

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**PRODUÇÃO “*IN VITRO*” DE METANO, DIÓXIDO DE
CARBONO E OXIGÊNIO UTILIZANDO LÍQUIDO RUMINAL
DE BOVINOS ALIMENTADOS COM DIFERENTES
RAÇÕES**

Kleber Augusto Gastaldi
Zootecnista

Jaboticabal - São Paulo - Brasil
Fevereiro / 2003

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**PRODUÇÃO “*IN VITRO*” DE METANO, DIÓXIDO DE
CARBONO E OXIGÊNIO UTILIZANDO LÍQUIDO RUMINAL DE
BOVINOS ALIMENTADOS COM DIFERENTES RAÇÕES**

Kleber Augusto Gastaldi

Orientador: Profa. Dra. Jane Maria Bertocco Ezequiel

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal - Unesp, para obtenção do título de Doutor em Zootecnia - Área de concentração em Produção Animal

Jaboticabal - São Paulo - Brasil
Fevereiro / 2003

Gastaldi, Kleber Augusto
G255p Produção "in vitro" de metano, dióxido de carbono e oxigênio
utilizando líquido ruminal de bovinos alimentados com diferentes
rações / Kleber Augusto Gastaldi. -- Jaboticabal, 2003
x, 95 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2003
Orientadora: Jane Maria Bertocco Ezequiel
Banca examinadora: Luis Roberto de Andrade Rodrigues, Raul
Franzolin Neto, Leandro das Dores Ferreira da Silva, Geraldo Maria
da Cruz
Bibliografia

1. Nutrição. 2. Ruminantes. 3. Meio ambiente. I. Título. II.
Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.085:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

KLEBER AUGUSTO GASTALDI - nascido em 20 de julho de 1973, na cidade de Ribeirão Preto-SP, é Zootecnista, formado pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal-SP (FCAV), em janeiro de 1997, sendo bolsista na categoria Iniciação Científica (FAPESP e, posteriormente, CNPq) desde 1994. Recebeu o prêmio de “melhor Trabalho de Graduação” entre os formandos da XXXIV Turma de Zootecnista da FCAV. De março de 1997 a fevereiro de 1999 e de março de 1999 a fevereiro de 2003 fez os Cursos de Pós-Graduação, mestrado e doutorado, respectivamente, em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal na FCAV. No mestrado foi bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP), categorias MS-I e MS-II. Durante suas atividades acadêmicas, ministrou aulas nas disciplinas Nutrição Animal e Ovinocultura como estágios de Docência da CAPES, co-orientou em Trabalho de Graduação, participou como Membro Titular na Banca Examinadora de quatro Trabalhos de Graduação, fez dois estágios no Departamento de Zootecnia da FCAV, ministrou palestras, coordenou curso de extensão, participou de diversos cursos de extensão, publicou dois artigos em Revista Científica com corpo editorial, onze em anais de eventos internacionais e trinta e dois em anais de eventos nacionais e apresentou treze trabalhos em eventos científicos.

*O bom educador não é aquele que
Te passa a conhecimento pronto,
E sim aquele que te ensina a
Buscar o conhecimento por
Meios próprios*

*Meu pai Valdomiro Gastaldi,
Minha mãe Maria Helena de Almeida Gastaldi,
Minha esposa Enêida Cristina Castro Gastaldi,
Minha filha Fernanda Castro Gastaldi,
Meu filho João Vítor Castro Gastaldi,
Meus irmãos Fabrício Gastaldi e Rodrigo Gastaldi.*

A vocês,

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste, em especial:

- a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos de Doutorado;
- a minha esposa e filhos pela compreensão dos motivos que levaram-me a estar ausente do nosso lar em diversas ocasiões durante a condução deste trabalho;
- aos meus Pais, pelo total apoio e confiança;
- a Profa. Dra. Jane Maria Bertocco Ezequiel pela orientação e exemplo de perseverança;
- ao Prof. Dr. Jorge de Lucas Júnior pela valiosa colaboração no desenvolvimento da metodologia e uso do Laboratório do Departamento de Engenharia Rural da FCAV;
- ao Sr. Dejair Buzoli, funcionário da Unidade Animal de Estudos Digestivos e Metabólicos do Departamento de Zootecnia da FCAV pelas inúmeras ajudas na fase de campo do experimento e, principalmente, demonstração de amizade;
- ao colega José Valmir Feitosa, pelo exemplo de companheirismo e dedicação;
- aos membros da banca examinadora do trabalho, pelas oportunas sugestões e críticas construtivas que em muito enriqueceram este trabalho.
- a Fazenda de Ensino e Pesquisa da FCAV pelo fornecimento do milho e do feno;
- a Caramuru Produtos Alimentícios pela doação da casca do grão de soja e do farelo de girassol;
- a Universidade Estadual Paulista pela oportunidade concedida e pelo sonho realizado.

SUMÁRIO

	Página
1. CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	01
1.1. Referências Bibliográficas.....	11
CAPÍTULO 2 - METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA E QUALITATIVA DA PRODUÇÃO DE GÁS “IN VITRO”	16
2.1. Resumo.....	17
2.2. Introdução.....	18
2.3. Material e Métodos.....	22
2.4. Discussão.....	29
2.5. Referências Bibliográficas.....	32
3. CAPÍTULO 3 - PRODUÇÃO DE GÁS “IN VITRO” E PROPORÇÕES DE METANO, DIÓXIDO DE CARBONO E OXIGÊNIO NO LÍQUIDO RUMINAL DE BOVINOS ALIMENTADOS COM DIFERENTES RAÇÕES.....	37
3.1. Resumo.....	38
3.2. Introdução.....	39
3.3. Material e Métodos.....	40
3.4. Resultados e Discussão.....	44
3.4.1. Produção Total de Gás.....	44
3.4.1.1. Efeito do Concentrado.....	45
3.4.1.2. Efeito da Qualidade do Volumoso.....	45
3.4.2. Proporções de Metano, Dióxido de Carbono e Oxigênio no Gás Produzido.....	50
3.4.3. Produções de Metano, Dióxido de Carbono e Oxigênio no Líquido Ruminal e Correlações com a Produção Total de Gás.....	56
3.4.4. Potenciais Hidrogeniônicos.....	58
3.5. Conclusões.....	61
3.6. Referências Bibliográficas.....	61

4. CAPÍTULO 4 - PARTICIPAÇÃO DE CADA INGREDIENTE CONCENTRADO DA RAÇÃO NA PRODUÇÃO “IN VITRO” DE METANO, DIÓXIDO DE CARBONO, OXIGÊNIO E NITROGÊNIO NO LÍQUIDO RUMINAL DE BOVINOS ALIMENTADOS COM DIFERENTES RAÇÕES.....	64
4.1. Resumo.....	65
4.2. Introdução.....	66
4.3. Material e Métodos.....	69
4.4. Resultados e Discussão.....	72
4.4.1. Produção Total de Gás.....	72
4.4.2. Proporções de Metano, Dióxido de Carbono e Oxigênio no Gás Produzido.....	75
4.4.3. Produções Médias de Metano, Dióxido de Carbono e Oxigênio.....	79
4.4.4. Potenciais Hidrogeniônicos e Correlações com as Produções de Gases.....	82
4.5. Conclusões.....	88
4.6. Referências Bibliográficas.....	88
5. CAPÍTULO 5 - IMPLICAÇÕES.....	91
5.1. Referências Bibliográficas.....	94

PRODUÇÃO “*IN VITRO*” DE METANO, DIÓXIDO DE CARBONO E OXIGÊNIO UTILIZANDO LÍQUIDO RUMINAL DE BOVINOS ALIMENTADOS COM DIFERENTES RAÇÕES

RESUMO - Este trabalho objetivou desenvolver uma metodologia “in vitro” simples e de baixo custo para avaliação da produção total de gás e proporções de metano, dióxido de carbono, oxigênio e nitrogênio presentes no mesmo, oriundos do processo fermentativo do líquido ruminal de bovinos. Foram avaliados os efeitos de três relações volumoso:concentrado (70, 50 ou 30% de volumoso, na matéria seca) e de duas qualidades de feno de capim-coastcross (*Cynodon dactylon* L. Pers., cultivar coastcross) sobre a produção de metano, dióxido de carbono e oxigênio. Foram avaliados também os efeitos da adição do volumoso, do concentrado, da mistura volumoso+concentrado e de cada componente do concentrado (milho, casca do grão de soja ou farelo de girassol) sobre a produção destes gases dentro de cada tratamento experimental. O tempo de fermentação foi de doze horas e as medidas das produções de gases (em mL) foram efetuadas em gasômetros especialmente projetados. As análises dos gases foram efetuadas em cromatógrafo gasoso. As rações com maiores porcentagens de concentrado e o volumoso de melhor qualidade nutricional resultaram em maiores produções de gás “in vitro”. As rações com maiores porcentagens de volumoso e o volumoso de pior qualidade nutricional resultaram em produções de gás “in vitro” com maiores proporções de metano e de oxigênio e menores de dióxido de carbono. O aumento da porcentagem de concentrados na ração resultou em maiores produções de metano e de dióxido de carbono e menor de oxigênio. O ingrediente milho foi o que resultou em maiores produções médias de metano e de dióxido de carbono, seguido, em ordem decrescente, pelo farelo de girassol e pela casca do grão de soja.

Palavras-chave: fermentação, meio ambiente, nutrição, ração, rúmen, ruminantes

METHANE, CARBON DIOXIDE AND OXYGEN “IN VTRO” PRODUCTION USING RUMINAL LIQUID OF BOVINES FED WITH DIFFERENT RATIONS

ABSTRACT - This work was conducted to develop a simple ‘in vitro’ methodology of low cost to evaluate the total production of gas and methane, carbon dioxide, oxygen, and nitrogen proportions, originated from fermentative process of rumen- liquid. The effects of three roughage:concentrated relations (70, 50 or 30% of roughage, in dry matter basis) and of coastcross grass (*Cynodon dactylon* L. Pers.) hay of two qualities, on the production of methane, carbon dioxide, and oxygen. The effects of the rumen-liquid mixed with the roughage, the concentrate, the roughage+concentrate mixture, and each component (grain corn, soybean seed coats and sunflower meal) of the concentrate on the production of these gases using the rumen fluid of each experimental treatment were also evaluated. The substrates were fermented by twelve hours and the gas production (in mL) was measured in gasometers especially projected for this purpose. The gas analyses were accomplished by gas chromatography. The diets with higher percentages of concentrate and the roughage with higher nutritional quality showed higher “in vitro” production of gas. The diets with higher quality roughage and lower nutritional quality showed in “in vitro” production of gas with higher proportion of methane and oxygen and with lower proportion of carbon dioxide. The increase of the concentrate percent in the diet resulted in higher productions of methane and carbon dioxide and lower production of oxygen. Grains of corn resulted in higher average productions of methane and carbon dioxide followed, in decreasing order, by sunflower meal and soybean seed coats.

Keywords: environment, fermentation, nutrition, ration, rumen, ruminants

1. CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os ruminantes têm sido acusados atualmente como um dos maiores responsáveis pela destruição da camada de ozônio e pelo aquecimento global da Terra, devido a liberação de quantidades consideráveis de metano e de dióxido de carbono na atmosfera. Além de que, a produção destes gases tem efeito negativo também para o animal, pois, no caso do metano, por exemplo, resulta em perdas que variam de 2 a 15% da energia bruta ingerida (JOHNSON et al., 1994).

Considerando os aumentos nas produções de leite e carne necessários para atender as demandas crescentes das populações de vários países e que estes não devem ser obtidos através do aumento do número de animais e/ou de área, considerando os riscos ambientais que podem acarretar, tais demandas somente poderão ser atingidas através do incremento da produtividade animal.

Caso estratégias de alimentação baseadas em princípios tecnológicos sejam aplicadas, a eficiência de utilização do alimento por unidade de produção de leite, carne e/ou mesmo trabalho poderá ser aumentada e, ainda, contribuir potencialmente para a estabilização da concentração de metano na atmosfera, que é um parâmetro que cresce de importância por ser objeto de negociação entre países para a redução da emissão de, além deste, outros gases produtores do “efeito estufa”. De acordo com levantamento realizado pela Embrapa Meio Ambiente (LIMA et al., 1999) no Brasil, para o ano de 1994, 91% do metano gerado a partir de fontes agrícolas (total de 9,7 Tg) seriam provenientes da fermentação no trato digestivo de ruminantes e mais 4% seriam oriundos do tratamento de resíduos animais. Segundo DRENNEN & CHAPMAN (1992) e McALLISTER et al. (1996), o metano contribui com apenas cerca de 19% do aquecimento global causado por atividades humanas, porém, este gás é 4 a 6 vezes mais potente em gerar calor (efeito termogênico) do que o dióxido de carbono (CO₂) (McALLISTER et al., 1996). Segundo MOSS (2000), ainda que o

gás mais correlacionado com o efeito estufa seja o dióxido de carbono, uma molécula de metano contribui 25 vezes mais para este efeito do que uma de dióxido de carbono.

Devido a esse maior efeito termogênico, a concentração de metano, que vem crescendo nos últimos 30 anos cerca de 1% ao ano, poderia ser estabilizada por uma redução de suas emissões de apenas 10 a 20%, comparada com uma redução similar de 80 a 85% de CO₂ e outros gases causadores do efeito estufa (LENG, 1993). Ainda que todos os ruminantes no planeta produzam apenas 10 a 15% do total das emissões globais de metano (VAN SOEST, 1994), os ruminantes domésticos representam uma das poucas fontes de metano que podem de alguma forma ser manipuladas. Outras fontes significativas de metano são tabuleiros de arroz inundado, pântanos e fontes geotermiais, a maioria desta últimas no fundo dos oceanos.

Por muito anos, diversos experimentos foram conduzidos visando a redução da produção de metano em ruminantes. Inicialmente, estes eram apenas de interesse nutricional, objetivando o aumento da eficiência alimentar através da redução da parte energética dos alimentos perdida na forma de metano (BENCHAAAR et al., 2001). Há poucos anos, um novo interesse relacionado à redução na emissão de metano por ruminantes tem sido observado devido a este gás ter sido identificado como um potente causador do efeito estufa, contribuindo para a mudança climática e o aquecimento global (Tyler, 1991, citado por BENCHAAAR et al., 2001).

