

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO DA FERMENTAÇÃO RUMINAL POR BOVINOS
CONSUMINDO FENO DE TIFTON 85 E CONCENTRADO COM
ADITIVOS**

Astrid Rivera Rivera

Médica Veterinária

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

2006

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO DA FERMENTAÇÃO RUMINAL POR BOVINOS
CONSUMINDO FENO DE TIFTON 85 E CONCENTRADO COM
ADITIVOS**

Astrid Rivera Rivera

Orientadora: Prof^a. Dra. Telma Teresinha Berchielli

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).

JABOTICABAL-SÃO PAULO- BRASIL

Julho de 2006

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iii
SUMMARY.....	iv
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1 Introdução.....	1
2 Generalidades sobre a produção de metano.....	2
3 Metabolismo ruminal.....	4
4 Manipulação ruminal.....	6
4.1 Aditivos.....	6
5 Estimativa de metano pela técnica de produção de gases <i>in vitro</i>	9
6 Objetivos.....	13
CAPÍTULO 2 – EFEITO DO USO DE ADITIVOS NA FERMENTAÇÃO RUMINAL DA DIETA COMPOSTA POR VOLUMOSO E CONCENTRADO.....	14
Resumo.....	14
1 Introdução.....	15
2 Material e métodos.....	17
3 Resultados e discussão.....	21
4 Conclusões.....	27
CAPÍTULO 3 - ESTIMATIVA <i>IN VITRO</i> DA PRODUÇÃO DE GÁS METANO, USANDO ADITIVOS EM UM SUBSTRATO COMPOSTO POR VOLUMOSO E CONCENTRADO.....	28
Resumo.....	28
1 Introdução.....	29
2 Material e métodos.....	31
3 Resultados e discussão.....	35
4 Conclusões.....	38
CAPÍTULO 4 – IMPLICAÇÕES.....	39
REFERÊNCIAS.....	40
APÊNDICE.....	51

ESTUDO DA FERMENTAÇÃO RUMINAL POR BOVINOS CONSUMINDO FENO DE TIFTON 85 E CONCENTRADO COM ADITIVOS

RESUMO – O trabalho teve como objetivos avaliar o efeito do uso de monensina e de um complexo de leveduras, ácidos graxos poliinsaturados e aminoácidos (LAA) no consumo de matéria seca e nutrientes, na estimativa da digestibilidade ruminal, nos parâmetros de fermentação ruminal (pH, concentração de nitrogênio amoniacal e de ácidos graxos de cadeia curta), na população de protozoários e na produção de metano. Foram realizados dois experimentos, no primeiro com seis bovinos anelados, com peso médio de 530 kg, que foram tratados com 5g dia⁻¹ de LAA ou monensina ou caulim usado como controle, adicionados à dieta base composta por feno de Tifton 85 (*Cynodon Spp.*) e concentrado, em uma relação 80:20. No segundo experimento foram testados os mesmos aditivos, usando a técnica de produção de gases *in vitro* para estimar a produção de gás metano. O delineamento experimental usado foi em blocos casualizados. Entre os resultados houve menor consumo de matéria seca e dos nutrientes ($P<0,05$) e maior produção de ácido propiônico ($P<0,05$) efeito da monensina. A digestibilidade da matéria seca e dos nutrientes não foi influenciada pela utilização dos aditivos. O pH e a concentração de nitrogênio amoniacal foram adequadas para o crescimento microbiano. A produção de metano não foi alterada usando aditivos.

Palavras-chave: ácidos graxos poliinsaturados, bovino, leveduras, metano, monensina.

STUDY OF RUMINAL FERMENTATION BY CATTLE FEEDING HAY (*Cynodon Spp.*)
AND CONCENTRATE WITH ADDITIVES

SUMMARY - The objectives of this work were to evaluate the effect of additives: monensin and yeast cells, unsaturated fatty acid, amino acid complex on nutrient intake, nutrient digestibilities, ruminal parameters, protozoa population and methane production. Two experiments were conducted. One experiment, six beef cattle, 530 kg live weight, feeding hay (*Cynodon Spp.*) and concentrate (proportion 80:20) were used. Monensin or yeast cells, unsaturated fatty acid, amino acid complex or caulim (control) were given daily (5g). Two experiments, same additives were used to estimate methane production using the gas production technique. The statistics model was random block. The nutrient intake decreased ($P < 0.05$) and propionic acid increased ($P < 0.05$) using monensin. There were no effect of additives on nutrient digestibilities. Ammonia nitrogen and pH were adequate for microorganisms growth. There were no effect of additives on methane production.

KEYWORDS: bovine, unsaturated fatty acid, methane, monensin, yeast cells.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 Introdução

No Brasil, a pecuária tem potencial para se estabelecer como uma atividade competitiva nos mercados nacional e internacional, especialmente porque os sistemas de produção são quase que exclusivo de pastagens.

O problema da sazonalidade da produção forrageira é conhecido e intensificado pelo fato de que as forrageiras tropicais, mesmo no período das chuvas, não serem capazes de produzir, durante muito tempo, alimento com qualidade que possibilite o atendimento das exigências para crescimento dos animais, em especial, aqueles de alto potencial genético (CEZAR & EUCLIDES FILHO, 1996). Além disso, é conhecido que as forragens tropicais podem gerar mais metano durante o processo fermentativo ruminal do que as plantas de clima temperado, pelo fato de apresentarem altos teores de parede celular. Atualmente este é um ponto importante tratado pelos pesquisadores, tanto porque o metano representa perda de energia dos alimentos quanto pelo impacto ambiental.

O processo de fermentação ruminal e a decomposição anaeróbia dos dejetos dos ruminantes, bem como o uso agrícola dos solos, são consideradas importantes fontes de emissão de gases de efeito estufa geradas pelo setor agropecuário. O Brasil comprometeu-se no Protocolo de Kioto, assinado em 2005, na Convenção das Nações Unidas sobre mudanças do clima a avaliar e executar alternativas para reduzir a emissão dos denominados gases de efeito estufa.

Portanto, é importante nortear pesquisas que melhorem a eficiência na utilização dos alimentos consumidos pelos animais e, ao mesmo tempo, reduzam a emissão de metano para a atmosfera.

2 Generalidades sobre a produção de metano

O metano (CH_4) é um gás composto de carbono e hidrogênio e que, de acordo com o levantamento (Figura 1) realizado pela US EPA (2003), é considerado, após dióxido de carbono (CO_2) (84.7%), como o maior responsável do efeito estufa (7.9%) e junto a outros gases de menor emissão como óxido nitroso (N_2O), hidrofluorcarbonos (HFC), perfluorcarbonos (PFC) e hexafluoreto de enxofre (SF_6). O aumento na emissão desses gases produz o aquecimento da superfície terrestre e destruição da camada de ozônio na estratosfera (PRIMAVESI et al., 2004).

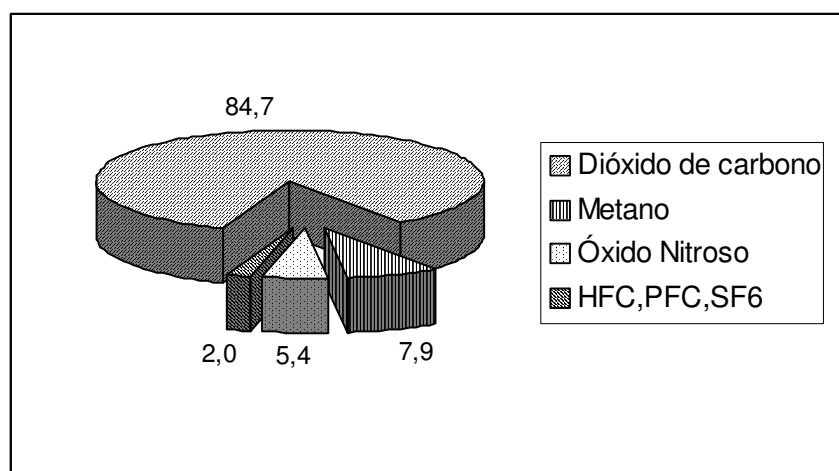


Figura 1. Levantamento das fontes de emissão dos gases de efeito estufa
Fonte: US EPA (2003).

Da produção total de metano, 30% estão relacionados com fontes de emissão naturais e 70% provêm de fontes antrópicas (Figura 2), das quais a atividade agropecuária é responsável por 67 - 70% das emissões (IPCC,2001). Estima-se que a fermentação ruminal contribui com 33-39% desta atividade (TEDESCHI et al., 2003). De acordo com estas estatísticas e na tentativa de diminuir a emissão dos gases poluidores, na Convenção das Nações Unidas sobre a mudança do clima foi assinado o Protocolo de Kioto em

2005, e que segundo o Artigo No. 2 e 3 os países envolvidos, comprometem-se a limitar e diminuir a emissão dos gases de efeito estufa como mínimo em 5% (baseados no registro de emissões de 1990), no período compreendido entre 2008 e 2012 (PROTOCOLO DE KIOTO, 2005).

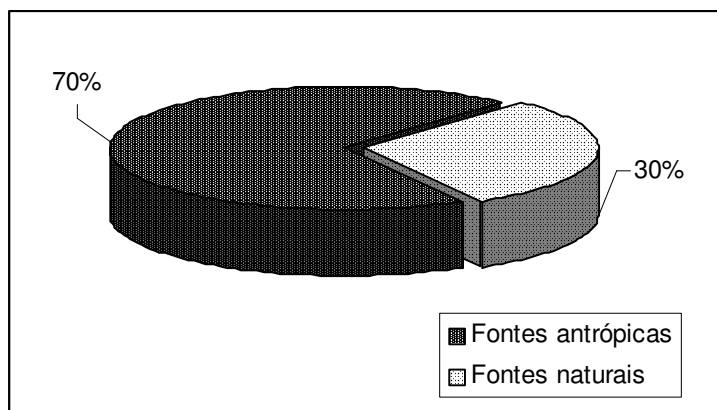


Figura 2. Fontes de emissão de metano
Fonte: IPCC (2001)

O Brasil comprometido com as disposições do protocolo, deve estabelecer programas que conduzam a diminuir as emissões dos gases de efeito estufa. Considerado como o país com o maior rebanho bovino comercial do mundo, com 170.153.901 milhões de cabeças em 2004 (ANUALPEC, 2005), e com dependência quase exclusiva de volumosos, torna-se um significativo contribuinte na emissão de CH_4 , produto da fermentação entérica (PRIMAVESI et al., 2004).

Tem sido estabelecido que, a intensidade da emissão do CH_4 na pecuária está relacionada com fatores dependentes do tipo de animal, do consumo de alimento e do grau de digestibilidade das dietas fornecidas (JOHNSON & JOHNSON, 1995). Considerando que as dietas nos países tropicais estão baseadas em volumosos, o valor nutritivo da planta forrageira é relevante na produção de CH_4 . As forrageiras tropicais apresentam menor valor nutritivo, quando comparadas com as de clima temperado. De maneira geral, o decréscimo no valor nutritivo está associado às condições climáticas (precipitação,

intensidade luminosa, temperatura, etc.) e ao manejo, determinando a taxa de crescimento das plantas (MINSON, 1990 citado por McCRAB & HUNTER, 1999).

A Embrapa Pecuária Sudeste, quantificou a taxa de emissão de metano entérico de bovinos leiteiros em condições tropicais, determinando emissão de CH₄ superior por bovinos alimentados com forrageiras tropicais (PRIMAVESI et al., 2004). Portanto, o aumento na digestibilidade das dietas fornecidas, além de melhorar a produção de carne e do leite, ajuda a diminuir a emissão de CH₄.

3 Metabolismo Ruminal

Os ruminantes possuem a capacidade para converter alimentos de baixa qualidade em proteína de alta qualidade (VARGA & KOLVER, 1997). O rúmen é considerado um ecossistema microbiano diverso e único. Composto por três tipos de microrganismos ativos no seu interior: bactérias, protozoários e fungos, sendo as bactérias constituintes de 60 a 90% da biomassa microbiana com cerca de 200 espécies (KOZLOSKI, 2002). A fermentação anaeróbia do alimento principalmente de tipo fibroso é possível devido ao sinergismo existente entre a população microbiana, permitindo a degradação pela ação de complexos de enzimas, como a β 1-4 celulase, agindo sobre a parede celular das plantas. No entanto, a fermentação do alimento e conversão em carne e leite pode ser pouco eficiente devido a fatores associados a digestibilidade das forrageiras (VARGA & KOLVER, 1997).

