

Aditivos alimentares para redução da emissão de metano em vacas leiteiras

Alex Lopes da Silva¹, Leticia Guerra Piuzana¹, Amanda Barbosa Sant'Ana¹, Thierry Ribeiro

Tomich², Fernanda Campos de Sousa³, Polyana Pizzi Rotta¹

¹Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa

²Embrapa Gado de Leite

³Departamento de Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa

Introdução

A crescente demanda por produtos de origem animal, principalmente carnes e leite, é uma preocupação constante de líderes mundiais, pois envolve uma complexa estratégia de segurança alimentar. Considerando o padrão de consumo atual de leite, estima-se que até o ano de 2050 deverá haver um incremento de 60 a 80% na produção para suprir a demanda mundial (Morgavi et al., 2010; Beauchemin et al., 2020; Honan et al., 2021). Assim, a evolução dos sistemas de produção, incluindo aplicação de tecnologias, intensificação e aumento da eficiência de produção é uma condição obrigatória para um futuro próximo.

A fermentação ruminal desempenha um papel central na produção de ruminantes, uma vez que permite que esses animais possam utilizar alimentos de baixo valor nutricional para humanos, como forragens, e os transformar em alimentos com alta biodisponibilidade, como carnes e leite. Em média, mais de 80% dos alimentos que são utilizados para a produção de ruminantes não são elegíveis para o consumo humano (Mottet et al., 2017). Em contraponto aos benefícios citados, o processo de fermentação ruminal leva à produção entérica de metano, um importante contribuinte para a emissão de gases do efeito estufa (GEE). Além disso, a produção de metano representa uma perda de 2 a 12% do total de energia bruta consumida pelo animal. Essa energia poderia ser potencialmente utilizada para biossíntese de tecidos e produtos mas será perdida para a atmosfera pela respiração e eructação dos animais (Patra et al., 2017; Honan et al., 2021).

Estima-se que a agricultura, pecuária e atividades florestais sejam responsáveis por cerca de 18.4% das emissões de GEE, sendo a produção animal responsável por 6% da emissão global (Patra et al., 2017; Hannah, 2020). Nesse cenário, a emissão de metano entérico ganha destaque, por representar em torno de 50% das emissões de GEE em fazendas leiteiras, podendo chegar a mais de 80% em sistemas menos intensivos (Mazzetto et al., 2022). Ao se avaliar a pegada de carbono de toda a cadeia leiteira, constata-se que em

torno de 70% das emissões de GEE ocorrem dentro da fazenda (Rotz, 2018). Como o metano é o grande responsável pela emissão de gases dentro dos sistemas de produção, reforça-se a necessidade de estratégias para mitigar a emissão desse gás.

Nesse contexto, a utilização de estratégias alimentares associadas à utilização de aditivos, que possam controlar a metanogênese ruminal, vêm ganhando destaque nas últimas décadas, com foco bem definido em reduzir as emissões de GEE, tornando os sistemas de produção mais sustentáveis (Beauchemin et al., 2020). Assim, a busca por adequações aos métodos de produção, que visem mitigar a emissão de metano e outros GEE, deve ser considerada uma parte inerente ao sistema de produção.

Metanogênese ruminal

No ambiente ruminal, os carboidratos (celulose, hemicelulose e amido), que representam a principal fonte de energia para os ruminantes, são hidrolisados à glicose ou outros monossacarídeos, através de enzimas produzidas pela microbiota ruminal. Em seguida, esses monossacarídeos são metabolizados pela microbiota ruminal, produzindo ácidos graxos voláteis (AGV's; principalmente acetato, propionato e butirato), CO_2 e hidrogênio (H_2) (Hill et al., 2016; Beauchemin et al., 2020). Esse H_2 , que é produzido durante o metabolismo de AGV's, tem atuação intracelular como redutor para cofatores, que são essenciais durante a síntese dos AGV's. No entanto, para que o processo de fermentação ruminal tenha continuidade é preciso que os cofatores, que foram reduzidos, sejam reoxidados. Assim, ocorre a ação de enzimas hidrogenases que liberam o H_2 para o ambiente ruminal na forma de dihidrogênio (H_2) dissolvido (Beauchemin et al., 2020). De forma simplificada, durante a síntese de acetato e butirato são produzidos CO_2 e H_2 , enquanto na síntese de propionato o H_2 é utilizado (Tabela 1).

Tabela 1 - Equações estequiométricas da síntese ruminal dos principais ácidos graxos voláteis.

AGV	Equação estequiométrica
Acetato	$\text{Glicose} \rightarrow 2\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2 + 2\text{CO}_2 + 4\text{H}_2$
Butirato	$\text{Glicose} \rightarrow \text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2 + 2\text{CO}_2 + 2\text{H}_2$
Propionato	$\text{Glicose} + 2\text{H}_2 \rightarrow 2\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$

O acúmulo de H_2 no ambiente ruminal pode criar um efeito negativo para a continuidade do processo de fermentação, pois o aumento da pressão de H_2 pode inibir enzimas microbianas envolvidas na transferência de elétrons,

principalmente a NADH desidrogenase, resultando em acúmulo de NADH (Morgavi et al., 2010). Consequentemente, há a necessidade de que o H₂ seja removido e, dentre os processos que podem ser utilizados como dreno para o H₂ dissolvido no rúmen, a síntese de metano é o primariamente utilizado (Beauchemin et al., 2020; Honan et al., 2021).

A principal via de formação de metano no rúmen, responsável por cerca de 80% do total de metano formado, envolve a redução de CO₂ (fonte de carbono) através da utilização do H₂ (doador de elétrons) dissolvido no rúmen (Beauchemin et al., 2020). No entanto, outros compostos, tais como grupos metil ou acetato, podem ser utilizados como fonte de carbono, enquanto o formato pode servir como doador de elétrons, embora esses ocorram em menor escala (Morgavi et al., 2010; Beauchemin et al., 2020). De forma simplificada, a síntese ruminal de metano pode ser resumida pelas equações apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Substratos utilizados na síntese de metano (CH₄) ruminal e suas respectivas equações estequiométricas.