O metano é produzido em condições anaeróbias por bactérias metanogênicas presentes no ambiente ruminal (LASSEY et al., 1997), sendo influenciado pela idade e nível produtivo do animal. A sua produção é modulada principalmente pela presença de dióxido de carbono e de hidrogênio livres no ambiente ruminal, onde, a partir do hidrogênio livre, ocorre a redução do dióxido de carbono por microrganismos metanogênicos, com conseqüente formação de metano.

Segundo HEGARTY (1999), a redução da metanogênese pode ser conseguida das seguintes formas: a) inibindo reações que liberam hidrogênio no

ambiente ruminal; b) promovendo reações alternativas que recebem o hidrogênio durante a reoxidação de equivalentes redutores e; c) promovendo reações alternativas consumidoras de hidrogênio. Tentativas para identificar inibidores químicos específicos para a produção de metano não tem tido sucesso (LOPEZ et al., 1999).

Em ruminantes, o metano é produzido basicamente pela fermentação da ração no retículo-rúmen. O fator primário afetando a emissão de metano do trato gastrintestinal é a ração, pelo fato de fornecer o substrato, direta ou indiretamente, para as bactérias metanogênicas. É sabido que, certamente, atributos fisiológicos do animal interagem com a ração e bactérias metanogênicas em uma via complexa resultando em variações na emissão de metano. As bactérias metanogênicas, desta forma, também interagem de maneira complexa com outras bactérias e protozoários ruminais em uma competição pelo uso do hidrogênio para produzir metano e outros produtos finais na fermentação entérica. O tipo de fermentação resultante pode variar de alta emissão de metano, caracterizado por uma alta relação acetato:propionato, a uma baixa emissão de metano, caracterizado por uma baixa relação acetato:propionato (JOHNSON & JOHNSON, 1995).

Até no final da década de 80, a avaliação de alimentos era incorporada a modelos que assumiam que havia um equilíbrio entre proteína microbiana e o suprimento energético, levando à conclusão de que os nutrientes disponíveis acima do requerimento para manutenção seriam utilizados com igual eficiência (LENG, 1993). Porém, especialmente no caso de ruminantes alimentados principalmente à base de forragens, observações experimentais não comprovaram tais conclusões teóricas. Foi então constatado que em sistemas de produção a disponibilidade de nutrientes para a microbiota ruminal é o fator primordial que define o limite superior de produção (McALLISTER et al., 1996). Caso haja uma menor eficiência de crescimento microbiano, isto é, a uma menor eficiência de síntese de proteína microbiana, ocorrerá uma baixa relação proteína:energia nos nutrientes absorvidos e, conseqüentemente, uma maior produção de metano.

Portanto, a emissão de metano em relação à produtividade do ruminante depende de dois fatores: a) a eficiência fermentativa no rúmen e; b) a eficiência de conversão do alimento em produtos animais, que não é dependente apenas da eficiência fermentativa, mas também do balanço de nutrientes absorvidos após a fermentação. Bovinos submetidos a rações de baixa qualidade “perdem” cerca de 15 a 18% da energia digestível na forma de metano, ao passo que o fornecimento de rações balanceadas reduz a emissão de metano para 7% (LENG, 1990; LENG, 1993; McALLISTER et al., 1996). Resultados semelhantes podem ser obtidos com o uso de ionóforos (LANA & RUSSELL, 1997), porém, por se tratar de uma classe especial de antibióticos, seu uso continuado tem gerado reações contrárias por grupos de defesa de consumidores nos países industrializados, principalmente europeus.

A complexidade da estequiometria das diferentes reações bioquímicas que ocorrem durante a fermentação requer maiores estudos (BRUNI & CHILIBROSTE, 2000). É sabido que imediatamente após a incubação do substrato no rúmen, este é parcialmente solubilizado e os componentes solúveis são rapidamente fermentados. Os componentes insolúveis precisam primeiramente serem hidratados e colonizados pelos microrganismos ruminais para serem posteriormente fermentados. Diferentes substratos e seus componentes apresentam resistências variadas a estes processos, resultando em perfis de produção de gás distintos. Diante disto, Chamberlain (1994), citado por BRUNI & CHILIBROSTE (2000), considerou a técnica de produção de gás como um indicador da atividade microbiana, já que ambas estão associadas a fração energética dos alimentos disponível no rúmen, onde, conhecendo a produção total de gás e seu perfil, a atividade microbiana poderia ser estimada.

Para ocorrer uma digestão ruminal normal e produzir acetato, propionato e butirato como nutrientes para o crescimento animal, a pressão de hidrogênio no rúmen precisa ser baixa (ULYATT & LASSEY, 2000; JOBLIN, 1999). No rúmen, isto ocorre quando bactérias metanogênicas, altamente eficazes na captura do hidrogênio livre, utilizam o mesmo para produzir metano (JOBLIN, 1999). Segundo este mesmo autor, a forma como o hidrogênio é utilizado no rúmen é o

elemento chave para o controle da emissão de metano por ruminantes, pois, é sabido que a produção de metano no rúmen é diretamente proporcional à concentração de hidrogênio no mesmo (CZERKAWSKI et al., 1972).

Para obter-se o máximo de rendimento energético através da fermentação anaeróbia de carboidratos, é necessário que o hidrogênio produzido seja utilizado para que ocorra a regeneração de NAD^+ sem interferir no piruvato e nem no acetil-CoA. A formação do metano é considerada consumidora de energia por drenar o hidrogênio procedente de todos os microrganismos do rúmen, permitindo um maior rendimento total de ATP. No rúmen existem outros consumidores de hidrogênio como, por exemplo, as conversões de NO_3 em NH_3 e de SO_4 em H_2S e a saturação de ácidos graxos insaturados. Entretanto, estes outros consumidores de hidrogênio não apresentam grande importância quantitativa (FAHEY & BERGER, 1993). BEUVINK & SPOELTRA (1992) verificaram que a relação entre produção de gás e desaparecimento do substrato pode não ser linear quando o pH está abaixo de 6,2, sendo imprescindível a utilização de tampões para garantir que o mesmo permaneça acima deste valor durante a fermentação.

Desta forma, garantindo boas condições ruminais para o crescimento microbiano e ajustando as rações para que exista o correto balanço de nutrientes absorvidos, o ruminante irá demonstrar seu potencial de produção e, ao mesmo tempo, contribuirá para a estabilização do efeito estufa pela redução da emissão de metano. Para que ambos efeitos sejam atingidos, é necessário garantir o uso de soluções tecnológicas que viabilizem a adoção de rações balanceadas em função da dinâmica da microbiota ruminal.

Intervenções na ração dos animais parecem ser viáveis, tanto tecnicamente quanto na prática, objetivando reduzir a produção de metano por unidade de produto animal pela otimização do processo de fermentação ruminal. Neste aspecto, sistemas de produção onde os ruminantes recebem rações com forragens de baixa qualidade nutricional, são os que possuem maiores possibilidades de sucesso visando reduzir a sua emissão, considerando que alta porcentagem de suplementação concentrada pode comprometer a específica

habilidade desses animais de converter alimentos fibrosos em alimentos de qualidade para a população humana.

Estratégias para reduzir o aquecimento da Terra e aumentar a produtividade animal requerem novos sistemas de produção, onde devem ser consideradas as emissões de metano e de outros gases que possam provocar danos ao meio ambiente.

Sob condições de campo, os rebanhos são compostos por diferentes tipos de indivíduos e níveis de produção, onde parâmetros nutricionais como ingestão de alimentos e composição de nutrientes da ração, não são freqüentemente conhecidos (KIRCHGEBNER et al., 1995).

Utilizando dados de produção de metano obtidos em vários estudos, KIRCHGEBNER et al. (1994) propuseram um modelo considerando a ingestão de nutrientes, tais como: fibra bruta (FB), nitrogênio livre (N_{livre}), proteína bruta (PB) e extrato etéreo (EE), em kg/dia, para estimar a variação na emissão de metano de vacas em lactação, gestantes e em lactação, gestantes fora de lactação, não gestantes e de novilhos, segundo a equação abaixo, obtendo um bom ajuste ($r^2 = 0,92$).

$$\text{Emissão de metano (g/dia)} = 63 + 79 (\text{FB}) + 10 (N_{livre}) + 26 (\text{PB}) - 212 (\text{EE})$$

Foi verificado também que a inclusão de propriedades dietéticas neste modelo, tais como o tipo de forragem, aumentou o ajuste na predição da emissão de metano. Foi notado que a maior emissão de metano, no caso de silagem de milho quando comparada com produtos a base de capim, refletiu mais o efeito das rações como um todo do que das características nutricionais específicas dos alimentos que as compunham (KIRCHGEBNER et al., 1994).

É esperado que o aumento na produtividade de bovinos em crescimento/engorda resulte em declínio assintótico da emissão de metano por quilo de carne produzida, num padrão similar ao verificado por KIRCHGEBNER et al. (1995) para vacas em lactação. Esses autores mostraram que houve pequena contribuição da produção de leite para a emissão total de metano,

explicada pelo fato de que aumentos na produção de leite são acompanhados por aumento no conteúdo dietético de concentrados, geralmente pobres em fibra. No entanto, desde que os alimentos ricos em fibra bruta sejam normalmente usados para atender as exigências de manutenção, eles são responsáveis por consideráveis quantidades de metano emitido na atmosfera. Desta forma, foi verificado que aumentos na produção de leite resultariam em declínio proporcional assintótico da emissão de metano (efeito de diluição) por unidade de produto (leite). Assim, por exemplo, segundo estes autores, um aumento na performance animal para produção de leite de 4000 para 6000 kg de leite/vaca/ano resultaria numa diminuição na produção de metano da ordem de 25% por quilo de leite produzido.

De fato, WALKER et al. (1997) relataram que novilhos alimentados com grandes quantidades de alimentos, apresentaram maior ingestão de matéria seca, alcançando o peso de abate 90 dias mais cedo e produziram, em média, 11,9 kg a menos de metano em relação aos novilhos “controle” (15,7 kg *versus* 27,6 kg).

KIRCHGEBNER et al. (1995) verificaram que, em bovinos de corte criados em regime de pasto, a emissão total de metano durante o período de produção (engorda) foi aproximadamente duas vezes maior do que em bovinos confinados, especialmente quando a qualidade da forragem e a produção foram baixos.

A emissão de metano por ruminantes varia largamente entre as espécies e os sistemas de produção (KIRCHGEBNER et al., 1995). Em vacas em lactação, foram observados entre 200 e 400 g/cabeça/dia (TYRRELL et al., 1988; HOLTER & YOUNG, 1992). Bovinos em fase de crescimento e engorda liberaram de 70 a 200 g/cabeça/dia (JOHNSON et al., 1991). Para ovinos e caprinos, variou entre 10 e 30 g/cabeça/dia (ARIELI, 1994; ROWE et al., 1985). No entanto, os modelos que estimam essa emissão por pequenos ruminantes não têm sido validados até o momento sob variadas condições de campo e, nestas espécies, maiores variações individuais a níveis similares de ingestão de matéria seca têm sido observadas (ULYATT et al., 1997).

Inicialmente, BLAXTER & CLAPPERTON (1965) relataram que a

produção de metano por bovinos era influenciada pela ingestão de alimentos (expressa como múltiplo das exigências de manutenção) e digestibilidade da energia bruta. No entanto, para rações pobres em forragens, JOHNSON et al. (1991) verificaram ajuste insatisfatório para o modelo proposto por BLAXTER & CLAPPERTON (1965). Além de que, KIRCHGEBNER et al. (1994) citaram que ocorreram acréscimos na produção de metano por vacas em lactação com o aumento na ingestão de matéria seca, o ajuste da equação de regressão obtida por este modelo foi insatisfatória ($r^2 = 0,19$). Considerando que a ingestão de matéria seca foi um mau preditor da quantidade de metano liberada e que a digestibilidade da energia bruta da ração foi pouco exata para descrever o principal componente responsável pela emissão de metano, estes autores sugeriram que as variações na emissão de metano podem ser melhor explicadas pelas diferenças na composição dos nutrientes.

Em estudos com vacas em lactação, utilizando a ingestão de nutrientes como variáveis de regressão, KIRCHGEBNER et al. (1994) mostraram que o consumo de fibra foi o fator mais importante para estimar a liberação de metano. Segundo esses autores, a estimulação da atividade de microrganismos metanogênicos celulolíticos associados com rações ricas em fibra bruta parece ser óbvio. Com rações contendo altas quantidades de carboidratos facilmente fermentescíveis, o padrão de fermentação muda em direção a outras formas de diminuir o hidrogênio, como, por exemplo, formação de propionato.

KIRCHGEBNER et al. (1994) também mostraram que a ingestão de proteína bruta possui pouca influência sobre a emissão de metano. Em contraste, a ingestão de extrato etéreo a reduz drasticamente, mas, o efeito total é pequeno, devido ao baixo conteúdo deste nutriente nas rações para ruminantes.

MURRAY et al. (1976) mostraram que, aproximadamente, 10% do total de metano liberado na atmosfera por ruminantes são produzidos no intestino grosso dos mesmos.

A reação de formação de metano é considerada consumidora de energia, drenando o hidrogênio procedente de todas as reações químicas que ocorrem no

rúmen, permitindo um melhor rendimento total de adenosinatrifosfato (ATP). Esse maior rendimento proporciona a formação de mais células microbianas, aumentando, desta forma, a proteína disponível para o ruminante. Isso indica que a produção de metano traz benefício a estes animais, já que promove uma fermentação mais eficaz e mantém baixa a concentração de hidrogênio no rúmen (CHURCH, 1976).

Existe uma interação muito importante entre determinadas bactérias ruminais e a transferência interespecífica de hidrogênio. A interação entre as espécies que produzem hidrogênio e as que o utilizam tem efeito regulador importante na fermentação ruminal. Este elemento químico não se acumula no rúmen, sendo utilizado por espécies metanogênicas, junto com o dióxido de carbono, resultando em produção de metano. A eliminação do hidrogênio presente no rúmen pelas espécies metanogênicas estimula importantes espécies microbianas produtoras de hidrogênio, tais como *Ruminococcus albus*, *R. flavefaciens*, *Salenomonas ruminantium* e muitas outras a produzirem mais hidrogênio, alterando seus metabolismos através de vias que proporcionem maiores rendimentos de energia (CHURCH, 1976).