A maior parte dos nutrientes do alimento, principalmente as fontes energéticas e protéicas, são transformados em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), em massa microbiana e em gases como metano (CH₄), dióxido de carbono (CO₂) e hidrogênio (H₂) (BAKER, 1999). Os AGCC podem ser considerados um resíduo da fermentação para os microrganismos, entretanto para o ruminante, representam a principal fonte de energia. A energia presente nos AGCC representa em torno de 75 a 80% da energia originalmente presente

nos carboidratos fermentados e, normalmente, contribuem em 50 a 70% da energia digestível do alimento (KOZLOSKI, 2002).

A estequiometria (Tabela 1) da conversão de um mol de glicose para AGCC e a proporção em que cada ácido é produzido, depende da espécie bacteriana, que pode ser especializada em produzir um tipo ou outro e principalmente da concentração de nicotinamida adenosina difosfato (NADH) e H₂ na célula (KOZLOSKI, 2002). O excesso de H₂ no rúmen, é eliminado pelas bactérias metanogênicas, principalmente do gênero *Archae* (BAKER, 1999), utilizando-o para reduzir CO₂ e formar CH₄ (KOZLOSKI, 2002). De acordo com o balanço estequiométrico, a produção de acetato e de butirato promovem maior produção de CH₄ pela maior produção de H₂ (WOLIN, 1960 citado por TEDESCHI et al., 2003).

Tabela 1. Estequiometria da conversão de glicose em AGCC

GLICOSE	= 2 acetato + 2 CO ₂ + 8 H	($\Delta H = -251 \text{ kcal mol}^{-1}$)
GLICOSE	= butirato + 2 CO ₂ + 4 H	($\Delta H = -118 \text{ kcal mol}^{-1}$)
GLICOSE+4H	= 2 propionato	($\Delta H = + 60 \text{ kcal mol}^{-1}$)
GLICOSE	= 2 lactato	($\Delta H = - 16 \text{ kcal mol}^{-1}$)

Fonte: KOZLOSKI (2002)

A produção de CH₄ no rúmen está diretamente relacionada com a concentração de H₂ (CHAUCHEYRAS et al., 1995). Na medida que ocorre a fermentação dos carboidratos no rúmen, aumentam-se os teores de H₂ que, se não forem removidos, inibem os sistemas enzimáticos que envolvem o NADH, enzima importante na fermentação dos carboidratos (PEDREIRA, 2004).

De outra parte, sabe-se que do balanço entre o aporte de energia e proteína vai depender a eficiência no processo de fermentação ruminal. Assim o aporte de nitrogênio amoniacal pode servir como a principal fonte de N para a síntese de proteína microbiana, em bactérias fermentadoras de carboidratos estruturais, entretanto, algumas espécies, como as bactérias fermentadoras de carboidratos

não-estruturais, requerem aminoácidos e peptídeos (NRC, 1986). As bactérias ruminais podem incorporar aminoácidos em proteína microbiana ou fermentá-los como fonte de energia. A fermentação de aminoácidos também origina amônia ruminal. Como o crescimento microbiano é dependente do suprimento de carboidratos fermentáveis, os produtos finais do metabolismo de proteínas são influenciados pela disponibilidade de carboidratos (RUSSEL & STROBEL, 1989).

Com base no conhecimento dos processos fermentativos e da microflora do rúmen, têm sido desenvolvidas alternativas orientadas a manipular a fermentação no rúmen, para aumentar a digestibilidade das dietas, principalmente daquelas ricas em volumosos, fonte predominante na pecuária das regiões tropicais.

4 Manipulação Ruminal

O metabolismo no rúmen pode ser alterado de maneira direta ou indireta para melhorar a digestibilidade do alimento fornecido. A manipulação indireta está relacionada com as características do alimento, sendo assim que, o uso de suplementos como minerais, ou fontes de energia e nitrogênio aumentam a atividade metabólica dos microrganismos (McSWEENEY et al., 1999). Adicionalmente, o tipo de carboidrato suplementado influi no pH do rúmen e na população microbiana, incidindo na produção dos AGCC principalmente na relação acetato:propionato e por sua vez na produção de H₂. (HEGARTY, 1999). Além disso, a fermentação do carboidrato solúvel e do amido produz menos CH₄ do que a parede celular, devido à baixa tolerância das bactérias metanogênicas ao decréscimo do pH (BLAXTER & CLAPPERTON, 1965).

A manipulação direta do rúmen relaciona-se com o uso de aditivos biológicos ou químicos, que modificam a fermentação ao terem efeito sobre a microflora ruminal (DOMINGUEZ & ESCOBAR, 1997). A adição de soluções

tampão, de ionóforos ou de leveduras, entre outros, têm sido usados para favorecer a digestibilidade de alimentos fibrosos (VARGA & KOLVER, 1997).

4.1 Aditivos

O uso de ionóforos como monensina na alimentação de gado foi descrito desde 1975, em gado de corte (SCHELLING, 1984). O mecanismo de ação está relacionado com a capacidade dos ionóforos em se ligar a cátions, como sódio, e formar complexos lipofílicos para atravessar a membrana celular das bactérias gram positivas e de protozoários (BERGEN & BATES, 1984; CHOW et al. 1994). O sódio transportado ao interior da célula precisa ser trocado pelo potássio e, assim, retornar ao meio externo, neste processo há gasto de ATP provocando queda da reserva energética, alterando a divisão celular e possivelmente conduzindo à morte dos microrganismos (RUSSEL & STROBEL, 1989).

Efeitos da monensina no metabolismo ruminal estão associados ao aumento da proporção molar de ácido propiônico (BERGEN & BATES, 1984). Efeito atribuído ao decréscimo na população de bactérias gram positivas, produtoras de ácido láctico, acético, butírico, fórmico e hidrogênio, enquanto que, as bactérias gram negativas, que produzem ácido propiônico e succínico são resistentes. O decréscimo na produção de CH₄, também é evidente (CHEN & WOLIN, 1979).

Têm sido determinado que, com o uso de monensina, há aumento da população de *Selenomonas*, *Succinomonas*, *Megasphaera* e *Veillonella* e inibição no crescimento de bactérias produtoras de acetato como *Ruminococcus* e *Butyrivibrio* (CHEN & WOLIN, 1979). Simultaneamente a maior concentração de NADH/NAD⁺, favorece a síntese de propionato pela reoxidase do NADH, limitando o H₂ para a produção do acetato (HEGARTY, 1999). De outra parte, a fumarato redutase, enzima que permite a transformação do fumarato a succinato, que posteriormente vai se transformar no propionato, encontra-se em bactérias

gram negativas, resistentes à monesina (BERGEN & BATES, 1984). Com o aumento do ácido propiônico há maior eficiência no metabolismo energético, devido a que este é usado potencialmente na gliconeogênese pela incorporação direta ao ciclo de Krebs (SCHELLING, 1984).

A maior produção de propionato concorre diretamente com a produção de CH₄, ou seja, quanto maior a produção de ácido propiônico, menor a produção de CH₄ (JOHNSON & JOHNSON, 1995). O efeito da monensina na redução da metanogênese relaciona-se com o decréscimo de H₂ e de formato, substrato necessário na formação de CH₄ e não pelo efeito direto nas bactérias metanogênicas (CHEN & WOLIN, 1979). Outro mecanismo relacionado ao decréscimo de CH₄ é a redução no número de protozoários. Como já estabelecido, os protozoários fornecem H₂ às bactérias metanogênicas que mantêm com eles uma relação de simbiose (RUSSEL & STROBELL, 1989).

Outro aditivo atualmente usado é a levedura, que como probiótico tem mostrado efeito positivo na fermentação ruminal, principalmente na maior atividade bacteriana (NEWBOLD et al., 1995), e na digestibilidade da matéria seca e da fibra das forrageiras, além de induzir decréscimo na concentração de ácido láctico (CHAUCHEYRAS et al., 1995). Leveduras como o *Saccharomyces cerevisiae*, foram usadas desde 1925 por ECKLES & WILLIAMS citados por NEWBOLD et al. (1995), com resultados positivos no metabolismo ruminal. Aumento na taxa de digestão da fibra, e na produção de AGCC têm sido observados (ERASMUS et al., 1992). Estudos *in vitro*, realizados por ERASMUS et al. (2005) demonstraram que as leveduras reduzem a produção de ácido acético favorecendo a síntese de propiônico. De outra parte, determinou-se que estimulam a germinação de zoósporos do fungo *Neocallimastix frontalis* e o crescimento de bactérias celulolíticas, principalmente, *Fibrobacter succinogenes* e *Ruminococcus* (CHAUCHEYRAS & FONTY, 2001). Assim, o efeito sinérgico de bactérias e fungos age em tecidos lignificados da parede celular permitindo maior área de colonização bacteriana (SINGH & SAINI, 2002).

WALLACE (1994), associou o uso efeito das leveduras à remoção de oxigênio do ambiente ruminal, mantendo condições adequadas para o crescimento de bactérias anaeróbias estritas. Além disso, observou aumento na ingestão do alimento. Estudos similares de ERASMUS et al. (1992), determinaram diferenças significativas na ingestão de alimento e na produção de leite em vacas holandesas suplementadas com leveduras. Menor concentração de ácido láctico foi associado ao aumento na atividade de *Selenomonas ruminantium*.

Suplementação das dietas com ácidos graxos polinsaturados têm demonstrado efeito na produção de CH₄ (MACHMÜLLER et al., 1998). A menor produção de CH₄, tem sido atribuída à ação sobre microrganismos que direta ou indiretamente contribuem à formação de CH₄ (HENDERSON, 1973 citado por FAICHNEY et al., 2002). Estudo realizado por MACHMÜLLER et al. (1998) demonstraram menor número de protozoários como efeito da suplementação com ácidos graxos e decréscimo de H₂. Os protozoários no rúmen agem em simbiose com as bactérias metanogênicas aumentando a produção de CH₄ devido à transferência de H₂ entre as duas espécies (McALLISTER et al., 1996). Tem sido observado grande número de bactérias metanogênicas associadas a protozoários após períodos de alimentação, assim conseguem captar H₂ para posterior síntese de ATP (HEGARTY, 1999). Na ausência de protozoários o H₂ pode ser incorporado na formação de AGCC (MACHMÜLLER et al., 1998), ou para saturar ácidos graxos polinsaturados com decréscimo do substrato que precisam as bactérias metanogênicas para produzir CH₄ (FIEVEZ et al., 2003).

UNGERFELD et al. (2005) observaram inibição no crescimento de *Methanobrevibacter ruminantium*, *Mb. Ruminantium*, efeito da suplementação com ácidos polinsaturados. No entanto, segundo FAICHNEY et al. (2002) deve ser considerado o efeito negativo dos lipídeos na digestibilidade dos constituintes fibrosos das forrageiras, quando fornecidos em mais de 4%.

O interesse sobre o emprego do crômio como fonte suplementar na dieta de animais destinados à produção é devido a possíveis fatores como desempenho, taxa de crescimento, resposta imune e alteração metabólica. A

suplementação com crômio influencia a liberação de insulina e captação de glicose nas primeiras fases de vida de bezerros. Adicionalmente, pode melhorar a capacidade imunológica de animais estressados. Em confinamento, nos primeiros 30 dias observa-se um maior ganho de peso e eficiência alimentar em bovinos recebendo crômio na dieta. Têm efeito no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (OLIVEIRA & SORES, 2005).

5 Estimativa de metano pela técnica de produção de gases *in vitro*

A técnica de produção de gases *in vitro*, foi descrita há mais de meio século, tempo durante o qual se desenvolveram várias metodologias aceitas e usadas atualmente em vários grupos de pesquisa. As primeiras mensurações de gases obtidas da incubação de um substrato foram realizadas por McBEE (1953) e HUNGATE (1966) citados por RYMER et al. (2005), para avaliar o potencial de degradação no rúmen. Posteriormente, implementou-se o uso de seringas para incubar o substrato, sendo este o princípio do “Hohenheim Gas Test” desenvolvido por MENKE et al. (1979). THEODOROU et al. (1994) desenvolveram o uso transdutores de pressão manual, para assim estimar os gases produzidos e inferir à cinética de fermentação no rúmen. Atualmente, as metodologias existentes variam de acordo a fatores como: tipo de transdutor usado; tamanho e quantidade de amostra usada; composição do meio de cultura; preparação e proporção do inoculo; volume incubado, entre outros (RYMER et al., 2005).