Substratos	Equação estequiométrica
CO ₂ e H ₂	CO ₂ + 4H ₂ → CH ₄ + H ₂ O
Formato	4HCO ₂ H → CH ₄ + CO ₂ + 2H ₂ O
Metanol	4CH ₃ OH → 3CH ₄ + CO ₂ + 2H ₂ O
Metilamina	4CH ₃ NH ₂ Cl + 2H ₂ O → 3CH ₄ + CO ₂ + 4NH ₄ Cl
Acetato	C ₂ H ₄ O ₂ → CH ₄ + CO ₂

A síntese ruminal de metano é realizada por bactérias pertencentes ao domínio Archea, amplamente conhecidas como arqueas metanogênicas. As arqueas são bactérias estritamente anaeróbias que, em média, possuem a temperatura ótima de crescimento entre 37 e 42°C e pH ótimo entre 6,5 e 7,0, ou seja, são muito bem adaptadas ao ambiente ruminal. Estima-se que as arqueas metanogênicas representem por volta de 3% da microbiota ruminal, sendo a família Methanobrevibacter spp. 75% desse total (Morgavi et al., 2010; Sirohi et al., 2010; Patra et al., 2017).

As arqueas metanogênicas podem estar presentes no rúmen de forma livre ou associada a algum outro microrganismo (fungos e protozoários) ou com o biofilme formado na superfície das partículas dos alimentos. Ao se associar ao biofilme, as arqueas estarão protegidas da ação de compostos anti-metanogênicos, além de estarem próximas à microbiota ruminal que faz a produção ativa de CO₂ e H₂, o que facilita a transferência interespecíes

de H_2 (Patra et al., 2017). No entanto, o efeito de associação mais importante, e mais conhecido, é o estabelecido entre as arqueas metanogênicas e os protozoários. Protozoários são microrganismos altamente ativos, capazes de afetar a fermentação dos alimentos e outros microrganismos ruminais, uma vez que eles podem engolfar essas bactérias para dentro dos vacúolos digestivos, onde serão realizadas a hidrólise e a fermentação. A correta proporção de arqueas que se encontram associadas a protozoários não é definida, uma vez que acredita-se que essa situação seja transitória, e não permanente, no ambiente ruminal (Patra et al., 2017). Os protozoários servem como hospedeiro para as arqueas metanogênicas, protegendo-as da toxicidade do oxigênio ruminal e da ação de produtos anti-metanogênicos. Além disso, eles também contribuem com a produção de H_2 que é utilizado pelas bactérias que estão engolfadas ou em uma associação de proximidade com os protozoários, o que facilita a transferência interespecífica de H_2 (Morgavi et al., 2010).

Uma vez compreendido o mecanismo geral da biossíntese ruminal de metano, como uma visão geral sobre a microbiota responsável e suas interações, torna-se possível elencar alternativas que possam contribuir para a redução da emissão de metano entérico em bovinos de leite.

Mitigação da emissão de metano

A emissão de metano pode ser reportada de forma absoluta, onde se obtém a emissão em g/dia ou L/dia, ou de acordo com a intensidade de emissão, onde é reportado o seu valor em relação a quantidade de produto gerado ou a quantidade de alimento ingerido, como por exemplo, gramas de metano por quilos de leite corrigido ou gramas de metano por quilos de matéria seca ingerida. Quando a avaliação se concentra apenas no impacto ambiental da emissão de metano, a busca deve ser para redução da emissão absoluta desse gás. No entanto, a avaliação da intensidade de emissão passa a ser mais interessante e aplicada quando é feita de forma concomitante a busca por uma produção que seja sustentável, mas que seja capaz de produzir alimentos de qualidade. Assim é possível traçar estratégias que aliem produção com garantia de segurança alimentar e sustentabilidade.

De uma forma geral, as estratégias utilizadas para a redução da emissão de metano terão, pelo menos, uma das seguintes ações: 1) inibir diretamente o crescimento das arqueas metanogênicas, pela inativação de enzimas ou coenzimas necessárias no processo de metanogênese; 2) alterar o padrão de fermentação ruminal e, conseqüentemente gerar menos substratos (H_2 e CO_2) para a metanogênese; 3) aumentar as vias de competição pelos

substratos da metanogênese, através de outros drenos para H_2 e CO_2 , como a biohidrogenação, síntese de propionato ou acetato por via acetogênica.

Nesse contexto, as estratégias para redução da emissão de metano na bovinocultura leiteira podem envolver melhoramento animal, vacinas, manipulação da microbiota ruminal ou estratégias nutricionais, que vão desde a manipulação de componentes da dieta até a inclusão de aditivos anti-metanogênicos.

Embora o objetivo central desse texto seja discorrer sobre o efeito de aditivos alimentares sobre a emissão de metano, serão abordados de forma sucinta outros mecanismos, a fim de proporcionar ao leitor uma visão mais ampla sobre a temática.

Como a emissão de metano é afetada, primariamente, pelo consumo de matéria seca e pela fermentação ruminal, uma das formas mais efetivas para diminuir a intensidade da emissão de metano (g de CH_4 /kg de produto) é através do aumento da produtividade animal. Isso envolve melhorias no manejo, alimentação e saúde, com o objetivo central de aumentar a produção dos animais. O aumento da produtividade deve ser visto como o alicerce para tornar os sistemas de produção mais sustentáveis. Entretanto, deve-se salientar que aumentos em produtividade podem aumentar a emissão global de metano, caso não seja acompanhado por uma redução no número total de animais. Portanto deve-se substituir animais menos produtivos por animais mais produtivos (Beauchemin et al., 2020).

Alternativas como a seleção de animais para a menor emissão de metano vem ganhando a atenção de pesquisadores ao longo dos últimos anos. De forma geral, essa seleção busca animais que sejam mais eficientes e, conseqüentemente, tenham uma menor intensidade de emissão de metano. Outra alternativa em desenvolvimento é a criação de vacinas anti-metanogênicas, que tem como objetivo reduzir a população de arqueas no rúmen. Tanto a seleção de animais com menor emissão de metano, quanto o desenvolvimento de vacinas anti-metanogênicas, ainda carecem de evolução, mas já podem ser considerados grandes contribuidores para reduções futuras na emissão de metano.

A manipulação da composição da dieta, através do uso de alimentos concentrados ou fontes de gordura suplementar, pode ser uma estratégia altamente efetiva para mitigar a emissão de metano em ruminantes (Beauchemin and McGinn, 2006). A utilização de dietas com maiores proporções de concentrado, pode contribuir para diminuir a emissão de metano, uma vez que a fermentação de amido resulta em maior produção

de propionato, que compete por H_2 com a metanogênese. Além disso, a utilização de dietas com maiores teores de amido, pode levar a queda no pH ruminal, o que inibe o crescimento das principais arqueas metanogênicas, embora aumente o risco de acidose ruminal (Beauchemin et al., 2020).