Estudos realizados por BLAXTER & CLAPPERTON (1965) demonstraram que a produção de metano por unidade de alimento ingerido foi negativamente relacionada com o nível de ingestão. Desta forma, o fornecimento de ração para manutenção, favorecendo um aumento da digestibilidade, resultou em maior produção de metano por unidade de alimento ingerido. Estudos realizados por HOLTER & YOUNG (1992) e ØRSKOV et al. (1968) mostraram que a taxa de fermentação é igualmente importante, ou seja, substratos com taxa de fermentação lenta (carboidratos estruturais) produzem mais metano por unidade de substrato fermentado do que aqueles altamente fermentescíveis.

ØRSKOV et al. (1968) forneceram para vacas rações variando a proporção volumoso:concentrado de 100:0 a 20:80 e verificaram que a produção de metano diminuiu gradualmente com o aumento na quantidade de concentrado fornecido, sendo que a ração com relação 20:80 produziu metade da quantidade de metano em comparação à com relação 100:0.

Menor produção de metano, aumento na produção de propionato e diminuição na relação acetato:propionato foram observados em ruminantes alimentados a vontade com rações ricas em amido (ØRSKOV et al., 1968). Esta mudança no padrão de fermentação pode ser atribuída a um aumento na taxa de fermentação, favorecendo a produção de propionato ao invés de metano (DEMEYER & VAN NEVEL, 1975).

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivos: 1. desenvolver um método “in vitro” de baixo custo, prático, rápido e confiável para quantificação e qualificação dos gases produzidos nos processos fermentativos ruminais em bovinos; 2. avaliar as produções totais de gás “in vitro” e as proporções e produções de dióxido de carbono, metano e oxigênio do líquido ruminal misturado com o volumoso, com o concentrado ou com o volumoso+concentrado, oriundo de animais consumindo as diferentes rações experimentais; 3. avaliar a contribuição de cada um dos ingredientes dos concentrados das rações experimentais (milho, casca do grão de soja e farelo de girassol), em cada tratamento experimental, sobre as produções totais de gás “in vitro” e as proporções e produções de dióxido de carbono, metano, oxigênio e nitrogênio; 4. estabelecer correlações entre as produções totais de gás, proporções e produções de metano, dióxido de carbono, oxigênio e nitrogênio, pH, degradabilidades ruminais da matéria seca e das fibras em detergentes neutro e ácido e digestibilidades totais aparentes, em bovinos recebendo rações com três relações volumoso:concentrado (70:30, 50:50 ou 30:70, na matéria seca) e duas qualidades nutricionais de volumoso.

1.1. Referências Bibliográficas

ARIELI, A. Effect of whole cottonseed on energy partitioning and nitrogen balance in sheep. **Animal Production**, v. 58, p. 103-108, 1994.

BENCHAAAR C.; POMAR, C.; CHIQUETTE, J. Evaluation of dietary strategies to reduce methane production in ruminants: a modeling approach. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 81, p. 563-574, 2001.

BEUVINK, J. M. W.; SPOELTRA, S. F. Interactions between substrate, fermentation end-products, buffering system and gas production upon fermentation of different carbohydrates by mixed rumen microorganisms "in vitro". **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 37, p. 505-509, 1992.

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

BRUNI, M. A.; CHILIBROSTE, P. Simulación de la digestión ruminal por el método de la producción de gas. In: REUNIÓN LATINOAMERICANA DE PRODUCCIÓN ANIMAL, 15., 2000. **Anais...**, 2000. 1 CD-ROM.

CHURCH, D. C. Digestive physiology and nutrition of ruminants. In: _____. **Digestive physiology**, 2. ed. Oregon: Bookstores, 1976. 349 p.

CZERKAWSKI, J. W.; HARFOOT, C. G.; BRECKENRIDGE, G. The relationship between methane production and concentrations of hydrogen in the aqueous and gaseous phases during rumen fermentation "in vitro". **Journal of Applied Bacteriology**, v. 35, p. 537-551, 1972.

DEMEYER, D. I.; VAN NEVEL, C. J. Methanogenesis, an integrated part of carbohydrate fermentation, and its control. In: McDONALD, I. W.; WARNER, A. C. I. (Eds.) **Digestion and metabolism in the ruminant**. Armidale: The University of New England Publishing Unit, 1975. p. 366-382.

DRENNEN, T. E.; CHAPMAN, D. Negotiating a response to climate change: role of biological emissions. **Contemporary Policy Issues**, v. 10, p. 49-57, 1992.

FAHEY, G. C.; BERGER, L. L. Los carbohidratos en la nutrición de los rumiantes. In: CHURCH, C. D. (Ed.). **El rumiante: fisiología digestiva y nutrición**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1993. p. 305-337.

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

HOLTER, J. B.; YOUNG, A. J. Methane production in dry and lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 2165-2175, 1992.

JOBLIN, K. N. Rumen acetogens and their potential to lower ruminant methane emissions. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 50, p. 1307-1313, 1999.

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

JOHNSON, D. E. et al. New perspectives on ruminant methane emissions. In: WENK, C.; BOESSINGER, M. (Eds.) **Energy metabolism of farm animals**. EAAP, Publi. 58. Zurich: ETH, 1991. p. 376-379.

____. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a SF₆ tracer technique. **Environmental Science And Technology**, v. 28, p. 359-362, 1994.

KIRCHGEBNER, M.; WINDISCH, W.; MULLER, H. L. Methane release from dairy cows and pigs. In: AGUILERA, J. F. (Ed.) **Energy metabolism of farm animals**. EAAP Publ. 76. Mojacar: CSIC Servicio de Publicaciones, 1994. p. 300-402.

____. Nutritional factors for the quantification of methane production. In: ENGRHARDT, W. V. et al. (Eds.) Ruminant Physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RUMINANT PHYSIOLOGY, 8., 1995, Stuttgart. **Proceedings...** Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag, 1995. p. 333-348.

LANA, R. P.; RUSSELL, J. B. Effect of forage quality and monensin on the ruminal fermentation of fistulated cows fed continuously at a constant intake. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 224-229, 1997.

LASSEY, K. R. et al. Methane emissions measured directly from grazing livestock in New Zealand. **Atmospheric Environment**, v. 31, p. 2905-2914, 1997.

LENG, R. A. Factors affecting the utilization of "poor quality" forages by ruminants particularly under tropical conditions. **Nutrition Research Reviews**, v. 3, p. 277-303, 1990.

____. Quantitative ruminant nutrition - a green science. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 44, p. 363-380, 1993.

LIMA, M. A.; BOEIRA, R. C.; CASTRO, V. L. Inventário das emissões de gases de efeito estufa provenientes das atividades agrícolas no Brasil. In: **Mudanças Climáticas Globais e a Agropecuária Brasileira**, Junho 1999. Campinas: Embrapa Meio Ambiente: 1999. p. 33.

LOPEZ, S. et al. Effect of adding acetogenic bacteria on methane production by mixed rumen microorganisms. **Animal Feed Science and Technology**, v. 78, p. 1-9, 1999.

McALLISTER, T. A. et al. Environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 76, p. 231-243, 1996.

MOSS, A. R. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. **Annales de Zootechnie**, v. 49, p. 231-253, 2000.

MURRAY, R. M.; BRYANT, A.; LENG, R. A. Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. **British Journal of Nutrition**, v. 36, p. 1-14, 1976.

ØRSKOV, E. R.; FLATT, W. P.; MOE, P. W. Fermentation balance approach to estimate extent of fermentation and efficiency of volatile fatty acid formation in ruminants. **Journal of Dairy Science**, v. 51, p. 1429-1435, 1968.

ROWE, J. B.; DAVIES, A.; BROOME, A. W. J. Quantitative effects of defaunation on rumen fermentation and digestion in sheep. **British Journal of Nutrition**, v. 54, p. 105-119, 1985.

TYRRELL, H. F. et al. Effect of bovine somatotropine on metabolism of lactating dairy cows: energy and nitrogen utilization as determined by respiration calorimetry. **Journal of Nutrition**, v. 118, p. 1024-1030, 1988.

ULYATT, M. J.; LASSEY, K. R. Methane emissions from pastoral systems: the situation in New Zealand In: REUNIÓN LATINOAMERICANA DE PRODUCCIÓN ANIMAL, 15., 2000. **Anais...**, 2000. 1 CD-ROM.

ULYATT, M. J. et al. Methane emission from grazing sheep and cattle. In: NEW ZEALAND SOCIETY OF ANIMAL PRODUCTION, 1997. **Proceedings...**, 1997. p. 130-133.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476 p.

WALKER, J. A. et al. Animal performance and methane emitted by beef steers under alternative production strategies. **Journal of Animal Science**, v. 75 (Suppl. 1), p. 271, 1997.

2. CAPÍTULO 2 - METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA E

QUALITATIVA DA PRODUÇÃO DE GÁS “IN VITRO”

Metodologia para Determinação Quantitativa e Qualitativa da Produção de Gás “in vitro”

2.1. RESUMO – As metodologias atuais para mensuração das quantidades de gás produzidas pela atividade fermentativa no trato gastrointestinal superior dos ruminantes exigem alto custo em instalações sofisticadas para se medir diretamente nos animais ou são mensurações “in vitro”, onde são utilizadas poucas quantidades de líquido ruminal e de alimentos, além de soluções tampão em alguns casos, estando, portanto, sujeito a erros. Desta forma, este trabalho teve por objetivo estabelecer uma metodologia “in vitro” para avaliação quantitativa e qualitativa dos gases oriundos do processo fermentativo do líquido ruminal de bovinos. Os gases avaliados foram o metano, o dióxido de carbono, o oxigênio e o nitrogênio. A metodologia foi desenvolvida na Unidade Animal de Estudos Digestivos e Metabólicos do Departamento de Zootecnia e no Laboratório do Departamento de Engenharia Rural da FCAV-Unesp-Jaboticabal-SP, de maio de 2001 a dezembro de 2002. A simplicidade e o baixo custo caracterizam esta metodologia de avaliação da produção de gás a pressão constante, que utiliza 10 gramas de substrato em 800 mL de líquido ruminal.

Palavras-Chave: fermentação, nutrição, rúmen, ruminantes

2.2. Introdução

Muitos métodos estão disponíveis para medir a produção de gás em ruminantes. Estes variam de incubações do conteúdo ruminal durante curto período (métodos indiretos) até elaborados sistemas em câmaras calorimétricas (métodos diretos). Em todos os casos há vantagens e desvantagens. A escolha dependerá, principalmente, se as medidas serão realizadas em grupos de animais ou individualmente, ou se os mesmos poderão ser confinados em câmaras de respiração ou se movimentarem livremente durante as mensurações.

Entre os métodos disponíveis para avaliar animais individualmente, existem os com área fechada, com uso de indicadores e os indiretos. Em relação ao primeiro, a área deverá ser totalmente fechada (MILLER & KOES, 1988) ou poderá ser utilizada uma máscara na cabeça dos animais (YOUNG et al., 1975). Os métodos com indicadores incluem aqueles que utilizam isótopos (MURRAY et al., 1976), como o hexafluoreto de enxofre (ULYATT et al., 1997; JOHNSON et al., 1994), que é um gás encontrado na atmosfera em condições normais. Nos métodos indiretos, existem as estimativas da produção de metano a partir da produção e concentração de ácidos graxos voláteis no rúmen dos animais (DIJKSTRA, 1994; LENG, 1993), através das características dos alimentos ingeridos pelos animais (HOLTER & YOUNG, 1992; BLAXTER & CLAPPERTON, 1965) e pelo conteúdo ruminal incubado “in vitro” (BLÜMMEL et al., 1997; VAN KESSEL & RUSSELL, 1996; DAVIES et al., 1995; FRANCE et al., 1993; MENKE & STEINGASS, 1988).

Entre os métodos disponíveis para mensurar a produção de gás em grupos de animais, estão também os de área fechada (LOCKYER, 1997), as estimativas micrometeorológicas, em que pode ser utilizado indicador como o hexafluoreto de enxofre, e as estimativas por meio das características dos alimentos ingeridos pelos animais. A maioria das mensurações de produção de gases em ruminantes encontradas na literatura tem sido realizadas em câmaras de respiração, que são altamente seguras para controlarem condições

particulares. Por outro lado, poucas medidas têm sido feitas em animais sob condições naturais de pastejo (ULYATT et al., 1997) ou de confinamento.

A maioria dos equipamentos utilizados para medir a produção de gases em animais constituem-se de câmaras respiratórias onde permanecem em seu interior por determinado período. Estas câmaras dispõem de meios para introduzir alimentos e água, assim como recolher os dejetos. Existe o tipo fechado, onde o ar e os gases produzidos recirculam através da câmara, permanecendo o animal em seu interior por poucas horas. Existe também o sistema aberto, onde o ar exterior circula continuamente pelo interior da câmara, obrigando realizações de medidas criteriosas e sucessivas da quantidade de ar que entra e sai na mesma, assim como avaliações qualitativas. Este é o método mais utilizado com grandes animais, podendo ser obtidas amostras a tempos determinados e analisados automaticamente, sendo as informações obtidas armazenadas e processadas em computador. Tanto os tipos fechado como aberto apresentam a inconveniência de serem métodos caros e permitem a avaliação de poucos animais ao mesmo tempo (CHURCH & POND, 1977).

A produção de gás tem sido medida de três formas: a pressão constante; a volume fixo e uma combinação dos dois métodos (aumento de volume necessário para causar uma variação de pressão pré-definida).

MALAFIA et al. (1998), avaliando a cinética da degradação da matéria seca dos capins-tifton, elefante e algumas braquiárias, da soja perene e da silagem de milho por diferentes métodos “in situ” e “in vitro” e pela produção de gás (sistema manométrico), concluíram que a determinação manométrica e volumétrica da produção de gás apresentou menores variações nas mensurações, sendo, portanto, recomendada para estimar as taxas de degradação dos alimentos utilizados na alimentação de ruminantes.

