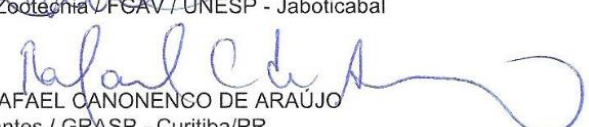
ORIENTADORA: TELMA TERESINHA BERCHIELLI

COORDINADORA: JULIANA DUARTE MESSANA

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


Pós-doutoranda JULIANA DUARTE MESSANA
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal


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

Jaboticabal, 19 de junho de 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LUCAS ROCHA REBELO - Nascido na cidade de Goiânia - GO, no dia 13 de junho de 1991, filho de Adonis Rebelo e Elaine Cristina Rocha Rebelo. Em fevereiro de 2010 ingressou no curso de Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso - MT, graduando-se em fevereiro de 2015. Em março de 2015, ingressou no curso de Mestrado em Zootecnia, na área de nutrição e alimentação de ruminantes na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista - Campus de Jaboticabal, sob a orientação da Profa. Dra. Telma Teresinha Berchielli. De outubro de 2016 a março de 2017 esteve envolvido em atividades de pesquisa no “Department of Animal Science - OARDC/OSU (Ohio Agricultural Research and Development Center/Ohio State University), Wooster, OH, USA”, sob a orientação do Prof. Dr. Chanhee Lee.

MENSAGEM

Demóstenes nasceu em Atenas em 384 a.C. Segundo relatos, no processo de aprimoramento de sua oratória ele usou práticas inusitadas. Para superar sua deficiência de fôlego, subia ladeiras declamando poemas. Para corrigir sua dicção, falava com seixos na boca. Para se acostumar com o burburinho das massas e não se distrair, discursava nas praias. Passou meses num porão copiando livros para incorporar palavras e ideias. O resultado foi que Demóstenes se tornou um dos maiores oradores de todos os tempos e provavelmente o maior da Grécia clássica.

Augusto Cury

Todos querem estar envolvidos, mas ninguém quer estar comprometido. Há uma grande diferença entre os dois. A próxima vez em que for comer ovos com bacon lembrem-se disso: a galinha estava envolvida, mas o porco estava comprometido!

James C. Hunter

Bons filhos se preparam para o sucesso, filhos brilhantes se preparam para enfrentar derrotas e frustrações. Bons alunos se preparam para receber um diploma, alunos fascinantes se preparam para a vida.

Augusto Cury

Quando você nasceu, você chorou e o mundo regozijou. Viva sua vida de tal maneira que, quando você morrer, o mundo chore e você se regozije.

Augusto Cury

Dedico

Aos meus pais Adonis Rebelo

e Elaine Cristina Rocha Rebelo,

à minha irmã Michelle Rocha Rebelo,

e a toda a minha Família.

Pelo exemplo de amor, força, diligência, companheirismo, moderação em todos os momentos, amizade e carinho que sempre demonstraram por mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus, tudo devemos.

Aos meus pais Adonis Rebelo e Elaine Cristina Rocha Rebelo, simplesmente pelo “tudo” que são para mim.

À toda minha família de Goiânia e Cuiabá, pela presença, generosidade, união, carinho, incentivo e pela grande contribuição na formação do meu eu.

À professora e orientadora Telma Teresinha Berchielli, pela orientação e que garantiu e dispensou a mim confiança e apoio necessário para o desenvolvimento de todas as minhas atividades de pesquisa.

À co-orientadora Juliana Duarte Messana, pela contribuição com este estudo.

À professora Izabelle A. M. A. Teixeira, pela contribuição e presença como membro integrante de algumas etapas de examinação deste estudo.

Ao Rafael Canonenco de Araujo, pela contribuição e atenção dispensada para com este estudo, e presença como membro da banca de examinação deste estudo.

À Márcia H. M. R. Fernandes, pela contribuição e presença como membro de algumas etapas de examinação deste estudo.

Aos professores Euclides Braga Malheiros e Jane M. B. Ezequiel pelas disciplinas ministradas, e conhecimentos transmitidos em suas respectivas aulas.

Aos meus amigos Vinícius Carneiro de Souza e Bruno Ramalho Vieira pelas boas experiências passadas juntos durante o mestrado, pelos inestimáveis e valiosos conselhos e troca de experiências.

À professora Rosemary Lais Galati e família pela amizade, por sempre estarem indiretamente presentes, apoiando e aconselhando com bons ensinamentos.

À Alícia Zem Fraga pela apoio e importante presença.

Aos amigos Irene C. Luna e Tiago Adriano Simioni, pela contribuição fundamental durante na condução deste estudo.

À Ana Paula Sader e Sr. Orlando, ambos funcionários do “LANA” do Depto. de Zootecnia, que estiveram presentes no período das análises laboratoriais, e sempre dispostos a ajudar quando foi necessário.

Aos funcionários da UNESP, e estagiários do setor de Digestibilidade e Avaliação de Alimentos da UNESP - FCAV, que contribuíram com este estudo.

Ao professor Chanhee Lee, pelo aceite em me receber sob a sua supervisão na instituição "The Ohio State University", pela contribuição com a melhoria da qualidade científica deste estudo, assim como pelas lições e ensinamentos.

Ao "CNPq" pela concessão da bolsa de estudos no primeiro ano do mestrado, e à "FAPESP" pela concessão da bolsa de estudos durante o segundo ano (Processo 2016/01562-0), assim como pela concessão da BEPE (Processo 2016/16848-7).

À "UNESP - FCAV", ao "LANA" do Depto. de Zootecnia, e ao setor Digestibilidade e Avaliação de Alimentos da UNESP - FCAV pelo aporte durante o estudo realizado.

À todos que são meus amigos, e que sempre estiveram torcendo por mim, dando votos de confiança. De tudo, vocês são extremamente importantes, uma vida sem amigos, é o mesmo que os peixes sem as águas. Cada momento, cada experiência, todas são de grande valor para a construção de uma vida.

Agradeço fortemente também por ter conhecido e convivido com o maquiavelismo incrustado em alguns seres vivos. De tudo, proporcionaram grande sabedoria e um experienciar antagônico.

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERÊNCIAS.....	19
CHAPTER 2 - ENCAPSULATED NITRATE PLUS ELEMENTAL SULFUR IMPROVES MICROBIAL PROTEIN SYNTHESIS AND REDUCE METHANE EMISSION WITHOUT TOXICITY RISKS IN NELLORE STEERS	30
ABSTRACT.....	30
1. INTRODUCTION.....	31
2. MATERIALS AND METHODS	32
<i>2.1. Animals and Experimental Design</i>	<i>32</i>
<i>2.2. Diets and Treatments</i>	<i>33</i>
<i>2.3. Feeding and Management.....</i>	<i>34</i>
<i>2.4. Data Collection and Sampling</i>	<i>35</i>
<i>2.5. Laboratory Analysis and Calculations.....</i>	<i>36</i>
<i>2.6. Statistical Analyses.....</i>	<i>38</i>
3. RESULTS.....	39
<i>3.1. Adaptation to the Encapsulated Nitrate</i>	<i>39</i>
<i>3.2. Nutrient Intake and Digestibility</i>	<i>40</i>
<i>3.3. Ruminal Fermentation</i>	<i>40</i>
<i>3.4. Nitrogen Utilization and Excretion.....</i>	<i>43</i>
<i>3.5. Enteric Methane Emission</i>	<i>44</i>
4. DISCUSSION	45
5. CONCLUSION	50
6. REFERENCES.....	50
APÊNDICE.....	57



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado **"Efeito de Nitrato encapsulado e enxofre sobre a fermentação ruminal, síntese de proteína microbiana e produção de metano em bovinos confinados"**, protocolo nº 15046/15, sob a responsabilidade da Profª Drª Telma Terezinha Berchielli, 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 07 de agosto de 2015.

Vigência do Projeto	30 de agosto de 2015 - 20 de dezembro de 2015
Espécie / Linhagem	Nelore e ½ Angus x ½ Nelore
Nº de animais	10
Peso / Idade	300
Sexo	Masculino
Origem	Fazenda Particular (compra)

Jaboticabal, 07 de agosto de 2015.


Profª Drª Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

LISTA DE ABREVIATURAS

AGVs - Ácidos graxos voláteis
aNDF - Neutral detergent fiber assayed with a heat stable amylase
ANOVA - Analysis of variance
ATP - Adenosina trifosfato / Adenosine triphosphate
BW - Body Weight
CH₄ - Metano
CNF - Carboidratos não fibrosos
CP - Crude protein
DM - Dry matter
DMI - Dry matter intake
DOMI - Digestible organic matter intake
EPMic - Eficiência de síntese de proteína microbiana
En - Nitrato encapsulado / Encapsulated nitrate
EN - Diet with encapsulated nitrate
ENS - Diet with encapsulated nitrate plus elemental sulfur
FDN - Fibra em detergente neutro
GE - Gross energy
Hb - Hemoglobina / Hemoglobin
H₂ - Hidrogênio
H₂S - Sulfeto de hidrogênio / Hydrogen sulfide
IMS - Ingestão matéria seca
IMOD - Ingestão de matéria orgânica digestível
MetHb - Metahemoglobina / Methemoglobin
MN - Microbial nitrogen
MO - Matéria orgânica
MPS - Microbial protein synthesis
MS - Matéria seca
N - Nitrogênio / Nitrogen
NDF - Neutral detergent fiber
NH₃ - Amônia / Ammonia
NH₃-N - Rumen ammonia nitrogen
N-NH₃ - Nitrogênio amoniacal ruminal
NNP - Nitrogênio não proteico
NPN - Non-protein nitrogen
NO₂⁻ - Nitrito / Nitrite
NO₃⁻ - Nitrato / Nitrate
NRC - National Research Council
OM - Organic matter
PB - Proteína bruta
PMet - Proteína metabolizável

PMic - Proteína microbiana
RDP - Rumen degradable protein
RUP - Rumen undegradable protein
S - Enxofre / Sulfur
SBM - Diet with soybean meal
S⁰ - Enxofre elementar
SF₆ - Sulfur hexafluoride
SO₄²⁻ - Sulfato
SD - Standard deviation
SEM - Standard error of the mean
U - Diet with urea
US - Diet with urea plus elemental sulfur
VFAs - Volatile fatty acids

LISTA DE TABELAS

CHAPTER 2

Página

Table 1. Proportion of ingredients and chemical composition of experimental diets.....	33
Table 2. Effect of encapsulated nitrate or urea with or without elemental sulfur on intake and apparent total-tract digestibility in Nellore steers.....	40
Table 3. Effect of encapsulated nitrate or urea with or without elemental sulfur on ruminal pH, NH ₃ -N, and VFAs in Nellore steers.....	41
Table 4. Nitrogen digestibility and utilization in Nellore steers fed diets containing encapsulated nitrate or urea with or without elemental sulfur.....	43
Table 5. Effect of encapsulated nitrate or urea with or without elemental sulfur on enteric methane emission in Nellore steers.....	44

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Página

Figura 1. Rotas metabólicas do NO_3^- em ruminantes.....	7
Figura 2. Estequiometria da redução de NO_3^- e CH_4	18

CHAPTER 2

Fig. 1. Sampling protocol during the experimental period.....	32
Fig. 2. Box plot of blood methemoglobin levels determined 3 h postfeeding during the adaptation period in blood of Nellore steers fed incremental levels of En in their diet.....	39
Fig. 3. Effect of encapsulated nitrate or urea with or without elemental sulfur on ruminal pH.....	41
Fig. 4. Effect of encapsulated nitrate or urea with or without elemental sulfur on ruminal N-NH_3	42
Fig. 5. Effect of encapsulated nitrate or urea with or without elemental sulfur on ruminal VFAs. The 0 h represents the collection before the morning feeding.....	42

INFLUÊNCIA DE NITRATO ENCAPSULADO E ENXOFRE NA DIETA SOBRE METABOLISMO E EMISSÃO DE METANO EM BOVINOS

RESUMO - Este estudo objetivou avaliar o efeito da substituição da fonte de proteína verdadeira e da ureia por nitrato encapsulado (En) e enxofre (S) elementar sobre consumo, digestibilidade, parâmetros ruminais, eficiência de síntese de proteína microbiana e emissão de CH₄ em bovinos Nelore. Foram utilizados cinco novilhos Nelore (352.7 ± 38.4 kg PV) canulados no rumen, e distribuídos em um delineamento em quadrado latino 5 × 5 (5 tratamentos e 5 períodos, 21 dias cada). O volumoso utilizado foi feno de Tifton 85 e o concentrado basal foi composto por milho, farelo de soja, e suplemento mineral comercial. Ureia, En e S foram adicionados para compor demais dietas. Os tratamentos foram: farelo de soja (SBM) como tratamento controle; ureia (U); U mais S elementar (US); nitrato encapsulado (EN); e EN mais S elementar (ENS). O En foi incluído nos tratamentos EN e ENS em 2% da MS (1,42% de NO₃⁻ ânion), enquanto que a inclusão de ureia nos tratamentos U e US foi de 0,8% na MS da dieta. A inclusão de S nos tratamentos U e EN foi em 0,24% da MS, e a relação N:S foi reduzida de 8:1 para 4:1 com a adição de S. O En foi incluído gradualmente de 0,5% até 2% da MS da dieta. Os contrastes ortogonais para avaliar os efeitos de tratamento foram: SBM vs. EN + ENS; U + US vs. EN + ENS; U vs. US; e EN vs. ENS. Os novilhos apresentaram baixos níveis de MetHb (média de 1,1%) a medida em que a quantidade de En foi aumentada. O consumo de OM e NDF foram menores ($P \leq 0,01$) para os animais alimentados com En comparado à SBM. A digestibilidade da DM, OM, e GE foram maiores ($P \leq 0,01$) quanto fornecido En comparado à ureia. O pH ruminal foi maior ($P = 0,01$) e N-NH₃ foi menor ($P = 0,01$) para animais recebendo En na dieta comparado à ureia. Comparado à ureia, o fornecimento de En causou redução ($P = 0,01$) na proporção de propionato, assim como aumento ($P \leq 0,03$) na proporção de acetato e na relação acetato:propionato. O consumo de N foi menor ($P \leq 0,07$) em animais alimentados com En comparado à SBM e ureia. O N retido (g N/d) foi menor ($P = 0,01$) com dietas com En comparado à SBM e ureia. Nitrogênio microbiano (MN; g MN/d) tendeu a aumentar ($P =$

0,06) com a inclusão de En comparado à SBM, e foi aumentado ($P \leq 0,04$) pela adição de S elementar à dietas com NNP. O fornecimento de dietas com En aumentou ($P \leq 0,01$) MN quando em proporção à ingestão de PB (CPI; g MN/kg CPI) e aumentou ($P = 0,02$) a eficiência de síntese de MN com base na ingestão de OM digestível (DOMI; g MN/kg DOMI) comparado à SBM, assim como tendeu a aumentar ($P = 0,09$) g MN/kg DOMI comparado à ureia. A adição de S elementar às dietas com NNP tendeu a aumentar ($P \geq 0,05$) g MN/kg CPI, e aumentou ($P = 0,04$) g MN/kg DOMI quando incluído na dieta EN. Animais alimentados com En tiveram redução ($P = 0,02$) na emissão de CH₄ em cerca de 31,2 g CH₄/d, e tenderam a reduzir ($P = 0,06$) a emissão de CH₄ em g CH₄/kg DMI e como % da GEI, quando comparados à SBM. Portanto, En mais S elementar em substituição parcial à proteína verdadeira da ração ou substituindo totalmente a ureia pode otimizar a eficiência de síntese de proteína microbiana e concomitantemente reduzir a emissão de CH₄ por bovinos Nelore.

Palavras-chave: bovinos, emissão de metano, enxofre, nitrato encapsulado, síntese de proteína microbiana

INFLUENCE OF ENCAPSULATED NITRATE AND SULFUR IN THE DIET ON METABOLISM AND METHANE EMISSION BY CATTLE

ABSTRACT - The objective of this study was to investigate the replacement of true protein source as well as the conventional NPN source (urea) by encapsulated NO_3^- (En) plus elemental sulfur (S) on microbial protein synthesis efficiency, and CH_4 emission in Nellore beef cattle. Five ruminally-cannulated Nellore steers (352.7 ± 38.4 kg BW) were used in a 5×5 Latin square design with 5 periods of 21 d each. Tifton 85 hay was used as forage and the basal concentrate consisted of corn, soybean meal, and commercial mineral supplement (50:50 wt/wt, forage:concentrate). Urea, En and S were added to compose the other diets. The treatments were: true protein from soybean meal as control (SBM); urea (U); U plus elemental S (US); encapsulated NO_3^- (EN); and EN plus elemental S (ENS). En was included in 2% on dietary DM (1.42% NO_3^- anion), while the inclusion of urea in U and US diets was 0.8% on dietary DM. The inclusion of S for U and EN diets was 0.24% on dietary DM, and the N:S ratio was reduced from 8:1 to 4:1 with the addition of S. En was gradually included from 0.5 to 2% on dietary DM by 0.5% every 4 d. The orthogonal contrasts for specific partitioning of treatment effects were: SBM vs. EN + ENS; U + US vs. EN + ENS; U vs. US; and EN vs. ENS. Steers displayed adequate MetHb levels as dietary En content increased. Organic matter and aNDF intake were smaller ($P \leq 0.01$) for animals fed En diets compared to SBM. Digestibility of DM, OM, and GE were greater ($P \leq 0.01$) when fed En diets compared to urea. Ruminal pH was greater ($P = 0.01$) and ruminal $\text{NH}_3\text{-N}$ was smaller ($P = 0.01$) for animals fed En diets compared to urea. Compared to urea, En supply resulted in lower propionate proportion ($P = 0.01$), but increased ($P \leq 0.03$) acetate proportion and acetate:propionate ratio. Nitrogen intake was smaller ($P \leq 0.07$) with En supply compared to SBM and urea. Retained N (g N/d) for animals fed En diets was smaller ($P = 0.01$) compared to SBM and urea. Microbial N (MN; g MN/d) tended to increase ($P = 0.06$) with En inclusion compared to SBM, and was increased ($P \leq 0.04$) by the addition of elemental S to NPN diets. Encapsulated NO_3^- diets supply increased ($P \leq 0.01$) MN as a proportion of CPI (g MN/kg CPI), increased ($P =$

0.02) MN efficiency based on digestible OM intake (DOMI; g MN/kg DOMI) compared to SBM, and as well tended to increase ($P = 0.09$) g MN/kg DOMI compared to urea. The addition of elemental S to NPN diets tended to increase ($P \geq 0.05$) g MN/kg CPI, and increased ($P = 0.04$) g MN/kg DOMI when included in EN. Animals fed En diets decreased ($P = 0.02$) CH₄ emission by 31.2 (g CH₄/d), and tended to decrease ($P = 0.06$) CH₄ emission (g CH₄/kg DMI, and CH₄ as % of GEI) when compared to SBM. Thus, En plus elemental S as a dietary additive replacing part of true protein of the ration or totally urea can optimize microbial protein synthesis efficiency and concomitantly decrease CH₄ emission by Nellore beef cattle.