O princípio da técnica baseia-se na simulação dos processos metabólicos que acontecem normalmente no rúmen, onde a degradação do alimento depende dos microrganismos e do ambiente ruminal adequado para se manterem ativos e fermentar o alimento. Sob essas condições, há formação de AGCC, além de CO₂, CH₄ e produção de massa microbiana (BLÜMMEL et al., 2005).

Na técnica *in vitro*, é usado um recipiente de incubação, que varia de acordo com a metodologia. As condições ambientais do rúmen como temperatura e anaerobiose são mantidas, sendo os gases produto da fermentação do substrato relacionado com a digestão microbiana e com a produção de AGCC, de CO₂ e de CH₄. THEODOROU et al. (1994) determinaram que, os gases diretos são produto da fermentação do carboidratos estruturais, enquanto que, os carboidratos solúveis e o amido geram gases indiretos, que são produzidos ao reagir o ácido propiônico, produto da fermentação com a solução tampão para manter o pH do meio. Assim, variações na proporção de AGCC associadas às características bioquímicas do substrato incidem no volume de gases produzidos (GETACHEW et al., 1998).

A técnica de produção de gases *in vitro* tem sido avaliada para determinar as principais fontes de variação. Assim, BUENO et al. (2005) avaliaram o efeito da espécie do animal doador (bovino *versus* ovino) do líquido ruminal na produção de gases de algumas forrageiras tropicais. Os resultados não mostraram diferença na estimativa de produção de gases, embora a taxa de fermentação tenha sido maior com líquido ruminal de origem bovino. No entanto, CONE et al. (2002), indicaram que o volume total de gases produzido usando fluido ruminal de bovinos, foi maior do que o fluido de ovelhas, quando alimentadas com dietas similares. CALABRÒ et al. (2004), compararam o uso de líquido ruminal de bovino e de búfalo determinando que há maior produção total de gases usando fluido ruminal de bovino, concluindo que a espécie do animal doador do fluido ruminal tem efeito na produção de gases.

Em outro estudo, BUENO et al. (2005) avaliaram o efeito do uso de diferentes proporções de fase líquida e sólida do inóculo, determinando que não há efeito da proporção de fase sólida na taxa de produção de gás. Embora, a contribuição de microrganismos da fase sólida do líquido ruminal seja importante para avaliar forrageiras com alto conteúdo de fibra. De outra parte, TREI et al. (1970) observaram maior volume de gases quando coletado fluido ruminal de novilhos alimentados com grão, do que daqueles alimentados com feno, sendo o

grão o substrato incubado. NAGADI et al. (2000) observaram que quando usado fluido ruminal de animais adaptados ao substrato incubado, apresentam-se diferenças no volume de gases produzidos quando comparado com animais não adaptados.

THEODOROU et al. (1994), observaram que aumentando a quantidade de substrato incubado, há acréscimo linear do volume total de gases, embora a taxa de produção não seja alterada. Alimentos fibrosos ou de lenta degradação aumentam a taxa de produção de gases conforme diminui o tamanho da partícula, possivelmente pela maior área de acesso para as bactérias atuarem (MENKE & STEINGRASS, 1988; LOWMAN et al., 2002).

A liberação dos gases acumulados em tempos predeterminados é outro fator que deve ser considerado. De acordo com THEODOROU et al. (1994), pressão maior de 7 psi (48kpa), interfere no crescimento bacteriano. Assim, liberando os gases a pressão decresce, mantendo as condições adequadas para o crescimento dos microrganismos. Este efeito pode ser corrigido com o uso de menor quantidade de substrato ou aumentando o tamanho do recipiente de incubação. LOWMAN et al., 1998 citados por RYMER et al. (2005) observaram que, o intervalo de liberação dos gases influi na estimativa do volume, sendo menor quando liberado a cada 6h e maior a cada 2h.

RYMER & GIVENS (1997) citados por RYMER et al. (2005) compararam três tipos de aparelhos usando a mesma metodologia da técnica de produção de gás. Os aparelhos comparados foram o transdutor de pressão automático e manual. Observando maior produção de gás quando usado o transdutor automático. Embora, estudo realizado por THEODOROU et al. (1994) mostraram maior volume de gás e menor taxa de produção usando transdutor manual.

Diferença na produção de gases pode acontecer por mudanças de pressão atmosférica, fator que deve ser considerado ao comparar resultados entre laboratórios.

6 Objetivos

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação com monensina ou com um complexo de leveduras, ácidos graxos poliinsaturados e aminoácidos sobre o consumo de matéria seca e dos nutrientes, na estimativa da digestibilidade ruminal, nos parâmetros de fermentação ruminal (pH, concentração de nitrogênio amoniacal e de ácidos graxos de cadeia curta) e na população de protozoários. Adicionalmente, estimou-se a produção de metano, usando a técnica de produção de gases *in vitro*

CAPÍTULO 2 – EFEITO DO USO DE ADITIVOS NA FERMENTAÇÃO RUMINAL DA DIETA COMPOSTA POR VOLUMOSO E CONCENTRADO

Resumo - Avaliou-se o efeito da adição de monensina e de um complexo contendo leveduras, ácidos graxos poliinsaturados e aminoácidos (LAA) sobre o consumo de matéria seca e nutrientes, na estimativa da digestibilidade ruminal, nos parâmetros de fermentação ruminal: pH, concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e na população de protozoários. Foram utilizados seis bovinos anelados, castrados, canulados no rúmen, dispostos em um delineamento experimental em blocos casualizados com três períodos (blocos), três tratamentos e duas repetições dentro do bloco. Os tratamentos consistiram em: 5g dia⁻¹ de LAA; 5g dia⁻¹ monensina sódica 5%; 5g dia⁻¹ de caulim usado como controle. O coeficiente de digestibilidade foi determinado através do marcador interno fibra em detergente ácido indigestível. Foram tomadas amostras de conteúdo ruminal para determinação de pH, AGCC, N-NH₃ e para contagem de protozoários. Houve efeito da monensina reduzindo significativamente (P<0,05) o consumo da matéria seca, dos nutrientes, observou-se aumento na produção de ácido propiônico e decréscimo na relação de ácido acético e propiônico (P<0,05). Não foi evidente o efeito dos aditivos na digestibilidade da dieta. A população de protozoários foi menor usando monensina (P<0,05).

Palavras-chave: ácidos graxos poliinsaturados, digestibilidade, FDAi, leveduras, monensina.

1 Introdução

Devido à deficiência, tanto de qualidade, quanto de quantidade das forrageiras tropicais, a produção de carne e leite é limitada. O pobre valor energético do alimento consumido, além da parede celular rica em lignina, dificulta a fermentação ruminal e a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e de proteína de origem microbiana. Sendo alimento de baixa digestibilidade, tem maior tempo de retenção no rúmen, decrescendo a taxa de passagem e o consumo. Assim, estratégias descritas por JOHNSON & JOHNSON (1995), como o aumento na qualidade da forragem fornecida, o uso de carboidratos não estruturais e o uso de aditivos como os ionóforos, leveduras, ácidos graxos poliinsaturados, entre outros, são alternativas para melhorar a digestibilidade das dietas e a eficiência do metabolismo energético.

Ionóforos como a monensina, foram liberados para uso nas dietas de bovinos de corte desde 1976, nos Estados Unidos com a finalidade de aumentar a eficiência na produção de carne (DOMESCIK & MARTIN, 1999). O modo de ação está associado ao transporte de sódio no interior da membrana celular das bactérias, principalmente gram positivas mobilizando potássio ao exterior, induzindo decréscimo do pH no interior da célula. A bactéria dissipa o excesso de prótons com gasto de energia, conduzindo ao decréscimo no crescimento e replicação (RUSSEL & STROBEL, 1989). Os ionóforos são inibitórios no crescimento de bactérias produtoras de ácido láctico, acético, butírico, fórmico e hidrogênio, enquanto que aquelas que produzem ácido succínico e propiônico são resistentes (CHEN & WOLIN, 1979). Embora, o uso de monensina por períodos prolongados induz resistência e adaptação das bactérias sensíveis (McALLISTER et al., 1996).

Os ácidos graxos poliinsaturados, usados como aditivos, têm sido associados à menor perda de energia metabolizável ao diminuírem a produção de metano (CH₄). A menor produção de CH₄, tem sido atribuída à ação sobre

microrganismos que direta ou indiretamente contribuem à formação de CH₄ (HENDERSON, 1973 citado por FAICHNEY et al., 2002). O mecanismo proposto é o uso de hidrogênio livre para saturar os ácidos, limitando o substrato para as bactérias metanogênicas produzir CH₄ (JOHNSON & JOHNSON, 1995; FIEVEZ et al., 2003). Estudo realizado por MACHMÜLLER et al. (1998), mostrou menor número de protozoários como efeito da suplementação com ácidos graxos poliinsaturados com decréscimo de H₂ e menor produção de CH₄.

De outra parte, a suplementação com probióticos, como as leveduras, associa-se ao crescimento de bactérias celulolíticas e à maior produção de AGCC (CHAUCHEYRAS et al., 1995; NEWBOLD et al., 1996; NAGARAJA et al., 1997). Conseqüentemente, tem sido demonstrado aumento na digestibilidade da forragem, no entanto, o mecanismo pelo qual a população de bactérias aumenta ainda não tem sido estabelecido (NEWBOLD et al., 1996). Tem sido sugerido que a captação de oxigênio pelas leveduras mantêm a anaerobiose, induzindo crescimento de bactérias anaeróbias estritas (WALLACE, 1994). Além disso, MARTIN & STREETER (1995) observaram aumento no número de *Selenomonas ruminantium*. Estas bactérias usam o ácido láctico como substrato, mantendo o pH no rúmen. Outros estudos demonstraram menor concentração de amônia em animais suplementados com leveduras, refletindo o uso na síntese de proteína microbiana (HARRISON et al., 1988).

O presente trabalho teve como objetivos determinar o efeito da adição de monensina ou de um complexo contendo leveduras, ácidos graxos poliinsaturados e aminoácidos sobre o consumo de matéria seca e dos nutrientes, na estimativa da digestibilidade ruminal, nos parâmetros de fermentação ruminal (pH, concentração de nitrogênio amoniacal e de ácidos graxos de cadeia curta) e na população de protozoários.

2 Material e métodos

O trabalho foi desenvolvido na Fazenda Experimental da Empresa Premix em Patrocínio Paulista e na Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Jaboticabal – SP. Foram utilizados seis bovinos, anelorados, machos, castrados, canulados no rúmen, com peso corporal médio de 530 kg e idade média de 4,5 anos, alojados em baias individuais, cobertas e providas de bebedouros e comedouros. Os tratamentos consistiram em: 5g dia⁻¹ do complexo de leveduras, ácidos graxos poliinsaturados e aminoácidos (LAA) (Tabela 1); 5g dia⁻¹ de monensina sódica 5%; 5g dia⁻¹ de caulim usado como controle, que foram fornecidos com a dieta base composta por feno de Tifton 85 (*Cynodon Spp.*) e concentrado, em uma relação 80:20, balanceada para atender as exigências de manutenção dos animais (NRC, 1996).

Tabela 1. Composição do complexo de leveduras, ácidos graxos poliinsaturados e aminoácidos, conforme níveis de garantia fornecido pelo fabricante.

Ácido Oléico	12	mg*
Ácido Linoléico	12.000	mg
Metionina	2.400	mg
Lisina	11.400	mg
Tirosina	4.850	mg
Crômio	285	mg
Probiótico (Leveduras)	0,3 x 10 ⁸	UFC **

* mg kg⁻¹, **UFC. unidades formadoras de colônia

A composição porcentual e químico-bromatológica dos alimentos fornecidos encontram-se na Tabela 2. Foi avaliado o efeito dos aditivos sobre o consumo de

matéria seca e dos nutrientes, na estimativa da digestibilidade ruminal, nos parâmetros de fermentação ruminal (pH, concentração de nitrogênio amoniacal e de ácidos graxos de cadeia curta) e na população de protozoários, durante três períodos de 21 dias de duração, sendo 14 dias para adaptação dos animais à dieta e sete dias para a coleta das amostras.