A utilização de fontes de gordura suplementar, principalmente quando compostas por ácidos graxos insaturados, pode ser uma alternativa para mitigar a emissão de metano. A forma de ação pode seguir diversas frentes, como: i) ação tóxica sobre as bactérias metanogênicas e protozoários; ii) dreno de H_2 , através do processo de biohidrogenação; iii) alteração do padrão fermentativo ruminal para maior produção de propionato. Apesar de resultados variados, estima-se que ocorra uma redução de até 15% na emissão de metano, quando níveis de 6% de gordura são atingidos na dieta (Patra et al., 2017; Beauchemin et al., 2020; Honan et al., 2021).

Aditivos

Existe uma série de aditivos que podem ser usados para a mitigação da emissão de metano entérico, onde podemos destacar inibidores de químicos, como 3-nitrooxypropanol (3NOP), compostos halógenos alifáticos (clorofórmio, bromofórmio, bromoclorometano e outros) e nitrato/sulfatos. Outra classe que pode ser destacada são os compostos secundários de plantas, onde taninos, saponinas e óleos essenciais são os principais representantes. Por último, podemos mencionar os modificadores ruminais, como os ionóforos e probióticos (Honan et al., 2021).

Embora exista uma série de aditivos, com diversos modos de ação, nesse texto serão abordados com mais detalhes alguns aditivos que são notadamente reconhecidos ou que tem ganhado destaque nos últimos anos.

Ionóforos

O principal ionóforo utilizado é a monensina sódica, que é um poliéster carboxílico produzido a partir da fermentação da bactéria *Streptomyces cinnamonensis*, sendo classificada como antibiótico, por interferir no transporte de íons através da membrana celular. Essa ação modifica a população bacteriana do rúmen devido à seletividade da monensina por determinadas bactérias ruminais específicas. A monensina inibe, principalmente, bactérias gram positivas devido a sua capacidade de ligação na bicamada lipídica da membrana celular, translocação de prótons e íons metálicos pela membrana, levando à morte celular. Essa modificação na população microbiana altera a fermentação ruminal, pois há a proliferação de bactérias gram negativas,

o que pode favorecer a maior produção de propionato em detrimento da produção de acetato e butirato, o que aumenta o dreno de H₂ e ao mesmo tempo diminui a sua produção (Almeida et al., 2021; Ahvanooei et al., 2023a).

A adição de monensina, nas dosagens de 190 a 260 mg/dia, reduziu a emissão de metano em 8,12 a 33,31 g/dia por vaca, respectivamente. No entanto, com inclusões abaixo dessa faixa de dosagem, não foi observado efeito significativo, o que reforça que a ação de aditivos é dose dependente (Ahvanooei et al., 2023b; a). De uma forma geral, a redução na emissão de metano alcançada pela inclusão de monensina é moderada. Diante de resultados obtidos em algumas meta-análises pode-se constatar que a redução média observada é de 5% na emissão de metano (Almeida et al., 2021; Ahvanooei et al., 2023b; Marumo et al., 2023).

Um ponto importante a se avaliar quando se trabalha com aditivos é a sua ação sobre o consumo de matéria seca e a produção de leite. Uma vez que a redução na emissão de metano pode ser um efeito da redução no consumo e não diretamente um efeito do aditivo sobre a metanogênese, o que pode acarretar perdas na produção e na eficiência alimentar. Ahvanooei et al. (2023a) avaliaram o efeito da suplementação com monensina sobre o consumo de matéria seca e observaram que houve redução quando a dose de monensina ofertada aumentou de 180 para 500 mg/dia. Entretanto, a suplementação de monensina, na dosagem de 450 mg/dia, aumentou o consumo de matéria seca de vacas no início da lactação. Com isso, observa-se que o efeito da monensina no consumo de matéria seca pode ser influenciado pelo estágio de lactação e pelo balanço energético do animal (Ahvanooei et al., 2023a).

Para produção de leite, a suplementação com monensina, na dosagem de até 230 mg/dia, aumentou a produção de leite linearmente, à medida que se aumenta a dosagem. O aumento da produção de propionato, precursor da gliconeogênese, pode contribuir para o melhor aproveitamento da energia vinda da alimentação, bem como aumentar a síntese de glicose e lactose, levando à maior produção de leite. Entretanto, esse efeito benéfico sobre a produção não foi observado quando a suplementação foi feita em dosagens maiores (Ahvanooei et al., 2023a). Esses resultados suportam as recomendações atuais que indicam uma inclusão entre 250 e 450 mg/dia (NASEM, 2021).

3-nitrooxypropanol (3-NOP)

O 3-Nitrooxypropanol (3-NOP) é um composto orgânico sintético que possui estrutura molecular semelhante à metil-coenzima M. Essa coenzima M participa da metanogênese como carreadora de um grupo metil e é o último composto intermediário que completa as diferentes vias de produção de metano no animal. A última reação na via da metanogênese é catalisada pela coenzima M redutase (MCR), presente nas arqueas metanogênicas. Para que a MCR seja ativada, o íon níquel em sua composição deve estar em sua forma oxidada. Devido à semelhança estrutural entre o 3-NOP e a metil-coenzima M, ele se liga à MCR, oxida o íon níquel e desativa a enzima MCR. Além disso, o grupo nitrato do 3-NOP é reduzido a nitrito durante o processo de ligação à MCR, inativando ainda mais essa enzima (Kebreab et al., 2023; Lileikis et al., 2023).

Entretanto, as arqueias metanogênicas possuem capacidade de reativar o MCR em um processo dependente de H₂ e energia. Logo, após a completa metabolização do 3-NOP, a taxa de produção e emissão de metano pode voltar aos patamares anteriores, evidenciando a necessidade de uma suplementação constante (Kebreab et al., 2023).

Kebreab et al. (2023) conduziram uma meta-análise onde observaram uma redução média de 32,7% na produção de metano, quando a inclusão do 3-NOP foi de 70,5 mg/kg MS. Além disso, observaram que quanto maior a dose de 3-NOP, maior é a redução relativa de cada unidade de expressão de metano. Ademais, a inclusão de 60 mg/kg MS de 3-NOP reduziu a produção de metano em 28,2%, 37% e 38% em animais alimentados com dieta à base de silagem de capim, silagem de capim + silagem de milho, e uma dieta à base de silagem de milho, respectivamente. Esse resultado demonstra que a ação deste aditivo é dependente do teor de fibra em detergente neutro da dieta, como observado também no estudo de Dijkstra et al. (2018). Para uma inclusão de 80 mg/kg MS, as reduções da emissão de metano, para as mesmas dietas base citadas anteriormente, foram ainda maiores (Lileikis et al., 2023), o que também corrobora com o observado por Dijkstra et al. (2018), onde os autores afirmam que a ação do 3-NOP é dependente do teor de FDN e também da dose aplicada.