Keywords: beef cattle, methane emission, sulfur, encapsulated nitrate, microbial protein synthesis

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

A produção pecuária atualmente tem enfrentado desafios, tais como, escassez de recursos ambientais, redução das margens de lucro, e preocupações sobre os danos ambientais. Ainda, o aumento de produção tem sido constante em função do aumento populacional. Assim, surge a necessidade de aperfeiçoamento do manejo alimentar nos sistemas produtivos de ruminantes.

Uma série de estudos tem sido conduzidos a fim de se estabelecer estratégias para melhoria da eficiência de produção. O foco dos estudos tem se baseado na alimentação, genética e manejo dos animais, sendo que a alimentação é o principal ponto chave do sistema de produção para melhorias nessa eficiência, e tem sido alvo de estudo há décadas.

O fornecimento de fonte de nitrogênio (N) não proteico (NNP) em substituição parcial à proteína verdadeira da dieta se enquadra como estratégia para aliar produtividade com o barateamento dos custos com a alimentação. O N proteico pode ser substituído parcialmente por NNP, uma vez que, os microrganismos exigem amônia (NH_3) para o seu metabolismo e constituição da proteína microbiana (PMic) (NRC, 2016). A PMic tem papel fundamental na produtividade, pois representa de 50 a 80% do total de proteína absorvida pelo animal (STORM; ØRSKOV, 1983).

Além de NH_3 , os microrganismos também requerem enxofre (S) para constituição dos aminoácidos sulfurados: metionina, cisteína, e cistina. Assim, o fornecimento de uma fonte complementar de S, via alimentação, se torna necessário em dietas onde uma fonte de NNP substitui parcialmente a proteína verdadeira dietética (NRC, 2016).

A inclusão de nitrato (NO_3^-) como fonte de NNP que em quantidades adequadas atende às exigências microbianas por NH_3 , juntamente com o S que é importante para crescimento microbiano, ambos ainda podem modular a fermentação microbiana, atuando como aceptor de elétrons no meio ruminal. Estratégias para modular a

fermentação ruminal e reduzir a produção de metano (CH_4) têm sido amplamente estudadas, e ingredientes na dieta que funcionam como aceptores de elétrons têm apresentado resultados promissores (HRISTOV et al., 2013).

O redirecionamento do hidrogênio (H_2) disponível no rumen, que seria o complemento da conversão de CO_2 em CH_4 para a então utilização na redução do NO_3^- ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_3$) e do enxofre ($\text{S}^0 \rightarrow \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{S}^{2-} \rightarrow \text{H}_2\text{S}$), fazem com que a produção de CH_4 pelas *Archea* seja suprimida (VAN ZIJDERVELD et al., 2010; LI et al., 2013).

Uma vez que a supressão da produção de CH_4 reduz as perdas de energia dietética via metanogênese, aumenta-se a energia metabolizável da dieta (LEE et al., 2015a; KLOP et al., 2016). O aumento na eficiência energética juntamente com o aumento no aporte de proteínas absorvidas pelo animal é portanto, contribuinte para o aumento na eficiência de produção animal.

Alguns estudos tem apresentado que a inclusão de NO_3^- não influencia a ingestão de matéria seca (IMS) quando adicionado na dieta de ruminantes (2% de NO_3^- na MS da dieta; EL-ZAIAT et al., 2014; GUYADER et al., 2015; TROY et al., 2015; OLIJHOEK et al., 2016), assim como a inclusão de S juntamente com o NO_3^- , também não exercem efeitos na IMS (PATRA; YU, 2014).

Por outro lado, a inclusão de NO_3^- na dieta de ruminantes pode causar a intoxicação, e tem sido motivo de alerta há um longo tempo (THORP Jr., 1938; BRADLEY; EPPSON; BEATH, 1939). A preocupação é devido à absorção de nitrito (NO_2^- , intermediário da redução $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NH}_3$) pela parede ruminal e seu efeito tóxico na corrente sanguínea pela conversão da hemoglobina (Hb) em metahemoglobina (MetHb). Entretanto, com o fornecimento de NO_3^- em uma quantidade adequada, procedendo-se uma adaptação à sua inclusão na dieta, a possibilidade de intoxicação é reduzida (LEE; BEAUCHEMIN, 2014).

Além do mais, a associação de quantidades adequadas, juntamente com prévia adaptação, e com a lenta liberação do íon NO_3^- no rumen, possível pela utilização do NO_3^- encapsulado, tem minimizado qualquer possibilidade de acúmulo de NO_2^- (EL-ZAIAT et al., 2014; LEE et al., 2015b). A lenta liberação do íon em função do

encapsulamento também pode contribuir para uma melhor sincronização entre energia e N disponíveis, que contribui para a eficiência de síntese de proteína microbiana (EPMic).

Poucos estudos avaliaram as possíveis interações entre o NO_3^- e o S em dietas para ruminantes, inclusive quando se refere ao En. Sendo assim, a hipótese deste estudo foi que o fornecimento de En, como fonte de NNP, em substituição parcial à proteína verdadeira, juntamente com uma fonte de S, potencializa a eficiência de síntese de proteína microbiana e reduz a emissão de CH_4 .

Nitrato na dieta de ruminantes

O NO_3^- é um ânion presente na natureza, essencial para a vida por fazer parte do ciclo do N. É encontrado nos solos, água, e comumente compõe a proteína bruta (PB) de uma variedade de alimentos que são consumidos pelos animais. Como ingrediente presente na dieta de ruminantes, tem sido objeto de estudo a um longo tempo (LEWIS, 1951; HOLTENIUS, 1957; WANG; GARCIA-RIVERA; BURRIS, 1961; GUYADER; UNGERFELD; BEAUCHEMIN, 2017).

Para ruminantes, o NO_3^- comporta-se como uma fonte de NNP, sendo 100% degradado no rumen. Sendo assim, o NO_3^- pode substituir totalmente a convencional ureia (GUO et al., 2009; VAN ZIJDERVELD et al., 2010, 2011; HULSHOF et al. 2012; LI et al., 2012; SILIVONG; PRESTON; VAN MAN, 2012; THANH; THU; PRESTON, 2012; LIN et al., 2013), e parcialmente a proteína verdadeira da dieta (LEE; BEAUCHEMIN, 2014). Essa substituição parcial da proteína verdadeira pode ser uma estratégia para reduzir os custos com a alimentação (CALDAS NETO et al., 2008).

Devido ao fato que o N-nitrato é convertido à NH_3 , este último sendo o principal N-substrato para a síntese de PMic (LENG; NOLAN, 1984), a inclusão de NO_3^- na dieta de ruminantes pode resultar em aumento na EPMic (GUO et al., 2009), e consequentemente, contribuir com aporte de proteína metabolizável (PMet) para o animal. Como já é sabido, entre 50 e 80% da PMet é advinda de PMic (STORM; ØRSKOV, 1983). Adicionalmente, estudos recentes com inclusão de NO_3^- para ruminantes têm apresentado resultados consistentes relacionados à modulação da

fermentação entérica, em prol de se reduzir a emissão de CH₄ pelos animais (DUTHIE et al., 2015; GUYADER et al., 2015; LEE et al., 2015a,b; OLIJHOEK et al., 2016; PETERSEN et al., 2015; TROY et al., 2015; ZHAO et al., 2015; KLOP et al., 2016).

A quantidade segura para o fornecimento de NO₃⁻ na alimentação tem sido elucidada pelos estudos publicados recentemente (BENU et al., 2015; LEE et al., 2015a,b; OLIJHOEK et al., 2016). Basicamente, a recomendação para a quantidade de NO₃⁻ na dieta considera as seguintes precauções: (1) O N advindo da fonte de NO₃⁻ deve respeitar a relação aproximada de 30 g N por kg de matéria orgânica (MO) digestível, para que a quantidade de N fermentável atenda à teórica 100% de eficiência da fermentação ruminal para um ótimo crescimento microbiano (LENG, 2008), pois como comentado acima, o NO₃⁻ é uma fonte de NNP; e (2) Deve ser incluído a uma quantidade suficiente para que a microbiota consiga metabolizar todo o NO₃⁻ fornecido até a molécula de NH₃, pois se a quantidade de NO₃⁻ exceder a capacidade dos microrganismos de metabolizá-lo até o composto final, ocorrerá acúmulo de NO₂⁻ no rumen (NO₃⁻ → NO₂⁻ → NH₃). Se ocorrer acúmulo de NO₂⁻ no rumen, com a consequente absorção em taxas elevadas para a corrente sanguínea, surge a possibilidade de intoxicação por metahemoglobinemia (i.e. anóxia tecidual).

Os recentes estudos utilizam uma inclusão de 2 a 3% de NO₃⁻ na MS da dieta (LUND et al., 2014; BENU et al., 2015; DUTHIE et al., 2015; GUYADER et al., 2015; LEE et al., 2015b; TROY et al., 2015; ZHAO et al., 2015; KLOP et al., 2016; NGUYEN; BARNETT; HEGARTY, 2016), geralmente fornecendo-o com a forma química associada ao metal cálcio [nitrato de cálcio - Ca(NO₃)₂]. Ainda, a adoção de adaptação com inclusão gradativa tem sido ferramenta para o alcance da dose final de NO₃⁻ sem implicações toxicológicas (LUND et al., 2014; NEWBOLD et al., 2014).

Outros fatores devem ser levados em consideração, além do nível de inclusão de NO₃⁻ na dieta. Fatores estes que influenciam na velocidade de dissociação do elemento no rumen, e consequentemente, a possibilidade ou não de eventual intoxicação, assim como na obtenção ou não de resultados positivos pela inclusão desse íon na dieta. Sendo assim, a utilização de NO₃⁻ na dieta de ruminantes deve considerar: (1) Adoção de prévia adaptação (CHENG et al., 1985); (2) Forma química do NO₃⁻ fornecido; (3) Demais

ingredientes que compõe a dieta, que influenciam no aspecto fermentativo da dieta como um todo; (4) Frequência de fornecimento da dieta (1, 2, ou mais vezes ao longo do dia); (5) Velocidade que o animal ingere o alimento nas primeiras horas após o fornecimento; (6) Características genéticas; e (7) Características particulares de cada animal.

Fontes de nitrato, metabolismo e parâmetros de estudo

Os efeitos da utilização de NO_3^- na dieta dos animais são dependentes da quantidade fornecida e disponibilidade dentro do rumen. A disponibilização do íon para a fermentação microbiana ruminal é influenciada consideravelmente pela fonte fornecida de NO_3^- , pois essas fontes têm velocidades diferentes de solubilização (LATHAM et al., 2016).

As fontes de NO_3^- que são mais comumente utilizadas para inclusão na dieta de ruminantes são: Nitrato de potássio (KNO_3); Nitrato de cálcio [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$]; Nitrato de sódio (NaNO_3); 50:50 Nitrato de cálcio:Nitrato de amônio [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2:\text{NH}_4\text{NO}_3$]; e 50:50 Nitrato de potássio:Nitrato de sódio ($\text{KNO}_3:\text{NaNO}_3$) (LATHAM et al., 2016).

O NO_3^- conjugado com cálcio [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$] é menos efetivo na redução da produção de CH_4 comparado às formas KNO_3 e NaNO_3 , e isso é causado provavelmente pelas diferenças de solubilidade (LATHAM et al., 2016). De acordo com esses autores, o cálcio tem menor solubilidade a um pH acima de 5,5, e considerando que o pH ruminal raramente se encontra abaixo de 5,5, provavelmente uma porção significativa do $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ permanece insolubilizado e portanto indisponível para exercer o pleno efeito da inclusão do NO_3^- .

No ambiente anaeróbico ruminal, o NO_3^- é reduzido por dois distintos passos (LENG, 2008): (1) Redução Dissimilatória e (2) Assimilatória do NO_3^- até NH_3 . Os mecanismos de controle que determinam a dominância da atividade da redutase no rumen são complexos, e a via predominante do metabolismo do NO_3^- no rumen é incerta (LENG, 2008). Contudo, as informações disponíveis sobre metabolismo anaeróbico em outros sistemas naturais provê uma ideia talvez mais simples sobre o sistema ruminal de redução de NO_3^- e NO_2^- até NH_3 , e tem sido assumido e afirmado que a redução

dissimilatória do NO_3^- para NH_3 segue dois caminhos de redução (LENG, 2008), como apresentado abaixo:



A redução dissimilatória é a produção de NH_3 pela redução de NO_3^- e/ou NO_2^- , que ocorre quando os valores do potencial redox no meio estão baixos, frequentemente na presença de sulfeto, ou alta concentração de matéria orgânica. A redução dissimilatória não é afetada pela quantidade de NH_3 , e a rápida conversão de NO_3^- para NH_3 ocorre mesmo com altas concentrações de NH_3 (LENG, 2008). Na redução assimilatória, ocorre o uso de enzimas que catalizam a redução de NO_3^- para NO_2^- e então para NH_3 . O termo “assimilatória” refere-se ao fato de que os produtos da atividade enzimática permanece no organismo. NO_3^- é reduzido a NO_2^- pela redução de NADH e NO_2^- é reduzido à NH_3 pela amonificação assimilatória de NO_2^- que é acoplada com a formação de ATP (adenosina trifosfato) (LENG, 2008).

Em dietas balanceadas em termos de energia e N, o NO_3^- (fonte de NNP) após ser reduzido pelas bactérias até NH_3 , fica então disponível para a microbiota incorporar NH_3 em seu metabolismo para constituir a PMic. Se ocorre um excesso de proteína degradável no rumen, como no caso de um desbalanço da dieta com alta quantidade de NNP em relação a carboidratos rapidamente fermentescíveis, ocorre um acúmulo de NNP. O acúmulo de NNP no rumen é caracterizado pelo excesso na quantidade das formas de N (NO_3^- , NO_2^- , ou NH_3), o qual supera a capacidade de sua metabolização pela microbiota.

Ambas as formas de NNP, tais como NO_3^- ou as suas formas reduzidas (NO_2^- e NH_3) podem ser absorvidas pelo epitélio ruminal, e ser direcionado para a corrente sanguínea (Figura 1). Quando alcança o sangue, NO_3^- e NH_3 podem ser reciclados e retornar ao rumen via saliva, podem serem eliminados na urina, ou mesmo ser excretado através das nas fezes. Particularmente na urina, os ruminantes eliminam somente uma

pequena porção de NO_3^- (LEWIS, 1951), enquanto que em monogástricos a maioria do NO_3^- é excretado na urina (GREENE; HIATT, 1954).

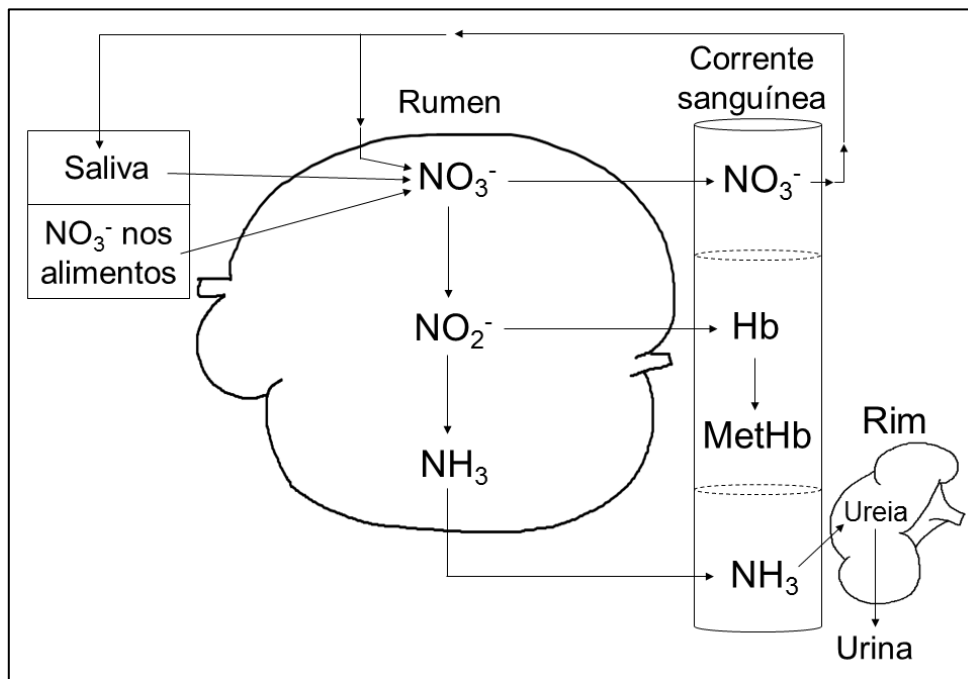


Figura 1. Rotas metabólicas do NO_3^- em ruminantes.

Os recentes estudos disponíveis na literatura apresentam que a inclusão de NO_3^- dentre as fontes NO_3^- de cálcio e NO_3^- de cálcio encapsulado, não interferiram na IMS (VAN ZIJDERVELD et al., 2011; LI et al., 2012; EL-ZAIAT et al., 2014; NEWBOLD et al., 2014; GUYADER et al., 2015; TROY et al., 2015; OLIJHOEK et al., 2016), enquanto que demais estudos apresentam o contrário (LEE et al., 2015a,b; KLOP et al., 2016).

Os trabalhos que obtiveram redução da IMS comparado ao tratamento controle (com ureia como fonte de NNP) e explicam que o gosto amargo do nitrato pode ter influenciado negativamente a palatabilidade da dieta. Ao mesmo tempo, uma menor IMS pode implicar em maior tempo de retenção do alimento ou do fluido ruminal, e então portanto maior será o tempo para o NO_3^- ser completamente reduzido a NH_3 (KLOP et al., 2016).

A suplementação de ruminantes com determinados ingredientes pode influenciar a fermentação ruminal, fazendo com que as rotas metabólicas sigam caminhos distintos. As pesquisas com inclusão de NO_3^- concluíram não interferir diretamente na fermentação ruminal, assim como, resultados contrários também foram apresentados.

A inclusão de crescentes níveis de NO_3^- (0; 0,5; 1,3; e 2,1% de NO_3^- na MS da dieta) aumentou linearmente N-NH_3 ruminal, mas o pH ruminal não diferiu (Olijhoek et al. 2016). Concordando com esses resultados, em um outro estudo, as inclusões crescentes de NO_3^- (0; 0,7; 1,4; 2,1; 2,8; 3,4; e 4,1% de NO_3^- na MS da dieta) aumentou linearmente N-NH_3 ruminal, enquanto que o pH ruminal não diferiu (LEE et al. 2015b). Entretanto, embora De Raphélis-Soissan et al. (2014) não encontraram diferenças para o N-NH_3 ruminal com a inclusão de 2% de NO_3^- na MS comparado ao tratamento ureia, foi observado um aumento no pH ruminal para os tratamentos com NO_3^- .

Os experimentos com inclusão de NO_3^- geralmente utilizam a ureia no tratamento controle para a devida comparação ao NNP suprido pelo NO_3^- . Ambos são fontes de NNP (NO_3^- e ureia) e rapidamente solubilizados no rumen, portanto, considera-se que ambos fornecem semelhantes quantidades de N, sendo provável que não ocorra diferença nas concentrações de N-NH_3 ruminal. Entretanto, é importante também considerar que esses parâmetros da fermentação ruminal podem depender das características da dieta.

