

CAPÍTULO 6

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MITIGAÇÃO DE METANO ENTÉRICO UTILIZANDO EXTRATO DE *Acmella oleracea* COMO ALTERNATIVA NA MODULAÇÃO DA FERMENTAÇÃO RUMINAL

Data de aceite: 03/06/2024

Leticia Virginia Pereira Leal

Universidade Federal do Sul e Sudeste do
Pará
Marabá – Pará
<http://lattes.cnpq.br/4530070075701045>

Iranilde Teodoro Reis

Universidade Federal do Sul e Sudeste do
Pará
Marabá – Pará
<http://lattes.cnpq.br/1903251351746627>

Licarion Pinto

Universidade Estadual do Rio de Janeiro
Rio de Janeiro – Rio de Janeiro
<http://lattes.cnpq.br/5267552018296169>

Marilene Nunes Oliveira

Universidade Federal do Sul e Sudeste do
Pará
Marabá – Pará
<http://lattes.cnpq.br/0204590454010990>

Sebastião da Cruz Silva

Universidade Federal do Sul e Sudeste do
Pará
Marabá – Pará
<http://lattes.cnpq.br/5097476970597467>

Rafael Mezzomo

Universidade Federal Rural da Amazônia
Parauapebas – Pará
<http://lattes.cnpq.br/0676459050707457>

Simone Yasue Simote Silva

Universidade Federal do Sul e Sudeste do
Pará
Marabá – Pará
<http://lattes.cnpq.br/4637413931051021>

RESUMO: O efeito estufa vem se agravando no planeta, em especial pela emissão de dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄) e óxido nitroso (N₂O). No Brasil, uma das principais fontes antrópicas de metano na agropecuária é a criação de bovinos. As plantas medicinais são bastante utilizadas como fonte natural de modulação da fermentação ruminal. Isso ocorre devido a presença de metabólitos secundários em toda a extensão da planta. Modificar a fermentação entérica é difícil sem causar efeitos adversos, logo esse presente estudo tem como objetivo explorar a mitigação do metano entérico utilizando como suplemento alimentar extrato de *Acmella oleracea* usando como parâmetro de mitigação a digestibilidade da matéria seca (DIVMS) e a produção de ácidos graxos voláteis (AGV). O experimento foi realizado por fermentação ruminal *in vitro*. Foi adicionada ao substrato volumoso:concentrado (50:50) o extrato

etanólico de *Acmella oleraceae* (AO) na concentração de 0 mg/mL (controle), 3mg/mL (T3), 30mg/mL (T30) e tempo de incubação de 6, 12, 24h. Para avaliar produção de AGV, foi feita a análise multivariada de dados que consiste no tempo de incubação, concentração de AO e interação “tempo x concentração”. A digestibilidade da Matéria seca apresentou alteração significativa ($p < 0.05$) no tempo de 24h em ambos os tratamentos (T3 e T30) em relação ao controle. No que se refere a produção de acetato, propionato e butirato, a única variável significativa foi o tempo de incubação ($p < 0,05$) em relação ao controle. Conclui-se que a utilização do extrato de AO houve um decréscimo na digestibilidade em tempos maiores de incubação, mas não alterou a produção de AGV. Sendo assim, havendo a possibilidade de mitigar a emissão de metano e a busca de novos parâmetros.

PALAVRAS-CHAVE: *Acmella*; Bioinsumo; Metabolitos secundários; Fermentação ruminal.

EVALUATION OF THE METHANE MITIGATION POTENTIAL OF *Acmella oleracea* EXTRACT AS AN ALTERNATIVE IN MODULATING RUMINAL FERMENTATION

ABSTRACT: The greenhouse effect has been worsening on the planet, especially due to the emission of carbon dioxide (CO₂), methane (CH₄) and nitrous oxide (N₂O). In Brazil, one of the main anthropogenic sources of methane in agriculture is cattle farming. Medicinal plants are widely used as a natural source for modulating rumen fermentation. This is due to the presence of secondary metabolites throughout the plant. Modifying enteric fermentation is difficult without causing adverse effects, so this study aims to explore the mitigation of enteric methane using *Acmella oleracea* extract as a feed supplement, using dry matter digestibility (DIVMS) and volatile fatty acid (VFA) production as mitigation parameters. The experiment was carried out using in vitro ruminal fermentation. The ethanolic extract of *Acmella oleraceae* (AO) was added to the volume:concentrate substrate (50:50) at a concentration of 0 mg/mL (control), 3mg/mL (T3), 30mg/mL (T30) and incubation times of 6, 12 and 24 hours. To assess VFA production, multivariate data analysis was carried out, consisting of incubation time, OA concentration and “time x concentration” interaction. Dry matter digestibility showed a significant change ($p < 0.05$) at 24 hours in both treatments (T3 and T30) compared to the control. With regard to the production of acetate, propionate and butyrate, the only significant variable was the incubation time ($p < 0.05$) compared to the control. It can be concluded that the use of OA extract led to a decrease in digestibility at longer incubation times, but did not alter VFA production. Therefore, there is the possibility of mitigating methane emissions and searching for new parameters.