Diversas variáveis, incluindo o tamanho da amostra, a quantidade de inoculo, o tamanho do recipiente e o tipo de sensor de pressão têm sido investigados para a determinação da faixa de produção “in vitro” de gás que pode ser medida com boa precisão (PELL & SCHOFIELD, 1993). THEODOROU et al. (1994), reportaram alterações no crescimento microbiano em sistemas “in

vitro” quando os gases gerados em diferentes intervalos de tempos não são extraídos do meio, enquanto que SCHOFIELD & PELL (1995) não verificaram estas alterações.

BRUNI & CHILIBROSTE (2000) propuseram a mensuração da produção acumulada de gases, de maneira alternativa ao desaparecimento do substrato, como indicador do metabolismo do carbono, centrando a atenção nos produtos finais da fermentação (dióxido de carbono, metano e ácidos graxos voláteis). Este sistema possui as vantagens de se estar medindo o resultado direto do metabolismo microbiano, ao invés de se registrar o desaparecimento do substrato, e de permitir o monitoramento a intervalos de tempos pré-determinados sem interferir no processo fermentativo, permitindo um estudo mais preciso da cinética de fermentação ruminal.

MENKE & STEINGASS (1988) propuseram que o CO_2 gerado no processo fermentativo pode ser capturado pelo NH_4 , formando NH_4HCO_3 , levando a uma subestimação da quantidade produzida.

A produção de dióxido de carbono durante a fermentação de um substrato resulta de duas fontes: direto dos passos metabólicos como a descarboxilação oxidativa do piruvato e das reações dos produtos finais da fermentação (ácidos graxos voláteis) com o bicarbonato da solução tampão (produção indireta de gás) (BEUVINK & SPOELTRA, 1992).

Diferentes teores de proteína na matéria orgânica fermentada podem resultar na perda de uniformidade entre a produção de gases e o desaparecimento do substrato (BRUNI & CHILIBROSTE, 2000). Além disso, imediatamente após a incubação, o substrato é parcialmente solubilizado e os componentes solúveis são rapidamente fermentados. Os componentes insolúveis precisam primeiramente serem hidratados e colonizados pelos microrganismos ruminais para serem fermentados, onde diferentes substratos e seus componentes apresentam resistências variadas a estes processos, resultando em perfis de produção de gases distintos. A complexidade da estequiometria das diferentes reações bioquímicas que ocorrem durante a fermentação requer maiores estudos.

Chamberlain (1994), citado por BRUNI & CHILIBROSTE (2000), considerou a técnica de produção de gases como um indicador da atividade microbiana, já que ambas estão associadas a energia contida nos alimentos disponível no rúmen, onde, conhecendo a produção de gases, é possível estimar a atividade microbiana.

A técnica de mensuração da produção de gases também tem sido utilizada para determinar o valor nutritivo de plantas forrageiras em processos de melhoramento genético e para auxiliar na compreensão das interações genótipo-ambiente das principais espécies utilizadas nos sistemas de produção (BRUNI & CHILIBROSTE, 2000).

Uma utilidade alternativa pouco explorada do sistema de produção de gás “in vitro” é o indicador do “status” interno do rúmen (CHILIBROSTE et al., 1999), podendo ser empregado para descobrirem mudanças na capacidade digestiva “in vivo”.

Desta forma, o sistema de produção de gases permite detectar diferentes qualidades dos alimentos que não puderam ser detectadas pelas determinações tradicionais.

Diante disto, este experimento teve por objetivo estabelecer uma metodologia simples e de baixo custo para avaliação quantitativa e qualitativa dos gases produzidos pela fermentação “in vitro” do líquido ruminal de bovinos.

2.3. Material e Métodos

Esta metodologia para a mensuração quantitativa e qualitativa dos gases produzidos pela fermentação “in vitro” do líquido ruminal de bovinos foi desenvolvida durante seis meses na Unidade Animal de Estudos Digestivos e Metabólicos do Departamento de Zootecnia e no Departamento de Engenharia Rural da FCAV/UNESP - Jaboticabal, SP. O método consiste, resumidamente, de três etapas: 1) Colheita do líquido ruminal e preparo da solução a ser fermentada; 2) produção e armazenamento dos gases gerados no processo fermentativo e; 3) análise qualitativa do gás produzido. O esquema da

metodologia foi baseada no aparato para mensuração da produção de gás citado por OSCAR et al. (1987) (Figura 1) e no aparato para determinação experimental da produção de gás em fezes submetidas a fermentação anaeróbia (Figura 2), denominado de biodigestor.

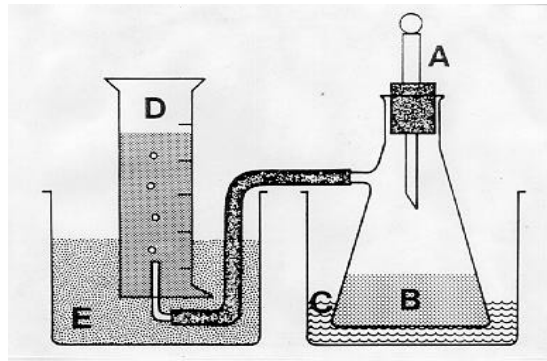


Figura 1: Aparato para colheita de gás "in vitro". A) amostrador de gás, B) amostra em fermentação, C) água a 39°C, D) cilindro graduado e E) solução de NaCl saturada a pH 2,5. Fonte: Adaptado de OSCAR et al. (1987).

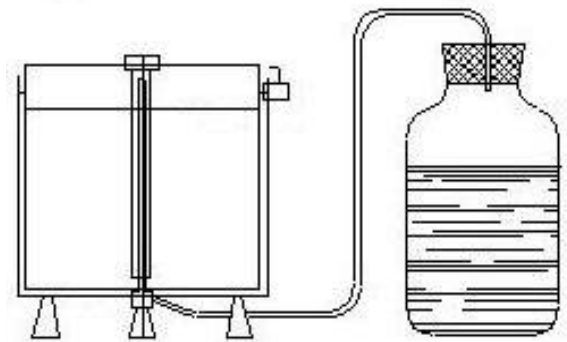


Figura 2. Esquema de um biodigestor utilizado para avaliar a produção total de gás, principalmente metano e dióxido de carbono, em fezes de animais em processo anaeróbio de fermentação.

As colheitas de líquido ruminal dos animais foram realizadas no período da tarde, antes da segunda refeição do dia, com auxílio de bomba a vácuo e um kitassato com capacidade de dois litros. Antes da colheita, os animais tiveram um período mínimo de adaptação às rações experimentais de sete dias.

Após colhido, o líquido ruminal foi filtrado em tecido de náilon com malha de 100 μm , medidos 800 mL em uma proveta e transferidos para garrafas de vidro de cor âmbar, com capacidade de 1000 mL. Em cada garrafa foram adicionados 10 g do substrato a ser avaliado. Em uma das garrafas não foi adicionado nenhum substrato, sendo utilizada como "controle". As garrafas foram alojadas por 12 horas em banho-maria, regulado a $39,5 \pm 2^\circ\text{C}$, e em ambiente escuro (Figura 3), sendo o gás produzido neste período recolhido em recipientes plásticos projetados para esta função (Figura 4). Ao término do período de fermentação, o gás gerado foi quantificado e transferido para um recipiente com capacidade de 50 mL. Quanto menor este recipiente, mais eficiente será a

substituição de todo o conteúdo do seu interior (ar atmosférico) pelo gás armazenado no reservatório no momento de transferência do mesmo. Diante disto, um recipiente de apenas 50 mL foi confeccionado ao invés de se utilizar um de 250 mL pré existente e utilizado para avaliação de biogás, produzido em biodigestores convencionais. A previa utilização de vácuo pode auxiliar neste processo (Figura 5).

A passagem do gás para o recipiente de transferência é necessária quando for inevitável o transporte de todo o aparato experimental até o local onde o cromatógrafo está instalado, assim como para evitar injeção acidental de água e/ou líquido ruminal no cromatógrafo gasoso, que é um equipamento muito sensível e delicado. Nas Figuras 6 e 7 são demonstrados os recipientes de transferência antes e após a injeção do gás no cromatógrafo gasoso (Figura 8) para as determinações qualitativas (proporções molares) de metano, dióxido de carbono e oxigênio. A injeção é realizada com a adição de água destilada no recipiente de transferência, que força o deslocamento do gás para o cromatógrafo (Figuras 6 e 7). A quantidade de gás injetada no cromatógrafo, por amostra, foi de aproximadamente 10 mL para todas as amostras.



Figura 3. Garrafas com líquido ruminal colocadas em banho-maria e recipientes confeccionados para o armazenamento dos gases produzidos



Figura 4. Recipientes confeccionados para o armazenamento dos gases produzidos no processo fermentativo “in vitro”.



Figura 5. Recipiente utilizado para a transferência do gás armazenado para o cromatógrafo gasoso (esquerda) em comparação ao utilizado para a transferência dos gases oriundos de biodigestores (direita).



Figura 6. Recipiente de transferência antes da injeção do gás no cromatógrafo gasoso pelo acréscimo de água no mesmo.



Figura 7. Recipiente de transferência após a injeção do gás no cromatógrafo gasoso pelo acréscimo de água no mesmo.



Figura 8. Cromatógrafo gasoso utilizado na análise das amostras

Após o término do período de fermentação, com o recipiente plástico para armazenamento de gás colocado na posição vertical, uma marca foi realizada em cada um destes no local onde ocorria o encontro com a água. Esta marca serviu para determinar a quantidade de gás que havia antes do esvaziamento para a avaliação qualitativa. Esta determinação foi efetuada preenchendo o recipiente plástico com água até atingir a marca e mensurando, com auxílio de uma bureta, a quantidade de água necessária para isso, em mililitros.

Conhecendo a produção total de gás e as características qualitativas do mesmo (proporção molar de cada gás), foi possível calcular as quantidades proporcionais de cada gás produzido.

Antes e após o período de 12 horas, pode ser determinado o potencial hidrogeniônico (pH) de cada líquido ruminal utilizado para a incubação dos substratos. Para isso, o pH pode ser obtido no líquido ruminal antes de inserir o substrato ao mesmo e/ou no final deste período, após filtrar o líquido ruminal com o substrato em um tecido com a mesma malha utilizada na primeira filtragem do líquido ruminal, no momento de sua colheita, neste caso, o mesmo tecido de náilon de 100 μm . Este procedimento diminui a possibilidade de erros na

obtenção dos valores de pH decorrentes da presença de substrato (sólidos) no meio. É sabido que o pH é influenciado pelo meio, que quanto mais densos possuem, normalmente, maior condução de elétrons do que meios menos densos, resultando em maior pH. Por isso a importância de se filtrar o material a ser medido o pH após o processo fermentativo para, desta forma, tirar o substrato remanescente que não foi degradado e que poderia influenciar (superestimar) a leitura do pH.

Antes da incubação dos substratos e terminado o processo fermentativo, após filtragem do líquido ruminal como citado anteriormente, foram colhidos cinco mililitros de amostra e adicionado um mililitro de ácido metafosfórico a 25%, sendo as amostras posteriormente congeladas. Este procedimento objetivou futuras determinações das proporções de ácidos graxos voláteis e das concentrações de nitrogênio amoniacal nas amostras, antes e após a incubação com os substratos em cada tratamento experimental.

A opção pela colheita do líquido ruminal dos animais no período da tarde possibilitou o uso do cromatógrafo gasoso durante o dia, coincidindo com o horário de funcionamento dos Laboratórios, evitando transtornos operacionais. Desta forma, as 12 horas de fermentação ocorreram durante a noite. A utilização de vidros âmbar tem por objetivo reduzir os efeitos da luz sobre o meio. As colheitas realizadas no período noturno favorecem também este aspecto, pois as amostras tem menor contato com luz no momento da colheita e ausência total durante as 12 horas de fermentação.

A proporção da quantidade de substrato a ser fermentado sobre a quantidade de líquido ruminal colocado nas garrafas neste experimento foi de 1,25% (peso/volume), estando próximo ao utilizado por SMACCHIA et al. (2000) em vacas leiteiras, que foi 1% (peso/volume). Estes autores utilizaram 30 mL de líquido ruminal e, como substratos, amostras de forragem de alfafa, feno de alfafa ou nenhum deles (“controle”). Verificaram maior atividade microbiana nos sistemas incubados com os substratos em comparação ao “controle” e que a relação $\text{CO}_2:\text{CH}_4$ foi maior após três horas de fermentação do que após 24 ou 48 horas e que não houve diferença entre as últimas. A avaliação da relação

CO₂:CH₄, que relaciona as atividades microbianas totais (CO₂) com as atividades microbianas metanogênicas (CH₄), sugere que a ausência de diferença entre 24 e 48 horas não justifica que o período de incubação seja superior a 24 horas quando se deseja avaliar as produções de CO₂ e CH₄ em sistemas “in vitro”. Com base nessas considerações e na frequência de alimentação a que os animais experimentais eram submetidos (duas refeições diárias, com intervalo de 12 horas entre elas), o tempo de incubação de 12 horas foi considerado.

Tempos maiores de fermentação também levam a um maior acúmulo de produtos finais da fermentação no meio, que podem resultar em alterações nos resultados. Além disso, a alteração na frequência de entrada de novo substrato no meio maior do que 12 horas também pode, possivelmente, alterar os resultados.

É possível que tempos menores de incubação estão mais sujeitos a erros devido efeitos externos a pré-incubação (colheita do líquido ruminal, filtragem e mensuração das quantidades a serem incubadas), como, por exemplo, inevitável contato com o oxigênio e outros gases atmosféricos, incidência de luz, possível alteração de temperatura do meio e agitação.