Tabela 2 - Composição porcentual e químico-bromatológica da dieta

Nutrientes	Ingredientes (%MS)	
	Feno Tifton 85 80	Concentrado 20
Matéria seca	88,98	89,08
Matéria orgânica	94,63	82,66
Proteína Bruta	13,20	21,71
Fibra insolúvel em detergente neutro	80,75	45,08
Fibra insolúvel em detergente ácido	39,76	20,24
Lignina	5,17	4,75
Matéria mineral	5,36	17,33
EB (Mcal kg ⁻¹ MS)	4,19	3,76
Composição do concentrado (%)		
Polpa cítrica desidratada		29,91
Gérmen de milho		30
Levedura seca		1
Farelo de amendoim		20
Casca de soja		6
Farelo de algodão		0,97
Farelo de trigo		6,27
Carbonato de cálcio		2,81
Uréia		1,39
Cloreto de sódio		0,18
Premix mineral*		1,47

*Fósforo 0,36%; Cálcio 1,7%; Enxofre 1,6g; Magnésio 1,7g; Potássio 8g; Zinco 52mg; Cobre 14,46mg; Manganês 25,41mg; Cobalto 0,32mg; Iodo 1mg; Selênio 0,5mg; Crômio 0,340mg; Sódio 1,2 mg; Metionina 700mg; Tirosina 1300mg; Lisina 4600 mg.

Durante cada período experimental a dieta foi fornecida duas vezes ao dia, às 7:30 e às 16:30. As sobras foram mensuradas para determinação do consumo de matéria seca. Foram coletadas amostras do alimento para posterior avaliação da composição química e digestibilidade.

As amostras pré-secas foram encaminhadas ao Laboratório de Nutrição Animal (LANA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Jaboticabal. Para determinação do conteúdo de matéria seca (MS) as amostras foram colocadas em estufa de ar forçado a 105°C durante 12h e para matéria mineral (MM) foram colocadas em mufla a 550°C durante 3h. A energia bruta (EB) foi determinada em bomba calorimétrica adiabática PARR Instruments e a fibra em detergente neutro (FDN), a fibra em detergente ácido (FDA), e a lignina adaptado de VAN SOEST et al. (1991).

Para a estimativa da produção fecal foram coletadas amostras de fezes durante sete dias. As coletas foram realizadas duas vezes ao dia, às 7:30 e 16:30, e congeladas para ao final do período formar uma amostra composta por animal. A estimativa da produção fecal foi realizada utilizando a fibra em detergente neutro indigestível (FDAi) como indicador interno com base na equação: Produção fecal (g dia^{-1}) = gramas de indicador ingerido/concentração do indicador nas fezes

A técnica de incubação *in situ* foi utilizada para obtenção da FDAi. Amostras em triplicata do alimento e das fezes foram incubadas no rúmen de bovinos, durante 144 horas, usando bolsas de tecido de náilon. Após a incubação, as bolsas foram lavadas e submetidas à secagem em estufa com ventilação forçada a 55°C durante 72 horas. A determinação de fibra em detergente ácido (FDA) foi realizada segundo VAN SOEST et al. (1991).

O coeficiente de digestibilidade no rúmen foi determinado através da equação: Coeficiente de digestão da MS = $100 \times [MS \text{ ingerida} - MS \text{ fecal} / MS \text{ ingerida}]$

Para determinação de pH e da concentração dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e do nitrogênio amoniacal (N-NH₃) foram realizadas coletas de conteúdo ruminal no 5º dia de cada período experimental. Para a coleta foi usada uma bomba de vácuo aspiradora NEVONI ® Ref. 5005-BR. As amostragens ocorreram nos períodos 0, 2, 4, 8, 12 horas após a alimentação, sendo tomada uma amostra para realizar a leitura de pH, através de um potenciômetro digital PHTEK – PH – 100 LIO SERUM ®. Duas alíquotas foram armazenadas e congeladas, a primeira alíquota foi usada para determinação de AGCC, a segunda foi acidificada com ácido clorídrico para posterior determinação de nitrogênio na forma de amônia (N-NH₃).

Para determinar a concentração de AGCC, as amostras foram descongeladas e centrifugadas a 10.000g durante 15 minutos, alíquotas de 1 mL foram tratadas com ácido fórmico 88%, para protonar os ácidos associados e garantir a volatilização dos AGCC no injetor do cromatógrafo. Amostras de 1 µm foram analisadas em cromatógrafo a gás (CG 270) com detector de ionização de chama, empregando coluna capilar empacotada (4% CW 20M Carbopack B-DA, 2.0mx1/8 "). A determinação de N-NH₃ foi realizada conforme metodologia descrita por CHANEY & MARBACH (1962).

Para a contagem de protozoários foram coletadas amostras de conteúdo ruminal antes de fornecer o alimento no 5º e 6º dia de cada período experimental. A amostra foi transferida para um recipiente junto com uma solução de formaldeído 40% na proporção de 1:1. A metodologia utilizada para a avaliação quantitativa e qualitativa dos gêneros de ciliados foi de acordo a DEHORITY (1984).

O delineamento experimental foi de blocos casualizados com duas repetições dentro do bloco e três tratamentos. Para a análise de concentração de ácidos graxos de cadeia curta, de nitrogênio amoniacal e pH foi usado o

delineamento em parcelas sub-divididas. As análises de variância foram realizadas utilizando o procedimento GLM do programa SAS[®] (LITTELL et al., 2002), e em caso de diferenças significativas ($P < 0,05$) as médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

3 Resultados e discussão

Consumo e digestibilidade

O consumo de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) e o coeficiente de digestibilidade matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), proteína bruta (PB) são apresentados na Tabela 3. Menor consumo de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e proteína bruta (PB) foram evidentes no tratamento com monensina.

Tabela 3 - Consumos médios diários de matéria seca (CMS), matéria orgânica (CMO), proteína bruta (CPB), fibra em detergente neutro (CFDN), energia bruta (CEB) e coeficiente de digestibilidade (%) da matéria seca (DMS), da matéria orgânica (DMO), da fibra em detergente neutro (DFDN) da proteína bruta (DPB), e da energia bruta (DEB), de bovinos recebendo volumoso, concentrado e aditivos

Variáveis	Tratamentos ¹			CV(%)
	LAA	Monensina	Controle	
	Consumo diário			
CMS, %PC	1,52 ^A	1,40 ^B	1,51 ^A	5,20
CMS, kg PC ^{-0,75}	73,45 ^A	67,43 ^B	73,04 ^A	4,69
CMS, kg dia ⁻¹	8,23 ^A	7,53 ^B	8,15 ^A	4,04
CMO, kg dia ⁻¹	7,59 ^A	6,95 ^B	7,51 ^A	4,13
CFDN, kg dia ⁻¹	6,06 ^A	5,54 ^B	5,99 ^A	4,18
CFDA, kg dia ⁻¹	2,95 ^A	2,70 ^B	2,92 ^A	4,32
CPB, kg dia ⁻¹	1,17 ^A	1,06 ^B	1,15 ^A	4,43
	Digestibilidade ruminal (%)			
DMS	54,40	55,04	56,33	4,08
DMO	52,02	53,28	54,59	5,19
DFDN	54,93	55,39	55,99	3,77
DFDA	53,34	53,83	53,81	4,57
DPB	58,87	61,15	60,02	6,57

¹ LAA =complexo leveduras, ácidos graxos poliinsaturados e aminoácidos
CV= Coeficiente de variação, PC=peso corporal
Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, nas linhas, diferem estatisticamente pelo teste Tukey (P<0,05).

Efeitos similares foram descritos em gado de corte quando as dietas suplementadas com monensina, embora o efeito tenha sido evidente em dietas baseadas em concentrados (BERGEN & BATES, 1984). O efeito da monensina no menor consumo de alimento é atribuído à maior eficiência no metabolismo energético, devido ao aumento na produção de ácido propiônico, único ácido graxo de cadeia curta usado potencialmente na gluconeogênese pela incorporação direta ao ciclo de Krebs (SCHELLING, 1984).

Neste trabalho a relação volumoso:concentrado da dieta foi de 80:20, com predomínio de volumoso e considerando o alto teor de FDN o consumo pode ter sido limitado pelo enchimento do rúmen, no entanto considera-se que o concentrado ao ser fonte de carboidratos solúveis, rapidamente degradáveis e de proteína supre às bactérias, principalmente aquelas que degradam fibra para se manterem ativas e melhorar a taxa de passagem e o consumo.

Os coeficientes de digestibilidade ruminal não diferiram estatisticamente. Esperava-se aumento na digestibilidade aparente da fibra pela suplementação com monensina, como descrito por TEDESCHI et al. (2003) e do LAA ao conter leveduras, como observado por MIRANDA et al. (1996). Sabe-se que estes aditivos melhoram as condições ambientais no rúmen e estimulam o crescimento da população bacteriana, principalmente de bactérias celulolíticas (ERASMUS et al., 1992; HEGARTY, 1999; CHAUCHEYRAS & FONTY, 2001).

SILVA (2004) avaliou a digestibilidade de dieta com base em feno de capim-Tifton 85 (99,2%), observando coeficientes de digestibilidade ruminal da matéria seca de 57,72%, superior ao observado neste trabalho. FEITOSA (2003), determinou que a degradabilidade da matéria seca, fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido do feno de capim-Tifton 85 com 10% de proteína bruta não foi afetada pela qualidade do feno. Outros estudos mostraram altos coeficientes de digestibilidade de dietas quando usada esta gramínea (HATFIELD et al., 1997; WEST et al., 1998). Assim, sugere-se que o indicador

usado (fibra em detergente ácido indigestível) para determinar a digestibilidade ruminal do feno de capim-Tifton 85 pode ter interferido nos resultados. ATAÍDE et al., (2001) observaram baixos coeficientes de digestibilidade em novilhos alimentados com feno de Tifton 85, atribuído à baixa recuperação do indicador interno FDA indigestível nas fezes.

Parâmetros ruminais: pH, nitrogênio amoniacal e ácidos graxos de cadeia curta

Os valores médios dos parâmetros ruminais são apresentados na Tabela 3. Menores valores de pH foram observados 12 horas após alimentação associado à produção dos AGCC produto da fermentação dos carboidratos solúveis (Figura 1). Não houve interação entre tratamento e período.

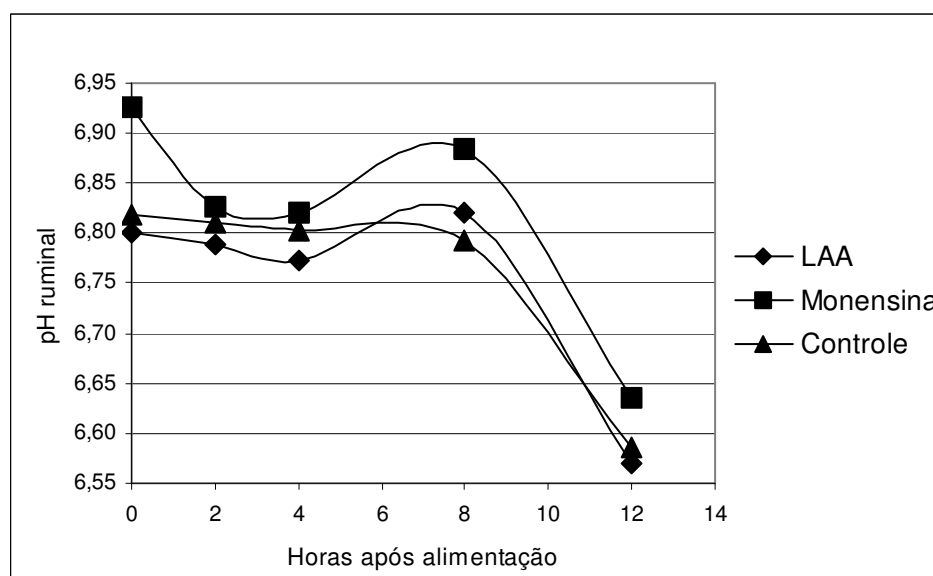


Figura 1 – Valores médios de pH ruminal antes (0) e 2, 4, 8 e 12 horas após alimentação, de bovinos recebendo dieta com e sem aditivos

Evidenciou-se que o pH manteve-se na faixa considerada adequada para os microrganismos manterem a fermentação ruminal, como esperado para dietas ricas em volumosos, sendo que o pH regula a afinidade dos microrganismos ao substrato e que, de acordo com ALLEN & MERTENS (1988), valores próximos a pH neutro melhoraram a capacidade de adesão das bactérias à fibra. Em relação aos tratamentos, os animais suplementados com LAA apresentaram valor médio de pH de 6,75, valor este que diferiu ($P < 0,05$) do tratamento com monensina (6,81). Menor produção de H_2 tem sido associado ao uso de monensina, devido à maior produção de ácido propiônico, ao ser transformado o fumarato a succinato, pela ação da fumarato redutase, enzima que encontra-se em bactérias gram negativas, resistentes à monesina (BERGEN & BATES, 1984).