KEYWORDS: *Acmella*; Bioinsumo; Secondary metabolites; Rumen fermentation.

INTRODUÇÃO

Segundo o Banco mundial (2022), a população mundial atual é cerca de 8 bilhões de pessoas. Em relação há duas décadas (6,14 bilhões), houve um aumento de, aproximadamente 23 % em relação a população atual. Com a população crescendo de forma gradual estima-se que em 2050 haverá uma superpopulação (Herrero, et al., 2015). O Brasil ocupa a primeira posição do ranking mundial de criação de bovinos, contendo aproximadamente 234,4 milhões de cabeça de gado ultrapassando a Índia. Atrelada ao

crescimento populacional e o aumento da renda *per capita*, há um aumento na produção da pecuária – atividade de criação de animais que deve atender a demanda de carne e leite da população. Vinculada ao desenvolvimento da pecuária, no período de 1961 a 2018, a liberação de metano aumentou em 51,4%. (IBGE, 2022; EMBRAPA, 2022; Chang et al., 2021).

Os principais gases do efeito estufa são: dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄), óxido nitroso (N₂O) e fluorados (F-gases) (EPA, 2023). Alguns critérios determinam o impacto desses gases no clima, o prazo de vida e a capacidade de reter calor. Sendo assim, o metano que é segundo mais abundante do GEE, responsável por cerca de 17,6% – o primeiro é o CO₂ (74,4%) – das emissões globais. Por apresentar curto período de vida (uma década) e a capacidade de reter calor 25 vezes maior que a do CO₂ torna o principal alvo de diversos estudos que visam buscar estratégias que possam mitigá-lo e consequentemente, reduzir o aquecimento global (IPCC, 2014; Pinto et al., 2022).

Em 2020, o Brasil foi responsável por 3,09% da emissão de gases global – cerca de 1.4 bilhões de toneladas brutas de CO₂ equivalente (CO_{2eq}) – e assim, tornando-se o 7º país que mais emite GEE. Da emissão total de CO_{2eq}, 26 % corresponde a emissão de metano. Dentre a emissão de metano antropogênico, o setor agropecuário é o principal responsável, majoritariamente pela fermentação entérica de animais ruminantes (Climate Watch, 2022; SEEG, 2020).

Além de impactar, negativamente, o meio ambiente, a produção de metano pelos animais ruminantes também reduz a eficiência energética alimentar. Entre 2 - 15% da energia bruta é perdida na formação de gás durante a digestão no metabolismo desses animais (Tawab et al., 2020).

A microbiota dos ruminantes vem sendo alvo de diversos estudos pela complexidade da fermentação ruminal e assim, muitas estratégias vêm sendo desenvolvidas utilizando mecanismos de inibição de CH₄ como: a inibição de protozoários presente no rúmen; a estimulação da produção de propionato; a redução da produção de hidrogênio; Inibição dos micro-organismos metanogênicos (Castro- Montoya et al. 2012).

Alguns parâmetros são empregados para detectar a diminuição na produção de metano proveniente da fermentação ruminal, tais como a elevação da capacidade de digerir a matéria seca (DIVMS) e a proporção de ácidos graxos voláteis (AGV) (Beauchemin et al., 2020).

A partir da degradação dos compostos dietéticos, principalmente, dos carboidratos são gerados alguns produtos de fermentação. Os ácidos graxos voláteis (AGV) são a principal fonte energética dos ruminantes. Os mais abundantes são, acetato, butirato e propionato. Ademais, também são produzidos gases como o dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄), gás hidrogênio (H₂) e amônia (NH₃) e são excretados para o meio ambiente por eructação (Alemu et al. 2011)

O gás Hidrogênio (H₂) presente no rúmen influencia nas proporções de AGV's

e na formação de metano. Na produção de propionato, o H_2 é removido. Enquanto na produção de acetato e butirato, liberam H_2 para serem formados. Os micro-organismos metanogênicos precisam de H_2 para reduzir o CO_2 , dessa maneira produzindo CH_4 . Assim, a formação de propionato entra em competição com os micro-organismos metanogênicos presentes no rúmen, pelo H_2 disponível. Portanto, o aumento da produção de propionato é uma alternativa para reduzir a produção de metano entérico (Janssen, 2010).