O precursor do cromatógrafo gasoso foi feito para analisar os ácidos graxos voláteis do rúmen nas décadas de 1950 e 1960. Desde então esta técnica tem sido muito desenvolvida, assim como os instrumentos utilizados para a sua realização. Estes instrumentos são capazes de analisar quase todos os compostos que podem ser vaporizados e que são encontrados em estado gasoso. A amostra a analisar é colocada no aparelho, sendo movida através de uma coluna cromatográfica quente por meio da injeção de um outro gás. Este processo requer pequenas quantidades de amostra e permite a separação quantitativa de compostos químicos com bastante rapidez (CHURCH & POND, 1977).

No momento das mensurações do total de gás produzido (em volume), foram determinados também a pressão destes (em milímetros de coluna de água) e a temperatura ambiente (em °K), objetivando calcular os volumes dos

gases nas Condições Normais de Temperatura e Pressão (CNTP), conforme descrito abaixo e citado por CAETANO (1985):

$$P_0 V_0 T_0^{-1} = P_1 V_1 T_1^{-1} \text{ , onde: } V_0 = \text{volume corrigido do biogás, em m}^3;$$

P_0 = pressão corrigida do biogás (10.332,72 mm H₂O);
 T_0 = temperatura corrigida do biogás (293,15 °K);
 V_1 = volume de biogás nas condições de leitura, em m³;
 P_1 = pressão do biogás no gasômetro (em mm H₂O) e;
 T_1 = temperatura local no instante da leitura (em °K).

É importante ressaltar que nesta metodologia o volume de gás gerado no processo fermentativo é mantido à pressão praticamente constante, pois, entende-se que uma alteração na pressão pode resultar na variação dos resultados experimentais, tanto quantitativos como qualitativos.

2.4. Discussão

As técnicas que utilizam os modelos animais “in vivo” teoricamente resultam nos dados mais confiáveis, obtendo a maior aproximação possível. Estas técnicas representam a melhor forma de avaliação biológica de um alimento, porém, apresentam alto custo, como, por exemplo, manter um elevado número de animais em instalações específicas, e lentidão em comparação com os sistemas “in vitro” (SAADOUN & CABRERA, 2000).

O método “in vitro” é comumente utilizado pela rapidez, ou quando é requerido grande número de análises em uma determinada avaliação. Entretanto, o acúmulo dos produtos finais da fermentação, assim como a ração a que o animal doador do líquido ruminal estava sendo submetido, podem afetar os resultados (CHERNEY et al., 1993).

Quando se deseja comparar dados de produção de gases “in vitro” com dados “in vivo”, alguns pontos importantes têm que ser considerados: é muito difícil determinar precisamente quais produtos resultarão da fermentação da fração solúvel dos alimentos no rúmen dos animais; a redução do tamanho das partículas dos alimentos ocorre pela mastigação, processo este fisicamente

diferente do processo de moagem mecânica; da mesma forma, a simulação da taxa de passagem no sistema “in vitro” é problemática. Mas, apesar destas considerações, os dados de produção de gases podem contribuir para o entendimento da digestão ruminal e descrição dos diferentes alimentos e, desta forma, predizer a performance animal de forma mais exata.

Tem que ser considerado que dados de desaparecimento do substrato no rúmen e de produção de gases são diferentes e não podem ser comparados diretamente em valores absolutos, pois, no caso do desaparecimento do substrato, é considerado principalmente o material insolúvel, enquanto que na produção de gases, a fração solúvel possui muita importância (BRUNI & CHILIBROSTE, 2000). BLÜMMEL & BECKER (1997) verificaram que a produção de gases de 200 mg de fibra em detergente neutro (FDN) é maior do que 200 mg da forragem como um todo e sugeriram que a eficiência com que o material fermentável é incorporado às células microbianas é uma explicação para a maior produção de gases da FDN. Entretanto, a contribuição das frações solúveis dos alimentos para a produção de gases, formação de massa microbiana e, conseqüentemente para o animal, pode ser maior do que a contribuição da fração fibrosa durante as primeiras horas de fermentação.

Uma utilidade alternativa e pouco explorada do sistema de produção de gás “in vitro” é como indicador do “status” interno do rúmen (CHILIBROSTE et al., 1999), podendo ser empregado para descobrirem mudanças na capacidade digestiva “in vivo” ou elucidar limitações digestivas de um substrato. Segundo BRUNI & CHILIBROSTE (2000), o sistema de produção de gás “in vitro” pode ser utilizado, ainda, como indicador do metabolismo do carbono de maneira alternativa ao desaparecimento do substrato, centrando a atenção nos produtos finais da fermentação (dióxido de carbono, metano e ácidos graxos voláteis).

A maioria dos métodos de mensuração da produção de gases “in vitro” implicam na incubação do alimento com o líquido ruminal e diversas soluções tampão (SMACCHIA et al., 2000). Os elementos utilizados na confecção destas soluções podem modificar a composição da microflora do líquido ruminal utilizado, considerando que algumas espécies são muito sensíveis

(BROUDISCOU et al., 1999). BEUVINK et al. (1992) verificaram que a relação entre produção de gás e desaparecimento do substrato pode não ser linear quando o pH se encontra abaixo de 6,2, sendo imprescindível a utilização de tampões para garantir que o mesmo permaneça acima deste valor durante a fermentação.

Estudos onde foram incubados diversos substratos durante 24 horas em sistemas fechados “in vitro” com líquido ruminal de ovinos alimentados com feno de alfafa, sem solução tampão, mostraram que o inóculo utilizado teria capacidade suficiente para amortizar as mudanças de pH durante a incubação (SMACCHIA et al., 1995). Posteriormente, estes mesmos autores começaram a conduzir os seus experimentos sem a adição de soluções tampão aos meios, verificando que o pH durante as incubações “in vitro” de líquidos ruminais de bovinos em pastejo, sem a adição de soluções tampão, permaneceram dentro das variações observadas “in vivo”, independente dos substratos utilizados (SMACCHIA et al., 2000).

A maioria dos métodos de mensuração da produção de gás “in vitro” implicam na incubação do alimento com o líquido ruminal e diversas soluções tampão. Os elementos utilizados na confecção destas soluções podem modificar a composição da microflora do líquido ruminal utilizado, considerando que algumas espécies são muito sensíveis a pequenas variações do meio em que se encontram (BROUDISCOU et al., 1999).

CAMPOS et al. (2000) afirmaram que as diferenças nos resultados de produção de gás verificadas no seu trabalho podem ter sido causadas pelas diferentes amostragens dos 2,0 mL de líquido ruminal. Quanto maiores as quantidades de líquido ruminal e de substratos utilizados no processo fermentativo, menor será a possibilidade destas diferenças. Pelos dados obtidos por estes mesmos autores, pode-se concluir que quanto menor for a quantidade de amostra de alimentos utilizada, maior será o coeficiente de variação entre as repetições e, portanto, menor será a precisão dos resultados obtidos. Entretanto, quanto maior for a quantidade de amostra, para uma mesma quantidade de líquido ruminal, e/ou quanto maior for o tempo de fermentação, maior será a

redução do valor de pH do meio. O pH é um fator essencial para o crescimento microbiano que, certamente, exige uma certa cautela quando se trabalha com alimentos concentrados, que, geralmente, proporcionam uma maior diminuição deste.

Theodorou et al. (1998), citados por BRUNI & CHILIBROSTE (2000), publicaram uma ampla revisão sobre os princípios químicos e físicos que estão associados com o uso da técnica de produção de gases, sendo que os fatores mais importantes são: a solubilidade dos diferentes gases nos líquidos, o tipo de fermentação, a produção indireta de gases a partir das soluções tampão do meio de cultivo, o conteúdo de nitrogênio da amostra, o tamanho das partículas e o processamento das amostras.

Quando se deseja avaliar um sistema contínuo, como no caso da degradação dos alimentos no rúmen, seriam inadequadas as determinações das concentrações dos produtos finais da fermentação ou simplesmente a mensuração quantitativa e qualitativa do substrato remanescente após um determinado período de incubação. Neste contexto, a técnica de produção de gás “in vitro” é uma importante metodologia auxiliar, apresentando alta capacidade operacional e baixo custo, no qual os perfis dos gases produzidos podem ser gerados utilizando sistemas semi ou totalmente automatizados. O conhecimento dos produtos finais da fermentação (quantitativamente e qualitativamente) e dos resíduos não fermentados, permitem estimar a taxa, a extensão e a eficiência do processo fermentativo ruminal.

2.5. Referências Bibliográficas

BEUVINK, J. M. W.; SPOELTRA, S. F. Interactions between substrate, fermentation end-products, buffering system and gas production upon fermentation of different carbohydrates by mixed rumen microorganisms “in vitro”. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 505-509, 1992.

BEUVINK, J. M. W. et al. An automated method for measuring time-course of gas production of feedstuffs incubated with buffered rumen fluid. **Netherlands Journal of Agricultural Science**, v. 40, p. 401-407, 1992.

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

BLÜMMEL, M.; BECKER, K. The degradability characteristics of fifty-four roughages neutral detergent fibers as described by "in vitro" gas production and their relationships to voluntary feed intake. **British Journal of Nutrition**, v. 77, p. 757-768, 1997.

BLÜMMEL, M.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. "In vitro" gas production: a technique revisited. **Journal of Animal Nutrition**, v. 77, p. 24-34, 1997.

BROUDISCOU, L. P.; PAPON, Y.; BROUDISCOU, A. F. Optimal mineral composition of artificial saliva for fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microorganisms. **Animal Feeding Science and Technology**, v. 79, p. 43-55, 1999.

BRUNI, M. A.; CHILIBROSTE, P. Simulación de la digestión ruminal por el método de la producción de gas. In: REUNIÓN LATINOAMERICANA DE PRODUCCIÓN ANIMAL, 15., 2000. **Anais...**, 2000. 1 CD-ROM.

CAETANO, L. **Proposição de um sistema modificado para quantificação de biogás**. 1985. 75f. Dissertação (Mestrado em Energia na Agricultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1985.

CAMPOS, F. P. et al. Avaliação do sistema de monitoramento computadorizado de digestão "in vitro". 1. Testes preliminares. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p. 525-530, 2000.

CHERNEY, D. J. R.; SICILIANO, J. J.; PELL, A. N. Technical note: forage “in vitro” dry matter digestibility as influenced by fiber source in the donor cow diet. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 1335-1338, 1993.

CHILIBROSTE, P. et al. The use of cumulative gas production technique to characterize changes in the fermentation characteristics of rumen contents following variable periods of starvation and grazing in dairy cows. **Animal Science**, v. 69, p. 647-655, 1999.

CHURCH, D. C.; POND, W. G. **Bases científicas para la nutrición y alimentación de los animales domésticos**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1977. 462 p.

DAVIES, D. R. et al. An automated pressure evaluation system (APES) for determining the fermentation characteristics of ruminant feeds. **Annales de Zootechnie**, v. 44 (Suppl. 1), p. 36, 1995.

DIJKSTRA, J. Production and absorption of volatile fatty acids in the rumen. **Livestock Production Science**, v. 39, p. 61-69, 1994.

FRANCE, J. et al. A model to interpret gas accumulation profiles associated with “in vitro” degradation of ruminants feeds. **Journal of Theoretical Biology**, v. 163, p. 99-111, 1993.

HOLTER, J. B.; YOUNG, A. J. Methane production in dry and lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 2165-2175, 1992.

JOHNSON, D. E. et al. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a SF₆ tracer technique. **Environmental Science And Technology**, v. 28, p. 359-362, 1994.

LENG, R. A. Quantitative ruminant nutrition - a green science. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 44, p. 363-380, 1993.

LOCKYER, D. R. Methane emission from grazing sheep and calves. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 66, p. 11-18, 1997.

MALAFAIA, P. A. M. et al. Cinética ruminal de alguns alimentos investigada por técnicas gravimétricas e metabólicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 27, p. 370-380, 1998.

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

MILLER, W. H.; KOES, R. M. Construction and operation of an open-circuit indirect calorimetry system for small ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 66, p. 1042-1047, 1988.

MURRAY, R. M.; BRYANT, A.; LENG, R. A. Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. **British Journal of Nutrition**, v. 36, p. 1-14, 1976.

OSCAR, T. P.; SPEARS, J. W.; SHIH, J. C. H. Performance, methanogenesis and nitrogen metabolism of finishing steers fed monensin and nickel. **Journal of Animal Science**, v. 64, p. 887-896, 1987.

PELL, A. N.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion "in vitro". **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 1063-1073, 1993.

SAADOUN, A.; CABRERA, M. C. Los métodos de simulación de la digestión y del metabolismo: el modelo celular. In: REUNIÓN LATINOAMERICANA DE PRODUCCIÓN ANIMAL, 15., 2000. **Anais...**, 2000. 1 CD-ROM.

SMACCHIA, A. M.; FIGALLO, R. M.; PIDELLO, A. Complementary use of “in sacco” and “in vitro” studies to investigate ruminal forage degradation in relation to gas production. **Annales de Zootechnie**, v. 44, suppl. 1, p. 173, 1995.

____. Producción de metano en rumen “in vitro” de vacas lecheras en pastoreo de alfalfa: efectos tiempo de incubacion y substrato. In: REUNIÓN LATINOAMERICANA DE PRODUCCIÓN ANIMAL, 15., 2000. **Anais...**, 2000. 1 CD-ROM.

SCHOFIELD, P.; PELL, A. N. Validity of using accumulated gas pressure readings to measure forage digestion “in vitro”: a comparison involving three forages. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 1496-1498, 1995.

THEODOROU, M. et al. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 48, p. 185-197, 1994.

ULYATT, M. J. et al. Methane emission from grazing sheep and cattle. In: NEW ZEALAND SOCIETY OF ANIMAL PRODUCTION, 1997. **Proceedings...**, 1997. p. 130-133.

VAN KESSEL, J. A.; RUSSELL, J. B. The effect of pH on ruminal methanogenesis. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 20, p. 205-210, 1996.

YOUNG, B. A.; KERRIGAN, B.; CHRISTOPHERSON, R. J. A versatile respiratory pattern analyzer for studies of energy metabolism of livestock. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 55, p. 17-22, 1975.