Tabela 3 – Parâmetros ruminiais de bovinos recebendo dieta com e sem aditivos.

Parâmetros ruminiais	Tratamentos ¹			CV (%)
	LAA	Monensina	Controle	
pH	6,75 ^B	6,81 ^A	6,76 ^{AB}	1,27
N-NH ₃	7,38	6,61	7,65	40,12
AGCC total (mmol L ⁻¹)	90,35 ^A	81,16 ^B	88,40 ^A	7,13
Acético (A)	68,75 ^A	67,48 ^A	58,60 ^B	6,75
Propiônico (P)	14,37 ^B	16,71 ^A	13,20 ^B	9,58
Butírico (B)	7,21 ^A	5,83 ^B	7,11 ^A	11,87
Relação A:P	3,78 ^B	3,05 ^A	3,62 ^B	7,50

¹LAA =complexo leveduras, ácidos graxos poliinsaturados e aminoácidos

AGCC=ácido graxo de cadeia curta, CV= Coeficiente de variação.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, nas linhas, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

As concentrações de N-NH₃ ruminal são apresentados na Tabela 3. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) nas médias entre tratamentos. Não houve interação entre tratamento e período. O valor de máxima concentração observou-se 2 horas após alimentação (Figura 2), associada à degradação das fontes protéicas provenientes do concentrado. A menor concentração ($P < 0,05$) foi

evidente às 8 horas após alimentação, correspondendo à utilização pelos microrganismos.

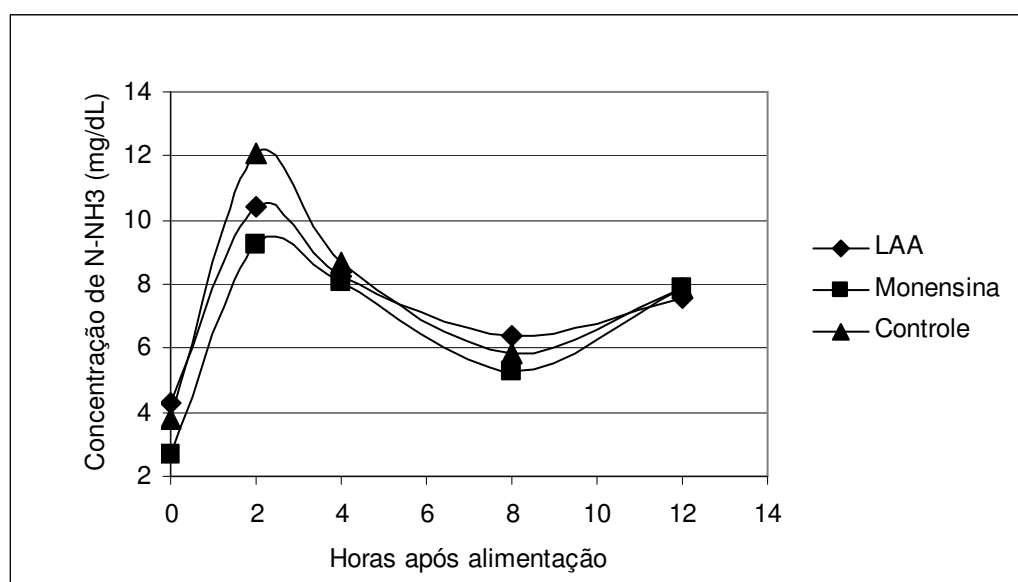
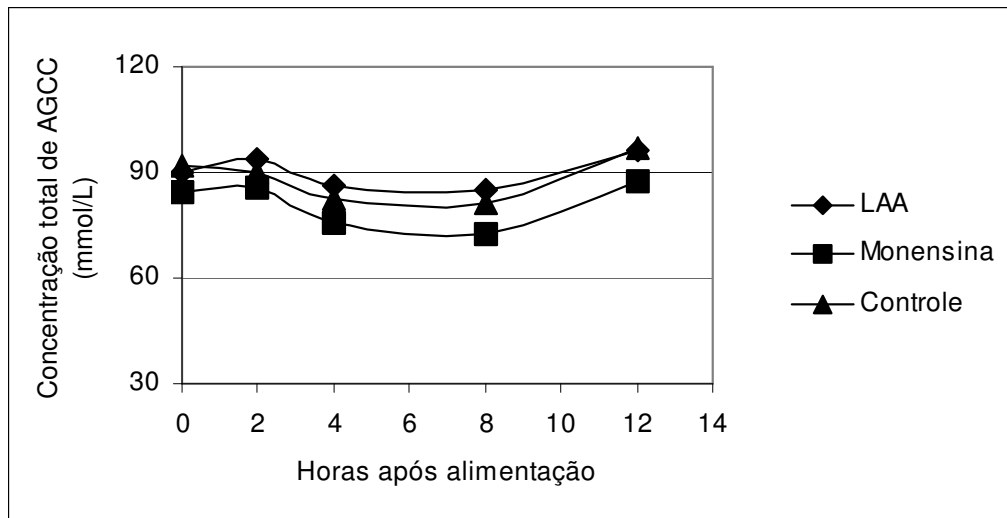


Figura 2 – Valores médios de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) antes (0) e 2, 4, 8 e 12h após alimentação, de bovinos recebendo dieta com e sem aditivos

Não houve diferença significativa entre tratamentos, no entanto observou-se que a concentração de N-NH₃ manteve-se acima de 5mg dL⁻¹, concentração mínima para suprir as necessidades para o crescimento da população microbiana (SATTER & SLYTER, 1974). Sendo que as bactérias celulolíticas são capazes de utilizar N-NH₃ como fonte de nitrogênio para a síntese de proteína microbiana.

As médias da concentração total e de AGCC apresentam-se na Tabela 3. Observou-se menor concentração total de AGCC no tratamento com monensina (Figura 3), no entanto, houve maior concentração de ácido propiônico e menor relação acético:propiônico, efeito que coincide com o maior valor de pH (6,81) observado neste trabalho, e que conforme descrito por ZHEN-HU et al. (2004), valores de pH ≥ 6,8 além de outros fatores favorecem a produção de ácido propiônico. Assim, mudanças moderadas de pH regulam a afinidade das

bactérias ao substrato favorecendo um grupo específico de bactérias (ALLEN & MERTENS, 1988) e permitindo maior degradação da fibra (BERGEN & BATES,



1984).

Figura 3 – Valores médios da concentração total de AGCC antes (0) e 2, 4, 8 e 12h após alimentação, de bovinos recebendo dieta com e sem aditivos

Além disso, tem sido estabelecido que a monensina aumenta a população de *Selenomonas*, *Succinomonas*, *Megasphaera* e *Veillonella* (CHEN & WOLIN, 1979), assim aumentam a produção de ácido propiônico. No entanto, o predomínio na concentração de acetato observado neste trabalho mostra que quando a dieta é rica em volumoso, a fermentação ruminal ocorre preferencialmente por esta via.

Contagem de Protozoários

O valor médio da população de protozoários são apresentados na Tabela 4. Diferença significativa ($P < 0,05$) na população total de protozoários evidenciou-se no tratamento com LAA, quando comparado com monensina, embora estes valores não tenham diferido do controle.

Tabela 4 - Contagem de protozoários de bovinos recebendo dieta com e sem aditivos

Protozoários (N° x 10 ³ mL ⁻¹)	Tratamentos ¹			CV (%)
	LAA	Monensina	Controle	
Entodinium	628,08	516,56	442,8	22,19
Diplodiniinae	287,5	234,39	217,95	29,40
Isotricha	109,40	88,28	134,72	37,96
Dasytricha	115,55 ^{AB}	80,78 ^B	128,38 ^A	23,29
Charonina	166,86	126,22	117,01	34,13
Total	706,49 ^A	531,82 ^B	632,60 ^{AB}	13,80

¹LAA =complexo leveduras, ácidos graxos poliinsaturados e aminoácidos

CV= Coeficiente de variação.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, nas linhas, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

O menor número de protozoários associado ao efeito da monensina pode ser ocasionado pela instabilidade da membrana celular conduzindo à morte BERGEN & BATES (1984). No entanto, a população de protozoários não decresceu de maneira significativa.

Assim, neste trabalho evidenciou-se que a digestibilidade da dieta não aumentou pelo uso de aditivos como esperado, além disso, o pH foi favorável para manter a atividade dos protozoários sugerindo que se houve acréscimo da população bacteriana não foi evidente pela possível predação por parte dos protozoários.

4 Conclusões

A suplementação com monensina influenciou no menor consumo de matéria seca e dos nutrientes, na maior formação de ácido propiônico e na menor população de protozoários. Não foram evidentes os efeitos dos aditivos na digestibilidade da dieta. O pH e o nitrogênio amoniacal permaneceram na faixa ideal para manter a atividade dos microrganismos ruminais.

CAPÍTULO 3 – ESTIMATIVA *IN VITRO* DA PRODUÇÃO DE GÁS METANO, USANDO ADITIVOS EM UM SUBSTRATO COMPOSTO POR VOLUMOSO E CONCENTRADO.

Resumo - Estimou-se a produção de metano ao adicionar monensina ou um complexo contendo leveduras, ácidos graxos poliinsaturados e aminoácidos (LAA) no substrato composto por feno Tifton 85 e concentrado, usando a técnica de produção de gases *in vitro*. Os tratamentos consistiram na adição de 0,1875 mg dos aditivos: LAA, monensina ou caulin (usado como controle) em 300 mg do substrato base composto por feno Tifton 85 e concentrado na relação 80:20. Para a obtenção do inóculo foram adaptados três bovinos, anelorados, com feno de Tifton 85 e concentrado na relação 80:20. Foram realizadas três incubações, cada uma com 24 horas de duração. Os períodos de leitura, registro e amostragem dos gases produzidos foram às 9, 12 e 24 horas. Amostras dos gases foram usadas para leitura de metano. Às 24 horas de incubação, amostras da fase líquida foram coletadas para determinação da concentração de ácidos graxos de cadeia curta. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com parcelas subdivididas, sendo as parcelas os tratamentos, distribuídos ao acaso com três repetições e nas sub-parcelas o tempo de leitura do volume de gases totais e de metano. O volume de gases produzido foi similar entre tratamentos. Não houve efeito do LAA e de monensina na produção de metano.

Palavras-chave: aditivos, bovinos, metano, produção de gases *in vitro*.

1 Introdução

Atualmente, o metano (CH_4), gás derivado de atividades naturais e antrópicas, é considerado gás de efeito estufa, junto com outros gases como o dióxido de carbono e óxido nitroso, apresentando acréscimo na concentração nos últimos 150 anos (IPCC, 2001). Portanto, há interesse mundial na redução da emissão destes gases nos próximos anos, para mitigar a mudança no clima e as conseqüências desta.

A pecuária, considerada como uma fonte antrópica na produção de CH_4 , apresenta variações na intensidade de emissão associada a fatores tais como tipo de animal, nível no consumo de alimento e grau de digestibilidade das dietas fornecidas (JOHNSON & JOHNSON, 1995). Além disso, nos sistemas de produção de carne e leite, a emissão de CH_4 representa perda de energia metabolizável refletida em menor produtividade. Seria importante aumentar a eficiência na utilização dos nutrientes no rúmen, principalmente a energia, para atingir maior produção por unidade de alimento consumido e simultaneamente contribuir com o decréscimo de CH_4 (GETACHEW et al., 2005).