Recentemente, diversos pesquisadores têm se dedicado a encontrar alternativas que possam reduzir a produção de CH_4 proveniente do trato digestivo dos animais. Entre as estratégias já observadas, destacam-se a imunização, o controle biológico, os probióticos, a eliminação dos protozoários do rúmen, a utilização de antibióticos e a manipulação e adição de aditivos fitogênicos na dieta dos animais (Castro-montoya et al. 2012).

A adição de fitogênicos é considerada uma forma natural de regular o processo digestivo. Os fitobióticos possuem propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes devido aos seus metabólitos secundários, o que lhes permite modificar a população microbiana no rúmen e potencialmente aumentar a eficiência da produção, reduzindo assim a emissão de metano proveniente do trato digestivo (Calsamiglia et al. 2007; Tawab et al. 2020).

Numerosos estudos mostram que a adição de extratos de plantas ricas em metabolitos secundários como, taninos, saponinas e flavonoides apresentam potencial de mitigação de metano. Segundo Jayanegara et al., 2020, ao adicionar extrato de *Scrophularia striata* - possui atividade antimicrobiana devidos seus compostos bioativos-modulou a fermentação ruminal e diminuiu a produção de metano no rúmen. Assim como, Cherdthong et al. 2019, reportou a diminuição de metano ao suplementar a dieta com pó das folhas de *Piper sarmentosum*, rica em compostos bioativos (alcaloides, flavonoides).

Diante o exposto, a *Acmella oleracea* é uma planta com propriedades medicinais que contém uma variedade de metabólitos secundários, com destaque para o espilantol, um alcaloide (Iamtham et al. 2023).

Portanto, levantou-se a hipótese que a adição de extrato da *Acmella oleracea* devido suas características apresenta potencial para modular a fermentação ruminal e afetar a digestibilidade da matéria seca.

METODOLOGIA

Obtenção do material vegetal

As amostras de jambú (*Acmella oleraceae*) foram obtidas na horta de um pequeno produtor, localizada no bairro da Liberdade no município de Marabá-PA. A produção da hortaliça deste local, é cultivada de forma convencional, ou seja, com uso de fertilizantes. Na produção das mudas utiliza-se a técnica hidropônica com substrato em bandejas. A partir do transplântio das plantas para o canteiro, em torno de 60 dias, foi realizada coleta do material vegetal para estudo.

Produção de gás *in vitro* e digestibilidade da matéria seca

O protocolo de coleta do líquido ruminal foi desenvolvido no laboratório de nutrição animal da universidade Rural da Amazônia (UFRA), localizada no município de Parauapebas, Pará, Brasil (6° 4'25.53"S; 49°48'54.57"W).

A fermentação ruminal foi realizada utilizando o método de Tilley e Terry (1963). O fluido ruminal (inóculo) foi coletado de um bovino fistulado da raça Nelore com massa corporal de aproximadamente 400 kg. O animal foi alimentado durante sete dias por uma ração misturada (concentrado: volumoso = 50:50) contendo forragem de capim Mombaça, farelo de soja, milho e suplemento mineral. No sétimo dia, antes da alimentação matinal, o inóculo foi filtrado em pano de malha fina e armazenado em uma garrafa previamente aquecida (39°C) e injetado CO₂. Em seguida, levado imediatamente ao laboratório e colocado em banho-Maria já aquecido a 39°C.

Antes de realizar a coleta do líquido ruminal, no laboratório, pesou-se 0,5 ± 0,05g de Substrato e transferi-os para frascos de penicilina de 100 mL. Também foi realizado a diluição dos extratos de jambú, utilizando etanol absoluto para obter as concentrações de 3 mg/mL e 30 mg/mL.

A incubação foi realizada em frascos de penicilina de 100mL, contendo: 500mg de substrato, 10 mL de líquido ruminal, 49,5 mL da solução tampão de McDougall (1948), 0,5mL do extrato; pH 6-7. Logo foi obtida dois tratamentos (T3 e o T30) e o controle (T0) (solução que contém o líquido ruminal, a solução tampão e o substrato, mas sem o extrato da planta).

Todos foram preenchidos com dióxido de carbono (CO₂) e vedados com lacres de alumínio. Em cada tratamento foi realizado 5 repetições.

As amostras foram incubadas em três tempos distintos: 6 horas, 12 horas e 24 horas, todas a uma temperatura de 39°C e cinco repetições para cada tempo. Durante a incubação na estufa (Marca:Vulcan; Modelo: EESCRAF-504D), a cada 6h os frascos foram agitados, manualmente, e com o auxílio de uma seringa, retirado o gás produzido pela fermentação.

Este procedimento está descrito na tabela 1.

Após passar o período de incubação de 6, 12 e 24 horas, as misturas foram separadas por filtração à vácuo em cadinhos filtrantes. Em seguida, a massa filtrada foi levada à estufa (Marca: Solab; Modelo: SL-100) por 24 horas a 105°C. Passado o período incubatório, os cadinhos com as amostras foram levados ao dessecador por 25 minutos e pesados.