Em relação ao consumo de matéria seca, na meta-análise realizada por Almeida et al. (2021) observou-se uma redução de 4,5% no consumo de matéria seca quando animais foram suplementados com 3-NOP. Entretanto, a meta-análise realizada por Jayanegara et al. (2018) não indicou redução significativa no consumo de matéria seca para animais recebendo 3-NOP

de 0 a 280 mg/kg MS. O mesmo trabalho mostrou redução na emissão de metano em relação ao consumo de matéria seca, leite produzido, matéria orgânica digerida e energia bruta consumida.

De forma geral, pode-se observar que o uso de 3-NOP como aditivo anti-metanogênico possui um grande potencial, sendo esperada uma redução por volta de 38% na emissão de metano (Dijkstra et al., 2018; Kebreab et al., 2023).

Taninos

Os taninos são complexos de polifenóis vegetais que podem ser encontrados em leguminosas e outras plantas do tipo C3 (Berça et al., 2023). São capazes de se ligar principalmente a proteínas e, em menor extensão, a íons metálicos, aminoácidos e polissacarídeos (Goel and Makkar, 2012). Podem ser divididos em dois grupos: taninos hidrolisáveis (HT) e taninos condensados (CT). Eles possuem estruturas químicas diferentes, sendo os CT, os mais estudados em termos de mitigação de metano pela sua capacidade de formar complexos e precipitar proteínas (Ku-Vera et al., 2020).

Apesar dos taninos serem considerados como “fator antinutricional”, pesquisas recentes vêm demonstrando que, quando utilizados de forma adequada na dieta de bovinos, alguns taninos têm efeitos positivos na produção e qualidade do leite e no bem-estar animal (Berça et al., 2023). Além disso, a adição de CT na dieta, pode contribuir com a mitigação de emissões entéricas de metano (Cardoso-Gutierrez et al., 2021; Orzuna-Orzuna et al., 2021). No entanto, como existe uma ampla variedade de fontes de CT com diferentes atividades biológicas o nível dietético a ser utilizado na dieta de ruminantes carece de pesquisas para obtenção de respostas mais eficazes (Besharati et al., 2022).

O modo de ação dos CT na redução da emissão de metano entérico ainda é objeto de investigação. Contudo, os dois principais mecanismos de ação pela inclusão de CT na dieta para a mitigação de metano são: 1) pela ação direta, por meio da inibição de crescimento das arqueas metanogênicas do rúmen, no qual os CT se ligam à adesina proteica ou a partes do envelope celular, prejudicando o complexo metanogênio-protozoário, diminuindo a transferência de H_2 entre as espécies e, conseqüentemente, inibindo o crescimento das arqueas (Ku-Vera et al., 2020); e 2) pela ação indireta, no qual os grupos hidroxila dos CT podem se ligar a nutrientes (proteínas, carboidratos e amido), formando complexos insolúveis no rúmen e indisponíveis a microbiota ruminal, conseqüentemente, reduzindo a disponibilidade de substratos para o

crescimento de microrganismos metanogênicos (Berça et al., 2023).

Sabe-se que a inclusão de CT acima de 6% da matéria seca (MS) da dieta é um fator antinutricional limitando o CMS, a digestibilidade da fibra e o desempenho animal (McAllister et al., 2005; Berça et al., 2023). No entanto, estudos vem relatando que a inclusão de CT em doses entre 2 e 4% MS da dieta, pode trazer benefícios principalmente para a redução de emissão de metano pelos ruminantes. Berça et al. (2023) através de uma meta-análise desenvolveram uma equação de predição ($CH_4 = 26,89 - 2,54 \times CT$) utilizando métodos *in vivo* e *in vitro* e concluíram que é necessária uma dose mínima de 3,13% de CT na dieta para reduzir 1% da emissão de metano entérico (L/Kg MS). Utilizando somente métodos *in vivo*, estes mesmos autores verificaram que é necessária uma dose mínima de 2,32% de CT para reduzir a emissão de metano em 1%, conforme a equação ($CH_4 = 29,55 - 3,64 \times CT$). Quando elevaram a inclusão de CT para 3,9%, as equações indicaram uma redução na produção de metano de 6% para experimentos *in vitro + in vivo* e uma redução de 16,7% para experimentos *in vivo*.

Com relação aos parâmetros ruminais, alguns autores observaram aumento na produção de AGV e propionato quando a dieta foi suplementada com taninos. Conseqüentemente, o aumento de propionato se tornou uma via alternativa para eliminação de H_2 do rúmen, reduzindo a emissão de metano (Orzuna-Orzuna et al., 2021). Além disso, Berça et al. (2023) observaram um aumento da proporção molar de propionato e butirato com níveis elevados de CT na dieta, atribuindo a redução na metanogênese a correlação negativa entre o aumento de propionato e a produção de metano.

O CMS está diretamente relacionado a produção e emissão entérica de metano pelos ruminantes. Fagundes et al. (2020) relataram redução na emissão de metano em estudo feito com bovinos de corte suplementados com CT de extrato de acácia com inclusão de 1,25% MS para o grupo controle e 2,5% MS para o grupo tratamento e atribuíram este resultado a uma diminuição no CMS e não aos efeitos diretos do CT sobre as arqueas metanogênicas. Por outro lado, outros autores não encontraram efeitos do CMS sobre as emissões de metano em resposta à inclusão de CT na dieta (Anantasook et al., 2015; Alves et al., 2017; Berça et al., 2023). De acordo com a meta-análise realizada por Berça et al. (2023), não foram observadas alterações no CMS com a inclusão de até 124 g CT/Kg MS na dieta. Orzuna-Orzuna et al. (2021) relataram não haver alteração no CMS com a suplementação com tanino, no entanto, encontraram redução na digestibilidade da matéria seca em doses acima de 12 g/Kg MS.

Em relação a produção de leite, Herremans et al. (2020) desenvolveram uma meta-análise onde relataram que os taninos não apresentaram efeito na produção de leite e na produção de leite corrigida para energia. Da mesma forma, a gordura e a proteína também não foram afetadas pela inclusão de taninos na dieta. Alves et al. (2017) não observaram efeitos da inclusão de taninos na produção e composição do leite de vacas em lactação. No entanto, o efeito do CT na produção de leite ainda deve ser mais pesquisado, pois as informações ainda são escassas em comparação ao CMS e a metanogênese.