O CH_4 é mais intensamente produzido quando fornecidas dietas fibrosas, sendo o produto da fermentação o ácido acético ou butírico (WOLIN, 1960 citado por BLÜMMEL et al., 2005). Durante a síntese de ácido acético e ácido butírico é produzido hidrogênio, usado pelas bactérias metanogênicas para formar CH_4 , para posterior liberação do rúmen (BAKER, 1999).

O uso de aditivos é uma alternativa para melhorar a digestibilidade dos alimentos fibrosos. Efeitos dos ionóforos como monensina no metabolismo ruminal têm sido associados ao decréscimo na população de bactérias gram positivas e a menor produção de CH_4 (BERGEN & BATES, 1984). De outra parte, aumento na população bacteriana e na digestibilidade têm sido demonstradas quando suplementadas as dietas com leveduras (CHAUCHEYRAS et al., 1995; ERASMUS et al., 2005). Adicionalmente, decréscimo na produção de CH_4 tem

sido observado quando usados ácidos graxos poliinsaturados, ao serem saturados com hidrogênio livre, limitando o substrato para as bactérias metanogênicas (CZERKAWISKI et al., 1966; BROUDISCOU et al., 1994).

Assim, os aditivos apresentam-se como uma alternativa viável para aumentar a eficiência do metabolismo ruminal e para reduzir a emissão de CH₄. No entanto, para determinar a eficiência do metabolismo ruminal e estimar a produção de CH₄, é importante o uso de técnicas laboratoriais confiáveis e reproduzíveis. No decorrer do tempo, diversas pesquisas visando buscar técnicas para avaliar a digestibilidade dos alimentos foram desenvolvidas.

A técnica de “produção de gases *in vitro*”, tem demonstrado ser uma opção viável e confiável na avaliação do valor nutritivo e digestibilidade dos alimentos usados nas dietas e para estimar a produção de CH₄ (RYMER et al., 2005)

A técnica foi reportada a primeira vez em 1953 por MCBEE & HUNGATE citados por RYMER et al. (2005), que mensuraram os gases produzidos ao incubar o alimento em banho-maria, e avaliaram o potencial de degradação no rúmen. A partir daí, diversas metodologias foram desenvolvidas durante vários anos e atualmente são aceitas e aplicadas na pesquisa (THEODOROU et al., 1994; MAURICIO et al., 1999; RYMER et al., 2005).

A metodologia de THEODOROU et al. (1994), tem sido avaliada como versátil, permitindo trabalhar simultaneamente com um número indeterminado de amostras. O princípio está baseado na mensuração dos gases produzidos pela fermentação dos componentes solúveis e não solúveis do substrato, incubado em frascos de vidro sob condições que simulam o rúmen (temperatura, pH, anaerobiose). A pressão interna dos frascos é registrada em tempos predeterminados, usando um transdutor de pressão semi-automático. O resultado é obtido da regressão do volume de gás produzido no tempo de incubação (THEODOROU et al., 1994). Os gases produzidos podem ser um indicador da digestibilidade aparente do alimento no rúmen (BLÜMMEL & ØRSKOV, 1994).

Na estimativa de CH₄ a técnica de produção de gases *in vitro* tem apresentando resultados confiáveis quando comparada com técnicas *in vivo* como a calorimetria respiratória (BLÜMMEL et al., 2005). Além disso, apresenta vantagens tais como o maior controle sobre as condições experimentais e o menor tempo experimental (FONDEVILLA & BARRIOS, 2001). Vários estudos para estimar a produção de CH₄, usando a técnica têm sido descritos, demonstrando aplicabilidade (MOHAMMED et al., 2004; BLÜMMEL et al., 2005; GETACHEW et al., 2005; UNGERFELD et al., 2005).

O presente estudo teve como objetivo estimar a produção de metano ao adicionar monensina ou um complexo contendo leveduras, ácidos graxos poliinsaturados e aminoácidos no substrato incubado, usando a técnica de produção de gases *in vitro*.

2 Material e métodos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Nutrição Animal (LANA) e no Laboratório do Departamento de Engenharia Rural da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Foi estimada a produção de gás metano avaliando o efeito do complexo de leveduras, ácidos graxos poliinsaturados e aminoácidos (LAA) (Tabela 1) ou de monensina no substrato composto por feno Tifton 85 e concentrado, usando a técnica de produção de gases *in vitro*, de acordo com a metodologia de THEODOROU et al. (1994) e modificada por MAURICIO et al. (1999).

Os tratamentos consistiram na adição de 0,1875mg de LAA ou monensina ou caulim (usado como controle) em 300mg do substrato base composto de feno de Tifton 85 e concentrado, em uma relação 80:20. Cada tratamento foi incubado em frascos de vidro (100mL) com três repetições, e uma réplica por repetição, além disso, foram usados três brancos e um substrato padrão, para um total de

22 frascos incubados. Foram realizadas três incubações, cada uma com 24 horas de duração. Amostras dos gases produzidos foram registradas e coletadas nos períodos 9, 12 e 24 horas.

Tabela 1. Composição do complexo de leveduras, ácidos graxos poliinsaturados e aminoácidos, conforme níveis de garantia fornecido pelo fabricante.

Ácido Oléico	12	mg*
Ácido Linoléico	12.000	mg
Metionina	2.400	mg
Lisina	11.400	mg
Tirosina	4.850	mg
Crômio	285	mg
Probiótico (Leveduras)	$0,3 \times 10^8$	UFC **

* mg kg⁻¹, ** UFC unidades formadoras de colônia

Amostras do feno de Tifton 85 (*Cynodon Spp.*) e do concentrado foram tomadas para posterior avaliação da composição química, no Laboratório de Nutrição Animal (LANA). As amostras pré-secas foram utilizadas na determinação do conteúdo de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB) de acordo com AOAC (1990), e fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), segundo VAN SOEST et al. (1991). A energia bruta (EB) foi determinada em bomba calorimétrica adiabática PARR Instruments.

Para a produção de gases *in vitro* foi usada a metodologia de THEODOROU et al. (1994) modificada por MAURICIO et al. (1999). No dia anterior de cada incubação foi preparado o meio de cultura (Apêndice A1) composto por: solução de macrominerais; solução de microminerais; solução tampão; solução de resarzurina; meio “B” e água destilada. O meio foi preparado sob fluxo contínuo de CO₂ e após do preparo foi mantido em estufa a 39°C.

Previamente, amostras do feno Tifton 85 (240mg) e de concentrado (60mg) foram pesadas e colocadas em cada frasco, posteriormente foram mantidas em

estufa a 39°C. O dia da incubação os frascos foram retirados da estufa e foram adicionados 30mL de meio de cultura, 15mL de inóculo e o aditivo correspondente ao tratamento. Foi mantido o um espaço livre de 55mL para o acúmulo dos gases produzidos. Após o pré-enchimento dos frascos, foram injetados com CO₂, vedados com rolhas de borracha e selados com anilhas de alumínio e incubados em estufa a 39°C durante 24 horas. Foram usados três brancos e um substrato padrão.

Para a obtenção do inóculo foram usados como doadores do líquido ruminal três novilhos anelados, castrados, canulados no rúmen, com peso corporal médio de 278 kg e idade média de 24 meses, adaptados durante 10 dias à dieta com volumoso (feno Tifton 85) e concentrado na relação 80:20, balanceada para atender as exigências de manutenção dos animais (NRC, 1996). O conteúdo ruminal foi coletado nas primeiras horas da manhã, antes de ser fornecido o alimento. Após a retirada uma porção de conteúdo do rúmen, foi filtrado em duas camadas de gaze para separar a fase sólida da fase líquida, sendo armazenadas em garrafas térmicas, previamente aquecidas, para serem transportadas ao laboratório no menor tempo possível.

No laboratório, 50% da fase sólida e 50 % da fase líquida foram misturadas em liquidificador durante 15 segundos, posteriormente o inóculo foi filtrado em gaze e colocado em bequer ao banho maria a 39°C e gasificado com CO₂ até ser colocado em cada frasco.

Durante cada período de incubação, leituras de pressão (psi = pressão por polegada quadrada) originadas dos gases acumulados no espaço livre do frasco foram registradas no transdutor de pressão PressDATA 800 ®. O transdutor foi conectado a uma válvula de três saídas. A primeira saída foi conectada ao transdutor de pressão, a segunda à agulha Nº 22 para ser introduzida na tampa de borracha do frasco e a terceira a uma seringa plástica para mensurar o volume. Os períodos de leitura foram 9, 12 e 24 horas. Em cada período, amostras de gás foram coletadas na seringa acoplada à válvula e posteriormente transvazadas a tubos de vacutainer de 5mL sem aditivo, para serem analisadas

no Laboratório de Biomassa e Biodigestão Anaeróbia do Departamento de Engenharia Rural da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Após amostragem, os gases acumulados foram liberados e a pressão interna foi zerada. As leituras de pressão registradas foram usadas para calcular o volume de gás produzido. Às 24 horas de incubação, amostras de 3mL foram coletadas de cada frasco e congeladas para posterior determinação da concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC).

A leitura de CH₄ foi realizada em cromatógrafo de fase gasosa Finigan GC-2001, equipado com as colunas Porapak Q e Peneira Molecular e detector de condutividade térmica.

Para determinar a concentração de AGCC, as amostras foram descongeladas e centrifugadas a 10.000g durante 15 minutos, alíquotas de 1mL foram tratadas com ácido fórmico 88%, para protonar os ácidos associados e garantir a volatilização dos AGCC no injetor do cromatógrafo. Amostras de 1µm foram analisadas em cromatógrafo a gás (CG 270) com detector de ionização de chama, empregando coluna capilar empacotada (4% CW 20M Carbopack B-DA, 2.0 m x 1/8 ").

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com parcelas subdivididas, tendo nas parcelas os tratamentos distribuídos ao acaso com três repetições e nas sub-parcelas o tempo de leitura do volume de gases totais e de metano. As análises de variância foram realizadas utilizando o procedimento GLM do programa SAS[®] (LITTELL et al., 2002), e em caso de diferenças significativas ($P < 0,05$) as médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

3 Resultados e discussão

Produção de gases

Os resultados de produção de gases e de CH₄ são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores médios do volume de gases totais e de metano (CH₄), produzidos por grama de matéria seca (MS) incubada com e sem aditivos.

Volume de gás (mL g ⁻¹ MS)	Tratamentos ¹			CV(%)
	LAA	Monensina	Controle	
Total	62,33	61,67	63,05	17,48
CH ₄	21,04	22,29	23,78	31,87

¹ LAA =complexo leveduras, ácidos graxos poliinsaturados e aminoácidos
CV= Coeficiente de variação.

A produção total de gases e de metano não foi estatisticamente significativo. Observou-se curva de produção de gases similar entre tratamentos durante o período de incubação (Figura 1), indicando que o padrão de fermentação não diferiu.

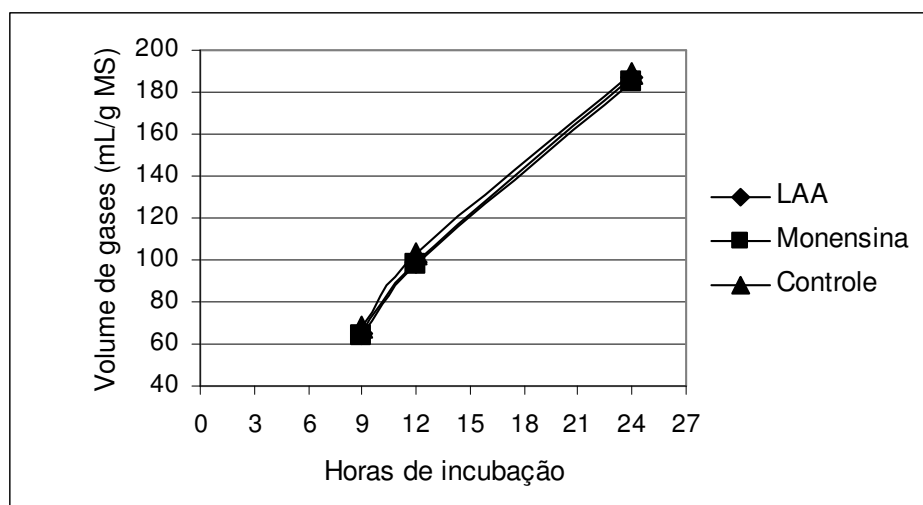


Figura 1- Produção de gás obtida pela incubação do substrato e aditivos durante 24 horas.