	Concentração	Tempo (h)	Nº de repetições
Extrato do jambú	0 mg/g	6	5
		12	5
		24	5
	3,0 mg/g	6	5
		12	5
		24	5
	30,0 mg/g	6	5
		12	5
		24	5

Tabela 1. Dados para análises de DIVMS

Fonte: A autora

Análises de ácidos graxos voláteis

Retirou-se 1 mL da solução filtrante e foi colocado em um microtubo de 2 mL no qual, foi adicionado ácido fosfórico (H_3PO_4) ao filtrante na proporção 1:1 para realizar as análises de ácidos graxos voláteis (AGV). As amostras de AGV foram centrifugadas (4000 rpm x 10 min. em temperatura ambiente) e transferidas para vials de 2 mL, para análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A análise por CLAE foi realizada no Laboratório de Análises Químicas da Faculdade de Química da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará. O equipamento utilizado foi um Cromatógrafo da marca Dionex Ultimate 3000 Dual (Dionex Corporation, Sunnyvale, Ca, USA) equipado com amostrador automático (autosampler) e detector de arranjo de fotodiodos (DAD), o qual coleta espectros na região do ultravioleta e visível, na faixa de 210-600 nm.

A fase estacionária usada foi sílica em uma coluna de C18 (250mm x 4,6mm de diâmetro interno, tamanho das partículas de 5µm). O volume de amostra injetado foi de 25 µL e a temperatura da coluna foi mantida a 30°C. A fase móvel constituiu-se da solução tampão fosfato diácido de sódio (NaH_2PO_4) pH 3 e acetonitrila (ACN), utilizando gradiente exploratório linear. O gradiente foi retornado à concentração inicial em 5 min e mantido por mais 10 min, para o equilíbrio do sistema, antes da injeção da próxima amostra. O fluxo do eluente foi de 1,0 mL/min.

A curva de calibração padrão foi preparada utilizando-se uma mistura de ácidos graxos que continham os ácidos: acético, fórmico, propiônico, butírico, valérico, isovalérico, isocapríco e capríco. Foi utilizado o ácido adípico como padrão interno. Ao todo foram preparadas sete concentrações (mM/mol): 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8. As análises foram realizadas em triplicatas.

Análises Estatísticas

Os dados coletados do experimento *in vitro* foram analisados usando o procedimento de análise de variância (ANOVA) utilizando o software Rstudio (versão 4.3.1) Diferenças entre meios de tratamentos foram testados usando o teste de Tukey e a significância foi declarada em $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito do extrato de jambú na digestibilidade da matéria seca (DIVMS)

A digestibilidade da matéria seca no período de incubação de 6h e 12h não apresentou diferença entre o controle e os tratamentos ($P > 0.05$). Já no período de 24h houve alteração na DIVMS. Apresentando uma diferença significativa em relação ao controle ($P < 0.05$). Os valores na DIVMS variaram entre 56,07 e 63,87. De acordo como tabela 2

PARÂMETRO	6H					
	CON	TRATAMENTO		SEM*	P-VALOR CON VS T3	P-VALOR CON VS T30
		T3	T30			
Digestibilidade (mg/g)	12,01	9,01	10,75	1,12	0,84	0,39
	12H					
Digestibilidade (mg/g)	38,11	38,09	37,48	2,95	1,00	0,88
	24H					
Digestibilidade (mg/g)	63,87	56,07	57,60	2,23	0,01	0,04

* Standard Error of the Mean

Tabela 2. Efeito do extrato de jambú sobre a digestibilidade da matéria seca (DIVMS) no período de incubação de 6, 12 e 24 horas.

Fonte: A autora

Estudos anteriores adicionaram diversas plantas medicinais na dieta para analisar a efetividade na fermentação ruminal, emissão de gás metano, digestibilidade da matéria seca *in vitro* e a produção de ácidos graxos voláteis. Posto isso, de acordo Grainger et al. 2009 ao adicionar compostos bioativos extraídos da *Acacia mearnsii*, embora tenha apresentando diminuição da produção de metano, houve decréscimo na digestibilidade.

Outros estudos que relataram alteração na digestibilidade da matéria seca quando adicionado plantas medicinais. Segundo Zhang et al. 2022, ao mesmo tempo que houve

aumento da digestibilidade da matéria seca utilizando 1% e 2% de extrato das folhas de *Neolamarckia cadamba*, também ocorria um decréscimo na produção de metano.

A diminuição da digestibilidade da matéria seca pode estar relacionada com a concentração e pH inadequados fornecidas. De acordo com Khiaosa-ard et al. 2020, a dosagem e o pH influenciam na eficiência de suplementos com alcaloides, pois a atividade microbiana é alterada e não a comunidade de micro-organismos.