A redução do NO_3^- à NH_3 é mais favorável energeticamente do que a propiogênese (UNGERFELD; KOHN, 2006) desviando a fermentação de glicose da propiogênese para a formação de acetato. Portanto, o fornecimento de NO_3^- tende a modificar a fermentação ruminal em favor da produção de acetato, em contrapartida, reduzindo a produção de propionato. Concordando com a explicação, De Raphélis-Soissan et al. (2014) e Troy et al. (2015) ao fornecerem NO_3^- obtiveram aumento na concentração de acetato em cerca de 8% e redução de propionato em cerca de 21,2%. Este último citado, obtiveram aumento em 29,9% na relação acetato:propionato para os tratamentos com NO_3^- .

Em contrapartida, Olijhoek et al. (2016) ao fornecer crescentes doses de NO_3^- não obtiveram diferenças para acetato, propionato e para a relação acetato:propionato, e ainda, no estudo de Lee et al. (2015b) o propionato ruminal não diferiu, o acetato diferiu

quadraticamente, ocorrendo uma redução para as inclusões de 1,4; 2,1; e 2,8% de NO_3^- na MS, e a relação acetato:propionato não diferiu.

O crescimento microbiano no rumen é função da quantidade de energia derivada do processo da fermentação ruminal e da quantidade de N disponível (CALSAMIGLIA et al., 2010). Processos de redução que permitem uma maior conservação da energia para o crescimento devem ser mais vantajosos para os microrganismos (GUO et al., 2009). O processo termodinâmico da redução de NO_3^- é energeticamente mais favorável que a metanogênese (redução: $\text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4$) (GUO et al., 2009). Sendo assim, o fornecimento de NO_3^- como uma fonte suplementar de NNP, além de fornecer N prontamente disponível para o início da atividade microbiana em sincronia com os carboidratos rapidamente fermentescíveis, beneficia o metabolismo microbiano.

Considerando que, a presença de NO_3^- na dieta de ruminantes além de suprir parcialmente as exigências microbianas de N, pode possibilitar um metabolismo energético mais eficiente (redução de NO_3^- vs. redução de CH_4), portanto, pode aumentar a EPMic. EPMic é representada pela quantidade de proteína microbiana sintetizada por mol de ATP hidrolizado, e com o seu aumento, conseqüentemente ocorre aumento do fornecimento de PMic para o animal. Esse metabolismo se faz importante, pois a PMic é a principal fonte de suprimento de aminoácidos metabolizáveis para o animal (BRODERICK, 1994).

Embora Olijhoek et al. (2016) apresentaram que as crescentes inclusões de NO_3^- em substituição a ureia não influenciou a síntese de PMic (g PB/d) e a EPMic (g PB/kg MO digerida no rumen), é possível encontrar asserções com relação à melhoria na síntese de PMic *in vitro* (GUO et al., 2009; GUYADER; UNGERFELD; BEAUCHEMIN, 2017) e *in vivo* (NGUYEN; BARNETT; HEGARTY, 2016).

Nitrato encapsulado frente à intoxicação e adaptações metabólicas

Assim como a ureia, o NO_3^- também é uma fonte de NNP, entretanto as recomendações para quantidade a ser incluída na dieta, assim como a estratégia de adaptação para inclusão na alimentação de ruminantes de ambos, são diferentes. O

protocolo de adaptação da ureia já é bem estabelecido na literatura, enquanto que para o NO_3^- ainda não se tem um guia de adaptação definido.

O NO_3^- é metabolizado pelos microrganismos até sua conversão em NH_3 ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_3$) (TIEDJE, 1988). O NO_2^- é o intermediário dessa reação, e quando ocorre um acúmulo de NO_2^- no rumen, este é absorvido pela parede ruminal até a corrente sanguínea. No sangue, o NO_2^- se liga ao grupo heme da Hb (BRUNING-FANN; KANEENE, 1993), convertendo a Hb da forma ferrosa (Fe^{2+}) para a forma férrica (Fe^{3+}) (LUNDBERG et al., 2008). A forma férrica, denominada MetHb, confere incapacidade à molécula de transportar oxigênio para os tecidos, o que acarreta uma condição de anóxia geral, levando o animal a quadros clínicos (LEE et al., 2015b). O efeito tóxico do NO_2^- pelo consumo de NO_3^- no conteúdo de alimentos tem sido observado há muito anos (THORP, 1938; BRADLEY; EPPSON; BEATH, 1939; DAVIDSON; DOUGHTY; BORON, 1941).

A MetHb é um parâmetro diretamente relacionado com a absorção de NO_2^- (LEE; BEAUCHEMIN, 2014), e análise de sua concentração (MetHb) no sangue tem se tornado rotina nos experimentos que trabalham com a inclusão de NO_3^- , principalmente para aqueles que testam crescentes níveis de inclusão.

Não somente o NO_2^- , mas o NO_3^- e NH_3 também podem ser absorvidos pelo epitélio ruminal e alcançar a corrente sanguínea (Figura 1). Assim como o NO_2^- , o NO_3^- e NH_3 em concentrações elevadas no sangue também podem ser tóxicas para o animal. Na corrente sanguínea essas diferentes formas de N, quando presentes, se diferem quanto à dosagem tóxica, sendo o NO_2^- com potencial tóxico muito maior do que as formas NO_3^- e NH_3 . Sendo assim, certas quantidade de NH_3 e NO_3^- podem estar presentes no sangue sem problemas, pois o próprio metabolismo animal é capaz de lidar com a detoxificação. Enquanto que, quando se trata do NO_2^- , mesmo que em pequenas quantidades, já ocorre respostas metabólicas à toxidez.

Qualquer potencial substância pode ocasionar intoxicação ao animal quando a sua concentração no organismo excede a capacidade de metabolização, como comentado anteriormente. Com relação à intoxicação por NO_2^- , o manejo alimentar tem fundamental participação na predisposição para o seu acúmulo no organismo animal. Dentre os

fatores que podem estar relacionados com a propensão à intoxicação estão (LENG, 2008): (1) Pouca quantidade de carboidratos não fibrosos (CNF) com relação à quantidade de NNP, pois assim como o NNP o CNF é rapidamente solubilizado no rumen, e se não há energia que possa ser disponibilizada rapidamente aos microrganismos para sincronizar com a disponibilização do N a partir do NNP, pode ocorrer acúmulo de NH_3 pela incapacidade da microbiota metabolizá-lo; (2) Elevada quantidade de NNP na dieta, independente da presença ou não de CNF, pois os microrganismos possuem capacidade limitada de metabolização dos compostos nitrogenados; (3) Quantidade de NO_3^- na dieta; (4) Taxa de consumo da dieta fornecida; (5) Incompleta redução de NO_3^- e NO_2^- no rumen até NH_3 ; e (6) Lenta taxa de passagem ruminal (e.g., longa retenção de NO_3^- e NO_2^- no rumen).

Uma estratégia para se evitar a intoxicação com inclusão de NO_3^- na dieta é a adoção de prévia adaptação, procedida com incrementos crescentes e graduais até alcançar a dose final (LEE; BEAUCHEMIN, 2014). A importância dessa inclusão gradual é devido ao aumento potencial (3 a 10 vezes) da capacidade dos microrganismos de converter NO_3^- até o metabólito final (NH_3) (ALLISON; REDDY, 1984; ALABOUDI; JONES, 1985; CHENG et al., 1985; SHI et al., 2012). Portanto, com os microrganismos adaptados à presença de NO_3^- , evita-se que a sua incapacidade de conversão total até NH_3 resulte em acúmulo de NO_2^- . Outro benefício conferido pela adaptação da microbiota à inclusão de NO_3^- seria o efeito mais pronunciado sobre a inibição da metanogênese (ALLISON; REDDY, 1984).

Algumas especulações são apresentadas no tocante à adaptação que o próprio organismo do animal pode apresentar após a inclusão do NO_3^- em doses crescentes. É possível que o animal apresente sensíveis modificações adaptativas, que por sinal permitem reduzir a sua susceptibilidade à intoxicação pela presença de NO_2^- na corrente sanguínea, como por exemplo, aumento no volume sanguíneo e na quantidade de eritrócitos circulantes, aumentando a concentração de Hb (JAINUDEEN; HANSEL; DAVISON, 1964).

Uma outra estratégia que tem sido utilizada para com a redução do potencial tóxico que o NO_3^- apresenta, é o fornecimento do NO_3^- em sua fórmula encapsulada com

componentes químicos inertes, que permitam uma lenta liberação do ânion em meio a fermentação. Estudos com NO_3^- encapsulado apresentaram resultados positivos para os parâmetros avaliados, dentre eles a concentração estável da MetHb sanguínea (EL-ZAIAT et al., 2015; LEE et al., 2015b). Entretanto, por mais que esse elemento seja encapsulado e de lenta liberação, é recomendado que se proceda uma adaptação para à sua inclusão.

Além da especulação relacionada à possibilidade de intoxicação, o encapsulamento do NO_3^- também apresenta benefícios no tocante à uma disponibilização de N para os microrganismos de uma maneira mais sincronizada com a energia provida pela dieta. Como comentado anteriormente, embora haja uma consideração entre sincronismo de energia e proteína, no sentido de que a presença de CNF em dietas com NNP possibilita uma melhor sincronização entre os metabólitos exigidos pela microbiota, de qualquer maneira, ambas fontes de NNP (e.g. NO_3^- ou ureia) são mais rapidamente solubilizadas em meio ruminal do que os CNF. Para tanto, a fonte de NO_3^- encapsulado pode apresentar melhores benefícios relacionados a parâmetros produtivos, quando se comparada a fonte convencional de NO_3^- .

Enxofre na dieta de ruminantes e requerimentos

O enxofre, macromineral essencial na dieta de ruminantes, faz parte da composição de proteínas, fazendo parte da composição dos aminoácidos (metionina, cisteína e cistina), de algumas vitaminas (vitaminas B, tiamina e biotina) e de diversos outros compostos orgânicos como os hormônios (NRC, 2016). Por ser parte destes compostos, o S no organismo animal está relacionado com as funções de síntese e metabolismo de proteínas, metabolismo de carboidratos e lipídeos, coagulação sanguínea, funções endócrinas e balanço ácido-base do fluido intra e extracelular (MCDOWELL, 1999).

Para os ruminantes, o S é um nutriente essencialmente fornecido com o objetivo de suprir as exigências dos microrganismos ruminais. É requerido para o crescimento e normal metabolismo celular de bactérias (ANDRIGUETTO, 1993), particularmente as

bactérias celulolíticas (SPEARS et al., 1976). A microbiota é capaz de sintetizar todos os compostos orgânicos que contém S, requeridos pelo tecido mamífero, a partir de S inorgânico, assim como a partir do S em sua forma orgânica por meio dos aminoácidos sulfurados presente nos alimentos (NRC, 2016). Ao metabolizar os compostos sulfurados no rumen, os microrganismos incorporam-os na PMic, que posteriormente será utilizada pelo animal.

A quantidade de S preconizada pelo NRC (2016) para bovinos em crescimento e terminação é de 0,15% da MS da dieta, considerando os níveis máximos entre 0,30-0,50% para essa categoria animal. Para a inclusão de S na dieta deve-se atentar às seguintes considerações: (1) Quantidade de S já presente nos ingredientes alimentares pré-estabelecidos na dieta, a fim de se respeitar a quantidade de S preconizada para a categoria animal; (2) Quantidade de N na dieta para respeitar a relação entre N:S de acordo com as exigências microbianas; (3) Característica dos demais ingredientes da dieta, como a relação volumoso:concentrado e as características fermentativas particulares de cada ingrediente; e também (4) Deve-se considerar que a fonte de S adicional que será incluída na dieta pode se relacionar diferentemente com os fatores anteriormente descritos.

O S presente nos ingredientes da dieta algumas vezes já suprem os requerimentos dos ruminantes, mas é importante considerar que dependendo da característica da dieta, nem todo o S é disponibilizado para fermentação microbiana. Os requerimentos para S podem aumentar à medida em que a dieta proporciona uma maior taxa de passagem, com maior escape ruminal de proteína, limitando a quantidade ótima de S para a fermentação ruminal (NRC, 2016).

O teor de S na dieta está diretamente relacionado com o teor de proteína dos ingredientes, em que uma maior quantidade de proteína dietética frequentemente pode resultar em níveis mais altos de S. Sendo assim, quando se fornece uma fonte de NNP substituindo parcialmente a fonte de proteína verdadeira, uma suplementação com S adicional se faz necessária (NRC, 2016). A inclusão de S deve ser realizada para adequar relação nitrogênio:enxofre na dieta entre 4:4 a 16:5 (LI et al., 2013), a fim de se atender os requerimentos microbianos desses dois elementos.

Fontes de enxofre, metabolismo e parâmetros de estudo

O enxofre pode entrar no trato gastro intestinal por intermédio dos alimentos, da água, ou por secreção endógena da saliva. Pela alimentação, o S pode ser consumido pelo animal pelas formas orgânicas e inorgânicas.

As formas orgânicas são as que estão presentes na composição dos ingredientes, fazendo parte das proteínas que contém o S na composição dos aminoácidos, tais como, metionina, cisteína, homocisteína, taurina, cistationina, ácido cisteico e cistina (NRC, 2005), assim como também das vitaminas do complexo B, tiamina e biotina (NRC, 2016), que também contém S. Dentre as formas inorgânicas pode se destacar: Sulfato de sódio (Na_2SO_4); Sulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$; Sulfato de cálcio (CaSO_4); Sulfato de potássio (K_2SO_4); Sulfato de magnésio (MgSO_4); e Enxofre elementar (S^0).

Cada uma das fontes de S apresenta diferentes disponibilidades para a fermentação (SARAN NETTO et al., 2009). A fonte de S elementar e o S orgânico produzem menos radicais livres quando metabolizados do que o sulfato (SO_4^{2-}) (NILES; MORGAN; EDWARDS, 2002). As fontes com SO_4^{2-} , tais como CaSO_4 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, são mais prontamente disponíveis para o metabolismo microbiano, sendo aproximadamente 50% disponível. Enquanto que, a disponibilidade de S^0 é aproximadamente 35% para o crescimento microbiano ruminal (KAHLON et al., 1975). Esses fatores de disponibilidade devem ser levados em consideração durante a formulação da dieta.

No rumen, duas classes de microrganismos são classificadas como responsáveis pelo metabolismo de S: (1) os que realizam a Redução Dissimilatória; (2) e os que realizam a Redução Assimilatória. Na redução assimilatória as bactérias reduzem SO_4^{2-} a sulfeto de hidrogênio (H_2S), que é incorporado a aminoácidos, enquanto que a redução dissimilatória, as bactérias utilizam do SO_4^{2-} como um aceptor de elétrons e produzem H_2S como um produto final do seu metabolismo (SINGLETON Jr., 1993; BRADLEY; LEAVITT; JOHNSTON, 2011).

As formas pelas quais o S sai do rumen em direção ao omaso são por meio da proteína não degradável rúmen, pela PMic, ou então pelas próprias formas inorgânicas

de S que não foram fermentadas pela microbiota. Assim que alcança o abomaso as fontes inorgânicas de S são primeiramente absorvidas por meio de transporte ativo, enquanto que as formas orgânicas contidas nas proteínas são quebradas pela proteólise, até os aminoácidos contendo S. Os aminoácidos são transportados para o sistema circulatório através de um mecanismo dependente de sódio, e a maioria do S absorvido em excesso é excretado na urina como SO_4^{2-} .

Com a presença de S no fluido ruminal os microrganismos o utilizam para seu metabolismo, sintetizam aminoácidos contendo S e então produzem a PMic. Se a quantidade de S na dieta não atende às exigências microbianas, o metabolismo microbiano pode ser prejudicado e conseqüentemente reduzir a digestão ruminal dos nutrientes dietéticos (VIDAL et al., 2007). Sendo assim, tem sido sugerido que o fornecimento de S na dieta estimula a atividade microbiana, aumentando a eficiência de fermentação dos nutrientes, provendo maior quantidade de PMic para o metabolismo animal. Isso se faz importante pois a PMic representa de 50 a 80% da proteína metabolizável para o animal (STORM; ØRSKOV, 1983).

A melhoria da atividade microbiana pela presença de S pode aumentar a digestibilidade da dieta, o consumo de matéria seca, e portanto pode melhorar a eficiência de conversão dos nutrientes dietéticos para o metabolismo animal. Os efeitos da presença de S na dieta de ruminantes foram estudados, e encontra-se disponível na literatura desde trabalhos pioneiros (BLOCK; STEKOL, 1950; THOMAS et al., 1951; BLOCK; STEKOL; LOOSLI, 1951; STARKS et al., 1953), assim como trabalhos recentes (DREWNOSKI; HANSEN, 2013; SARTURI et al., 2013; JOSÉ DA SILVA et al., 2014; JOSÉ DA SILVA et al., 2016), incluindo recentes revisões (KLOPFENSTEIN; ERICKSON; BREMER, 2008; DREWNOSKI; POGGE; HANSEN, 2014).

Rees, Minson e Smith et al. (1974) e Rees e Minson (1978) encontraram que a fertilização de forragem tropical *Digitaria sp.* com S reduziu o tempo de retenção no rumen e aumentou o consumo e digestibilidade comparado com o consumo em áreas não fertilizadas. A menor digestibilidade obtida foi das dietas que não receberam fertilização com S, foi possivelmente causada pela redução da atividade microbiana, como sugerem os autores. Whanger (1965) sugere que a taxa de redução de SO_4^{2-} e incorporação deste

na proteína bacteriana é 10 vezes mais rápida para animais alimentados com dieta que contém quantidade adequada de S, quando comparada a quantidade deficientes de S.

Em estudo com a inclusão de 0,29 até 0,37% de S na dieta não houve influência na IMS (SPEARS; BURNS; HATCH, 1985); assim como também a IMS não foi influenciada pela inclusão de S nos níveis 0,15; 0,20; até 0,25% no trabalho de Zinn et al. (1997). Os níveis de 0,22 até 0,51% de S (ARTHINGTON et al., 2002), e a inclusão de 0,6% comparado com 0,3% no trabalho de Richter, Drewnoski e Hansen (2012), ambos também não exerceram influência na IMS. Entretanto outros estudos, observaram que o consumo de dietas com 0,11; 0,20; 0,28; e 0,38%, reduziu o consumo quando o S fornecido foi acima de 0,20% da MS da dieta (QI; LU; OWENS, 1993). O nível de 0,31 ou 0,46% S, também acarretou em redução na IMS comparado ao tratamento controle com 0,13% de S no estudo de Spears, Lloyd e Fry (2011), e assim como também, o fornecimento total de 0,29% de S tendeu a reduzir a IMS no estudo de Loneragan et al. (2001).

Os estudos anteriormente citados utilizaram diferentes fontes de S suplementar, o que resultou em resultados contrastantes no que se refere a IMS, e estes podem estar associados com a relativa diferença na disponibilidade total do S. Embora as diferentes fontes de S tem sido apresentadas como fatores influentes aos resultados, no estudo de José da Silva et al. (2014) não foi observada diferença em qualquer fator nutricional avaliado para as diferentes fontes de S testadas para bovinos, dentre elas o íon SO_4^{2-} e S elementar. Neste último, os parâmetros que foram avaliados são: ingestão de MS, MO, e PB; pH ruminal; e concentração de N-NH_3 ruminal.