3. CAPÍTULO 3 - PRODUÇÃO DE GÁS “IN VITRO” E PROPORÇÕES DE METANO, DIÓXIDO DE CARBONO E OXIGÊNIO NO LÍQUIDO RUMINAL DE BOVINOS ALIMENTADOS COM DIFERENTES RAÇÕES

Produção de Gás “in vitro” e Proporções de Metano, Dióxido de Carbono e Oxigênio no Líquido Ruminal de Bovinos Alimentados com Diferentes Rações

3.1. RESUMO - Este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos de três relações volumoso:concentrado (70, 50 ou 30% de volumoso, na matéria seca) e de dois fenos de capim-coastcross (*Cynodon dactylon* L. Pers, cultivar coastcross) com diferentes qualidades nutricionais sobre a produção total de gás e as proporções de metano, dióxido de carbono e oxigênio no rúmen dos animais. Foram utilizadas seis rações que apresentavam a mesma relação entre energia metabolizável fermentável no rúmen (em Mcal) e proteína degradável no rúmen (em gramas) de 31,7. Um sistema “in vitro” foi utilizado para avaliar os efeitos das adições do volumoso, do concentrado, da mistura volumoso+concentrado ou da ausência destes substratos (“controle”) aos líquidos de rúmen colhidos dos animais em cada tratamento experimental. Os líquidos ruminais foram colhidos de seis animais canulados no rúmen adaptados aos alimentos estudados. Seis animais canulados no rúmen foram utilizados como doadores de líquido ruminal. O tempo de fermentação foi de doze horas e a medição da quantidade de gás produzido em cada avaliação (em mL), foi efetuada em gasômetros especialmente projetados e as análises dos gases foram efetuadas em cromatógrafo gasoso. As rações com relação volumoso:concentrado de 30:70 resultaram em maiores produções ruminais de gás “in vitro” do que as com relações 50:50 ou 70:30 (837 versus 654 e 617 mL, respectivamente) e menores proporções de metano (49,9 versus 53,6 e 55,2%, respectivamente). Entretanto, com o aumento da produção total de gás, houve um aumento nas produções de metano e de dióxido de carbono, apesar de ter ocorrido redução nos seus valores percentuais. Com o oxigênio e o

nitrogênio, o aumento da produção total de gás conduziu a redução dos mesmos, tanto na proporção quanto na produção.

Palavras-Chave: fermentação, meio ambiente, nutrição, ração, rúmen, ruminantes

3.2. Introdução

Os ruminantes têm sido acusados atualmente de serem um dos maiores responsáveis pela destruição da camada de ozônio e pelo aquecimento global da Terra, devido à liberação de quantidades consideráveis de gases na atmosfera. Estratégias para reduzir esse aquecimento e aumentar a produtividade animal requerem novos sistemas de produção, onde devem ser consideradas as emissões de metano e de outros gases que possam provocar danos ao meio ambiente.

O metano é produzido em condições anaeróbias por bactérias metanogênicas presentes no ambiente ruminal, sendo modulado principalmente pela presença de dióxido de carbono e de hidrogênio livres no ambiente ruminal onde, a partir destes, ocorre a formação de metano por microrganismos metanogênicos (LASSEY et al., 1997). O excesso de hidrogênio produzido durante a fermentação de carboidratos e proteínas para subsequente formação de ácidos graxos voláteis (acetato e butirato) é utilizado para o crescimento microbiano, biohidrogenação de ácidos graxos insaturados e produção de ácido graxo glicogênico (propionato e valerato), sendo assumido que o restante seria completamente utilizado para a produção de metano (BENCHAAAR et al., 2001). Os carboidratos podem influenciar a quantidade de metano produzido no rúmen, onde os fibrosos, como a hemicelulose e a celulose, podem resultar em maior proporção de metano durante a fermentação do que os não fibrosos (WILKERSON et al., 1995). Além disso, a qualidade da fibra pode exacerbar ou limitar a quantidade e qualidade dos gases produzidos durante a fermentação ruminal.

Parece ser viável intervenções na ração dos animais objetivando a otimização do processo de fermentação ruminal e, conseqüentemente, redução da produção de metano por unidade de produto animal, tanto tecnicamente quanto na prática. Pouco se sabe a respeito da influência de volumosos de pior ou melhor qualidades nutricionais, associados a diferentes proporções de concentrados, sobre a quantidade dos principais gases produzidos durante a fermentação no rúmen dos bovinos. Com o avanço tecnológico da nutrição animal, alternativas alimentares abrangendo diferentes relações volumoso:concentrado associadas a diferentes ingredientes estão sendo pesquisadas objetivando a máxima eficiência alimentar com conseqüente aumento da produção bovina (GALATI et al., 2002).

A técnica de produção de gás é fundamentada na simulação das fermentações ruminais em frascos de vidro inoculados com microrganismos ruminais, sendo que o gás produzido pode ser medido em intervalos pré-determinados (MAURICIO et al, 1998).

Desta forma, este trabalho objetivou avaliar a produção total de gás e as proporções e produções de metano, dióxido de carbono e oxigênio resultantes da fermentação “in vitro” do líquido ruminal de bovinos alimentados com rações com diferentes relações volumoso:concentrado (70, 50 ou 30% de volumoso) e com volumosos de duas qualidades nutricionais, quando foram adicionados o volumoso, o concentrado, o volumoso+concentrado ou nenhum destes substratos ao mesmo.

3.3. Material e Métodos

Foram utilizados seis bovinos mestiços (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*) canulados no rúmen, com peso médio de 550 kg e aproximadamente três anos e meio de idade. O experimento foi conduzido em seis períodos, onde cada animal recebeu ao acaso uma das seis rações experimentais. Cada período teve duração de dez dias, sendo sete de adaptação e três de colheitas, que foram feitas no oitavo e no décimo dia, usadas como repetição.

Seis rações foram confeccionadas, uma para cada tratamento experimental (Tabela 1), com diferentes relações volumoso(V):concentrado(C) (70V:30C, 50V:50C ou 30V:70C) e diferentes fenos de capim-coastcross (*Cynodon dactylon* L. Pers., cultivar coastcross), um considerado melhor e outro de pior qualidade nutricional (Tabela 2), ambos moídos em partículas de aproximadamente 2 cm.

As rações apresentavam a mesma relação (31,7) entre energia metabolizável fermentável no rúmen (Mcal) e proteína degradável (g) (Tabela 3). Os animais receberam as rações em duas refeições diárias, de 4,5 kg de matéria seca (MS) cada, às 7h30min e às 18h30min. A quantidade de alimento fornecida foi estabelecida em função do consumo máximo diário verificado na ração com a maior porcentagem do volumoso de pior qualidade nutricional, de forma a não permitir sobra.

Tabela 1. Composição das rações experimentais fornecidas diariamente aos animais.

Ração experimental		Ingrediente (em kg de matéria natural)					
Relação V:C ¹	Qualidade do volumoso	Feno	Milho moído	Casca do grão de soja	Farelo de girassol	Uréia	Sal mineral
70:30	FR ²	7,00	1,00	1,33	0,67	0,07	0,04
	FB ³	7,00	1,00	1,33	0,67	0,00	0,04
50:50	FR	5,00	3,08	1,28	0,64	0,07	0,04
	FB	5,00	3,08	1,28	0,64	0,02	0,04
30:70	FR	3,00	5,09	1,27	0,64	0,06	0,04
	FB	3,00	5,09	1,27	0,64	0,03	0,04

¹Relação V:C = relação volumoso:concentrado; ²FR = feno de pior qualidade nutricional;

³FB = feno de melhor qualidade nutricional

Tabela 2. Composição bromatológica e qualitativa dos ingredientes das rações experimentais.

Ingrediente	Matéria seca (%)	Na matéria seca ¹							
		Em %						Em Mcal/kg	
		PB	PD	NDT	EE	FDN	FDA	EM	EMfe ²
Feno pior	92,4	4,0	2,2	51	1,6	81,9	47,9	1,76	1,70
Feno melhor	91,8	10,4	6,2	56	2,2	76,4	43,6	2,07	1,99
Milho moído	89,1	10,0	7,5	89	3,7	28,0	2,8	3,65	3,52
Casca do grão de soja	90,9	13,3	10,2	84	2,3	72,5	50,0	3,26	3,18
Farelo de girassol	91,8	30,8	12,3	66	3,3	55,2	39,2	2,40	2,28
Uréia	99,0	282	282	0	0	0	0	0	0
Sal mineral	95,0	0	0	0	0	0	0	0	0

¹PB = Proteína Bruta; PD = Proteína Degradável; NDT = Nutrientes Digestíveis Totais estimados;

EE = Extrato Etéreo; FDN = Fibra em detergente Neutro; FDA = Fibra em Detergente Ácido;

EM = Energia Metabolizável; EMfe = Energia Metabolizável Fermentável;

²Estimada pela seguinte fórmula: EMfe = EM - (0,035 x EE) (AFRC, 1993)

Tabela 3. Parâmetros nutricionais das diferentes rações experimentais, na matéria seca.

	Relação volumoso (V):concentrado (C)					
	70V:30C		50V:50C		30V:70C	
Qualidade do volumoso	FR	FB	FR	FB	FR	FB
% PB ¹	9,7	12,1	10,8	12,5	12,0	13,0
% NDT ²	59,5	63,2	67,4	70,1	75,3	76,8
Relação NDT:PB	6,15	5,24	6,22	5,59	6,29	5,92
Relação NDT:PD ³	8,96	8,63	8,62	8,44	8,40	8,31
Relação EMfe ⁴ :PD	31,42	31,42	31,39	31,39	31,44	31,44

FR = Feno de pior qualidade nutricional; FB = feno de melhor qualidade nutricional;

¹Proteína Bruta; ²Nutrientes Digestíveis Totais; ³Proteína Degradável;

⁴Energia Metabolizável Fermentável

No cálculo dos teores de nutrientes digestíveis totais (NDT) utilizados nas Tabelas acima, foram utilizadas as equações de regressão para as classes de alimentos 1 e 4 propostas por SCHNEIDER et al. (1952) para a espécie bovina.

A classe 1 inclui todas as forrageiras e volumosos cortados e secos (forrageiras secas e grosseiras (volumosos), feno de leguminosa ou não leguminosa, palha, forragem (parte aérea sem espigas, palhas e inflorescências) e outros produtos com mais de 18% de fibra, cascas). Além disso, produtos como a casca de amendoim, casca de caroços de algodão e de

aveia também são classificados como volumosos e incluídos neste classe (McDOWELL et al., 1974). Para esta classe, a seguinte fórmula foi utilizada para estimar o teor de NDT:

$$\text{NDT} = 92,464 - 3,338(\text{FB}) - 6,945(\text{EE}) - 0,762(\text{ENN}) + 1,115(\text{PB}) + 0,031(\text{FB})^2 - 0,133(\text{EE})^2 + 0,036(\text{FB})(\text{ENN}) + 0,207(\text{EE})(\text{ENN}) + 0,1(\text{EE})(\text{PB}) - 0,022(\text{EE})^2(\text{PB})$$

A classe de alimentos 4 inclui os alimentos energéticos, tais como grãos de cereais, com baixos teores de celulose, frutas, nozes e raízes, além de outros produtos com menos de 20% de proteína bruta e menos de 18% de fibra bruta (McDOWELL et al., 1974). Para esta classe, a seguinte fórmula foi utilizada para estimar o teor de NDT:

$$\text{NDT} = -202,686 - 1,357(\text{FB}) + 2,638(\text{EE}) + 3,003(\text{ENN}) + 2,347(\text{PB}) + 0,046(\text{FB})^2 + 0,647(\text{EE})^2 + 0,041(\text{FB})(\text{ENN}) - 0,081(\text{EE})(\text{ENN}) + 0,553(\text{EE})(\text{PB}) - 0,046(\text{EE})^2(\text{PB})$$

As colheitas de líquido ruminal e os processamentos dos mesmos desde a incubação até as mensurações quantitativas e qualitativas dos gases produzidos e os cálculos para as Condições Normais de Temperatura e Pressão (CNTP) foram efetuados conforme exposto no Capítulo 2. Neste caso, para cada animal foram usadas quatro garrafas com 800 mL de líquido ruminal em cada uma das duas colheitas (repetições) por período experimental. Na primeira garrafa foram adicionados 10 g do respectivo volumoso (pior ou melhor), na segunda, 10 g do concentrado utilizado na respectiva ração e, na terceira, 10 g da ração (volumoso+concentrado). Na quarta garrafa nada se adicionou, sendo utilizada como “controle”.

O experimento foi conduzido em um delineamento em quadrado latino com seis períodos. Cada período durou dez dias, sendo sete dias de adaptação e três de colheita, sendo duas colheitas: uma no oitavo dia e outra no décimo (repetição).

Para a análise estatística dos dados, para cada substrato avaliado (“controle”, volumoso, concentrado ou volumoso+concentrado) foi utilizado o

delineamento em quadrado latino com seis períodos (tratamentos experimentais). Para a avaliação dos diferentes substratos dentro de um mesmo tratamento experimental, foi utilizado o delineamento em blocos casualizados, com quatro tratamentos (diferentes substratos) e seis repetições (animais), onde os blocos controlaram os efeitos dos diferentes períodos experimentais. As análises em quadrado latino foram efetuadas com auxílio da planilha eletrônica EXCEL da Microsoft®, enquanto que para as em Blocos Casualizados, foi utilizado o programa computacional ESTAT, desenvolvido pelo Pólo Computacional do Departamento de Ciências Exatas da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, campus de Jaboticabal, SP.

3.4. Resultados e Discussão

3.4.1. Produção Total de Gás

A maior produção de gás foi verificada nos líquidos ruminais oriundos dos animais que receberam as rações 30V:70C, independente do substrato adicionado (Figura 1a). Nas amostras onde não se adicionou nenhum substrato (“controles”), foi verificada grande diferença entre os tratamentos experimentais, sendo esta de aproximadamente 225% entre as rações 70V:30C e 30V:70C, enquanto que nestas mesmas amostras, quando os concentrados foram adicionados como substrato, a diferença foi menor (35%). Entretanto, as produções totais foram baixas quando comparadas às obtidas na presença de qualquer dos substratos estudados.