Análises dos AGV

Através das análises por HPLC da mistura de ácidos graxos pode-se observar no cromatograma, figura 1, a presença de oito ácidos graxos, que em comparação com dados fornecidos por Vargas, 2020, pode-se correlacionar cada um deles com o tempo de retenção (tr), tabela 3.

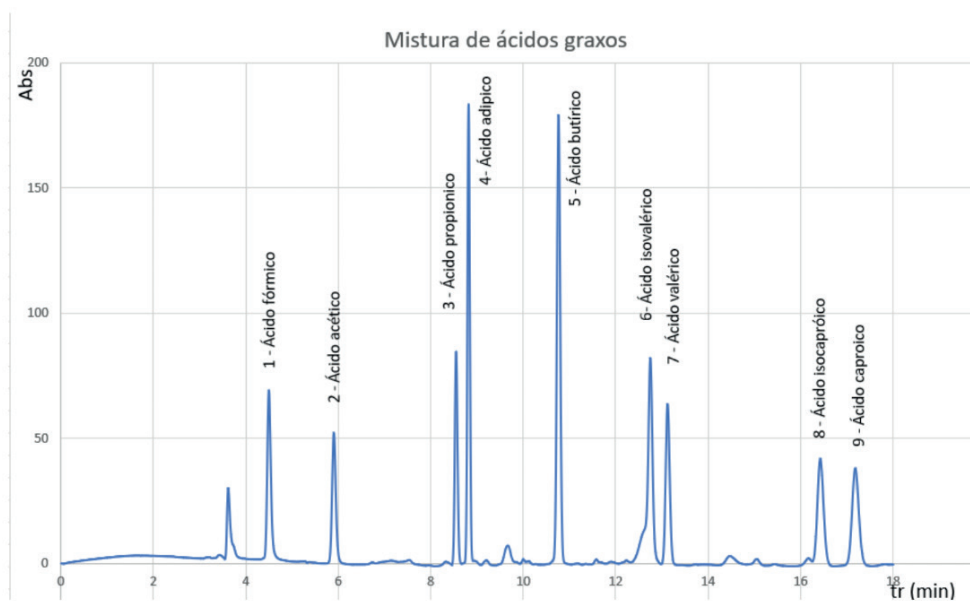


Figura 1. Cromatograma da mistura de ácidos graxos

Fonte: A autora

Pico	Tempo de retenção (tr)	Ácido graxos
01	4,494	ácido fórmico
02	5,897	ácido acético
03	8,547	ácido propionico
04	8,814	ácido adípico*
05	10,76	ácido butírico
06	12,747	ácido isovalérico
07	13,12	ácido valérico
08	16,427	ácido isocapróico
09	17,84	ácido caprúico

*padrão interno

Tabela 3. Ácidos graxos e respectivos tempo de retenção obtidos através de HPLC

Fonte: A autora

Através das oito diferentes concentrações analisadas foi possível obter uma curva de calibração para cada um dos ácidos presentes na mistura, todos apresentaram valor de R^2 próximo de 1, significando uma confiabilidade dos dados.

Efeito do extrato de jambú na produção de ácidos graxos voláteis (AGV)

Dentre os produtos finais da fermentação ruminal, os ácidos graxos voláteis correspondem a 70% de energia fornecida ao animal. Os ácidos mais abundantes são: acético, propiônico e butírico, sendo assim, foi realizado uma análise de variância (ANOVA) das as concentrações de acetato, propionato e butirato obtidos das amostras analisadas utilizando-se a curva de calibração referente a cada um deles. Levou-se em considerações duas variáveis, representadas por A = concentração do extrato de jambú; e B = tempo de incubação. Além disso, também foi analisado a interação entre essas variáveis, denominada de AB = *concentração x tempo*. Logo, de acordo com a figura 2, observa-se a interação entre as variáveis descritas e a concentração do jambú não são significativas ($p > 0,05$). Somente o Tempo de incubação mostrou capacidade de influenciar significativamente as concentrações de (A) acetato e (B) propionato ($p < 0,05$). Para o butirato, nenhuma variável influencia na resposta ($p > 0,05$).