No estudo de Rumsey (1978) a inclusão de S reduziu o pH ruminal de 5,59 para 5,35, mas a inclusão do elemento S em si não é preponderante para uma variação no valor de pH. Neste mesmo estudo a concentração de acetato reduziu com a inclusão de S, enquanto que a concentração de propionato e de outros AGVs não diferiram. Concordando com os resultados anteriores, Zinn et al. (1997) com as inclusões de 0,15; 0,20; e 0,25% de S, não observaram diferença em IMS, pH ruminal, AGVs total ruminal e EPMic (g Nmic/kg MO fermentada), entretanto aumentou propionato (efeito linear, $P < 0,10$) de 30,8 para 35,5 mol/100 mol, reduziu acetato (efeito quadrático, $P < 0,10$) de 50,7

para 47,4 mol/100 mol, e reduziu a produção estimada de CH₄ (efeito quadrático, $P < 0,05$) de 6,81 para 5,66 mol/d. Semelhantes resultados de AGVs ruminal também foram encontrados por Thompson et al. (1972), com o decréscimo na concentração de acetato e aumento de propionato em bovinos confinados quando o S dietético foi aumentado de 0,12 para 0,37%.

Respostas positivas para com o aumento de EPMic foram encontradas por Zinn et al. (1997), assim como também apresentadas no estudo de McSweeney e Denman (2007), mas é importante considerar que a EPMic pode apenas ser alcançada com níveis adequados não somente de S, mas assim como também de N. Os tratamentos controle sem a adição de S resultaram em aumento no nível de N-NH₃ ruminal, menor concentração de S⁻², e menor EPMic (MCSWEENEY; DENMAN, 2007).

Nitrato e enxofre como mitigadores da emissão de CH₄

Os estudos recentes com inclusão de NO₃⁻ na alimentação de ruminantes apresentam efeitos consistentes em relação à redução da produção de CH₄ entérico (GUYADER et al., 2015; LEE et al., 2015a; KLOP et al., 2016; GUYADER; UNGERFELD; BEAUCHEMIN, 2017). Assim como, a inclusão de fonte de S juntamente com NO₃⁻ potencializa a mitigação da produção de CH₄ no rumen (VAN ZIJDERVELD et al., 2010, 2011; LI et al., 2013).

Referindo-se à metanogênese, o foco da utilização de ambos componentes se dá por conta do efeito como aceptor de elétrons. No rumen o NO₃⁻ é reduzido a NH₃, assim como também, o S é reduzido à H₂S. Para que a redução aconteça são necessários equivalentes de redução (elétrons de hidrogênio). Dessa forma, o NO₃⁻ e S funcionam como um dreno de hidrogênio do ambiente ruminal. A menor quantidade de elétrons no rumen implica em menor quantidade de substrato para as bactérias metanogênicas, que resultará em menor produção e emissão de CH₄ pelos ruminantes (HULSHOF et al., 2012).

A conversão do NO₃⁻ até NH₃ no rumen é mais favorável que a conversão do CO₂ em CH₄ pelas bactérias metanogênicas (LEE; BEAUCHEMIN, 2014), pois a redução de

NO_3^- para NO_2^- (Equação 1) e a subsequente redução de NO_2^- para NH_3 (Equação 2) rende mais energia que a redução de CO_2 para CH_4 (Equação 3) (UNGERFELD; KOHN, 2006). Ambas equações estão apresentadas na Figura 2, abaixo.

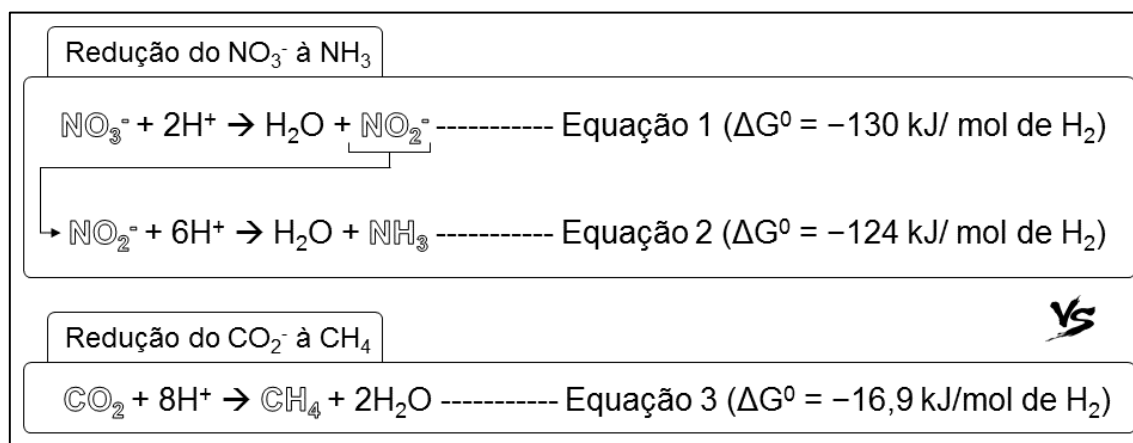


Figura 2. Estequiometria da redução de NO_3^- e CH_4 .

O cálculo teórico da redução da produção de CH_4 baseado na estequiometria é que para cada 1 mol de NO_3^- (100 g) totalmente reduzido até NH_3 , usando 4 mols de H_2 , a supressão da produção de CH_4 será em torno de 1 mol de CH_4 (26 g) (LEE; BEAUCHEMIN, 2014). Enquanto que, a redução de SO_4^{2-} consome 8 elétrons no total, e portanto oferece o mesmo potencial de redução da produção entérica de CH_4 que o NO_3^- . Estequiometricamente a total redução de 100 g de SO_4^{2-} até H_2S deve suprimir a produção de CH_4 em cerca de 16,7 g (VAN ZIJDERVELD et al., 2011).

Os resultados reportados na literatura do efeito da inclusão de NO_3^- sobre a produção de CH_4 variam de 16 a 57% de redução em g CH_4/d (KNAPP et al., 2014). No estudo de Lee et al. (2015a) foi obtido uma redução de 7% para cada 1% de NO_3^- na MS para bovinos de corte; Olijhoek et al. (2016), obtiveram redução de 10.9% para cada 1% de NO_3^- na MS para bovinos de leite; e Klop et al. (2016) apresentaram uma redução de 10% para cada 1% NO_3^- na MS também para bovinos de leite.

Com relação ao potencial da inclusão de S na dieta de ruminantes frente à mitigação da metanogênese, avaliado em estudos recentes, foram obtidas consideráveis reduções na produção de CH_4 em torno de 26% (g CH_4/d) quando fonte de S foi

adicionado comparado à dietas que receberam NO_3^- mas sem fonte externa de S (VAN ZIJDERVELD et al., 2011; LI et al., 2013).

Mediante o exposto, o presente estudo objetivou avaliar o efeito da substituição parcial da fonte proteína verdadeira ou totalmente a convencional fonte de NNP (ureia) por nitrato encapsulado com adição de enxofre elementar sobre consumo, digestibilidade, parâmetros ruminais, eficiência de síntese de proteína microbiana e emissão de metano entérico em bovinos Nelore.

2. REFERÊNCIAS

ALABOUDI, A. R.; JONES, G. A. Effect of acclimation to high nitrate intakes on some rumen fermentation parameters in sheep. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 65, p. 841-849, 1985.

ALLISON, M. J.; REDDY, C. A. Adaptations of gastrointestinal bacteria in response to changes in dietary oxalate and nitrate. In: Klug, M. J.; Reddy, C. A. (Ed.). **Proceedings of the Third International Symposium on Microbial Ecology**. American Society for Microbiology. Washington, DC, 1984. p. 248-256.

ANDRIGUETTO, J. M. **Nutrição animal**: as bases e os fundamentos da nutrição animal. 2. ed. São Paulo, 1993.

ARTHINGTON, J. D.; RECHEIGL, J. E.; YOST, G. P.; MCDOWELL, L. R.; FANNING, M. D. Effect of ammonium sulfate fertilization on bahiagrass quality and copper metabolism in grazing beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 2507-2512, 2002.

BENU, I., CALLAGHAN, M. J.; TOMKINS, N.; HEPWORTH, G.; FITZPATRICK, L. A.; PARKER, A. J. The effect of feeding frequency and dose rate of nitrate supplements on blood haemoglobin fractions in *Bos indicus* cattle fed Flinders grass (*Iseilemia spp.*) hay. **Animal Production Science**, v. 54, p. 1300-1304, 2015.

BLOCK, R. J.; STEKOL, J. A.; LOOSLI, J. K. Synthesis of sulfur amino acids from inorganic sulfate by ruminants. II. Synthesis of cystine and methionine from sodium sulfate by the goat and by microorganisms of the rumen of the ewe. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 33, p. 353-363, 1951.

BLOCK, R. J.; STEKOL, J. A. Synthesis of sulfur amino acids from inorganic sulfate by ruminants. **Experimental Biology and Medicine**, v. 73, p. 391-394, 1950.

BRADLEY, W. B.; EPPSON, H. F.; BEATH, O. A. Nitrate as the cause of oat hay poisoning. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 94, p. 541-542, 1939.

BRADLEY, A. S.; LEAVITT, W. D.; JOHNSTON, D. T. Revisiting the dissimilatory sulfate reduction pathway. **Geobiology**, v. 9, p. 446-457, 2011.

BRODERICK, G. A. Quantifying forage protein quality. In: FAHEY Jr., G. C. COLLINS, M. D.; MERTENS, D. R.; MOSER, L. E. (Ed.). **Forage Quality, Evaluation, and Utilization**. American Society of Agronomy, Madison: WI, 1994. p. 200-228.

BRUNING-FANN, J. S.; KANEENE, J. B. The effects of nitrate, nitrite, and N-nitroso compounds on animal health. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 35, p. 237-253, 1993.

CALDAS NETO, S. F.; ZEOULA, L. M.; PRADO, I. N.; BRANCO, A. F.; KAZAMA, R.; GERON, L. J. V.; MAEDA, E. M.; FERELI, F. Proteína degradável no rumen na dieta de bovinos: digestibilidades total e parcial dos nutrientes e parâmetros ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 1094-1102, 2008.

CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; REYNOLDS, C. K.; KRISTENSEN, N. B.; VAN VUUREN, A. M. Strategies for optimizing nitrogen use by ruminants. **Animal**, v. 4, p. 1184-1196, 2010.

CHENG, K. J.; PHILLIPPE, R. C.; KOZUB, G. C.; MAJAK, W.; COSTERTON, J. W. Induction of nitrate and nitrite metabolism in bovine rumen fluid and the transfer of this capacity to untreated animals. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 65, p. 647-652, 1985.

DAVIDSON, W. B.; DOUGHTY, J. L.; BORON, J. L. Nitrate poisoning of livestock. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 5, p. 303-313, 1941.

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

DREWNOSKI, M. E.; HANSEN, S. L. Effect of delaying the feeding of high sulfur until 28 days after adaptation to finishing diet on cattle intake, gain, and ruminal hydrogen sulfide concentrations. **Livestock Science**, v. 155, p. 230-235, 2013.

DREWNOSKI, M. E.; POGGE, D. J.; HANSEN, S. L. High-sulfur in beef cattle diets: a review. **Journal of Animal Science**, v. 92, p. 3763-3780, 2014.

DUTHIE, C. A.; ROOKE, J. A.; TROY, S.; HYSLOP, J. J.; ROSS, D. W.; WATERHOUSE, A.; ROEHE, R. Impact of adding nitrate or increasing the lipid content of two contrasting diets on blood methaemoglobin and performance of two breeds of finishing beef steers. **Animal**, v.10, p.786-795, 2015.

EL-ZAIAT, H. M.; ARAUJO, R. C.; SOLTAN, Y. A.; MORSY, A. S.; LOUVANDINI, H.; PIRES, A. V.; PATINO, H. O.; CORREA, P. S.; ABDALLA, A. L. Encapsulated nitrate and cashew nut shell liquid on blood and rumen constituents, methane emissions, and growth performance of lambs. **Journal of Animal Science**, v. 92, p. 2214-2224, 2014.

GREENE, I.; HIATT, E. P. Behavior of the nitrate ion in the dog. **American Journal of Physiology**, v. 176, p. 463-467, 1954.

GUYADER, J., EUGÈNE, M.; MEUNIER, B.; DOREAU, M.; MORGAVI, D. P.; SILBERBERG, M.; ROCHETTE, Y.; GERARD, C.; LONCKE, C.; MARTIN, C. Additive methane-mitigating effect between linseed oil and nitrate fed to cattle. **Journal of Animal Science**, v. 93, p. 3564-3577, 2015.

GUYADER, J.; UNGERFELD, E. M.; BEAUCHEMIN, K. A. Redirection of metabolic hydrogen by inhibiting methanogenesis in the rumen simulation technique (RUSITEC). **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 393, 2017.

GUO, W. S.; SCHAEFER, D. M.; GUO, X. X.; REN, L. P.; MENG, Q. X. 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**, v. 22, p. 542-549, 2009.

HOLTENIUS, P. Nitrite poisoning in sheep, with special reference to the detoxification of nitrite in the rumen: an experimental study. **Acta Agriculturae Scandinavica**, v.7, p.113-163, 1957.

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

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

JAINUDEEN, M. R.; HANSEL, W.; DAVISON, K. L. Nitrate toxicity in dairy heifers. 2. Erythropoietic responses to nitrate ingestion during pregnancy. **Journal of Dairy Science**, v.47, p.1382-1387, 1964.

JOSÉ DA SILVA, C.; DIOGO, J. M. S.; OLIVEIRA, T. S.; LEITE, G. G.; CABRAL FILHO, S. L. S. Efeito de diferentes fontes de enxofre na síntese de proteína microbiana ruminal *in vitro*. **NutriTime Revista Eletrônica**, v. 13, p. 4691-4696, 2016.

JOSÉ DA SILVA, C.; LEONEL, F. P.; PEREIRA, J. C.; COSTA, M. G.; MOREIRA, L. M.; OLIVEIRA, T. S.; ABREU, C. L. Sulfur sources in protein supplements for ruminants. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 43, p. 537-543, 2014.

KAHLON, T. S.; MEISKE, J. C.; GOODRICH, R. D. Sulfur metabolism in ruminants. In vitro availability of various chemical forms of sulfur. **Journal of Animal Science**, v. 41, p. 1147-1152, 1975.

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

KLOP, G.; HATEW, B.; BANNINK, A.; DIJKSTRA, J. Feeding nitrate and docosahexaenoic acid affects enteric methane production and milk fatty acid composition in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 1161-1172, 2016.

KLOPFENSTEIN, T. J.; ERICKSON, G. E.; BREMER, V. R. Board invited review: Use of distillers by-products in the beef cattle feeding industry. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 1223-1231, 2008.

LATHAM, E. A.; ANDERSON, R. C.; PINCHAK, W. E.; NISBET, D. J. Insights on alterations to the rumen ecosystem by nitrate and nitrocompounds. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 228, 2016.

LEE, C.; ARAUJO, R. C.; KOENIG, K. M.; BEAUCHEMIN, K. A. Effects of encapsulated nitrate on enteric methane production and nitrogen and energy utilization in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 93, p. 2391-2404, 2015a.

LEE, C.; ARAUJO, R. C.; KOENIG, K. M.; BEAUCHEMIN, K. A. Effects of encapsulated nitrate on eating behavior, rumen fermentation, and blood profile of beef heifers fed restrictively or ad libitum. **Journal of Animal Science**, v. 93, p. 2405-2418, 2015b.

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

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

LENG, R. A.; NOLAN, J. V. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 67, p. 1072-1089, 1984.

LEWIS, D. The metabolism of nitrate and nitrite in the sheep; the reduction of nitrate in the rumen of the sheep. **Biochemical Journal**, v.48, p.175-180, 1951.

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

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

LIN, M.; GUO, W.; MENG, Q.; STEVENSON, D. M.; WEIMER, P. J.; SCHAEFER, D. M. Changes in rumen bacterial community composition in steers in response to dietary nitrate. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 97, p. 8719-8727, 2013.

LONERAGAN, G. H.; WAGNER, J. J.; GOULD, D. H.; GARRY, F. B.; THOREN, M. A. Effects of water sulfate concentration on performance, water intake and carcass characteristics of feedlot steers. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 2941-2948, 2001.

LUND, P.; DAHL, R.; YANG, H. J.; HELLWING, A. L. F.; CAO, B. B.; WEISBJERG, M. R. The acute effect of addition of nitrate on in vitro and in vivo methane emission in dairy cows. **Animal Production Science**, v. 54, p. 1432-1435, 2014.

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

MCDOWELL, L. R. (Ed.). **Minerais para ruminantes sob pastejo em regiões tropicais, enfatizando o Brasil**. 3. ed. Gainesville: University of Florida, 1999. 92 p.

MCSWEENEY, C. S.; DENMAN, S. E. Effect of sulfur supplements on cellulolytic rumen micro-organisms and microbial protein synthesis in cattle fed a high fibre diet. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 1757-1765, 2007.

NEWBOLD, J. R.; VAN ZIJDERVELD, S. M.; HULSHOF, R. B. A.; FOKKINK, W. B.; LENG, R. A.; TERCENIO, P.; POWERS, W. J.; VAN ADRICHEM, P. S. J.; PATON, N. D.; PERDOK, H. B. The effect of incremental levels of dietary nitrate on methane emissions in Holstein steers and performance in Nelore bulls. **Journal of Animal Science**, v. 92, p. 5032-5040, 2014.

NGUYEN, S. H.; BARNETT, M. C.; HEGARTY, R. S. Use of dietary nitrate to increase productivity and reduce methane production of defaunated and faunated lambs consuming protein-deficient chaff. **Animal Production Science**, v. 56, p. 290-297, 2016.

NILES, G. A.; MORGAN, S. E.; EDWARDS, W. C. The relationship between sulfur, thiamine and polioencephalomalacia - a review. **Bovine Practitioner**, v. 36, p. 93-99, 2002.

NRC - National Research Council. **Mineral tolerance of animals**. 2nd rev. ed. National Academy Press. Washington, DC. 2005.

NRC - National Research Council. **Nutrient Requirements of Beef Cattle**. 8th. rev. ed. National Academy Press. Washington, DC. 2016.

OLIJHOEK, D. W.; HELLWING, A. L. F.; BRASK, M.; WEISBJERG, M. R.; HØJBERG, O.; LARSEN, M. K.; DIJKSTRA, J.; ERLANDSEN, E. J.; LUND, P. Effect of dietary nitrate level on enteric methane production, hydrogen emission, rumen fermentation, and nutrient digestibility in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 6191-6205, 2016.

PATRA, A. K; YU, Z. Combinations of nitrate, saponin, and sulfate additively reduce methane production by rumen cultures in vitro while not adversely affecting feed digestion, fermentation or microbial communities. **Bioresource Technology**, v. 155, p. 129-135, 2014.

PETERSEN, S. O.; HELLWING, A. L. F.; BRASK, M.; HØJBERG, O.; POULSEN, M.; ZHU, Z.; BARAL, K. R.; LUND, P. Dietary nitrate for methane mitigation leads to nitrous oxide emissions from dairy cows. **Journal of Environmental Quality**, v. 44, p. 1063-1070, 2015.