Avaliação de aditivos

Recentemente em nossa equipe, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal de Viçosa, foram desenvolvidos dois trabalhos científicos avaliando o efeito de aditivos sobre a emissão de metano em vacas leiteiras. De forma resumida, são apresentados a seguir os experimentos e os principais resultados obtidos nesses estudos.

Experimento 1

Nesse estudo foi avaliado o efeito da monensina sódica ou polifenóis (tanino condensado) sobre o consumo, digestibilidade, desempenho e emissão de metano de vacas Holandesas em lactação.

Foram utilizadas 9 vacas da raça Holandesa com delineamento em três quadrados latinos (3×3) agrupados, sendo três vacas fistuladas no rúmen e seis vacas não fistuladas, em sistema de consumo individual. Os animais foram submetidos a 3 tratamentos: controle (CON), monensina (MON) e suplemento proteico contendo polifenóis (POL). Os animais do tratamento MON receberam 12 mg/kg de MS de monensina sódica, enquanto os animais do tratamento POL receberam 2 g/kg de MS do suplemento contendo polifenóis. O período experimental foi de 84 dias, subdivididos em três períodos de 28 dias, com 14 dias para a adaptação dos animais.

Do 15º ao 17º dia do experimento foi mensurada a produção de leite dos animais. Amostras de todas as ordenhas, desse período, foram coletadas para análise da composição quanto a gordura, proteína, lactose, sólidos totais. No mesmo período, amostras de sobra, silagem e feno ofertados foram coletadas. O consumo dos animais foi determinado pela diferença entre o ofertado e a sobra. A coleta spot de fezes foi realizada diretamente da ampla retal. Em seguida, a amostra foi seca em estufa com circulação de ar à 55°C, por 72 horas, sendo confeccionada uma amostra composta referente aos três dias de coleta.

Entre o 24º e 28º dia o metano emitido pelos animais foi mensurado utilizando a técnica do gás traçador hexafluoreto de enxofre (SF₆). A taxa de emissão de metano pelo animal, foi calculada a partir das concentrações de metano e de SF₆ medidas e da emissão de SF₆ em taxa conhecida. Os animais foram equipados com a cápsula de permeação, cabresto, um sistema de tubo capilar que coleta o ar e o transfere para uma canga de PVC. Após 24 horas de coleta, as cangas coletadas tiveram sua pressão registrada e sofreram um processo de pressurização. O ar ruminal foi amostrado em um frasco, sendo preparados cinco frascos de amostra por canga. A concentração de metano foi determinada pela análise em cromatógrafo de gás equipado com detector de ionização de chama. Já a concentração de SF₆ foi determinada por meio de um cromatógrafo a gás equipado com detector de captura de elétrons.

Os dados foram analisados através de contrastes, sendo avaliadas as comparações entre o grupo controle e a média dos tratados e o grupo monensina e polifenóis entre si.

Na Tabela 3 são apresentados os resultados de consumo e digestibilidade de vacas holandesas recebendo ou não a suplementação com aditivos alimentares.

Tabela 3 - Consumo de matéria seca e matéria orgânica de vacas holandesas recebendo dietas com diferentes tipos de aditivos alimentares.

Itens ¹	Tratamentos ²			EPM ³	P-Valor ⁴	
	CON	MON	POL		Cont vs. Trat	Mon vs. Pol
Consumo, kg/dia						
MS	22,8	22,9	23,4	1,270	0,344	0,275
MO	21,4	21,4	22,0	1,190	0,413	0,238
PB	4,22	4,16	4,21	0,219	0,631	0,536
FDN	8,70	8,26	8,81	0,490	0,311	0,015
Digestibilidade, g/kg						
MS	646	639	634	14,9	0,388	0,741
MO	668	659	657	14,6	0,334	0,837
PB	721	720	709	14,0	0,466	0,351
FDN	540	509	517	24,0	0,080	0,659

¹MS=matéria seca, MO =matéria orgânica, PB=proteína bruta, FDN=fibra em detergente neutro.

²CON=controle, MON=monensina, POL=polifenóis, ³Erro padrão da média, ⁴Cont vs. Trat= contraste entre o tratamento controle e a média dos grupos tratados, Mon vs. Pol = contraste entre os tratamentos monensina e polifenóis.

Pela Tabela 3 observa-se que houve efeito significativo ($P < 0,05$) para consumo de FDN, quando comparados os tratamentos monensina e polifenóis. Para o restante das análises de consumo não foi observado efeito significativo ($P > 0,05$). Em relação às análises de digestibilidade, foi observada uma tendência ($P = 0,080$) para digestibilidade de FDN, quando comparados os grupos que receberam algum tipo de aditivo em relação ao grupo controle. Para as demais análises de digestibilidade, não foi observado efeito significativo ($P > 0,05$) entre os tratamentos.

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados sobre a produção e a composição do leite de vacas holandesas recebendo ou não a suplementação com aditivos alimentares (Tabela 4).

Tabela 4 - Produção e composição do leite de vacas holandesas recebendo dietas com diferentes tipos de aditivos alimentares.

Itens	Tratamentos ³				P-Valor ⁵	
	CON	MON	POL	EPM ⁴	Cont vs. Trat	Mon vs. Pol
PL, kg/dia	36,7	38,3	38,1	2,06	0,146	0,827
PLCEI, kg/dia	33,5	35,6	35,0	1,93	0,155	0,645
Composição do leite						
Gordura, %	3,42	3,62	3,52	0,185	0,256	0,506
Gordura, kg/dia	1,26	1,37	1,37	0,093	0,177	0,556
Proteína, %	3,17	3,14	3,14	0,042	0,170	0,929
Proteína, kg/dia	1,16	1,20	1,20	0,688	0,223	0,895
Lactose, %	4,90	4,85	4,85	0,024	0,190	0,999
Lactose, kg/dia	1,80	1,86	1,85	0,104	0,273	0,788
Sólidos Totais, %	12,4	12,4	12,4	0,169	0,753	0,847
Caseína	2,55	2,54	2,54	0,054	0,735	0,900
NUL ² , mg/dL	21,0	20,9	20,2	0,584	0,262	0,185
CCS (log CCS)	3,41	3,47	3,72	0,407	0,258	0,158

¹Produção de Leite, ²Produção de leite corrigida para energia, ³Nitrogênio ureico do leite, ⁴CON=controle, MON=monensina, POL=polifenóis, ⁵Erro padrão da média, ⁶Cont vs. Trat= contraste entre o tratamento controle e a média dos grupos tratados, Mon vs. Pol = contraste entre os tratamentos monensina e polifenóis.