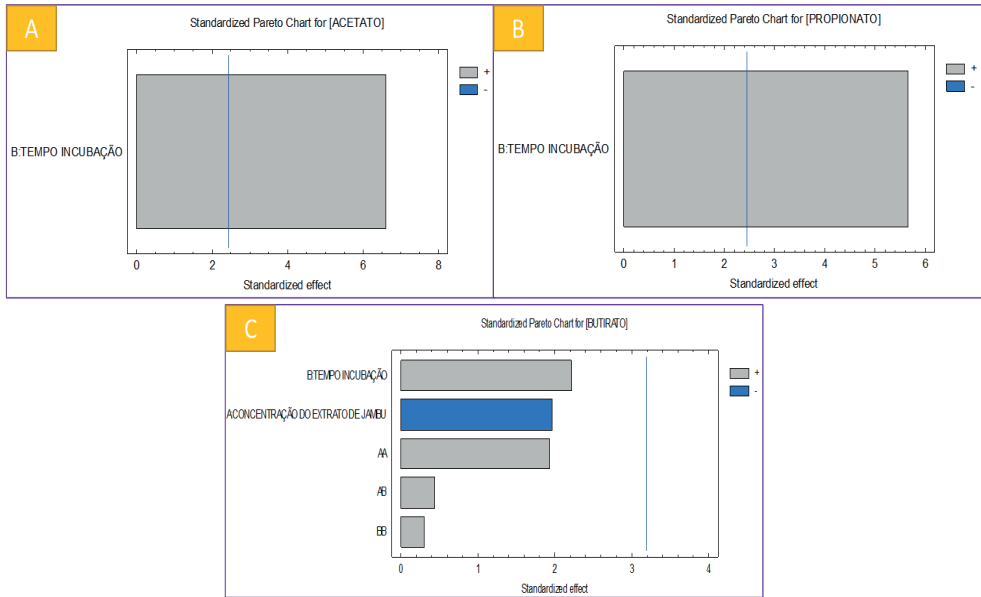


Figura 2. Gráfico de Pareto dos efeitos concentração de jambú [A], Tempo de incubação [B] e interação concentração x tempo (AB) na concentração: (A) Acetato; (B) Propionato; e (C) Butirato

Fonte: A autora

A partir dos dados que se construiu o modelo é possível otimizar as respostas das variáveis, com o intuito de observar qual é o melhor tempo e concentração para melhorar a resposta das concentrações dos AGV. Na figura 3, através do gráfico de superfície de respostas, analisa-se os níveis das variáveis para o aumento da concentração de acetato e propionato, e para ambos foi observado que o melhor tempo de incubação para o aumento da concentração é 24h. Na análise da variável “concentração de extrato” identificou que com ou sem extrato, o efeito é o mesmo. Vale destacar que o tempo e concentração na otimização da concentração de butirato não foi significativo ($p > 0,05$), assim não gerou uma resposta de superfície.

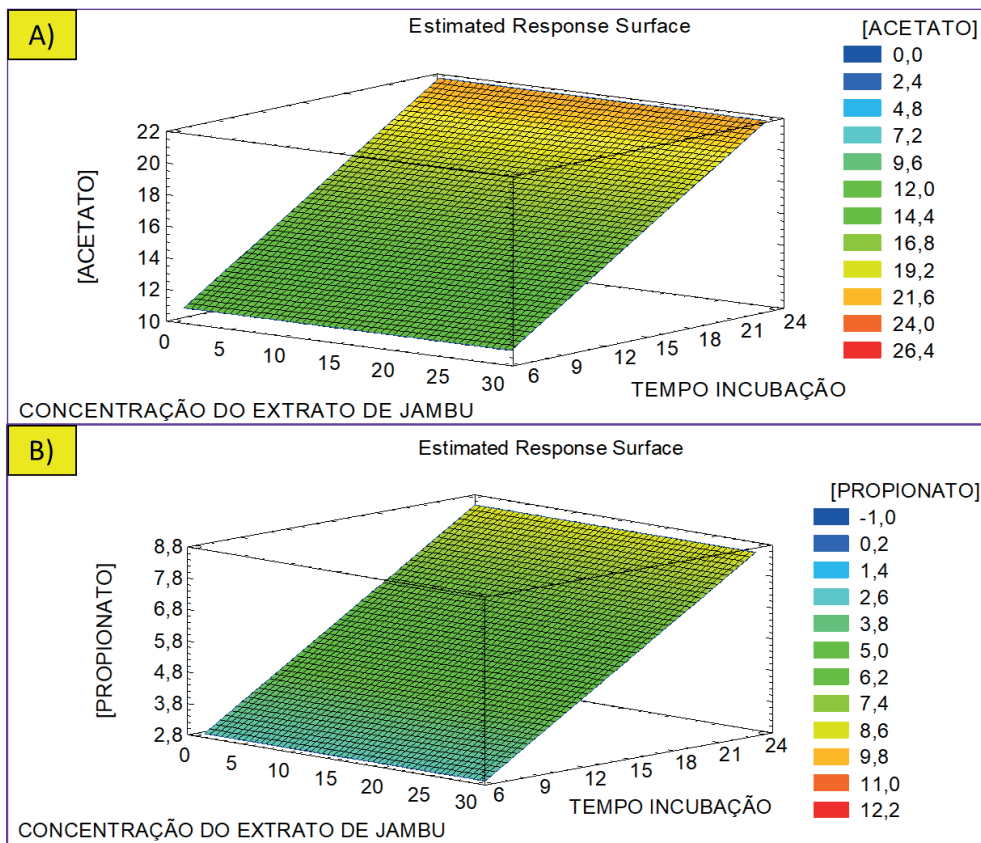


Figura 3. Gráfico de superfície de resposta para o modelo linear mostrando os resultados experimentais para A) concentração de acetato; e B) concentração de propionato.