QI, K.; LU, C. D.; OWENS, F. N. Sulfate supplementation of growing goats: Effects on performance, acid-base balance, and nutrient digestibilities. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 1579-1587, 1993.

REES, M. C.; MINSON, D. J. Fertilizer sulphur as a factor affecting voluntary intake, digestibility and retention time of pangola grass (*Digitaria decumbens*) by sheep. **British Journal of Nutrition**, v. 39, p. 5-11, 1978.

REES, M. C.; MINSON, D. J.; SMITH, F. W. The effect of supplementary and fertilizer sulphur on voluntary intake, digestibility, retention time in the rumen, and site of digestion of pangola grass in sheep. **Journal of Agricultural Science**, v. 82, p. 419-422, 1974.

RICHTER, E. L., DREWNOSKI, M. E.; HANSEN, S. L. The effect of dietary sulfur on beef steer mineral status, performance, and meat fatty acid composition. **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 3945-3953, 2012.

RUMSEY, T. S. Effects of dietary sulfur addition and synovex-s ear implants on feedlot steers fed an all-concentrate finishing diet. **Journal of Animal Science**, v. 46, p. 463, 1978.

SARAN NETTO, A.; ZANETTI, M. A.; PAIVA, F. A.; SALLES, M. S. V.; DEL CLARO, G. R.; LOPES, L. C.; NOGUEIRA FILHO, J. C. M. Efeitos da fonte de enxofre sobre a população de protozoários e degradabilidade no rúmen. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 910-917, 2009.

SARTURI, J. O.; ERICKSON, G. E.; KLOPFENSTEIN, T. J.; ROLFE, K. M. BUCKNER, C. D.; LUEBBE, M. K. Impact of source of sulfur on ruminal hydrogen sulfide and logic for the ruminal available sulfur for reduction concept. **Journal of Animal Science**, v. 91, p. 3352-3359, 2013.

SHI, C.; MENG, Q.; HOU, X.; REN, L.; ZHOU, Z. Response of ruminal fermentation, methane production and dry matter digestibility to microbial source and nitrate addition level in an *in vitro* incubation with rumen microbes obtained from wethers. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 11, p. 3334-3341, 2012.

SILIVONG, P.; PRESTON, T. R.; VAN MAN, N. Effect of supplements of potassium nitrate or urea as sources of NPN on methane production in an *invitro* system using molasses and Paper mulberry or Muntingia foliages as the substrate. **Livestock Research for Rural Development**, v. 17, p. 4-12, 2012.

SINGLETON Jr., R. The Sulfate-Reducing Bacteria: An Overview. In: ODOM, J. M.; SINGLETON Jr., R. (Ed.) **The sulphate-reducing bacteria**: contemporary perspectives. 1. ed. New York: Springer-Verlag Inc, 1993. p.1-19.

SPEARS, J. W.; ELY, D. G.; BUSH, L. P.; BUCKNER R. C. Sulfur supplementation and *in vitro* digestion of forage cellulose by rumen microorganisms. **Journal of Animal Science**, v. 43, p. 513-517, 1976.

SPEARS, J. W.; BURNS, J. C.; HATCH, P. A. Sulfur fertilization of cool season grasses and effect on utilization of minerals, nitrogen, and fiber by steers. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 347-355, 1985.

SPEARS, J. W.; LLOYD, K. E.; FRY, R. S. Tolerance of cattle to increased dietary sulfur and effect of dietary cation-anion balance. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 2502-2509, 2011.

STARKS, P. B.; HALE, W. H.; GARRIGUS, U. S.; FORBES, R. M. The utilization of feed nitrogen by lambs as affected by elemental sulfur. **Journal of Animal Science**, v. 12, p. 480-491, 1953.

STORM, E.; ØRSKOV, E. R. The nutritive value of rumen microorganisms in ruminant. 1. Large-scale isolation and chemical composition of rumen microorganisms. **British Journal of Nutrition**, v. 50, p. 463-470, 1983.

TIEDJE, J. M. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonia. In: ZEHNDER, A. J. B. (Ed.). **Biology of Anaerobic Microorganisms**. Wiley: New York, 1988. p. 179-244.

THANH, V. D.; THU, N. V.; PRESTON, T. R. Effect of potassium nitrate or urea as NPN source and levels of Mangosteen peel on *in vitro* gas and methane production using molasses, *Operculinaturpethum* and *Brachiariamutica* as substrate. **Livestock Research for Rural Development**, v. 24, n. 63, 2012.

THOMAS, W. E.; LOOSLI, J. K.; WILLIAMS, H. H.; MAYNARD, L. A. The utilization of inorganic sulfates and urea nitrogen by lambs. **Journal of Nutrition**, v. 43, p. 515-523, 1951.

THOMPSON, L. H.; WISE, M. B.; HARVEY, R. W.; BARRICK, E. R. Starea, urea and sulfur in beef cattle rations. **Journal of Animal Science**, v. 35, p. 474-480, 1972.

THORP Jr. F. Further observations on oat hay poisoning. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 92, p. 159, 1938.

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

UNGERFELD, E. M.; KOHN, R. A. The role of thermodynamics in the control of ruminal fermentation. In: Sejrsen, K.; Hvelplund, T.; Nielsen, M. O. (Ed.). **Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism and Impact of Nutrition on Gene Expression, Immunology and Stress**. Wageningen Academic Publishers, Wageningen: Netherlands, 2006. p. 55-85.

VAN ZIJDERVELD, S. M.; GERRITS, W. J. J.; APAJALAHTI, J. A.; NEWBOLD, J. R.; DIJKSTRA, J.; LENG, R. A.; PERDOK, H. B. Nitrate and sulfate: Effective alternative hydrogen sinks for mitigation of ruminal methane production in sheep. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 5856-5866, 2010.

VAN ZIJDERVELD, S. M.; GERRITS, W. J. J.; DIJKSTRA, J.; NEWBOLD, J. R.; HULSHOF, R. B. A.; PERDOK, H. B. Persistency of methane mitigation by dietary nitrate supplementation in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 4028-4038, 2011.

VIDAL, J. M.; PAIVA, P. C. A.; ARCURI, P. A.; LOPES, F. C. F.; ZAQUINI, L. Efeito de diferentes doses de enxofre no consumo voluntário e nas populações de protozoários do

rúmen de novilhas mestiças alimentadas com capim-elefante de baixa qualidade. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 218-222, 2007.

WANG, L. C.; GARCIA-RIVERA, J.; BURRIS, R. H. Metabolism of nitrate by cattle. **Biochemical Journal**, v.81, p.237-242, 1961.

WHANGER, P. D.; MATRONE, G. Effect of dietary sulfur upon the fatty acid production in the rumen. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 98, p. 454-461, 1965.

ZHAO, L.; MENG, Q.; REN, L.; LIU, W.; ZHANG, X.; HUO, Y.; ZHOU, Z. Effects of nitrate addition on rumen fermentation, bacterial biodiversity and abundance. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v. 28, p. 1433-1441, 2015.

ZINN, R. A.; ALVAREZ, E.; MENDEZ, M.; MONTAÑO, M.; RAMIREZ, E.; SHEN, Y. Influence of dietary sulfur level on growth performance and digestive function in feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 1723-1728, 1997.

CAPÍTULO 2

O artigo a seguir está redigido conforme normas de publicação do *British Journal of Nutrition*, exceto o posicionamento das tabelas.

CHAPTER 2 - ENCAPSULATED NITRATE PLUS ELEMENTAL SULFUR IMPROVE MICROBIAL PROTEIN SYNTHESIS AND REDUCE METHANE EMISSION IN NELLORE STEERS

ABSTRACT - The objective of this study was to investigate the replacement of soybean meal or urea by encapsulated nitrate (En) plus elemental sulfur (S) on the efficiency of microbial protein synthesis (MPS) and methane (CH₄) emission in Nellore beef cattle. Five ruminally-cannulated Nellore steers were used in a 5 × 5 Latin square design with 5 periods of 21 d each. The basal diet was prepared as TMR and included chopped Tifton 85 hay as a forage source in a 50:50 (wt/wt) concentrate to forage ratio. The treatments were: soybean meal as control (SBM); urea (U); U plus S (US); En (EN); and EN plus S (ENS). The orthogonal contrasts were: SBM v. EN + ENS; U + US v. EN + ENS; U v. US; and EN v. ENS. Microbial N (MN; g/d) tended to increase ($P = 0.06$) with En inclusion compared to SBM, and was increased ($P \leq 0.04$) by the addition of S to NPN diets. En diets supply increased ($P \leq 0.01$) MN as a proportion of crude protein intake (CPI; g MN/kg CPI), increased ($P = 0.02$) MN efficiency based on digestible organic matter intake (DOMI; g MN/kg DOMI) compared to SBM, and as well tended to increase ($P = 0.09$) g MN/kg DOMI compared to urea. The addition of elemental S to NPN diets tended to increase ($P \geq 0.05$) g MN/kg CPI, and increased ($P = 0.04$) g MN/kg DOMI when included in EN. Animals fed En diets decreased ($P = 0.02$) CH₄ emission by 31.2 (g CH₄/d), and tended to decrease ($P = 0.06$) CH₄ emission (g CH₄/kg DMI, and CH₄ as % of GEI) when compared to SBM. Thus, En plus elemental S partially replacing soybean meal or totally replacing urea can optimize MPS efficiency and concomitantly decrease CH₄ emission by Nellore beef cattle.

Keywords: beef cattle, Encapsulated nitrate, Sulfur, Methane emission, Microbial protein synthesis

1. INTRODUCTION

The use of nitrate (NO_3^-) for ruminants has gained research interest due to its potential as an antimethanogenic compound⁽¹⁻³⁾. In rumen fermentation, NO_3^- is reduced by microbes to ammonia (NH_3) with nitrite (NO_2^-) as the intermediary product. Ammonia generated becomes available for microbial protein synthesis (MPS) as a N source⁽⁴⁾, which can replace non-protein N (NPN; e.g. urea) or dietary true protein.

The replacement of rumen-degraded protein from soybean meal to NPN is interpreted with caution due to uncertain beneficial results⁽⁵⁾. Meanwhile, encapsulated nitrate (En) designed to provide slow release of NO_3^- anion, further than contribute to improve the synchronism of N and energy supplied to microbial fermentation, might confer an energetic advantage on microorganisms due to energy conserved in NO_3^- reduction (against CO_2 reduction; $\text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4$). Decrease in methanogenesis result in more availability of CO_2 in the rumen, and the energy benefit is proven by the positive correlation between CO_2 and MPS⁽³⁾. MPS has a critical role in the ruminant protein metabolism, because metabolizable protein is composed in 50 to 80% from microbial protein⁽⁶⁾.

Dietary adaptation to NO_3^- is required (e.g., a stepwise increase in dietary NO_3^- to the target concentration over a certain period of time), and when is performed, the capacity of the rumen microbes reduce NO_3^- until NH_3 is improved, resulting in less risk of NO_3^- / NO_2^- accumulation⁽⁷⁾. Furthermore, the slower release of NO_3^- in the rumen from En than NO_3^- salt^(8,9), results in an effective microbial adaptation to NO_3^- supply.

In diets with NPN source inclusion, it is important to include sulfur (S) sources to meet the microbial constitution requirements of S amino acids (cystine, cysteine and methionine). The S reduction in the rumen fermentation as well NO_3^- , may act as an electron acceptor⁽¹⁰⁾, enabling additional reduction in the enteric methane (CH_4) production. Moreover, S metabolism can donate electrons to the NO_3^- reduction, thus contributing to avoid accumulation of the reaction intermediate (e.g. NO_2^-)⁽¹¹⁾.

Some studies have evaluated the possible interactions between NO_3^- salt and S in ruminant diets^(10,12). However, the use of NO_3^- in its encapsulated form with S source replacing true protein, needs to be explored. Thus, the objective of this study was to

evaluate the effect of the partial replacement of soybean meal or total replacement of urea by En with the addition of elemental S on the efficiency of MPS and CH₄ emission in Nellore cattle.

2. MATERIALS AND METHODS

The experimental protocol was approved by the Ethics, Bioethics, and Animal Welfare Committee of São Paulo State University (UNESP), School of Agricultural and Veterinarian Sciences, Jaboticabal (protocol number 15046/15). This experiment was conducted at the Department of Animal Science, UNESP, School of Agricultural and Veterinarian Sciences, Jaboticabal, São Paulo, Brazil.

2.1. Animals and Experimental Design

Five ruminally-cannulated Nellore steers (308.0 ± 46.0 kg of initial BW, 397.4 ± 30.8 kg of final BW) with an average of 12 ± 2 months were used. The experiment was conducted in a 5×5 Latin square experimental design with five treatments and five periods (21 d). Each period consisted of 14 d for diet adaptation and 7 d for sampling (Fig. 1).

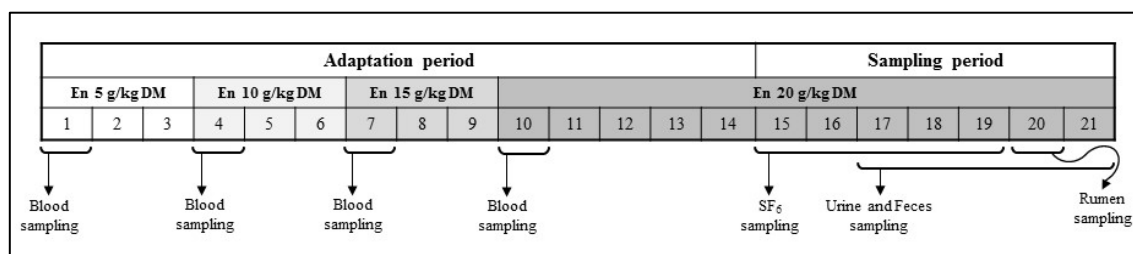


Fig. 1. Sampling protocol during the experimental period. Number from 1 to 21 represent the days of each period.

Animals were kept in individual pens (3×4 m) for housing, with individual feeders and water dispensers. Rumen cannulation surgeries were conducted 2 months prior the

beginning of the experiment, and was obtained a standard post-surgical recovery procedure with no leakage of ruminal contents for all animals.

2.2. Diets and Treatments

The diets were formulated according to the Brazilian Nutrient Requirements for Zebu Beef Cattle system⁽¹³⁾. Treatment diets were rumen degradable protein isonitrogenous (Table 1).

Table 1. Proportion of ingredients and chemical composition of the experimental diets

Item	Diets*				
	SBM	U	US	EN	ENS
Ingredient proportions, g/kg DM					
Chopped Tifton 85 hay†	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0
Soybean meal	105.0	40.0	40.0	40.0	40.0
Ground corn	370.0	427.0	425.0	415.0	413.0
Urea	-	8.0	8.0	-	-
Encapsulated NO ₃ ‡	-	-	-	20.0	20.0
Elemental S§	-	-	2.4	-	2.4
Mineral premix	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0
Chemical composition, g/kg DM					
DM, as-fed basis	927.0 ± 5	926.0 ± 6	924.0 ± 6	924.0 ± 6	922.0 ± 6
OM	927.0 ± 1	923.0 ± 1	921.0 ± 1	911.0 ± 1	909.0 ± 1
CP	150.0 ± 4	146.0 ± 4	146.0 ± 4	140.0 ± 4	140.0 ± 4
aNDF¶	452.0 ± 13	447.0 ± 16	446.0 ± 16	444.0 ± 16	444.0 ± 16
GE, MJ/kg DM	15.9 ± 0.4	15.9 ± 0.4	15.9 ± 0.4	15.5 ± 0.4	15.5 ± 0.4
Calculated concentration, g/kg DM					
RDP**	89.0 ± 2	92.0 ± 2	91.0 ± 2	86.0 ± 2	86.0 ± 2
RUP**	61.0 ± 1	54.0 ± 1	54.0 ± 1	53.0 ± 1	53.0 ± 1
Dietary S + Supp. S***	2.9 + 0.0	2.7 + 0.0	2.7 + 2.4	2.7 + 0.0	2.7 + 2.4
N:S ratio	8:1	8:1	4:1	8:1	4:1

*SBM = Soybean meal; U = Urea; US = Urea + Elemental S; EN = Encapsulated nitrate; ENS = Encapsulated nitrate + Elemental S.

†Tifton 85 hay chopped to a 5-cm particle size.

‡Encapsulated nitrate (NO₃⁻) 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].

§Elemental sulfur source (99% of S).

||Diet was analyzed by the individual composition of the ingredients (n 5).

¶Assayed with heat stable amylase and expressed inclusive of residual ash.

**Estimated based on ingredient values from Valadares Filho *et al.*⁽¹³⁾.

***Dietary S: amount of S contained in the ingredients (hay + soybean meal + corn + mineral premix).
Supplementary S: amount of S added via elemental S source. Amount presented as g/kg DM. The maximum tolerable limit for S in beef cattle is 5 g/kg DM of S in diets containing more than 400 g/kg DM of forage⁽⁴⁴⁾.

Encapsulated NO_3^- (GRASP Ind. & Com. LTDA, Curitiba, PR, Brazil), urea (Petrobras S.A., Rio de Janeiro, RJ, Brazil) and elemental S (Carbotex Química Ind., Com. & Part. LTDA, Araçariquama, SP, Brazil) were added to the concentrate mixture accordingly to the experimental treatment (Table 1). The treatments used were a basal diet containing: True protein from soybean meal as control diet (SBM), urea (U), U plus elemental S (US), encapsulated NO_3^- (EN), and EN plus elemental S (ENS).

The inclusion level of En (20 g/kg DM; 14.3 g/kg DM of NO_3^-) used in the present study was chosen according to previous studies^(9,14), while the urea inclusion level (8 g/kg DM) was calculated to supply the same amount of N from NPN sources than En diets. Furthermore, 8 g/kg DM of urea is commonly used by Brazilian livestock farmers in diets for beef cattle. The N supplied by En and urea (both added as NPN sources) replaced about 62% the N from soybean meal in the control diet. Elemental S was included by 2.4 g/kg DM on US and ENS diets, and reduced the N:S ratio from 8:1 to 4:1.

2.3. Feeding and Management

All diets were prepared daily and fed once a day (07.00 hours) as total mixed ration (TMR). During adaptation and sampling periods (d 1 to 21) the diets were offered *ad libitum*.

Encapsulated NO_3^- was introduced in the diet in a stepwise manner. In the En treatments (EN and ENS), En was gradually included from 5 to 20 g/kg DM by 5 g/kg DM increments every 4 d (Fig. 1). The inclusion of soybean meal (on all treatments), urea (on U and US) and elemental S (on US and ENS) was performed without prior adaptation.

2.4. Data Collection and Sampling

Nutrients intake. Nutrient intake was obtained from d 17 to 21. Orts were collected during the same period. Tifton hay was collected weekly, whereas the diets and the ingredients were collected from ever new feed batch (every 15 d). Immediately after collection, hay and Orts samples were weighed and dried in an air circulating oven (55°C) for 72 hours. All samples were ground in Willey mill (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA) through a 1 mm sieve, and then stored for further chemical analysis.