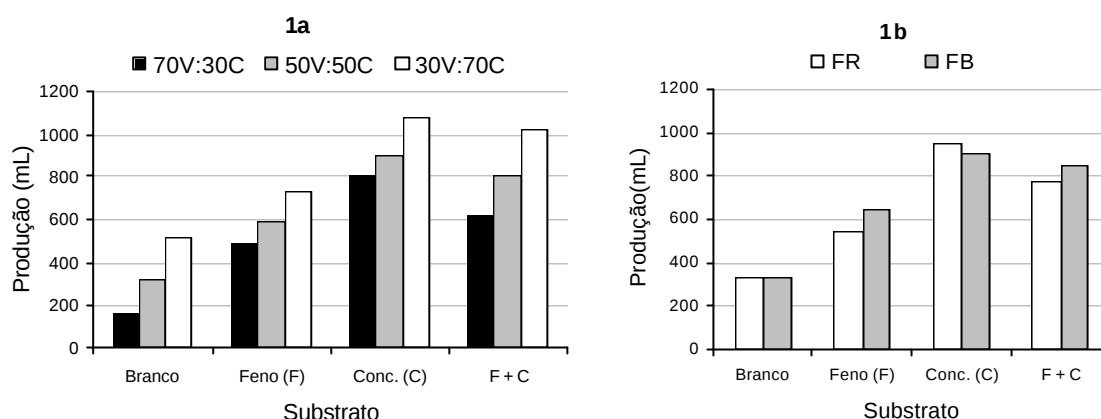


Figura 1. Produção de gás (em mL) devida à adição de diferentes substratos ao líquido ruminal de bovinos alimentados com rações com diferentes relações volumoso(V):concentrado(C) (1a) e com volumosos de pior (FR) ou melhor qualidades nutricionais (FB) (1b).
Conc. = Concentrado.

3.4.1.1. Efeito do Concentrado

As maiores produções de gás foram verificadas nos líquidos ruminais onde foram adicionados somente os substratos concentrado. Quando se adicionou o substrato volumoso+concentrado, as produções de gás foram intermediárias aos dos substratos volumoso e concentrado, sendo que, nos animais que receberam as rações 50V:50C e 30V:70C, as médias para estes substratos foram mais próximas às verificadas para o substrato concentrado, enquanto que nos animais que receberam a ração 70V:30C, este valor se aproximou mais da média verificada para o substrato volumoso.

3.4.1.2. Efeito da Qualidade do Volumoso

Os líquidos ruminais dos animais alimentados com o volumoso de melhor qualidade nutricional apresentaram maior produção total de gás quando se adicionaram os substratos volumoso ou volumoso+concentrado aos líquidos ruminais (Figura 1b). Os animais alimentados com este volumoso apresentaram produção de gás para o substrato volumoso+concentrado mais

próximo à produção verificada para o substrato concentrado do que para o substrato volumoso, sendo que, neste caso, o substrato volumoso+concentrado proporcionou maior produção de gás. O substrato concentrado proporcionou maior produção de gás nos líquidos ruminais oriundos dos animais alimentados com o volumoso de pior qualidade nutricional, contrariamente ao obtido com os substratos volumoso ou volumoso+concentrado, conforme já descrito.

Analisando os valores médios obtidos em cada tratamento experimental (Tabela 4 e Figura 2), foram verificadas diferenças ($P < 0,05$) nas seguintes situações para cada substrato adicionado ao meio: para o “controle”, as rações 30V:70C proporcionaram maiores produções de gás em comparação às 70V:30C, independente da qualidade nutricional do volumoso utilizado na alimentação dos animais, indicando que o líquido ruminal oriundo de animais alimentados com elevadas proporções de concentrado possui propriedades inerentes que o faz produzir gás em maior intensidade do que quando se utiliza líquido ruminal de animais alimentados com elevada ou média proporções de volumosos; para o substrato volumoso, a ração 30V:70C nos animais alimentados com o volumoso de melhor qualidade nutricional proporcionou maior produção de gás do que os animais alimentados com o volumoso de pior qualidade nutricional na ração 70V:30C; para o substrato concentrado, a ração 30V:70C nos animais alimentados com o volumoso de pior qualidade nutricional proporcionou maior produção de gás do que os animais alimentados com o volumoso de pior qualidade nutricional na ração 70V:30C e; para o substrato volumoso+concentrado, a ração 30V:70C proporcionou maior produção de gás, independente da qualidade nutricional do volumoso utilizado na alimentação dos animais, do que os animais alimentados com o volumoso de pior qualidade nutricional na ração 70V:30C.

Tabela 4. Produção de gás “in vitro” (em mL) no líquido ruminal de bovinos alimentados com volumosos de pior (FR) ou de melhor qualidades nutricionais (FB) e submetidos a rações com diferentes relações volumoso(V):concentrado(C), como inoculantes de diferentes substratos.

Substrato	Tratamento experimental						Média	CV (%)
	70V:30C		50V:50C		30V:70C			
	FR	FB	FR	FB	FR	FB		
“Controle”	150 ^{Bd}	169 ^{Bc}	320 ^{ABd}	326 ^{ABc}	535 ^{Ab}	508 ^{Ac}	335	38,69
Volumoso (V)	401 ^{Cc}	536 ^{BCb}	570 ^{ABCc}	610 ^{ABCb}	658 ^{ABb}	797 ^{Ab}	595	23,33
Conc. ¹ (C)	782 ^{Ba}	816 ^{ABa}	923 ^{ABa}	875 ^{ABa}	1141 ^{Aa}	1018 ^{ABa}	926	20,01
V + C	527 ^{Bb}	707 ^{ABa}	766 ^{ABb}	840 ^{ABa}	1048 ^{Aa}	986 ^{Aa}	812	24,14
Média	465	557	645	663	846	827	--	--
CV (%)	9,60	12,69	10,80	19,24	12,93	10,97	--	--

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, dentro de cada coluna, e de letras maiúsculas, dentro de cada linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Conc.¹ = Concentrado.

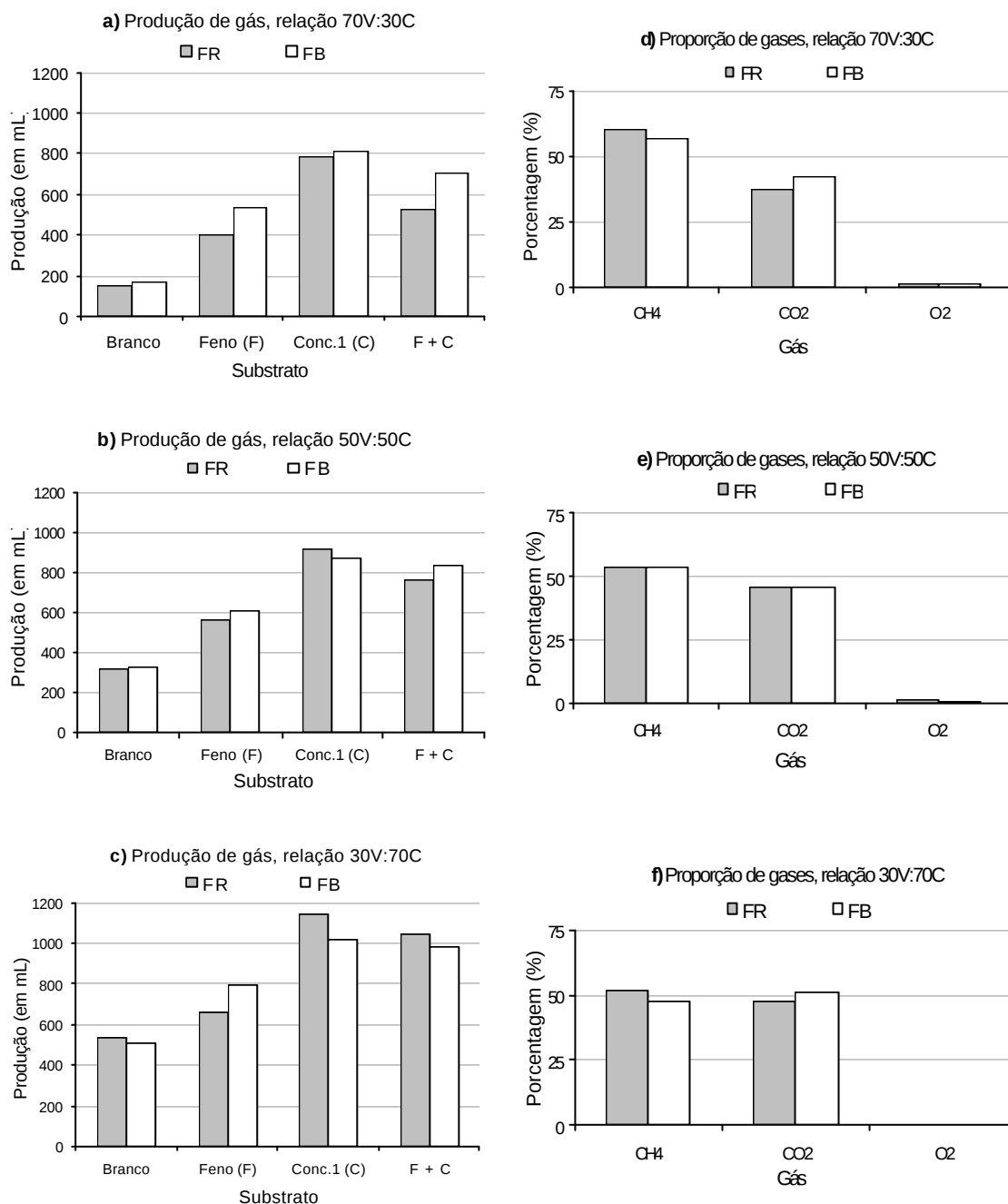


Figura 2. Produção de gás "in vitro" (em mL) no líquido ruminal de bovinos alimentados com volumosos de pior (FR) ou melhor qualidades nutricionais (FB) e submetidos a rações com diferentes relações volumoso(V):concentrado(C), como inoculante de diferentes substratos.

O volumoso de melhor qualidade nutricional na ração 30V:70C proporcionou maior produção de gás do que o de pior qualidade nutricional na

ração 70V:30C ($P<0,05$). Entretanto, quando se utilizou o substrato concentrado, o volumoso de pior qualidade nutricional nas ração 30V:70C proporcionou maior produção de gás do que o mesmo volumoso na ração 70V:30C.

Esses resultados indicam que o concentrado da ração tem maior influência na produção de gás quando o volumoso utilizado na alimentação dos animais é de pior qualidade nutricional. O concentrado parece ser melhor digerido quando em altas proporções nas rações com o volumoso de pior qualidade nutricional. A inclusão de volumoso de melhor qualidade nutricional em alta proporção resultou na mesma produção total de gás via concentrado do que quando se utilizou concentrado em alta proporção. Estes resultados confrontam com o secular conceito de que a fermentação de volumosos e de concentrados são decorrentes de vias metabólicas e de microrganismos distintos dentro das condições ruminais.

Quando se incubou o substrato volumoso+concentrado, a qualidade do volumoso não mais influenciou a produção de gás, sendo que os líquidos ruminais oriundos de animais alimentados com rações com altas proporções de concentrado, tanto com os volumosos de pior ou de melhor qualidades nutricionais, apresentaram maiores produções de gás do que o líquido ruminal oriundo de animais alimentados com rações com baixas proporções de concentrado e volumoso de pior qualidade nutricional ($P<0,05$) (Tabela 4).

Os líquidos ruminais dos animais que receberam as rações com a mesma relação V:C, não apresentaram efeito da qualidade dos volumosos para nenhum dos substratos ou para o “controle”, corroborando com as deduções já efetuadas.

Ainda na Tabela 4, pode-se estimar teoricamente, através dos valores de produção total de gás observados para os substratos volumoso e concentrado isoladamente, qual a produção esperada no substrato volumoso+concentrado em cada tratamento experimental, considerando as proporções de volumoso e de concentrado em cada um deles, verifica-se que os valores estimados são sempre inferiores aos realmente mensurados. Isto estaria indicando, provavelmente, a existência de um efeito sinérgico entre

esses substratos. Quando foi utilizado o volumoso de pior qualidade nutricional, estas diferenças foram pequenas, com média de 3,28%, sendo de 2,28, 2,61 e 4,96% nas rações 70V:30C, 50V:50C e 30V:70C, respectivamente. Quando foi utilizado o volumoso de melhor qualidade nutricional, estas diferenças foram maiores, com média de 9,18%, sendo de 12,31, 11,67 e 3,55% nas rações 70V:30C, 50V:50C e 30V:70C, respectivamente. Resumidamente, foi verificado que quando se utilizou o volumoso de melhor qualidade nutricional, maior foi a diferença percentual entre as produções teoricamente esperadas e realmente observadas, havendo uma redução nesta diferença com a diminuição do volumoso na ração. Ao contrário, no caso dos animais alimentados com o volumoso de pior qualidade nutricional, houve aumento desta diferença percentual entre as produções teoricamente esperadas e realmente observadas com a redução do volumoso na ração. Isto indica que quem produz essa diferença entre os valores de produção total de gás observados e os esperados é o volumoso.

Analisando as Figuras 2d, 2e e 2f, é verificado que a maior diferença entre os volumosos de melhor e de pior qualidades nutricionais ocorreu na ração com maior proporção de volumoso (70V:30C). Na ração 30V:70C, não foi verificada grande diferença, sugerindo que a composição dos distintos concentrados, um para os animais alimentados com o volumoso de melhor qualidade nutricional e outro para os animais alimentados com o volumoso de pior qualidade nutricional, não resultou em diferença nítida na produção total de gás “in vitro” como observado para os diferentes volumosos. Tais ocorrências corroboram a afirmação descrita acima sobre o maior efeito do volumoso na produção qualitativa de gás do que do concentrado, assim como a existência de efeitos sinérgicos.

Desta forma, fica evidente a dificuldade de se trabalhar com estimativas no ambiente ruminal, devido, provavelmente, às intensas interações microbiológicas e químicas existentes.

Para a produção total de gás, dentro do delineamento em quadrado latino utilizado neste experimento, não se verificou efeito de linhas (representado pelos diferentes animais utilizados no experimento), denotando a

similaridade existente entre os mesmos. Entretanto, existiram diferenças entre colunas (representado pelos diferentes períodos experimentais), denotando a importância de se tentar isolar (bloquear) os seus efeitos sobre os resultados nos delineamentos estatísticos utilizados em experimentos desta natureza.