Pode-se observar na Tabela 4 que não houve efeito significativo entre os tratamentos ($P>0,05$) para a produção de leite, produção de leite corrigida para energia ou para composição do leite. No entanto, vale ressaltar que os tratamentos que receberam suplementação com aditivos, apresentaram uma produção de leite numericamente maior, embora, como destacado, não houve diferença estatística significativa.

Na Tabela 5 estão apresentados os dados sobre a emissão total de metano (g/dia), a emissão de metano em relação a produção de leite (g de metano por litro de leite), a emissão de metano em relação a produção de leite corrigida para energia (g de metano por litro de leite corrigido para energia), a emissão de metano em relação ao consumo de matéria seca (g de metano por kg de matéria seca consumida), a emissão de metano em relação ao consumo de matéria orgânica (g de metano por kg de matéria orgânica consumida) e a emissão de metano em relação ao consumo de matéria orgânica digestível (g de metano por kg de matéria orgânica consumida), de acordo com os tratamentos.

Tabela 5 - Emissão de metano de vacas holandesas recebendo dietas com diferentes tipos de aditivos alimentares.

Itens ¹	Tratamentos ²				P-Valor ⁴	
	CON	MON	POL	EPM ³	Cont vs. Trat	Mon vs. Pol
EM, g/dia	259	239	229	30,60	0,140	0,557
EM/PL ¹ , g/L	7,16	6,24	6,11	0,772	0,145	0,856
EM/PLCE ² , g/L	7,73	6,49	6,59	0,761	0,117	0,894
EM/MS ³ , g/kg	11,71	10,71	9,69	0,800	0,055	0,217
EM/MO ⁴ , g/kg	12,5	11,4	10,3	0,908	0,059	0,207
EM/MOD ⁵ , g/kg	19,0	17,5	15,8	1,300	0,053	0,200

¹EM/PL=emissão de metano por litro de leite produzido, EM/PLCE=emissão de metano por litro de leite produzido corrigido para energia, EM/MS=emissão de metano por quilo de matéria seca consumida, EM/MO=emissão de metano por quilo de matéria orgânica consumida, EM/MOD=emissão de metano por kg de matéria orgânica digestível, ²CON=controle, MON=monensina, POL = polifenóis, ³Erro padrão da média, ⁴Cont vs. Trat= contraste entre o tratamento controle e a média dos grupos tratados, Mon vs. Pol = contraste entre os tratamentos monensina e polifenóis,

De acordo com a Tabela 5, pode-se observar que houve uma tendência ($P=0,055$) de menor emissão de metano por kg de matéria seca consumida, dos grupos que receberam algum tipo de aditivo (monensina ou polifenóis)

em relação ao grupo controle. Quando avaliado o grupo controle em relação aos polifenóis, houve diferença significativa ($P=0,034$), com menor emissão de metano por kg de matéria seca consumida dos polifenóis em relação ao grupo controle.

Também houve tendência ($P=0,059$) de menor emissão de metano por kg de matéria orgânica consumida, dos grupos que receberam algum tipo de aditivo (monensina ou polifenóis) em relação ao grupo controle. Quando avaliado o grupo controle em relação aos polifenóis, houve diferença significativa ($P=0,035$), com menor emissão de metano por kg de matéria orgânica consumida dos polifenóis em relação ao grupo controle. O mesmo comportamento foi observado para a emissão de metano por kg de matéria orgânica digestível, onde houve uma tendência ($P=0,053$) de menor emissão de metano por kg de matéria orgânica digestível, dos grupos que receberam algum tipo de aditivo (monensina ou polifenóis) em relação ao grupo controle. Quando avaliado o grupo controle em relação aos polifenóis, houve diferença significativa ($P=0,031$), com menor emissão de metano por kg de matéria orgânica digestível consumida dos polifenóis em relação ao grupo controle.

Em síntese, nesse estudo não foi observada depleção do CMS, enquanto houve uma redução de 16,8% na intensidade de emissão de metano (g/kg de MO digestível) para polifenóis em comparação com o tratamento controle.

Experimento 2

Neste estudo, avaliou-se o efeito da suplementação com polifenóis sobre a produção de leite e a emissão de metano de vacas holandesas ou mestiças Holandês×Gir.

Foram utilizadas 16 vacas em lactação, sendo 8 animais mestiços Holandês×Gire e 8 da raça Holandesa, em delineamento em blocos casualizados, onde os blocos foram formados de acordo com os dias em lactação. Os animais foram submetidos a 2 tratamentos: controle (CON) e suplemento proteico contendo polifenóis (POL), fornecido a 2,7 g/kg de MS. O período experimental foi de 90 dias, com 22 dias para a adaptação dos animais.

Os animais foram alocados em baias individuais, cobertas, providas de comedouros e bebedouros, onde receberam silagem de milho como volumoso e concentrado para suprir as exigências nutricionais para uma produção de leite de aproximadamente 30 kg/dia. A alimentação foi ofertada duas vezes ao dia, às 08:00 e 14:30 horas e foram ordenhados 3 vezes ao dia, às 07:00, 14:00 e 20:00 horas. O consumo diário foi obtido pela diferença entre o ofertado e a sobra de alimentos.

Entre os dias 15 e 17; 45 e 47 e 75 e 77 foi mensurada a produção de leite dos animais e coletadas amostras para análise da composição. Entre os dias 17 e 19; 47 e 49 e 77 e 79 o feno e a silagem ofertada aos animais, bem como as sobras foram amostradas e submetidas à secagem em estufa à 55°C, por 72 horas. As amostras dos componentes da ração concentrada foram coletadas durante a confecção de cada lote de ração. Entre os dias 23 e 30; 53 e 60 e 83 e 90 a emissão de metano pelos animais foi mensurada utilizando a técnica do gás traçador de enxofre hexafluoreto (SF₆), conforme descrito anteriormente.

Na Tabela 6 estão apresentados os dados sobre a produção e a composição do leite dos animais, de acordo com o tratamento e a raça. Pode-se observar que não houve efeito significativo entre os tratamentos (P>0,05) para a produção de leite, produção de leite corrigida para energia ou para composição do leite. No entanto, vale ressaltar que apesar de não ter sido observado efeito estatístico significativo, os tratamentos que receberam suplementação na dieta, apresentaram uma produção de leite numericamente maior.

Tabela 6 – Produção e composição do leite de vacas em lactação recebendo dieta com suplemento alimentar.