Total Collection of Feces and Urine. Total tract apparent digestibility and N balance were performed from d 17 to 21. At each spontaneous defecation, feces were collected from the floor and stored in 20-L containers. At each 24 h cycle, total fecal amount was weighed and 5% of the total was sampled. The fecal samples were dried, ground as described before for feeds, and stored for further chemical analysis. Total urine was collected using a collecting funnel attached to the animals waist. The funnels were connected to polyethylene hoses that carried the urine to 20-L containers. A quantity of 200 mL H₂SO₄ (20% v/v) was placed in each container to maintain the urine pH below 3. At the end of each 24 h collection period, the amount of urine was weighed, mixed, filtered through a cheesecloth and then an aliquot of 10 mL of urine was diluted with 40 mL H₂SO₄ (0.036 N) for analysis of purine derivatives and another aliquot (undiluted) was obtained for analysis of total N. All samples were stored at -20°C for later analysis.

Ruminal Fermentation. Ruminal fluid was obtained on d 20 at 0, 2, 4, 6, 12, and 24 h after feeding. Rumen content was obtained from several sites within the rumen-reticulum and subsequently filtered through two layers of cheesecloth. Rumen pH was immediately measured using digital pHmeter (Nova Técnica, PHM, Piracicaba, SP, Brazil). Subsamples of ruminal content were obtained for later analysis of volatile fatty acids (VFAs), and preserved by addition of 0.2 mL of 50% (v/v) H₂SO₄ for later analysis of ammonia nitrogen (NH₃-N). These samples were stored at -20°C.

Blood Sampling. During adaptation (d 1 to 14), blood samples were collected on d 1, 4, 7, and 10 from individual animals to measure blood methemoglobin (MetHb). Blood

samples were taken from the jugular vein 3 hours after feeding^(7,14,15). According to Lee and Beauchemin⁽⁷⁾, 3 hours after feeding nitrate occur the peak of MetHb on blood.

Methane Measurements. Sulfur hexafluoride (SF₆) tracer gas technique was used as a described by Johnson *et al.*⁽¹⁶⁾ and adapted by Primavesi *et al.*⁽¹⁷⁾. From d 15 to 19, enteric CH₄ production was monitored from individual animals. Prior to the experiment, PVC canisters were placed around the animal's neck for adaptation to the apparatus. In addition, prior to the experiment, SF₆ calibrated permeation tubes were placed in the reticulum-rumen of individual animals. The background air was also collected during the measurement.

2.5. Laboratory Analysis and Calculations

Feed ingredients, Orts, and feces were analyzed as follows: dry matter (DM); organic matter (OM); neutral detergent fiber (aNDF); nitrogen content; and gross energy (GE). The analysis of DM (934.01) and OM (942.05) were done according to the recommendations of Association of Official Analytical Chemists⁽¹⁸⁾. The aNDF was analyzed following the recommendations of Van Soest *et al.*⁽¹⁹⁾, containing thermostable alpha-amylase⁽²⁰⁾ using the Ankom²⁰⁰ Fiber Analyzer (ANKOM Technology Corp., Fairport, NY, USA). Nitrogen content in samples was determined by DUMAS method⁽²¹⁾ (LECO Corp., model FP-528 nitrogen analyzer, St. Joseph, MI, USA). Crude protein (CP) content was calculated by multiplying total N by 6.25. The analysis of GE was performed by combustion of samples in an adiabatic bomb calorimeter (Parr Instrument Co., model 6300, Moline, IL, USA).

After thawing, urine subsamples (undiluted) were composited by animal and period and analyzed for total N using LECO (as described above). The purine derivatives (allantoin and uric acid) were determined in the diluted urine subsamples by the colorimetric method, according to Fujihara *et al.*⁽²²⁾, described by Chen and Gomes⁽²³⁾. The absorbed microbial purines (X, mmol/d) was calculated from the excretion of purine derivatives in the urine (Y, mmol/d), by the equation: $Y = (0.85 \times X) + (0.385 \times BW^{0.75})$, where 0.85 is the recovery of purines absorbed as urinary derivatives of purines, and

$0.385 \times BW^{0.75}$ represents the endogenous contribution to purine excretion⁽²⁴⁾. The intestinal flow of N microbial compounds (Y, g N/d) was calculated as a function of absorbed microbial purines (X, mmol/d) using the following equation:

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

where 70 represents N content in purine (mg N/mmol); 0.83, the digestibility of microbial purines; and 0.116, purine-N:total-N in bacteria⁽²³⁾.

Ruminal fluid samples were thawed and NH₃-N analysed by steam distillation with 2N KOH according to the method described by Fenner⁽²⁵⁾ adapted for use in Kjeldahl distillation, in the TECNAL equipment (Nitrogen Distiller TE-036/1, Piracicaba, SP, Brazil). The ruminal samples for VFAs analysis were centrifuged at $15,000 \times g$ (4°C) for 15 min and quantified by GC (GC2014, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) with an HP-INNOWax capillary column (30 m $\times$ 0.32 mm; 0.50 mm film thickness; Agilent Technologies, Colorado, US) at an initial temperature of 80°C and a final temperature of 240°C.

Blood samples were analyzed for MetHb within 1 h after collection using a blood gas analyzer (ROCHE co-oximeter, Cobas b 123 POC, São Paulo, SP, Brazil). The concentrations of SF₆ and CH₄ gas were analyzed using Gas Chromatograph (GC-2014, Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with column Porapak Q (2m $\times$ 3mm i.d., 80 to 100 mesh, Shimadzu, Kyoto, Japan), flame ionization detector for CH₄, and electron capture detector for SF₆, as described by Johnson *et al.*⁽¹⁶⁾.

The CH₄ production was calculated using the following equation:

$$QCH_4 \text{ (g/d)} = QSF_6 \times [CH_4] / [SF_6],$$

where QCH₄ is the emission rate of CH₄ by animal in g/d, QSF₆ is the known release rate of SF₆ from permeation tube in rumen, [CH₄] = CH₄ concentration in animal canister minus the CH₄ concentration in background canister, and [SF₆] = SF₆ concentration in animal canister minus the SF₆ concentration in background canister.

2.6. Statistical Analyses

The Mixed procedure of SAS (version 9.3, SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA) was used for the analysis of intake, digestibility, N digestibility and utilization, and CH₄ emission. The experimental design was 5 × 5 Latin square, described by the following mathematical model:

$$Y = \mu + Ti + Aj + Pk + \varepsilon_{ijk},$$

in which μ is the overall average; Ti is the treatment effect ($i = 1$ to 5); Aj is the animal effect ($j = 1$ to 5); Pk is the period effect ($k = 1$ to 5); and ε_{ijk} is the error term. Treatment was included as a fixed effect. Animal, period and residual experimental error were included as random effects. The LSMEANS option was used to generate the individual means for each treatment. Means were compared by orthogonal contrasts for specific partitioning of treatment effects. The contrasts were: 1) SBM v. EN + ENS; 2) U + US v. EN + ENS; 3) U v. US; and 4) EN v. ENS. Ruminal parameters (pH, NH₃-N, and VFAs) were analyzed as time-repeated measures according to the model:

$$Y = \mu + Ti + Pj + Ak + TPA_{ijk} + TimeL + (T * Time)_{iL} + \varepsilon_{ijkL},$$

in which μ is the overall mean, Ti is the treatment effect ($i = 1$ to 5), Pj is the period effect ($j = 1$ to 5), Ak is the animal effect ($k = 1$ to 5), $TimeL$ is the effect of collection time ($L = 0$ to 24), $(T * Time)_{iL}$ is the interaction treatment*time after feeding, and ε_{ijkL} is the error term. Treatment was included as a fixed effect. Animal, period and residual experimental error as random effects. The LSMEANS was used to generate the means of variables. The effects of treatment, time, and interaction between treatment and time were defined by the F-test of ANOVA using the SLICE option to separate significant interaction. Means were compared by orthogonal contrasts as indicated above. Statistical significance was declared at $P < 0.05$. Differences with $0.05 < P < 0.10$ were considered a trend toward significance.

3. RESULTS

3.1. Adaptation to the Encapsulated Nitrate

Steers displayed levels of 1.1 of MetHb (% of Hb) on average, with maximum values of 1.4% as dietary En content increased (Fig. 2). In each day of stepwise increase of En level (d 3, 6, 9, and 12), feed consumption rate in the first three hours after feeding, as % of the total DMI, was measured, and was not different between diets (data not shown in tables).

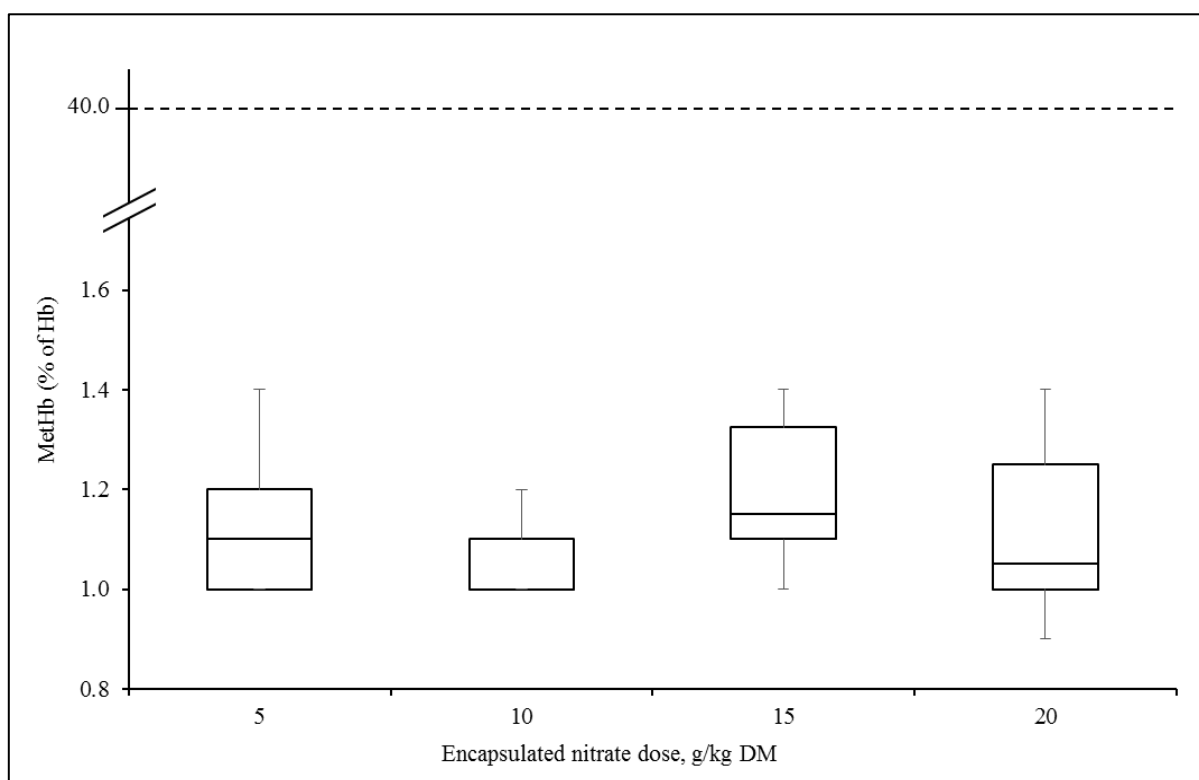


Fig. 2. Box plot of blood methemoglobin (MetHb as % of Hb) determined 3 h postfeeding during the adaptation period in blood of Nellore steers (n 10) fed incremental levels of En in their diet. Encapsulated NO_3^- was gradually included from 5 to 20 g/kg DM by 5 g/kg DM increments every 4 d in EN and ENS diets. The upper error bar represents the highest MetHb level measured. The top of the box represents the third quartile value for MetHb level. The line within the box represents the median MetHb level. The bottom of the box represents the first quartile MetHb level, and the lower error bars represent the minimum MetHb level measured. Dotted line represents the limit of MetHb level for onset the toxicity expressed on depression of intake and performance.

3.2. Nutrient Intake and Digestibility

Intake and digestibility based on total collection of feces are presented in Table 2. Dry matter and GE intake tended to decrease ($P = 0.05$) for animals fed En diets compared to SBM, as well as OM and aNDF intake were lower ($P \leq 0.01$) with En diets compared to SBM. Organic matter intake tended to decrease ($P = 0.06$) for En diets compared to urea. Digestibility of DM, OM, and GE were greater ($P \leq 0.01$) with En diets supply compared to urea.

Table 2. Effect of encapsulated nitrate or urea with or without elemental sulfur on intake and apparent total-tract digestibility in Nellore steers

Total tract digestibility in Friesian steers										
Item	Diets*					SEM	Contrasts (<i>P</i> -value)			
	SBM	U	US	EN	ENS		SBM v. EN†	U v. EN‡	U v. US	EN v. ENS
Intake, kg/d§										
DM	6.5	6.2	6.3	6.0	6.0	0.38	0.05	0.15	0.66	0.87
OM	6.0	5.7	5.8	5.5	5.5	0.35	0.01	0.06	0.72	0.92
aNDF	2.9	2.8	2.8	2.7	2.7	0.17	0.01	0.18	0.84	0.79
GE, MJ/d	111.7	107.5	109.2	103.7	104.6	1.58	0.05	0.17	0.68	0.86
Digestibility, g/kg DM										
DM	769	752	745	768	759	1.35	0.40	0.01	0.34	0.24
OM	782	761	753	779	770	1.40	0.30	0.007	0.33	0.30
aNDF	721	696	701	713	704	1.47	0.11	0.12	0.56	0.29
GE	756	736	729	755	747	1.45	0.50	0.01	0.47	0.38

*SBM = Soybean meal; U = Urea; US = Urea + Elemental S; EN = Encapsulated nitrate; ENS = Encapsulated nitrate + Elemental S.

†SBM v. EN = soybean meal v. En treatments.

‡U v. EN = urea treatments v. En treatments.

§Intake measured during the total collection of feces and urine (d 17 to 21).

3.3. Ruminal Fermentation

Sampling time interactions ($P < 0.001$) occurred for ruminal pH, $\text{NH}_3\text{-N}$, and VFAs (Table 3; Fig. 3, 4, and 5). Ruminal pH was greater ($P = 0.01$) and ruminal $\text{NH}_3\text{-N}$ was smaller ($P = 0.01$) for animals fed En diets compared to urea. Treatments did not affect ($P \geq 0.12$) ruminal concentration of total VFAs. Compared to urea diets, En supply had

lower ($P = 0.01$) propionate proportion, but increased ($P \leq 0.03$) acetate proportion and acetate:propionate ratio.

Table 3. Effect of encapsulated nitrate or urea with or without elemental sulfur on ruminal pH, $\text{NH}_3\text{-N}$, and VFAs in Nellore steers

Item	Diets*					SEM	Contrasts (P -value)			
	SBM	U	US	EN	ENS		SBM v. EN†	U v. EN‡	U v. US	EN v. ENS
pH§,	6.78	6.78	6.76	6.87	6.83	0.05	0.11	0.03	0.62	0.37
$\text{NH}_3\text{-N}$, mg/dL§,	20.14	21.81	23.70	20.59	19.70	1.41	0.99	0.01	0.19	0.52
Total VFAs, mmol/L§	96.66	97.26	104.85	102.27	98.76	6.47	0.46	0.61	0.12	0.57
VFAs as proportion of total, %§										
Acetate	71.41	70.20	70.63	72.55	72.92	1.16	0.16	0.007	0.68	0.72
Propionate	14.66	15.36	15.85	13.85	13.26	1.02	0.25	0.01	0.64	0.58
Butyrate	9.88	10.52	9.63	9.75	10.06	0.54	0.97	0.71	0.20	0.64
Isobutyrate	1.13	1.07	1.03	0.98	1.05	0.04	0.11	0.45	0.54	0.28
Valerate	1.07	1.11	1.11	1.10	1.02	0.07	0.76	0.25	1.00	0.25
Isovalerate	1.83	1.72	1.72	1.75	1.67	0.14	0.47	0.95	1.00	0.68
Acetate:Propionate	5.00	4.63	4.48	5.32	6.00	0.59	0.25	0.03	0.81	0.30

*SBM = Soybean meal; U = Urea; US = Urea + Elemental S; EN = Encapsulated nitrate; ENS = Encapsulated nitrate + Elemental S.

†SBM v. EN = soybean meal v. En treatments.

‡U v. EN = urea treatments v. En treatments.

§Sampling time interaction ($P < 0.001$).

||Time $\times$ treatment interaction ($P < 0.001$).

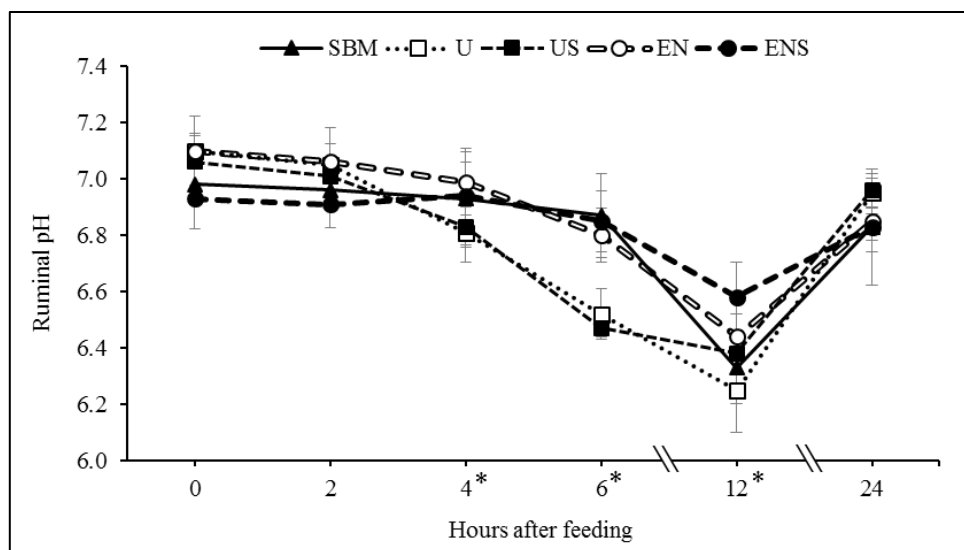


Fig. 3. Effect of encapsulated nitrate or urea with or without elemental sulfur on ruminal pH. The 0 h represents the collection before the morning

feeding. Time effect ($P < 0.001$); and time $\times$ treatment interaction ($P < 0.001$) at 4, 6, and 12 h. The ruminal pH was greater ($P \leq 0.03$) for En diets compared to urea at 4, 6, and 12 h. Error bars are defined a SE.