Fonte: A autora

De acordo com Antonius et al. 2023, observou que ao utilizar *Moringa oleifera*, *Rhodomyrtus tomentosa*, *Clerodendron serratum*, *Curcuma longa* Linn., *Urena lobata*, *Uncaria*, e *Parkia timoriana*, não houve efeito significativo na concentração de propionato e butirato ($p > 0.05$) em relação ao controle. Em contrapartida, as plantas medicinais afetaram, significativamente, a produção de acetato em relação ao controle ($p < 0.05$). Assim como, Cherdthong et al. 2019, ao adicionar *Piper sarmentosum*, uma fonte rica em flavonoides, não houve alteração significativa nas concentrações de acetato, propionato e butirato em relação ao controle ($p > 0,05$).

CONCLUSÃO

A redução das emissões de metano através do uso de plantas medicinais tem sido amplamente estudada por pesquisadores recentemente. Isso levou à investigação do potencial do extrato de jambu na perspectiva de mitigar metano, modulando a fermentação do sistema digestivo de ruminantes.

O extrato etanólico da *Acmella oleracea* nas concentrações e incubação utilizadas, não apresentou efeito significativo na produção dos ácidos graxos voláteis (acetato, propionato e butirato). Em relação a digestibilidade da matéria seca, tanto nas concentrações de 3mg/mL como de 30 mg/mL foi observado um decréscimo no tempo de incubação de 24h, ou seja, um efeito negativo na digestibilidade.

A utilização do extrato de *Acmella oleracea* como suplemento é pioneiro, logo necessita-se procurar novos parâmetros, como analisar o pH, a produção de proteína microbiana, produção gás total e N-amoniaco; identificar as comunidades dos micro-organismo. Além disso, otimizar as concentrações e tempo de incubação para uma melhor avaliação da fermentação ruminal.

REFERÊNCIAS

ANTONIUS, Antonius et al. Effectiveness of herbal plants on rumen fermentation, methane gas emissions, in vitro nutrient digestibility, and population of protozoa. **Veterinary World**, v. 16, n. 7, p. 1477, 2023.

ALEMU, Akilu W. et al. Rumen stoichiometric models and their contribution and challenges in predicting enteric methane production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 166, p. 761-778, 2011.

BEAUCHEMIN, Karen A.; MCGINN, Sean M.; PETIT, Hélène V. Methane abatement strategies for cattle: Lipid supplementation of diets. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 87, n. 3, p. 431-440, 2007.

BEAUCHEMIN, Karen A. et al. Fifty years of research on rumen methanogenesis: Lessons learned and future challenges for mitigation. **Animal**, v. 14, n. S1, p. s2-s16, 2020.

BANCO MUNDIAL. World Development Indicators Database **População, total (2022)** Disponível: <https://data.worldbank.org/indicador/SP.POP.TOTL>. Acesso em: 27 jan. 2024.

CALSAMIGLIA, Sergio. et al. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 6, p. 2580-2595, 2007.

CASTRO-MONTOYA, Joaquin et al. Interactions between methane mitigation additives and basal substrates on in vitro methane and VFA production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, n. 1-4, p. 47-60, 2012.

CHANG, Jinfeng et al. The key role of production efficiency changes in livestock methane emission mitigation. **AGU Advances**, v. 2, n. 2, p. e2021AV000391, 2021.

Climate Watch Historical GHG Emissions. 2022. **Washington, DC: World Resources Institute**. Disponível em https://www.climatewatchdata.org./countries/BRA?end_year=2020&start_year=1990#ghg-emissions. Acesso em: 24 jan 2024.

DE PAULA, Kelvin Gabriel Sant Anna et al. Emissão de metano na pecuária: relação causa-efeito e mecanismos modulatórios. **Pubvet**, v. 13, p. 148, 2019.

EMBRAPA. **Estudos socioeconômicos e ambientais**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/73611968/brasil-pode-superar-a-india-em-2023-na-producao-de-graos>. Acesso em: 22 jan. 2024.

EPA. **Greenhouse Gas Emissions**. Disponível em: <https://www.epa.gov/ghgemissions/global-greenhouse-gas-emissions-data>. Acesso em: 23 jan. 2024.