Observou-se que nos horários 9 e 12 de incubação houve acréscimo na produção de gases, devido ao acúmulo do gás indireto produto da reação entre o tampão e o ácido propiônico gerado da fermentação dos carboidratos rapidamente degradáveis e o gás indireto que começa ser produzido ao serem degradados os carboidratos estruturais. CHAI et al. (2004) sugeriram que, os gases produzidos nas três primeiras horas de incubação correspondem à fermentação dos componentes solúveis. Na medida que o tempo de incubação aumenta, o volume de gases produzido é maior, efeito da fermentação de carboidratos estruturais do substrato (THEODOROU et al., 1994). O padrão de fermentação entre tratamentos foi similar, sendo que, a curva de produção de gases corresponde ao padrão de fermentação para um substrato com predomínio de volumoso como descrito por GETACHEW et al. (2004), onde inicialmente são fermentados os açúcares e posteriormente os componentes estruturais. Assim, a taxa de produção e o volume total de gases, são correlacionados à composição química do substrato.

O volume de CH₄ foi similar entre tratamentos durante o período de incubação (Figura 2).

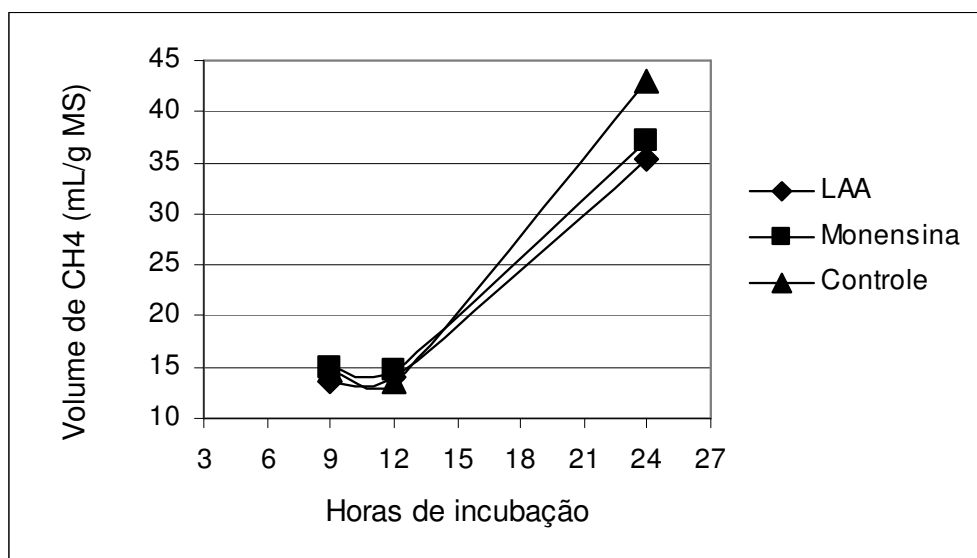


Figura 2- Produção de CH₄ obtida da incubação do substrato e aditivos durante 24 horas.

Não houve efeito dos aditivos na produção de CH₄. Observou-se menor volume de CH₄ no período de 9 a 12 horas após incubação do substrato, período no qual há menor produção de H₂, devido à maior produção de propionato, portanto o acúmulo de gases corresponde em parte ao gás indireto ou gás que é gerado ao reagir o bicarbonato de sódio com o propionato e assim manter o pH do meio onde está sendo fermentado o substrato. A maior produção de propionato concorre diretamente com a produção de CH₄, ou seja, quanto maior a produção de ácido propiônico, menor a produção de CH₄ (JOHNSON & JOHNSON, 1995). O acréscimo linear no volume de CH₄, a partir das 12 horas até o período final de incubação, associa-se à fermentação dos carboidratos estruturais e conseqüentemente à produção de ácido acético e butírico.

Estudos *in vitro*, têm demonstrado produção de CH₄ de 33 mL g⁻¹ MS, com acréscimo ao aumentar o teor de FDN (GETACHEW et al., 2005). Neste estudo os valores observados foram menores e sem diferir entre tratamentos. Sabe-se

que quando maior o teor de fibra de um ingrediente maior será a porcentagem de CH₄ liberado.

Relacionando o gás produzido com o CH₄ observa-se acréscimo de volume a partir do horário 12 de incubação, e que de acordo com FONDEVILA & BARRIOS (2001), corresponde à somatória do gás direto e indireto, sendo maior o indireto. O gás direto, produto da decarboxilação oxidativa do piruvato e o indireto produto da reação entre o tampão e os AGCC para manter o pH do meio. E como descrito anteriormente, a maior produção de gases está correlacionado à formação de ácido acético e butírico.

Concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

A concentração média dos ácidos graxos de cadeia curta são apresentados na Tabela 3. A concentração de AGCC não foi estatisticamente significativa. No entanto, têm sido estabelecido que às 24 horas de incubação, o substrato produz a maior quantidade de AGCC, associado à fermentação dos carboidratos do substrato (GETACHEW et al., 2004).

Tabela 3 - Concentração de AGCC (mmol L⁻¹) às 24 h de incubação do substrato com e sem aditivos

Concentração de AGCC (mmol L ⁻¹)	Tratamentos ¹			CV (%)
	LAA	Monensina	Controle	
Total	77,26	78,54	78,73	6,98
Acético	56,34	56,16	57,12	7,00
Propiônico	13,12	14,29	13,36	10,28
Butírico	7,79	8,08	8,25	9,1

¹LAA =complexo leveduras, ácidos graxos poliinsaturados e aminoácidos
CV= Coeficiente de variação.

Neste trabalho, a concentração de ácido acético foi numericamente maior, mostrando a correlação para um substrato com 80% de volumoso, no entanto esperava-se maior produção de AGCC totais efeito dos aditivos.

Esperava-se que os aditivos agissem sobre a microbiota para favorecer a produção de ácido propiônico e, porém decrescesse a produção de CH₄. No entanto verificou-se que as condições foram favoráveis para fermentação do substrato ao evidenciar produção de gases e de AGCC. Sugere-se realizar mais estudos usando a técnica de produção de gases *in vitro* para estimar CH₄, avaliando outros substratos, proporções de inóculo e concentração dos aditivos.

4 Conclusões

A produção de metano não foi alterada adicionando o complexo de leveduras, ácidos graxos poliinsaturados e aminoácidos e de monensina no substrato incubado.

CAPITULO IV. IMPLICAÇÕES

O desenvolvimento de estratégias como o uso de aditivos alimentares nas dietas para melhorar a digestibilidade, principalmente daquelas baseadas em volumosos, são importantes para aumentar a eficiência no aproveitamento da energia e diminuir a emissão de metano. A preocupação mundial pelo aquecimento da terra, como consequência da emissão de gases de efeito estufa como o metano, têm motivado aos países comprometidos com a proteção do meio ambiente, a criar programas orientados a uma produção sustentável. Adicionalmente, considerando a participação do Brasil no mercados externo de produtos como a carne, induz a produzir para suprir as necessidades e as exigências de consumidores, principalmente da Comunidade Econômica Européia que optam por produtos orgânicos, ao serem saudáveis e produzidos sem detrimento do meio ambiente

Dessa forma, pesquisas na área de nutrição de ruminantes que conduzam a maior eficiência na produção de carne e de leite, à menor emissão de metano e à conservação do meio ambiente devem ser de relevância. Assim, o uso de técnicas como a produção de gases *in vitro* é uma alternativa na pesquisa, que pode ser correlacionada e/ou associada a experimentos *in vivo*, para avaliar os alimentos usados nas dietas e assim determinar a eficiência na produção e o impacto ambiental.

REFERÊNCIAS

ALLEN, M.S.; MERTENS, D.R. Evaluating constraints on fiber digestion by rumen microbes. Symposium: rumen productivity. **Journal Nutrition**, v.118, n. 2, p. 261-270, 1988.

ANUALPEC 2005: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2005. 392p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 12 ed. Washington, 1990, 1098p.

ATAÍDE, J.R.; PEREIRA, O.G.; VALADARES FILHO, S.C.; GARCIA, R.; CECON. P.R.; ALVES, M.R.; MOREIRA, A.L. Consumo, digestibilidade e desempenho de

novilhos alimentados com rações á base de capim-tifton 85 em diferentes idades de rebrota. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.1, p.215-221, 2001.

BAKER, S.K. Rumen methanogens and inhibition of methanogenesis. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.50, n.8, p. 1293-1298, 1999.

BERGEN, W.G.; BATES, D.B. Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action. **Journal of Animal Science**, v.58, n.6, p. 1465-1483, 1984.

BLAXTER, K.L.; CLAPPERTON, J.L. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. **British Journal of Nutrition**, v. 19, n.2, p. 511-522, 1965.

BLÜMMEL, M.; ØRSKOV, E.R. Comparison of in vitro and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake cattle. **Animal Feed Science and Technology**, v.40, n.2, p.109-119, 1994.

BLÜMMEL, M.; GIVENNS, D.I.; MOSS, A.R. Comparison of methane produced by straw fed sheep in open-circuit respiration with methane predicted by fermentation characteristics measured by an in vitro gas procedure. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123-124, n.1, p. 379-390, 2005.

BROUDISCOU, L.; POCHET, S.; PONCET, C. Effect of linseed oil supplementation on feed degradation and microbial synthesis in the rumen of ciliate-free and refaunated sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v.49, n.2, p.189-202, 1994.

BUENO, I. C. S.; CABRAL FILHO, S.L.S.; GOBBO, S.P.; LOUVANDINI, H.; VITTI, D.M.S.S.; ABDALA, A.L. Influence of inoculum source in a gas production method. **Animal Feed Science and Technology**, v.123-124, n.1, p.95-105, 2005.

CALABRÒ, S.; WILLIAMS, B.A.; PICCOLO, V.; INFASCELLI, F.; TAMMINGA, S. A comparison between buffalo (*Bubalus bubalis*) and cow (*Bos taurus*) rumen fluids in terms of the in vitro fermentation characteristics of three fibrous feedstuffs. **Journal of Science Food and Agricultural**, v. 84, n.3, p.645-652, 2004.

CEZAR, I.M.; EUCLIDES FILHO, K. Novilho precoce: reflexos na eficiência e economicidade do sistema de produção. Campo Grande: **EMBRAPA-CNPQC** p.31, (Documentos, 66). 1996.

CHAI, W.Z.; GELDER, A.H.; CONE, J.W. Relationship between gas production and starch degradation in feed samples. **Animal Feed Science and Technology**, v.114, n. 2, p. 195-204, 2004.

CHANEY, A.L.; MARBACH, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, v.8, n.1, p. 130-137, 1962.

CHAUCHEYRAS, F.; FONTY, G.; BERTIN, G.; GOUET, P. In vitro H₂ utilization by a ruminal acetogenic bacterium cultivated alone or in association with an Archaea Methanogen is stimulated by a probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.9, p. 3466-3467, 1995.

CHAUCHEYRAS, F.; FONTY, G. Establishment of cellulolytic bacteria and development of fermentative activities in the rumen of gnotobiotically-reared lambs receiving the microbial additive *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077. **Reproduction Nutrition Development**, v.41, n.1, p.57-68, 2001.

CHEN, M.J.; WOLIN, M. Effect of monensin and lasalocid-sodium on the growth of methanogenic and rumen saccharolytic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.38, n.1, p. 72-77, 1979.

CHOW, J.M.; VAN KESSELL, J.S; RUSSELL, J.B. Binding of radiolabeled monensin and lasalocid to ruminal microorganisms and feed. **Journal of Animal Science**, v. 72, n.6, p. 1630-1635, 1994.

CONE, J.W.; GELDER, V.; BACHMANN, H. Influence of inoculum source on gas production profiles. **Animal Feed Science and Technology**, v.99, n.5, p.645-652, 2002.

CZERKAWSKI, J.W.; BLAXTER, K.L.; WAINMAN, F.W. The metabolism of oleic, linoleic and linolenic acids by sheep with reference to their effects on methane production. **British Journal of Nutrition**, v.20, n.3, p.349-362, 1966.

DEHORITY, B.A. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen ciliate protozoa. **Applied and Environmental Microbiology**, v.48, n.1, p. 182-185, 1984.