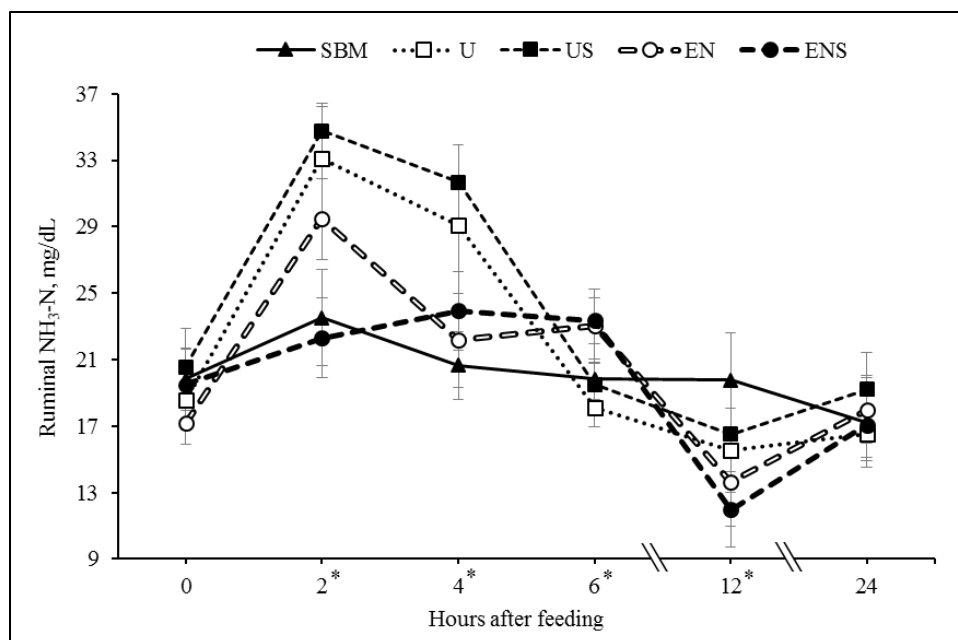


Fig. 4. Effect of encapsulated nitrate or urea with or without elemental sulfur on ruminal NH₃-N. The 0 h represents the collection before the morning feeding. Time effect ($P < 0.001$); and time $\times$ treatment interaction ($P < 0.008$) at 2, 4, 6, and 12 h. The ruminal NH₃-N was smaller ($P \leq 0.01$) for En diets compared to urea at 2 and 4 h; NH₃-N was greater ($P = 0.03$) for En diets compared to urea at 6 h; and NH₃-N was smaller ($P = 0.007$) for En diets compared to SBM at 12 h. Error bars are defined as SE.

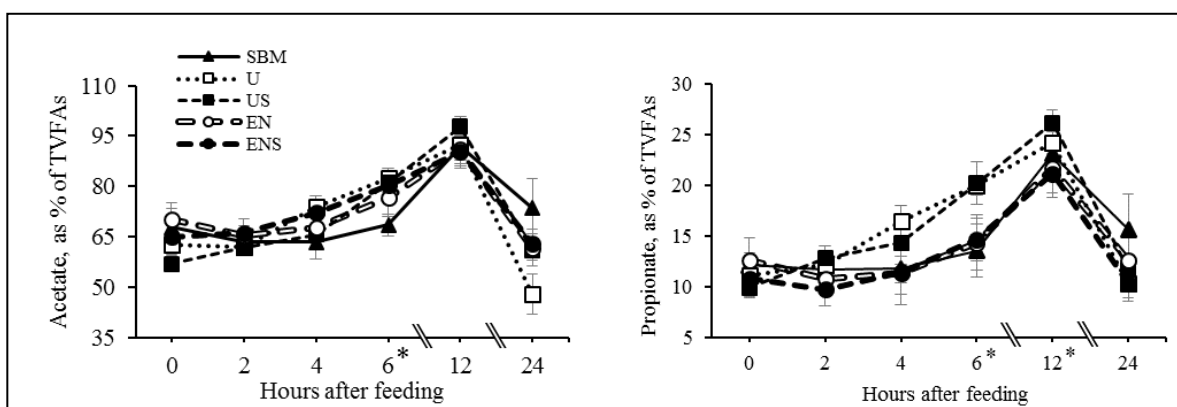


Fig. 5. Effect of encapsulated nitrate or urea with or without elemental sulfur on ruminal VFAs. The 0 h represents the collection before the morning feeding. Time effect ($P < 0.001$); and time $\times$ treatment interaction ($P < 0.001$) at 6, and 12 h. At 6 h, acetate was greater ($P = 0.02$) for En diets compared to SBM; and at 12 h, propionate was greater ($P \leq 0.04$) for urea diets compared to En.

3.4. Nitrogen Utilization and Excretion

Nitrogen intake was lower ($P \leq 0.07$) with En diets supply compared to SBM and urea. Animals fed En diets tended to decrease ($P \leq 0.07$) the fecal N losses (g/d) compared to SBM and urea (Table 4). Retained N (g/d) with En supply was lower ($P = 0.01$) compared to SBM and urea. Retained N as proportion of N intake was not different ($P \geq 0.18$) between diets.

Table 4. Nitrogen digestibility and utilization in Nellore steers fed diets containing encapsulated nitrate or urea with or without elemental sulfur

Item	Diets*					SEM	Contrasts (P-value)			
	SBM	U	US	EN	ENS		SBM v. EN†	U v. EN‡	U v. US	EN v. ENS
N intake, g/d§	156.0	146.8	149.2	135.4	135.8	9.36	0.001	0.01	0.68	0.94
N ATTD, g/kg DM	749.8	737.0	737.7	740.6	735.3	1.30	0.12	0.91	0.93	0.53
Fecal N,										
g/d	39.8	38.5	39.1	35.0	36.0	3.39	0.05	0.07	0.82	0.68
As % of N intake	25.0	26.3	26.2	25.9	26.5	1.30	0.12	0.91	0.93	0.53
Urinary N,										
g/d	55.5	49.7	53.6	52.3	50.4	3.00	0.24	0.91	0.33	0.64
As % of N intake	36.3	34.4	36.2	38.9	37.4	2.54	0.45	0.17	0.51	0.59
Retained N¶,										
g/d	60.6	58.6	56.5	48.1	49.4	6.61	0.01	0.01	0.66	0.78
As % of N intake	38.7	39.3	37.5	35.2	36.2	2.89	0.23	0.18	0.54	0.72
Microbial N,										
g/d	78.5	75.0	89.9	82.1	97.0	5.47	0.06	0.14	0.03	0.04
g/kg CPI	76.8	76.8	91.9	91.8	110.0	6.23	0.004	0.01	0.08	0.05
g/kg DOMI**	15.5	15.7	19.3	17.9	21.3	1.30	0.02	0.09	0.04	0.07
CP intake per DOMI										
g/kg DOMI	203.1	204.3	207.9	193.2	194.3	4.49	0.003	0.001	0.23	0.71

*SBM = Soybean meal; U = Urea; US = Urea + Elemental S; EN = Encapsulated nitrate; ENS = Encapsulated nitrate + Elemental S.

†SBM v. EN = soybean meal v. En treatments.

‡U v. EN = urea treatments v. En treatments.

§N intake measured during the total collection of feces and urine (d 17 to 21).

||Apparent total-tract digestibility.

¶Intake - feces - urine.

**DOMI = Digestible organic matter intake.

Microbial N (MN; g MN/d) tended to increase ($P = 0.06$) with En inclusion compared to SBM, and was increased ($P \leq 0.04$) by the addition of elemental S to NPN diets. Encapsulated NO_3^- diets supply increased ($P \leq 0.01$) MN as a proportion of CPI (g MN/kg CPI), increased ($P = 0.02$) MN efficiency based on digestible OM intake (DOMI; g MN/kg DOMI) compared to SBM, as well as tended to increase ($P = 0.09$) g MN/kg DOMI compared to urea. The addition of elemental S to NPN diets tended to increase ($P \geq 0.05$) g MN/kg CPI, increased ($P = 0.04$) g MN/kg DOMI when included in EN, and tended to increase ($P = 0.07$) g MN/kg DOMI when included in U. The relation between CP intake and digestible OM intake was decreased ($P \leq 0.003$) by En inclusion when compared to SBM and urea diets.

3.5. Enteric Methane Emission

Animals fed En diets decreased ($P = 0.02$) CH_4 emission by 31.2 (g CH_4/d), and tended to decrease ($P = 0.06$) CH_4 emission (g $\text{CH}_4/\text{kg DMI}$ and CH_4 as % of GEI) when compared to SBM (Table 5).

Table 5. Effect of encapsulated nitrate or urea with or without elemental sulfur on enteric methane emission in Nellore steers

Methane Emission in Holstein Steers										
Item	Diets*					SEM	Contrasts (P-value)			
	SBM	U	US	EN	ENS		SBM v. EN†	U v. EN‡	U v. US	EN v. ENS
CH ₄ emission										
g/d§	94.8	81.9	74.4	66.0	61.1	14.76	0.02	0.17	0.55	0.75
g/kg DMI	14.0	12.6	11.4	11.5	10.3	1.54	0.06	0.40	0.45	0.58
% of GEI	4.5	4.1	3.6	3.7	3.3	0.49	0.06	0.39	0.44	0.56

*SBM = Soybean meal; U = Urea; US = Urea + Elemental S; EN = Encapsulated nitrate; ENS = Encapsulated nitrate + Elemental S.

†SBM v. EN = soybean meal v. En treatments.

‡U v. EN = urea treatments v. En treatments.

§Collection of gases using the SF_6 technique during five consecutive days (from d 15 to 19).

||Calculated based on intake measured from d 15 to 19.

4. DISCUSSION

The results suggested that the inclusion of En as a supplementary source of NPN plus elemental S could improve the efficiency of microbial protein synthesis and reduce CH₄ emission by Nellore beef cattle.

Dry matter intake and blood MetHb levels three hours postfeeding⁽⁷⁾ during the 2-wk stepwise increase of En for animals fed the EN and ENS diets were verified to check signs of NO₂⁻ intoxication. Dry matter intake can be used as a practical parameter for checking eventual metabolic disorders, as well as blood MetHb is a parameter to check the absorption of NO₂⁻ to blood stream when animals are feeding NO₃⁻⁽²⁶⁾. With En inclusion, feed consumption rate in the first three hours after feeding (as % of the total DMI) did not change compared to the diets without En. This comparison was made for each one of the increased levels of NO₃⁻ on dietary DM (5, 10, 15, and 20 g/kg DM). These results agree with found by Van Zijderveld *et al.*⁽¹⁰⁾, with no difference in feed intake with NO₃⁻ inclusion over the adaptation period. Blood MetHb levels remained far below (0.9 to 1.4% of MetHb) the levels reported to cause toxicity⁽²⁷⁾ (methemoglobinemia; 30 to 40% of MetHb). Previous studies also showed low MetHb levels (2% in average) at similar feeding rates of NO₃⁻ than in our study, i.e., 20 g/kg DM⁽²⁸⁻³⁰⁾. In addition, other studies that used the same source of En also observed basal levels (around 1%) of blood MetHb^(31,32). Besides the slow anion release from En, other explanation for no difference found to these parameters, might be due to low level of NO₃⁻ included, as well the stepwise adaptation adopted.

During the collection period (d 17 to 21), DMI for En diets tended to be lower than urea, and this result could affected OM, aNDF, and GE intakes as observed. Nitrate has bitter taste, so DMI might be altered with NO₃⁻ inclusion by lowered diet palatability. Although other studies presented no influence on DMI with similar NO₃⁻ level inclusion^(30,33), and Bruning-Fann and Kaneene⁽²⁷⁾ related that DMI was only influenced when dietary NO₃⁻ level was above 30 g/kg DM, our result is in agreement with recent studies^(29,34). Compared to SBM, although animals fed En had lower nutrient intake, the digestibility was not affected, resulting in better nutrient usage. Even though animals fed

En diets compared to urea had no differences in nutrients intake, those fed with En had improved digestibility of DM, OM, and GE. Encapsulated NO_3^- might have induced dietary synchronism of N and energy as a result of the reduction in solubility of NPN in that form, and therefore benefited microbial potential fermentation.

Nitrogen intake was lower for animals fed En diets compared to SBM and urea. This might have been influenced by different amount of CP supplied on diets or by lower OMI obtained with En diets. Results for retained N (g N/d) were consistent with N intake, however, N digestibility were not different, and thus retained N as a proportion of N intake was not different. In agreement, other studies also reported that supplementary NO_3^- can substitute urea as a source of NPN without influencing losses of N^(12,35,36).

When NO_3^- in its unencapsulated form is introduced into the rumen, there is a rapid disappearance of nitrate from the rumen fluid⁽¹¹⁾. While NO_3^- may be rapidly taken up by bacteria and metabolized to NH_3 for their own use, the NO_3^- also could take different pathway, as be absorbed to blood stream in the recycling pathway, or be absorbed by microbes to future utilization⁽¹¹⁾. Other pathway than direct conversion to NH_3 , makes the conversion of NO_3^- to NO_2^- , and then to NH_3 , not exactly like is expected. Consequently, these other pathways could makes the NO_3^- availability slower, and reduce the potential of intoxication. However, must be consider that other factors are involved in this metabolism, as the other dietary components, amount of NO_3^- given, and the time taken for the delivery. This knowledge needs be improved, to be sure about the pathways from NO_3^- metabolism. Anyway, is known that En supply nitrogen slowly (rapidly degradable fraction, 45%; and slowly degradable fraction, 51%⁽³⁷⁾) and prevents elevated ammonia production that is inherent of feeding urea to ruminants (disappearance of 100% at first hour). In the present study, lower En solubilization compared to urea was suggested by lower ruminal $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration at 2 and 4 h postfeeding. In agreement, El-Zaiat *et al.*⁽⁸⁾ reported higher concentrations of $\text{NH}_3\text{-N}$ with urea compared with En treatments.

Efficiency of microbial protein synthesis was potencialized by En supply compared to SBM and to urea, and it is confirmed by greater microbial N (g) per DOMI (kg) (1.26- and 1.12-fold increase relative to SBM and urea, respectively). This improves on efficiency of MPS may have increased the yield of usage of dietary N, expressed by microbial N (g)

per CPI (kg) (1.31- and 1.19-fold increase relative to SBM and urea, respectively). Agreeing with our results for MN by NO_3^- supply, other studies confirmed the potential positive effect of NO_3^- on MPS^(3,38,39). The amount of protein synthesized per mole of ATP hydrolyzed, previously cited as efficiency of MPS, might be an indicative of the adequate supply of nutrients (protein) for ruminants. This efficiency is related to nutrients conversion in animal product, because microbial protein is one of the main contributors of metabolizable amino acid supply for beef cattle⁽⁴⁰⁾. Agreeing with this assumption, a study with En supply on cattle performance, shows animals feeding En on finishg phase improved feed efficiency (Gain:Feed) at similar level of inclusion as the present⁽³¹⁾.

Although Zhou et al.⁽⁴¹⁾, Patra and Yu⁽⁴²⁾, and Guyader et al.⁽³⁾ observed a decrease in isobutyrate and isovalerate with NO_3^- diets, in the present study, isobutyrate, isovalerate, as well valerate, and butyrate, did not show differences. However our results is in agreement with Olijhoek *et al.*⁽³⁰⁾, as well as Liu et al.⁽⁴³⁾ that observed no differences for isobutyrate, valerate, isovalerate. Guyader et al.⁽³⁾ do mention that the decrease obtained for isobutyrate and isovalerate with NO_3^- diets, suggests a decrease in deamination of branched-chain amino acids. This possible decrease in amino acid degradation should explain the greater daily microbial protein production⁽³⁾. As the present study did not differ those VFAs, we could not suggest the same explanation. Nonetheless, the efficiency of NO_3^- for MPS could be explained by the slow N release from nitrate, that may enhances the synchrony between N and energy availability for MPS, as by the energetic and thermodynamic process of NO_3^- reduction against methanogenesis pathway. Nitrate reduction ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_3$) is energetically more favorable than reduction of CO_2 by methanogenesis ($\text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4$)⁽³⁸⁾. Given the positive potential redox, NO_3^- can serve as an electron sink more competitive than CO_2 . Thus, first by suppression on CH_4 production, with less energy lost by CH_4 emission, and second by the energy conserved in NO_3^- reduction (against CO_2 reduction), more energy may be available for microbial growth. Decrease on production of CH_4 with increase on CO_2 available, confer an energetic advantage on organisms in the rumen ecosystem, and is confirmed by the positive correlation between CO_2 and MPS⁽³⁾.

Besides nitrogen, sulfur is required for rumen microbes to synthesize their own S amino acids (methionine, cysteine, and cystine) for their growth and normal cellular metabolism⁽⁴⁰⁾. The amount of S in the diets should be balance with the N content (9:1). In the current study, the calculated amount of S in the basal diet (2.7 - 2.9 g/kg DM) already achieved the amount recommended by NRC⁽⁴⁰⁾ (1.5 g/kg DM). The addition of elemental S (2.4 g/kg DM) in the US and ENS treatments were above NRC⁽⁴⁰⁾ recommendation for dietary S, but within the acceptable inclusion threshold of 5 g/kg DM for cattle fed more than 400 g/kg DM of forage⁽⁴⁴⁾. This dosage of elemental S was chosen to challenge the animal with a greater amount of S to combined with NPN sources, as well as, the source of S was chosen based on its lower solubility into ruminal fermentation, compared to sulfate source (SO_4^{2-})^(45,46). Even with the calculated N:S ratio reduced from 8:1 to 4:1 when S was added to the respective treatments (US and ENS) the amount of microbial N increased (g MN/d) as well the microbial N efficiency (g MN/kg DOMI). In agreement with our results, Thompson *et al.*⁽⁴⁷⁾, with N:S ratio reduced from 15:1 to 5:1 when elemental S was added to NPN diet, showed improved feed utilization, expressed by cattle performance. In contrast with these findings, Li *et al.*⁽¹²⁾ did not found differences on the microbial N outflow (g/d) with addition of elemental S (1.8 - 4.0 g/kg DM) to 18.8 g/kg DM of CaNO_3^- in lamb diets. This last study reduced the N:S from 16:1 to 4:1.

The total VFAs production were unaffected by treatments, although compared with urea diets, animals fed En increased the proportion of acetate and decreased propionate. Consequently, acetate:propionate ratio was greater with En diets compared to urea. Nitrate is a strong reducing agent, and NO_3^- reduction rapidly consumes electrons leading to decreased concentrations of NADH and increased NAD^+ , which in turn modify the rumen fermentation in favor of acetate production⁽⁴⁹⁾. Otherwise, NO_3^- conversion to NH_3 is energetically more favorable than propionogenesis⁽⁵⁰⁾. Therefore, with NO_3^- supply, glucose fermentation is deviate away from the propionigenesis into acetate, explaining the smaller propionate proportion. These findings are expected with NO_3^- supply to ruminants, and have been reported^(3,30,43).

Rumen pH was greater for En diets compared to urea, but all values remained within the range of 6.25 to 7.1 throughout the day ('normal' range is between 6 and 7).

Agreeing with our results, Guo et al.⁽³⁸⁾, Lee et al.⁽⁹⁾, and Nguyen et al.⁽⁵¹⁾ also observed increased rumen pH with NO_3^- diets. Elemental S included on US and ENS diets did not change the rumen pH, and this also was reported with S inclusion^(47,52). Although others reported no difference on rumen pH in cattle when NO_3^- was added in diets⁽²⁸⁾, and differences when S was added⁽⁵³⁾, must be consider that the composition of diet (concentrate v. forage) is determining. The proportion of concentrate to forage in this study is equal (50:50, wt/wt), thus this pH average is expected. However, even with minimum values (6.4) of rumen pH obtained by all treatments above the critical pH (5.5), the minimum pH value for En diets (6.44) is slightly higher compared with urea (6.25). Thus, in diets with greater inclusion of concentrate, those slightly higher minimum value of pH in En diets, could maintain the pH values at levels more reasonable for rumen fermentation.