Itens ¹	Tratamentos ²			Raça ⁴		EPM ³	P-Valor ⁵		
	CON	POL	EPM ³	H	HG		T	R	T×R
PL, kg/dia	24,8	25,7	6,13	27,4	23,1	6,14	0,774	0,188	0,517
PLCE, kg/dia	22,4	23,1	4,64	23,5	21,9	4,65	0,809	0,609	0,769
Gordura	3,47	3,49	0,21	3,40	3,55	0,21	0,945	0,501	0,518
Proteína	3,30	3,32	0,91	3,27	3,35	0,92	0,805	0,306	0,467
Lactose	4,95	4,97	0,14	4,90	5,02	0,14	0,814	0,301	0,459
NUL, mg/dL	15,9	14,8	1,76	15,5	15,3	1,76	0,150	0,795	0,091
CCS, log cél	4,68	4,43	0,51	4,64	4,47	0,50	0,736	0,811	0,748

¹PLCE = Produção de leite corrigida para energia, NUL = Nitrogênio Ureico do Leite; ²CON = Controle, POL = Polifenóis; ³Erro padrão da média; ⁴H = Holandês, HG = Holandês×Gir; ⁵T = efeito de tratamento, R = efeito de raça, T×R = efeito de interação entre tratamento e raça.

Na Tabela 7 estão apresentados os dados sobre a emissão total de metano (g/dia), a emissão de metano em relação a produção de leite (g/L) e a emissão de metano em relação a produção de leite corrigida para energia (g/L). Pode-

se observar que houve uma tendência ($P=0,071$) de menor emissão de metano por litro de leite produzido, dos grupos que receberam suplemento alimentar em comparação ao grupo controle. Quando avaliado o grupo controle em relação ao suplementado, foi observada diferença significativa ($P=0,024$), com menor emissão de metano por litro de leite produzido corrigido para energia pelos animais do grupo suplementados em relação ao controle.

Tabela 7 - Emissão de metano de vacas em lactação recebendo suplemento alimentar.

Itens ¹	Tratamentos ²		EPM ³	Raça ⁴		EPM ³	P-Valor ⁵		
	CON	POL		H	HG		T	R	T×R
EM, g/dia	174,7	154,4	23,3	167,8	161,3	58,35	0,310	0,752	0,081
EM/PL, g/L	7,75	6,08	0,58	7,11	6,73	0,60	0,071	0,665	0,174
EM/PLCE, g/L	8,89	6,50	0,75	8,24	7,15	0,68	0,024	0,287	0,512

¹EM=emissão de metano, EM/PL=emissão de metano por litro de leite produzido, EM/PLCE=emissão de metano por litro de leite produzido corrigido para energia; ²CON = Controle, POL=Polifenóis; ³Erro padrão da média; ⁴H = Holandês, HG = Holandês×Gir; ⁵T = efeito de tratamento, R = efeito de raça, T×R = efeito de interação entre tratamento e raça.

Nesse estudo, observou-se uma redução de 26,8% na intensidade de emissão de metano em função da produção de leite corrigida para energia, embora não tenham sido observadas alterações na produção de leite.

Considerações e perspectivas

Apesar da grande quantidade de pesquisas produzidas nos últimos anos visando desenvolver produtos para a mitigação de metano, há ainda a necessidade do desenvolvimento de novas pesquisas para ratificar resultados obtidos, bem como testar aditivos anti-metanogênicos sobre outras condições de dietas basais.

A mitigação da emissão de metano deve envolver, necessariamente, alternativas como a seleção de animais mais produtivos, a fim de reduzir a intensidade de emissão de metano, garantindo uma produção de alimentos de forma segura e sustentável.

Estratégias alimentares, como a manipulação de dietas ou a inclusão de aditivos anti-metanogênicos, devem ser consideradas como potenciais alternativas para a mitigação da emissão de metano. No entanto, é importante destacar que os resultados são variados e dependem de uma série de fatores, como a categoria animal, o nível de produção e a composição da dieta basal. Nesse contexto, é importante destacar que a maioria dos trabalhos realizados,

até então, testaram os aditivos de forma individualizada, o que demonstra uma necessidade urgente de trabalhos que avaliem combinações entre diferentes tipos de aditivos.

Por fim, é necessário que as avaliações de aditivos não sejam pautadas somente na emissão de metano, mas sim que seja considerada a pegada de carbono do aditivo durante o seu ciclo de vida. Assim, pode-se compreender a real contribuição da estratégia adotada para a mitigação da emissão de metano sobre a emissão total dos gases de efeito estufa.

Referências

- Ahvanooei, M. R. R., M. A. Norouziyan, A. H. Piray, P. Vahmani, and M. H. Ghaffari. 2023a. Effects of monensin supplementation on lactation performance of dairy cows: a systematic review and dose - response meta - analysis. *Sci. Rep.* 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-27395-9>.
- Ahvanooei, M. R. R., M. A. Norouziyan, A. H. Piray, P. Vahmani, and M. H. Ghaffari. 2023b. Effects of monensin supplementation on rumen fermentation, methane emissions, nitrogen balance, and metabolic responses of dairy cows: a systematic review and dose-response meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 10. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-23441>.
- Almeida, A. K., R. S. Hegarty, and A. Cowie. 2021. Meta-analysis quantifying the potential of dietary additives and rumen modifiers for methane mitigation in ruminant production systems. *Anim. Nutr.* 7:1219-1230. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.09.005>.
- Alves, T. P., A. C. Dall-Orsoletta, and H. M. N. Ribeiro-Filho. 2017. The effects of supplementing *Acacia mearnsii* tannin extract on dairy cow dry matter intake, milk production, and methane emission in a tropical pasture. *Trop. Anim. Health Prod.* 49:1663-1668. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1374-9>.
- Anantasook, N., M. Wanapat, A. Cherdthong, and P. Gunun. 2015. Effect of tannins and saponins in *S. amanea saman* on rumen environment, milk yield and milk composition in lactating dairy cows. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 99:335-344. <https://doi.org/10.1111/jpn.12198>.
- Beauchemin, K. A., and S. M. McGinn. 2006. Effects of various feed additives on the methane emissions from beef cattle. *Int. Congr. Ser.* 1293:152-155. <https://doi.org/10.1016/j.ics.2006.01.042>.
- Beauchemin, K. A., E. M. Ungerfeld, R. J. Eckard, and M. Wang. 2020. Review: Fifty years of research on rumen methanogenesis: Lessons learned and future challenges for mitigation. *Animal* 14:S2-S16. <https://doi.org/10.1017/S1751731119003100>.
- Berça, A. S., L. O. Tedeschi, A. da Silva Cardoso, and R. A. Reis. 2023. Meta-analysis of the relationship between dietary condensed tannins and methane emissions by cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 298:115564. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.115564>.
- Besharati, M., A. Maggiolino, V. Palangi, A. Kaya, M. Jabbar, H. Eseceli, P. De Palo, and J. M. Lorenzo. 2022. Tannin in Ruminant Nutrition: Review. *Molecules* 27:8273. <https://doi.org/10.3390/molecules27238273>.