DOMESCIK, E.J.; MARTIN, S. Effects of laidlomycin propionate and monensin on the in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. **Journal of Animal Science**, v.77, n.8, p. 2305-2312, 1999.

DOMINGUEZ, M.G.; ESCOBAR, A. Rumen manipulation for the improved utilization of tropical forages. **Animal Feed Science and Technology**, v.69, n.2, p.97-102,1997.

ERASMUS, L.J.; BOTHA P.M.; KISTNER, A. Effect of yeast culture supplement on production, rumen fermentation and duodenal nitrogen flow in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.75, n.8, p.3056-3065, 1992.

ERASMUS, L.J.; ROBINSON, P.H.; AHMADI, A.; HINDERS, R.; GARRETT, J.E. Influence of prepartum and postpartum supplementation of a yeast culture and monensin, or both, on ruminal fermentation and performance of multiparous dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v.122, n.1, p.219-239. 2005.

FAICHNEY, G.J.; GORDON, G.L.R.; WELCH, R.J.; RINTOULT, A.J. Effect of dietary free lipid on anaerobic fungi and digestion in the rumen of sheep. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.53, n.8, p.519-527, 2002.

FEITOSA, J.V. **Avaliação de modelos matemáticos de degradação de fenos de capim-Tifton 85 e de concentrado em bovinos**. 2003. 129p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

FIEVEZ, V.; DOHME, F.; DANELS, M.; RAES, K.; DEMEYER, D. Fish oils as potent rumen methane inhibitors and associated effects on rumen fermentation *in vitro* and *in vivo*. **Animal Feed Science and Technology**, v.104, n.1, p.41-58, 2003.

FONDEVILA, M.; BARRIOS, A. The gas production technique and its application to the study of the nutritive value of forages. **Cuban Journal of Agricultural Science**, v.35, n.3, p. 187-196, 2001.

GETACHEW, G.; BLÜMMEL, M.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v.72, n.3, p.261-281, 1998.

GETACHEW, G.; ROBINSON, P.H.; DePETERS, E.J.; TAYLOR, S.J. Relationships between chemical composition, dry matter degradation and *in vitro*

gas production of several ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 111, n. 1, p.57-71, 2004.

GETACHEW, G.; DePETERS, E.J.; ROBINSON, P.H.; FADEL, J.G. Use of an in vitro rumen gas production technique to evaluate microbial fermentation of ruminant feeds and its impact on fermentation products. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123-124, n.1, p. 547-559, 2005.

HARRISON, G.A.; HEMKEN, R.W.; DAWSON, K.A. Influence of adition of yeast culture suplemente to diets of lactating cows on ruminal fermentation and microbial populations. **Journal of Dairy Science**, v.71, n.10, p. 2967-2975, 1988.

HATFIELD, G.M.; MANDEBVU, P.; WEST, J. **A comparison of Tifton 85 and coastal bermudagrass cell walls.** 1997. Disponível em: <[http://www.dfrc.ars.usda.gov./Research Sumaries/1997](http://www.dfrc.ars.usda.gov./Research_Sumaries/1997)>. Acesso em: 20 mai. 2006.

HEGARTY, R.S. Mechanisms for competively reducing ruminal methanogenesis. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.50, n.8, p.1299-1305, 1999.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE, 2001. Disponível em: <<http://www.grida.no/climate/ipcc tar/wg1/index.htm>>. Acesso em: 10 out. 2004.

JOHNSON K.A.; JOHNSON D.E. Methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, v.73, n. 8, p. 2483-2492,1995.

KOZLOSKI, G. B. **Bioquímica dos ruminantes.** Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2002. 139p.

LITTELL, R.C.; STROUP, W.W.; FREUND, R.J. **SAS for linear models**. 4th ed. Cary SAS Institute, 2002, 466 p.

LOWMAN, R.S.; THEODOROU, M.K.; CUDDEFORD, D. The effect of sample processing on gas production profiles obtained using the pressure transducer technique. **Animal Feed Science and Technology**, v.97, n.3, p.221-237, 2002.

MACHMÜLLER, A.; OSSOWSKI, D.A.; WANNER, M.; KREUZER, M. Potential of various fatty feeds to reduce methane release from rumen fermentation in vitro (Rusitec). **Animal Feed Science and Technology**, v.71, n.3, p.117-130. 1998.

MARTIN, S.A.; STREETER, M.N. Effect of malate on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. **Journal of Animal Science**, v.73, n.5, p.2141-2145, 1995.

MAURICIO, R.M.; MOULD, F.L.; DHANOA, M.S.; OWEN, E.; CHANNA, K.S.; THEODOROU, M.K. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, v.79, n.4, p.321-330, 1999.

McALLISTER, A.T.; OKINE, E.K.; MATHISON G.W.; CHENG, K.J. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. **Canadian Journal of Animal Science**, v.76, n.2, p.231-243, 1996.

McCRAB, G.J.; HUNTER, R.A. Prediction of methane emissions from beef cattle in tropical production systems. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.50, n.8, p.1335-1339, 1999.

McSWEENEY, C.S.; DAALRYMPLE, B.P.; GOBIUS, K.S.; KENNEDY, P.M.; KRAUSE, D.O.; MACKIE, R.I.; XUE, G.P. The application of rumen biotechnology

to improve the nutritive value of fibrous feedstuffs: pre- and post-ingestion. **Livestock Production Science**, v.59, n. 3, p.265-283, 1999.

MENKE, K.H.; RAAB, L.; SALEWSKI, A.; STEINGASS, H.; FRITZ, D.; SCHNEIDER, W. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. **Journal of Agricultural Science**, v.93, n.1, p. 217-222, 1979.

MENKE, K.H.; STEINGASS, H. Estimation of the energetic feed value obtained from value obtained from chemical analysis and in vitro production using rumen fluid. **Animal Research Development**, v. 28, n.1, p. 7-55, 1988.

MIRANDA, R.L.A.; MENDOZA, M.G.D.; BÁRCENA-GAMA, J.R.; GONZÁLEZ, M.S.S.; FERRARA, R.; ORTEGA, C.M.E.; COBOS, P.M.A. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* or *Aspergillus oryzae* cultures and NDF level on parameters of ruminal fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 63, n. 2, p. 289-296, 1996.

MOHAMMED, N.; LILA, Z.A; AJISAKA, N.; HARA, K.; MIKUNI, K.; KANDA, S.; ITABASHI, H. Inhibition of ruminal microbial methane production by β -cyclodextrin iodopropane, malate and their combination in vitro. **Journal of Animal Physiology and Nutrition**, v.88, n.1, p.188-195, 2004.

NAGADY, S.; HERRERO, M.; JESSOP, N.S. The influence of diet of the donor animal on the initial bacterial concentration of ruminal fluid and in vitro gas production degradability parameters. **Animal Feed Science and Technology**. v. 87, n.2, p. 231-239, 2000.

NAGARAJA, T.G.; NEWBOLD, C.J.; VAN NEVEL, C.J. Manipulation of ruminal fermentation. In HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. (Ed). **The rumen microbial ecosystem**. London Blackie Academic & professional. 1997, p. 523-632.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of beef cattle**. 7 ed. Washington: National Academy Press, 1996. 242p.

NEWBOLD, C.J.; WALLACE, R.J.; CHEN X.B.; McINTOSH, F.M. Different strains of *Saccaromyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers in vitro and in sheep. **Journal of Animal Science**, v. 73, n.3, p.1811-1818, 1995.

NEWBOLD, C.J.; McINTOSH, F.M.; WALLACE, R.J. Mode of action of the yeast *Saccaromyces cerevisiae*, as a feed additive for ruminants. **British Journal of Nutrition**, v.76, n. 8, p.249-261, 1996.

OLIVEIRA, D.J.C.; SOARES FILHO, C.V.S. Suplementação com crômio para ruminantes. **Ciência Veterinária e Zootecia**, v.8, n.1, p. 71-77, 2005.

PEDREIRA, M.S. **Estimativa da produção de metano de origem animal por bovinos tendo como base a utilização de alimentos volumosos: utilização da metodologia do gás traçador hexafluoreto de enxofre (SF₆)**. 2004. 136p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

PRIMAVESI, O.; FRIGHETTO, R.T.; PEDREIRA, M.S.; LIMA, M.A.; BERCHIELLI, T.T.; BARBOSA, P.F. Metano entérico de bovinos leiteiros em condições tropicais brasileiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.3, p.277-283, 2004.

PROTOCOLO de Kioto, 2005 Disponível em:
<<http://unfccc.int/resource/docs/convkp/kpspan.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2005

RUSSELL, J.B.; STROBEL, L.H. Effects of additives on in vitro ruminal fermentation: a comparison of monensin and bacitracin, another gram-positive antibiotic. **Journal of Animal Science**, v. 66, n.3, p.552-558, 1989.

RYMER, C.; HUNTINGTON, J. A.; WILLIAMS, B.A.; GIVENS, D.I. In vitro cumulative gas production techniques: history, methodological considerations and challenges. **Animal Feed Science and Technology**, v.123-124, n.1, p. 9-30, 2005.

SATTER, L.; SLYTER, L.L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. **British Journal Nutrition**, v.32, n.2, p.199-208, 1974.

SCHELLING, G.T. Monensin mode of action in the rumen. **Journal of Animal Science**, v.58, n.6, p. 1518- 1527, 1984.

SILVA, E.A. **Influência da proteína degradável no rúmen na degradabilidade e digestibilidade da fibra e síntese de proteína microbiana de bovinos alimentados com feno de capim-Tifton 85**. 2004. 108p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

SINGH G.P.; SAINI, N. Role of anaerobic fungi in fibre digestion and its special significance to camel nutrition. **Indian Dairyman**, v.54, n.9, p. 64 - 68, 2002.

TEDESCHI, L.O.; FOX D.G.; TYLUTKI, T.P. Potential environmental benefits of ionophores in ruminant diets. **Journal Environmental Quality**, v.32, n.7, p.1591-1602. 2003.

THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S.; MCALLAN, A.B.; FRANCE, J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.48, n.1, p.185-197, 1994.

TREI, J.; HALE, W.; THEURER, B. Effect of grain processing on in vivo gas production. **Journal of Animal Science**, v.30, n.5, p. 825-831, 1970.

UNGERFELD, E.M.; RUST, S.R.; BURNETT, R.J.; YOKOYAMA, M.T.; WANG, J.K. Effects of two lipids on in vitro ruminal methane production. **Animal Feed Science and Technology**, v.119, n.3, p.179-185, 2005.

U.S. EPA. **ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY** 2003. Disponível em: <<http://unfccc.int/resource/docs/convkp/kpspan.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2004.

VAN SOEST, J.P.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.10, p. 3583-3597, 1991.

VARGA, A. G.; KOLVER, E. S. Microbial and animal limitations to fiber digestion and utilization. **Journal Nutrition**, v.127, n.esp., p.819-823, 1997.

WALLACE, R.J. Ruminal microbiology, biotechnology, and ruminant nutrition: progress and problems. **Journal of Animal Science**, v.72, n.5, p.2992-3003, 1994.

WEST , J.W.; MANDEBVU, P.; HILL, G.M.; GATES, R.N. Intake milk yield and digestion by dairy cows fed diets with increasing fiber content for bermudagrass hay or silage. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.6, p.1599-1607, 1998.

ZHEN-HU, H.; GANG, W.; HAN-QING Y. Anaerobic degradation of cellulose by rumen microorganisms at various pH values. **Biochemical Engineering Journal**, v.21, n.1, p. 59-62, 2004

APÊNDICE

Apêndice 1- Composição do meio de cultura para produção de gases *in vitro*

Ingredientes	Quantidades (g L⁻¹)
Solução de macrominerais	
CaCl ₂ 2H ₂ O	132,00
MnCl ₂ 4H ₂ O	100,00
CoCl ₂ 6H ₂ O	10,00
FeCoCl ₂ 6H ₂ O	80,00
Solução de microminerais	
Na ₂ HPO ₄	3,75
KH ₂ HPO ₄	3,32
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,60

Solução tampão

NH ₄ HCO ₃	4,00
Na HCO ₃	35,00

Resazurina0,10

Meio B

Cysteine HCl	625,00
NaOH 1M	4,00
Na ₂ SO ₃	328,13
água destilada	95,00