Mitigation of CH_4 emission by NO_3^- supply for ruminants is a pattern comproved by several studies published⁽²⁸⁻³⁰⁾. Our study used cannulated animals to measured CH_4 emission by SF_6 method, and considering the reported that there is the possibility of gas leakage from cannula that is not computed by SF_6 technique⁽⁵⁴⁾, the absolute values of CH_4 emission should be interpreted with caution because they could underestimate the real emission. However, our results showed that feeding En diets compared to SBM, daily CH_4 production was decreased by 31.2 g CH_4 /d, even with no effect in acetate (role as methanogenesis precursor) proportion. Furthermore, our results are in agreement (g CH_4 /kg DMI, and CH_4 as % of GEI) with studies in which cattle were used without cannula in the rumen, from the same research group as our^(55,56). Beyond all, must be into account that, firstly the animals had the cannula well fitted, because the surgeries were performed with care and, secondly, the present study was designed by latin square. Thus, when experimental procedures are standardized among treatments and experimental periods within an experiment, as performed in this study, in spite of possible bias in the absolute values, the relative comparisons between treatments should be valid.

Methane decrease obtained for En diets by 15.3% in CH_4 /DMI (g/kg) for each 10 g/kg of NO_3^- included was consistent with the range of previous studies by NO_3^- supply (16.3%⁽¹⁴⁾; 8.4%⁽³⁷⁾; 16.3%⁽⁵⁷⁾; both to beef cattle). Nitrate reduction (NO_3^- to NH_3) is more

favorable than the reduction of CO_2 to CH_4 (methanogenesis)⁽⁷⁾. Based on stoichiometry, the theoretical CH_4 reduction is that for 1 mol of NO_3^- (100 g) reduced to NH_3 , use of 4 mols of hydrogen, and will suppress CH_4 production by 1 mol (26 g)⁽⁷⁾. In our study, the CH_4 production decrease with En diets was 7.3% higher compared to the theoretical expected. The greater efficiency in CH_4 reduction potential than expected suggests that the NO_3^- lowering effect can not only be attributed to competition for H_2 ⁽³⁰⁾. Other factors could be related to the high efficiency of NO_3^- to reduce CH_4 production, and between them, might be due to rumen pH (6.8 on average) remained around 6.5 or 5.6, pH in which nitrate and nitrite reductases work optimally^(58,59); due to the availability of substrates (nutrients) that stimulate ruminal microbes metabolism, together with the availability of electron-donor for NO_3^- and NO_2^- reduction metabolism^(58,60), considering the slow NO_3^- anion release, and finally, by forming NO_2^- that is directly toxic to methanogens^(61,62).

Excess of nitrogen excreted, as well as CH_4 emission from livestock production are damaging to environment. Our study shows that En plus elemental S could be a strategy to include NPN in place of urea and replacing partially soybean meal, improving N usage efficiency by microbes, aligned with the potential to mitigate CH_4 emissions. Even with less CP intake proportional to DOMI, the efficiency of MPS was improved and, thus, arises the possibility to reduce dietary N maintaining adequate metabolizable protein to the host. Future research could address the supply of En and S with less amount of dietary N.

5. CONCLUSION

Encapsulated nitrate plus elemental S partially replacing soybean meal of the ration or totally replacing urea can optimize the efficiency of microbial protein synthesis and concomitantly decrease methane emission by Nellore beef cattle.

6. REFERENCES

1. Yang C, Rooke JA, Cabeza I, *et al.* (2016) Nitrate and inhibition of ruminal methanogenesis: microbial ecology, obstacles, and opportunities for lowering methane emissions from ruminant livestock. *Front Microbiol* 7, 132. doi:10.3389/fmicb.2016.00132.

2. Latham EA, Anderson RC, Pinchak WE, *et al.* (2016) Insights on alterations to the rumen ecosystem by nitrate and nitrocompounds. *Front Microbiol* **7**, 228. doi:10.3389/fmicb.2016.00228.
3. Guyader J, Ungerfeld EM & Beauchemin KA (2017) Redirection of Metabolic Hydrogen by Inhibiting Methanogenesis in the Rumen Simulation Technique (RUSITEC) *Front Microbiol* **8**, 393. doi: 10.3389/fmicb.2017.00393.
4. Dijkstra J, France J & Davies DR (1998) Different mathematical approaches to estimating microbial protein supply in ruminants. *J Dairy Sci* **81**, 3370-3384.
5. Broderick GA & Reynal SM (2009) Effect of source of rumen-degraded protein on production and ruminal metabolism in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* **92**, 2822-2834.
6. Storm E & Ørskov ER (1983) The nutritive value of rumen microorganisms in ruminant. 1. Large-scale isolation and chemical composition of rumen microorganisms. *Br J Nut* **50**, 463-470.
7. Lee C & Beauchemin KA (2014) A review of feeding supplementary nitrate to ruminant animals: nitrate toxicity, methane emissions, and production performance. *Can J Anim Sci* **94**, 557-570.
8. El-Zaiat HM, Araujo RC, Soltan YA, *et al.* (2014) Encapsulated nitrate and cashew nut shell liquid on blood and rumen constituents, methane emission, and growth performance of lambs. *J Anim Sci* **92**, 2214-2224.
9. Lee C, Araujo RC, Koenig KM, *et al.* (2015) Effects of encapsulated nitrate on eating behavior, rumen fermentation, and blood profile of beef heifers fed restrictively or ad libitum. *J Anim Sci* **93**, 2405-2418.
10. Van Zijderveld SM, Gerrits WJJ, Apajalahti JA, *et al.* (2010) Nitrate and sulfate: Effective alternative hydrogen sinks for mitigation of ruminal methane production in sheep. *J Dairy Sci* **93**, 5856-5866.
11. Leng RA (2008) The potential of feeding nitrate to reduce enteric methane production in ruminants. A Report to the Department of Climate Change, 90.
12. Li L, Silveira CI, Nolan JV, *et al.* (2013) Effect of added dietary nitrate and elemental sulfur on wool growth and methane emission of Merino lambs. *Anim Prod Sci* **53**, 1195-1201.

13. Valadares Filho SDC, Marcondes MI, Chizzotti ML, *et al.* (2010) Exigências nutricionais de zebuínos puros e cruzados. BR-CORTE. UFV, Suprema Gráfica Ltda: Viçosa, Brazil.
14. Newbold JR, Van Zijderveld SM, Hulshof RBA, *et al.* (2014) The effect of incremental levels of dietary nitrate on methane emissions in Holstein steers and performance in Nelore bulls. *J Anim Sci* **92**, 5032-5040.
15. Benu I, Callaghan MJ, Tomkins N, *et al.* (2016) The effect of feeding frequency and dose rate of nitrate supplements on blood haemoglobin fractions in *Bos indicus* cattle fed Flinders grass (*Iseilemia* spp.) hay. *Anim Prod Sci* **56**, 1605-1611. doi:10.1071/AN14886.
16. Johnson K, Huyler M, Westberg H, *et al.* (1994) Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a SF₆ tracer technique. *Environ Sci Technol* **28**, 359-362.
17. Primavesi O, Frigheto RTS, Pedreira MS, *et al.* (2004) SF₆-tracer technique for bovine ruminal methane field measurements: adaptations to Brazilian conditions. Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos. (Documento, 39).
18. AOAC. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Arlington, 15.ed., 1995.
19. Van Soest PJ, Robertson JB & Lewis BA (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci* **74**, 3583-3597.
20. Mertens DR (2002) Gravimetric determination of amylase treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, Arlington **85**, 1212-1240.
21. Etheridge RD, Pesti GM & Foster EH (1998) Comparison of nitrogen values obtained utilizing the kjeldahl nitrogen and Dumas combustion methodologies (Leco CNS 2000) on sample typical of animal nutrition analytical laboratory. *Anim Feed Sci Techol* **73**, 249-251.
22. Fujihara T, Ørskov ER & Reeds PJ (1987) The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. *J Agric Sci* **109**, 7-12.

23. Chen SB & Gomes MJ (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.
24. Verbic J, Chen XB, Macleod NA, *et al.* (1990) Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. *J Agric Sci* **114**, 243-248.
25. Fenner H (1965) Method for determining total volatile bases in rumen fluid by steam distillation. *J Anim Sci* **48**, 249-251.
26. Takahashi J, Ikeda M, Matsuoka S, *et al.* (1998) Prophylactic effect of l-cysteine to acute and subclinical nitrate toxicity in sheep. *Anim Feed Sci Technol* **74**, 273-280.
27. Bruning-Fann JS & Kaneene JB (1993) The effects of nitrate, nitrite, and N-nitroso compounds on animal health. *Vet Hum Toxicol* **35**, 237-253.
28. Veneman JB, Muetzel S, Hart KJ, *et al.* (2015) Does Dietary Mitigation of Enteric Methane Production Affect Rumen Function and Animal Productivity in Dairy Cows? *PLoS ONE* **10**, 10-e0140282. doi:10.1371/journal.pone.0140282.
29. Klop G, Hatew B, Bannink A, *et al.* (2016) Feeding nitrate and docosaehaenoic acid affects enteric methane production and milk fatty acid composition in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* **99**, 1161-1172.
30. Olijhoek DW, Hellwing ALF, Brask M, *et al.* (2016) Effect of dietary nitrate level on enteric methane production, hydrogen emission, rumen fermentation, and nutrient digestibility in dairy cows. *J Dairy Sci* **99**, 1-15. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10691>.
31. Lee C, Araujo RC, Koenig KM, *et al.* (2017) Effects of encapsulated nitrate on growth performance, carcass characteristics, nitrate residues in tissues, and enteric methane emissions in beef steers: finishing phase. doi: 10.2527/jas2017.1461.
32. Lee C, Araujo RC, Koenig KM, *et al.* (2017) Effects of encapsulated nitrate on growth performance, nitrate toxicity, and enteric methane emissions in beef steers: backgrounding phase. doi: 10.2527/jas2017.1460.
33. Troy SM, Duthie CA, Hyslop JJ, *et al.* (2015) Effectiveness of nitrate addition and increased oil content as methane mitigation strategies for beef cattle fed two contrasting basal diets. *J Anim Sci* **93**, 1815-1823.

34. Lee C, Araujo RC, Koenig KM, *et al.* (2015) Effects of feed consumption rate of beef cattle offered a diet supplemented with nitrate ad libitum or restrictively on potential toxicity of nitrate. *J Anim Sci* **93**, 4956-4966.
35. Van Zijderveld SM, Gerrits WJJ, Dijkstra J, *et al.* (2011) Persistency of methane mitigation by dietary nitrate supplementation in dairy cows. *J Dairy Sci* **94**, 4028-4038.
36. Guyader J, Eugène M, Meunier B, *et al.* (2015) Additive methane-mitigating effect between linseed oil and nitrate fed to cattle. *J Anim Sci* **93**, 3564-3577.
37. Lee C, Araujo RC, Koenig KM, *et al.* (2015) Effects of encapsulated nitrate on enteric methane production and nitrogen and energy utilization in beef heifers. *J Anim Sci* **93**, 2391-2404.
38. Guo WS, Schaefer DM, Guo XX, *et al.* (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 J Anim Sci* **22**, 542-549.
39. Nguyen SH, Barnett MC & Hegarty RS (2016) Use of dietary nitrate to increase productivity and reduce methane production of defaunated and faunated lambs consuming protein-deficient chaff. *Anim Prod Sci* **56**, 290-297.
40. NRC - National Research Council. **Nutrient Requirements of Beef Cattle**. 8th. rev. ed. National Academy Press. Washington, DC. 2016.
41. Zhou Z, Yu Z & Meng Q (2012) Effects of nitrate on methane production, fermentation, and microbial populations in in vitro ruminal cultures. *Bioresource technology* **103**, 173-179.
42. Patra AK & Yu Z (2013) Combinations of nitrate, saponin, and sulfate additively reduce methane production by rumen cultures in vitro while not adversely affecting feed digestion, fermentation or microbial communities. *Bioresour Technol* **155**, 129-135.
43. Liu L, Xu X, Cao Y, *et al.* (2017) Nitrate decreases methane production also by increasing methane oxidation through stimulating NC10 population in ruminal culture. *AMB Express* **7**, 76.
44. NRC - National Research Council. **Mineral tolerance of animals**. 2nd rev. ed. National Academy Press. Washington, DC. 2005.

45. Kahlon TS, Meiske JC & Goodrich RD (1975) Sulfur metabolism in ruminants. *In vitro* availability of various chemical forms of sulfur. *J Anim Sci* **41**, 1147-1152.
46. Niles GA, Morgan SE & Edwards WC (2002) The relationship between sulfur, thiamine and polioencephalomalacia - a review. *Bovine Practitioner* **36**, 93-99.
47. Thompson LH, Wise MB, Harvey RW, *et al.* (1972) Starea, urea and sulfur in beef cattle rations. *J Anim Sci* **35**, 474-480.
48. Farra PA & Satter LD (1971) Manipulation of the ruminal fermentation. III. Effect of nitrate on ruminal volatile fatty acid production and milk composition. *J Dairy Sci* **54**, 1018-1024.
49. Nolan JV, Hegarty RS, Hegarty J, *et al.* (2010) Effects of dietary nitrate on fermentation, methane production and digesta kinetics in sheep. *Anim Prod Sci* **50**, 801-806.
50. Ungerfeld EM & Kohn RA (2006) The role of thermodynamics in the control of ruminal fermentation. In: K. Sejrsen, T. Hvelplund, and M. O. Nielsen, editors, *Ruminant physiology: Digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands. p. 55-85.
51. Nguyen SH, Li L, Hegarty RS, *et al.* (2016) Effects of Rumen Protozoa of Brahman Heifers and Nitrate on Fermentation and In vitro Methane Production. *Asian-Australas J Anim Sci* **29**, 807-813.
52. Zinn RA, Alvarez E, Mendez M, *et al.* (1997) Influence of Dietary Sulfur Level on Growth Performance and Digestive Function in Feedlot Cattle. *J Anim Sci* **75**, 1723-1728.
53. Gould DH, Cummings BA & Hamar DW (1997) In vivo indicators of pathologic ruminal sulfide production in steers with diet-induced polioencephalomalacia. *J Vet Diagn Invest* **9**, 72-76.
54. Beauchemin KA, Coates T, Farr B, *et al.* (2012) Technical Note: Can the sulfur hexafluoride tracer gas technique be used to accurately measure enteric methane production from ruminally cannulated cattle? *J Anim Sci* **90**, 2727-2732.

55. Rossi LG, Fiorentini G, Vieira BR, *et al.* (2016) Effect of ground soybean and starch on intake, digestibility, performance, and methane production of Nellore bulls. *Anim Feed Sci Technol* **226**, 39-47.
56. Ribeiro AF, Messana JD, Neto AJ, *et al.* (2017) Enteric methane emissions, intake, and performance of young Nellore bulls fed different sources of forage in concentrate-rich diets containing crude glycerine. *Anim Prod Sci* **226**, 39-47.
57. Hulshof RB, Berndt A, Gerrits WJ, *et al.* (2012) Dietary nitrate supplementation reduces methane emission in beef cattle fed sugarcane-based diets. *J Anim Sci* **90**, 2317-2323.
58. Lewis D (1951) The metabolism of nitrate and nitrite in the sheep; the reduction of nitrate in the rumen of the sheep. *Biochemical Journal* **48**, 175-180.
59. Tillman AD, Sheriha GM & Sirny RJ (1965) Nitrate reduction studies with sheep. *J Anim Sci* **24**, 1140-1146.
60. Allison M & Reddy C (1984) Adaptations of gastrointestinal bacteria in response to changes in dietary oxalate and nitrate. Pages 248-256 in *Current Perspectives in Microbial Ecology-Proceedings of the Third International Symposium on Microbial Ecology*. M. J. Klug and C. Reddy, ed. American Society for Microbiology, Washington, DC.
61. Patra AK & Yu Z (2014) Combinations of nitrate, saponin, and sulfate additively reduce methane production by rumen cultures in vitro while not adversely affecting feed digestion, fermentation or microbial communities. *Bioresour Technol* **155**, 129-135.
62. Asanuma N, Yokoyama S & Hino T (2015) Effects of nitrate addition to a diet on fermentation and microbial populations in the rumen of goats, with special reference to *Selenomonas ruminantium* having the ability to reduce nitrate and nitrite. *Anim Sci J* **86**, 378-384.

APÊNDICE - Implicações da utilização nitrato encapsulado mais enxofre para bovinos

Frente aos desafios de mercado, a agropecuária encontra-se em um cenário no qual se tem buscado continuamente por estratégias que visam o aumento na eficiência produtiva. O termo eficiência produtiva é relacionado à consideração que se faz para a obtenção de um melhor rendimento de produção com o mínimo de dispêndios. O fornecimento de nitrato (NO_3^-) e enxofre (S) na dieta de ruminantes se adentra a esse cenário pois possibilita agregar dois fatores chaves vinculados à eficiência: maximização e otimização.

A eficiência de síntese de proteína microbiana (PMic) pode ser estimulada por ambos NO_3^- e S. Por ser uma fonte de nitrogênio não proteico (NPN), o NO_3^- estimula o metabolismo microbiano pelo fornecimento de N prontamente disponível, assim como, o S também o estimula, por ser requerido pelos microrganismos para composição de seus aminoácidos sulfurados (maximização da síntese de PMic). Além do mais, ambos atuam durante a fermentação ruminal como aceptores de elétrons (H_2), proporcionando redução na produção de metano (CH_4) pelas bactérias metanogênicas, logo, reduzindo o desperdício de energia via eliminação de carbono pela emissão de CH_4 (otimização do metabolismo energético).

O NO_3^- em sua forma encapsulada é uma estratégia que traz benefícios e pode favorecer a decisão para a sua inclusão na dieta de bovinos. O encapsulamento da molécula permite que o íon seja liberado lentamente durante a fermentação ruminal. A solubilização gradual e lenta, otimiza a disponibilização de nitrogênio (N) para os microrganismos, conciliando o fornecimento de N proporcionalmente à fermentabilidade das fontes de energia da dieta. Além disso, o NO_3^- encapsulado também colabora na redução do potencial de intoxicação por nitrito devido a sua liberação mais lenta no rúmen.

Embora os pesquisadores que têm trabalhado com inclusão de NO_3^- encapsulado para ruminantes não utilizam um protocolo de adaptação padronizado, ao produtor que

optar pela sua utilização, recomendo que se faça uma adaptação dos animais de forma gradual. O protocolo de adaptação adotado neste trabalho foi bem sucedido, dessa forma posso sugerir que a forma gradual como foi incluído NO_3^- neste estudo, seja base para consolidação de uma padronização.

Com base nos resultados deste estudo, recomendo a inclusão de NO_3^- encapsulado a um nível de 2% da MS da dieta juntamente com a adição de 0.24% de S elementar como estratégia para melhorar a eficiência de síntese de PMic e reduzir a produção e emissão de CH_4 pelos animais. Com relação a adaptação dos animais ao NO_3^- encapsulado, recomendo que a sua inclusão na dieta seja feita de forma gradual com o aumento de $\frac{1}{4}$ da dose a cada três dias, até alcançar a dose alvo.