- Cardoso-Gutierrez, E., E. Aranda-Aguirre, L. E. Robles-Jimenez, O. A. Castelán-Ortega, A. J. Chay-Canul, G. Foggi, J. C. Angeles-Hernandez, E. Vargas-Bello-Pérez, and M. González-Ronquillo. 2021. Effect of tannins from tropical plants on methane production from ruminants: A systematic review. *Vet. Anim. Sci.* 14:100214. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2021.100214>.
- Dijkstra, J., A. Bannink, J. France, E. Kebreab, and S. Van Gastelen. 2018. Short communication : Antimethanogenic effects of 3-nitrooxypropanol depend on supplementation dose , dietary fiber content , and cattle type. *J. Dairy Sci.* 101:9041-9047. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14456>.
- Fagundes, G. M., G. Benetel, K. C. Welter, F. A. Melo, J. P. Muir, M. M. Carriero, R. L. M. Souza, P. Meo-Filho, R. T. S. Frighetto, A. Berndt, and I. C. S. Bueno. 2020. Tannin as a natural rumen modifier to control methanogenesis in beef cattle in tropical systems: Friend or foe to biogas energy production?. *Res. Vet. Sci.* 132:88-96. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.05.010>.
- Goel, G., and H. P. S. Makkar. 2012. Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. *Trop. Anim. Health Prod.* 44:729-739. <https://doi.org/10.1007/s11250-011-9966-2>.
- Hannah, R. 2020. Sector by Sector: Where Do Global Greenhouse Gas Emissions Come From? Accessed. <https://ourworldindata.org/ghg-emissions-by-sector>.
- Herremans, S., F. Vanwindekens, V. Decruyenaere, Y. Beckers, and E. Froidmont. 2020. Effect of dietary tannins on milk yield and composition, nitrogen partitioning and nitrogen use efficiency of lactating dairy cows: A meta-analysis. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 104:1209-1218. <https://doi.org/10.1111/jpn.13341>.
- Hill, J., C. McSweeney, A. D. G. Wright, G. Bishop-Hurley, and K. Kalantar-zadeh. 2016. Measuring Methane Production from Ruminants. *Trends Biotechnol.* 34:26-35. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.10.004>.
- Honan, M., X. Feng, J. M. Tricarico, and E. Kebreab. 2021. Feed additives as a strategic approach to reduce enteric methane production in cattle: Modes of action, effectiveness and safety. *Anim. Prod. Sci.* 62:1303-1317. <https://doi.org/10.1071/AN20295>.
- Jayanegara, A., K. A. Sarwono, M. Kondo, H. Matsui, M. Ridla, and E. B. Laconi. 2018. Use of 3-nitrooxypropanol as feed additive for mitigating enteric methane emissions from ruminants : a meta-analysis. *Ital. J. Anim. Sci.* 0:650-656. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2017.1404945>.
- Kebreab, E., A. Bannink, E. M. Pressman, N. Walker, A. Karagiannis, S. van Gastelen, and J. Dijkstra. 2023. A meta-analysis of effects of 3-nitrooxypropanol on methane production, yield, and intensity in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 106:927-936. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22211>.
- Ku-Vera, J. C., R. Jiménez-Ocampo, S. S. Valencia-Salazar, M. D. Montoya-Flores, I. C. Molina-Botero, J. Arango, C. A. Gómez-Bravo, C. F. Aguilar-Pérez, and F. J. Solorio-Sánchez. 2020. Role of Secondary Plant Metabolites on Enteric Methane Mitigation in Ruminants. *Front. Vet. Sci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00584>.
- Lileikis, T., R. Nainiene, S. Bliznikas, and V. Uchockis. 2023. Dietary Ruminant Enteric Methane Mitigation Strategies: Current Findings , Potential Risks and Applicability. *Animals* 13:1-29. <https://doi.org/10.3390/ani13162586>.

- Marumo, J. L., P. A. LaPierre, and M. E. Van Amburgh. 2023. Enteric Methane Emissions Prediction in Dairy Cattle and Effects of Monensin on Methane Emissions: A Meta-Analysis. *Animals* 13. <https://doi.org/10.3390/ani13081392>.
- Mazzetto, A. M., S. Falconer, and S. Ledgard. 2022. Mapping the carbon footprint of milk production from cattle: A systematic review. *J. Dairy Sci.* 105:9713–9725. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22117>.
- McAllister, T. A., T. Martinez, H. D. Bae, A. D. Muir, L. J. Yanke, and G. A. Jones. 2005. Characterization of Condensed Tannins Purified From Legume Forages: Chromophore Production, Protein Precipitation, and Inhibitory Effects on Cellulose Digestion. *J. Chem. Ecol.* 31:2049–2068. <https://doi.org/10.1007/s10886-005-6077-4>.
- Morgavi, D. P., E. Forano, C. Martin, and C. J. Newbold. 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal* 4:1024–1036. <https://doi.org/10.1017/S1751731110000546>.
- Mottet, A., C. de Haan, A. Falcucci, G. Tempio, C. Opio, and P. Gerber. 2017. Livestock: On our plates or eating at our table? A new analysis of the feed/food debate. *Glob. Food Sec.* 14:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2017.01.001>.
- NASEM. 2021. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. National Academies Press, Washington, D.C.
- Orzuna-Orzuna, J., G. Dorantes-Iturbide, A. Lara-Bueno, G. Mendoza-Martínez, L. Miranda-Romero, and P. Hernández-García. 2021. Effects of Dietary Tannins' Supplementation on Growth Performance, Rumen Fermentation, and Enteric Methane Emissions in Beef Cattle: A Meta-Analysis. *Sustainability* 13:7410. <https://doi.org/10.3390/su13137410>.
- Patra, A., T. Park, M. Kim, and Z. Yu. 2017. Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 8:1–18. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0145-9>.
- Rotz, C. A. 2018. Symposium review: Modeling greenhouse gas emissions from dairy farms 1. *J. Dairy Sci.* 101:6675–6690. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13272>.
- Sirohi, S. K., N. Pandey, B. Singh, and A. K. Puniya. 2010. Rumen methanogens: A review. *Indian J. Microbiol.* 50:253–262. <https://doi.org/10.1007/s12088-010-0061-6>.