HERRERO, Mario et al. Livestock and the environment: what have we learned in the past decade?. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 40, p. 177-202, 2015.

IPCC. Intergovernmental Panel On Climate Change. **Climate Change 2014: Synthesis Report**. PACHAURI, R.K and MEYER, L. A. (eds.). *Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* IPCC, Geneva, Switzerland, 151 pp.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa de Pecuária municipal (2022)**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=destaques>. Acesso em: 22 jan. 2024.

JANSSEN, Peter H. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. **Animal Feed Science and Technology**, v. 160, n. 1-2, p. 1-22, 2010.

JAYANEGARA, Anuraga et al. Combination effects of plant extracts rich in tannins and saponins as feed additives for mitigating in vitro ruminal methane and ammonia formation. **Animals**, v. 10, n. 9, p. 1531, 2020.

KHIAOSA-ARD, Ratchaneewan et al. Physicochemical stressors and mixed alkaloid supplementation modulate ruminal microbiota and fermentation in vitro. **Anaerobe**, v. 65, p. 102263, 2020.

KUMAR, Sanjay et al. Factors affecting rumen methanogens and methane mitigation strategies. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 1557-1566, 2009.

KUMAR, Sumit et al. Role of Plant Secondary Metabolites in Defence and Transcriptional Regulation in Response to Biotic Stress. **Plant Stress**, p. 100154, 2023.

MACHADO, Fernanda. S. et al. Emissões de metano na pecuária: conceitos, métodos de avaliação e estratégias de mitigação. 2011.

MARTIN, Cecile; MORGAVI, Diego P.; DOREAU, Michel. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. **Animal**, v. 4, n. 3, p. 351-365, 2010.

McALLISTER, T.A.; NEWBOLD, C.J. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.48, n.2, p.7-13, 2008

MCCANN, Joshua C.; ELOLIMY, Ahmed A.; LOOR, Juan J. Rumen microbiome, probiotics, and fermentation additives. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 33, n. 3, p. 539-553, 2017.

McDOUGALL, E. I. 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. **Biochem. J.** 43:99- 109.

MOMBACH, Mircéia Angele et al. Emissão de metano entérico por bovinos: o que sabemos e que podemos fazer. In: **Embrapa Agrossilvipastoril-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. 2016. p. 181-202.

NOSCHANG, Joana Piagetti; BRAUNER, C. C. Saccharomyces cerevisiae na nutrição de ruminantes: Revisão. **Pubvet**, v. 13, n. 2, p. 1-8, 2019.

PINTO, Talita. P. et al. Panorama das emissões de metano e implicações do uso de diferentes métricas. **Observatório de Conhecimento e Inovação em Bioeconomia, Fundação Getúlio Vargas - FGV-EESP**, São Paulo, SP, Brasil. 2022.

NASCIMENTO, Luis Eduardo Silva et al. Phytochemical profile of different anatomical parts of jambu (*Acmella oleracea* (L.) RK Jansen): A comparison between hydroponic and conventional cultivation using PCA and cluster analysis. **Food Chemistry**, v. 332, p. 127393, 2020.

RONDANELLI, Mariangela et al. *Acmella oleracea* for pain management. **Fitoterapia**, v. 140, p. 104419, 2020.

SEEG. **Sistema de Estimativas de Emissões de Gases de Efeito Estufa**. Disponível em: www.seeg.eco.br. Acesso em: 22 jan. 2024.

SHARMA, Rahul; ARUMUGAM, Neelakantan. N-alkylamides of *Spilanthes* (syn: *Acmella*): structure, purification, characterization, biological activities and applications—A review. **Future Foods**, v. 3, p. 100022, 2021.

THIRUMURUGAN, Durairaj et al. An introductory chapter: secondary metabolites. **Secondary metabolites-sources and applications**, p. 3-21, 2018.

TILLEY, J. M. A., & TERRY, R. A. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. **Grass and forage science**, 18(2), 104-111, 1963

UTHPALA, T. G. G.; NAVARATNE, S. B. *Acmella oleracea* plant; identification, applications and use as an emerging food source—review. **Food Reviews International**, v. 37, n. 4, p. 399-414, 2021.

ZHANG, Qing et al. Effects of *Neolamarckia cadamba* leaves extract on methanogenesis, microbial community in the rumen and digestibility of stylo silage. **Journal of Cleaner Production**, v. 369, p. 133338, 2022.

WANG, M. et al. Responses of methane production and fermentation pathways to the increased dissolved hydrogen concentration generated by eight substrates in in vitro ruminal cultures. **Animal Feed Science and Technology**, v. 194, p. 1-11, 2014..

WANG, Kun; XIONG, Benhai; ZHAO, Xin. Could propionate formation be used to reduce enteric methane emission in ruminants?. **Science of the Total Environment**, v. 855, p. 158867, 2023.