Os coeficientes de variação variaram de 9,6 a 38,7%, denotando a importância de se trabalhar com o máximo de repetições e com a maior quantidade de líquido ruminal possíveis na tentativa de minimizar o erro experimental. O maior coeficiente de variação foi verificado no substrato “controle” (38,69%). Para os demais substratos, variou de 20,41 a 24,14, enquanto que, entre as diferentes relações volumoso:concentrado, variou de 9,60 a 19,24%, valores estes considerados baixos para experimentos desta natureza.

3.4.2. Proporções de Metano, Dióxido de Carbono e Oxigênio no Gás Produzido

Observando a Tabela 5 e a Figura 3, verifica-se que os animais que receberam a ração 70V:30C apresentaram maiores proporções médias de metano (CH_4) e de oxigênio (O_2) e menor de dióxido de carbono (CO_2) do que as rações 50V:50C e 30V:70C, sendo que entre estas últimas, as diferenças foram menores.

Em uma extensa revisão sobre a produção de metano por ruminantes, MOSS (2000) relatou que o tipo de ração oferecida aos ruminantes pode ter uma grande influencia na produção de metano. A relação volumoso:concentrado pode influenciar a fermentação ruminal, sendo esperado menor proporção de metano com o aumento da proporção de concentrados na ração (FAHEY & BERGER, 1993). VAN SOEST (1994) indicaram que rações ricas em grãos e/ou a adição de carboidratos solúveis influenciaram os parâmetros fermentativos no rúmen, com aumento da taxa de passagem, redução do pH e eliminação ou inibição de algumas populações de protozoários ciliados e bactérias metanogênicas.

Tabela 5. Proporções de metano (% CH₄), dióxido de carbono (% CO₂) e oxigênio (% O₂) “in vitro” no líquido ruminal de bovinos submetidos a rações com diferentes relações volumoso(V):concentrado(C) e com volumosos de pior (FR) ou melhor qualidades nutricionais (FB).

Substrato	Tratamento Experimental						Média	CV (%)
	70V:30C		50V:50C		30V:70C			
	FR	FB	FR	FB	FR	FB		
% CH ₄								
“Controle”	71,5 ^{Aa}	70,4 ^{ABa}	63,5 ^{ABCa}	61,1 ^{BCDa}	58,5 ^{CDa}	51,9 ^{Da}	62,8	9,15
Volumoso (V)	61,9 ^{Aab}	58,3 ^{ABb}	54,8 ^{ABb}	53,6 ^{ABb}	57,0 ^{ABa}	51,1 ^{Ba}	56,4	9,89
Conc. ¹ (C)	51,8 ^{Ab}	50,3 ^{Ab}	45,3 ^{Ac}	49,2 ^{Ab}	44,9 ^{Ab}	46,9 ^{Aa}	48,1	10,18
V + C	56,9 ^{Ab}	49,7 ^{ABb}	50,1 ^{ABc}	51,3 ^{ABb}	46,2 ^{Bb}	42,1 ^{Ba}	49,4	11,66
Média	60,6	57,2	53,4	53,8	51,7	48,0	---	---
CV (%)	12,56	9,83	9,36	6,24	7,25	14,92	---	---
% CO ₂								
“Controle”	24,1 ^{Db}	28,8 ^{CDc}	35,1 ^{BCC}	37,9 ^{ABCb}	40,8 ^{ABb}	47,2 ^{Aa}	35,6	16,16
Volumoso (V)	36,6 ^{Bab}	40,8 ^{ABb}	44,5 ^{ABb}	45,8 ^{Aa}	42,2 ^{ABb}	48,4 ^{Aa}	43,1	12,03
Conc. (C)	47,6 ^{Aa}	49,2 ^{Aab}	54,3 ^{Aa}	50,3 ^{Aa}	54,7 ^{Aa}	52,3 ^{Aa}	51,4	9,60
V + C	42,1 ^{Ba}	49,6 ^{Aa}	49,4 ^{ABab}	48,3 ^{ABa}	53,4 ^{Aa}	57,5 ^{Aa}	50,1	11,62
Média	37,6	42,1	45,8	45,6	47,8	51,3	---	---
CV (%)	20,65	12,51	11,11	7,44	8,61	14,02	---	---
% O ₂								
“Controle”	3,99 ^{Aa}	2,57 ^{Ba}	1,40 ^{Ca}	1,08 ^{CDa}	0,51 ^{Dea}	0,36 ^{Ea}	1,65	23,09
Volumoso (V)	1,44 ^{Ab}	0,91 ^{ABb}	0,68 ^{BCb}	0,54 ^{BCb}	0,48 ^{Bca}	0,33 ^{Cab}	0,73	42,34
Conc. (C)	0,67 ^{Ac}	0,61 ^{ABc}	0,43 ^{BCb}	0,45 ^{ABCb}	0,36 ^{Ca}	0,24 ^{Cc}	0,46	27,21
V + C	0,93 ^{Abc}	0,66 ^{ABc}	0,50 ^{BCb}	0,46 ^{BCb}	0,35 ^{Bca}	0,29 ^{Cbc}	0,53	35,63
Média	1,76	1,18	0,75	0,63	0,43	0,31	---	---
CV (%)	19,30	12,10	32,32	24,10	23,29	12,33	---	---

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, dentro de cada coluna e de cada gás, e de letras maiúsculas, dentro de cada linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). ¹Conc. = concentrado

A adição do substrato concentrado aos líquidos ruminais de todos os tratamentos experimentais resultou em produção de gás com menores proporções de CH₄ e de O₂ e maior proporção de CO₂ em comparação aos “controles”, independente da relação V:C, o que indica que mesmo havendo disponibilidade de CO₂ (Figura 3c), não houve transformação acentuada deste em CH₄, talvez devido a presença de poucas bactérias metanogênicas nestes casos e/ou pouca atividade das mesmas.

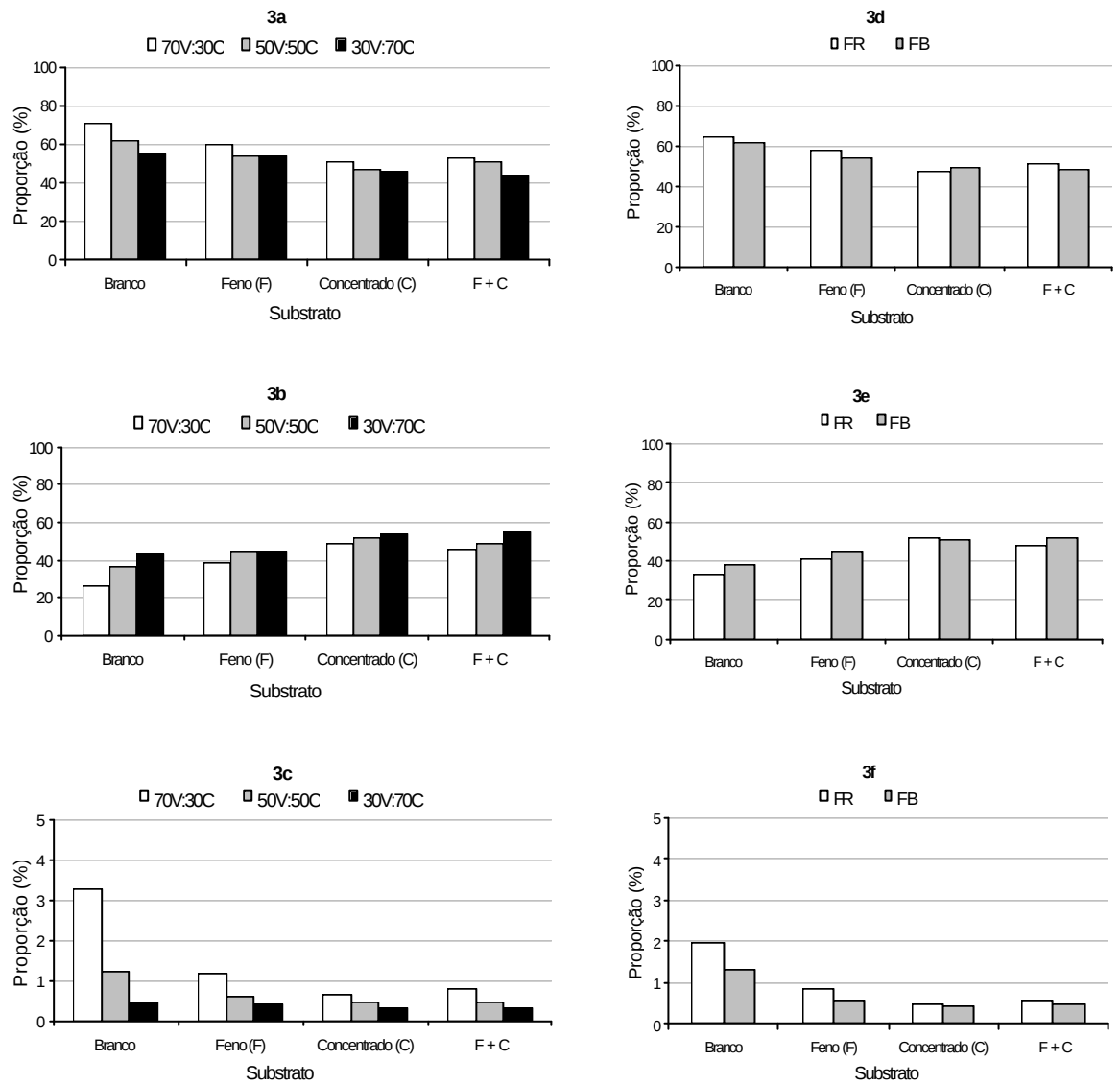


Figura 3. Proporções de metano, dióxido de carbono e oxigênio devido à adição de diferentes substratos ao líquido ruminal em bovinos alimentados com rações com diferentes relações volumoso(V) : concentrado(C) e com volumosos de pior (FR) ou de melhor qualidades nutricionais (FB).

A produção de dióxido de carbono durante a fermentação de um substrato resulta de duas fontes: a) direto dos passos metabólicos, como a descaboxilação oxidativa do piruvato e; b) das reações dos produtos finais da

fermentação (ácidos graxos voláteis) com o bicarbonato da solução tampão (produção indireta de gás) (BEUVINK & SPOELTRA, 1992). MENKE & STEINGASS (1988) propuseram que o CO_2 gerado no processo fermentativo pode ser capturado pelo NH_4 , formando NH_4HCO_3 , levando a uma subestimação da quantidade produzida.

Na fermentação metanogênica, o hidrogênio produzido por espécies não metanogênicas é utilizado para reduzir CO_2 a CH_4 . Na fermentação não metanogênica, o hidrogênio é utilizado para reduzir CO_2 a acetato. O potencial para produção de acetato através do dióxido de carbono existe no rúmen, mas a produção de metano sempre predomina. Assim, o conhecimento das bases fisiológicas e bioquímicas da produção preferencial de metano através do dióxido de carbono, ao invés de acetato, é um pré-requisito para a manipulação da fermentação ruminal (MILLER, 1995).

Os “controles” apresentaram maiores proporções de CH_4 e de O_2 e menores de CO_2 , com exceção da ração 30V:70C, onde os valores obtidos para os três gases avaliados foram próximos aos verificados nas amostras onde foram adicionados o volumoso. As maiores diferenças entre os “controles” e os demais substratos, para os três gases avaliados, foram verificadas nas rações 70V:30C.

Quando se adicionou o substrato volumoso+concentrado (ração) aos líquidos ruminais, as proporções dos gases oriundos do processo fermentativo foram intermediárias aos verificados para o volumoso ou para o concentrado quando adicionados exclusivamente. Exceção foi verificada para o tratamento 30V:70C, quando o volumoso de melhor qualidade nutricional foi utilizado na alimentação dos animais, onde o substrato volumoso+concentrado resultou em menor proporção de CH_4 , maior de CO_2 e intermediário de O_2 , em comparação aos substratos volumoso ou concentrado exclusivamente.

BENCHAAAR et al. (2001), avaliando estratégias dietéticas para reduzir a produção de CH_4 em ruminantes, verificaram que o aumento na proporção de concentrado resultou em redução de 40% na sua produção e que o uso de forragem mais digestível (menos madura) resultou em redução de 15%. Além disso, segundo SMACCHIA et al. (2000), as diferenças na quantidade de

metano emitida por bovinos dependem, entre outros fatores, do tipo de carboidratos ingeridos pelos animais, além da quantidade, e das conseqüentes modificações na microflora ruminal.

O volumoso de melhor qualidade nutricional apresentou maior desaparecimento da matéria seca e das fibras em detergentes neutro e ácido após as 12 horas de incubação “in situ” (Tabela 6), resultando, desta forma, em maior valor de NDT. Provavelmente, as diferenças principalmente quanto à composição dos carboidratos da parede celular proporcionaram este maior desaparecimento. Geralmente, as rações que possuem alta digestibilidade apresentam menor teor de fibra e maior teor de amido e de lipídeos, que proporcionam redução na emissão de metano, pois, bactérias que fermentam o amido podem competir com as bactérias metanogênicas pelo hidrogênio disponível no rúmen para produzirem grandes quantidades de propionato (RUSSELL, 1998). Esta diferença pode explicar as alterações qualitativas verificadas entre os tratamentos quando os animais foram alimentados com volumosos de diferentes qualidades nutricionais.

Tabela 6. Desaparecimento médio (em %) da matéria seca (MS) e das fibras em detergentes neutro (FDN) e ácido (FDA) dos volumosos de melhor ou pior qualidades nutricionais, após 12 horas de incubação “in situ”.

	MS	FDN	FDA
Volumoso de melhor qualidade nutricional	34,23	18,94	17,46
Volumoso de pior qualidade nutricional	24,38	13,90	5,16

Segundo CHURCH & POND (1977), o metano constitui a maior parte dos gases combustíveis nos ruminantes, correspondendo de 3 a 10% da energia bruta ingerida pelo animal, dependendo da natureza da ração e do nível de consumo de alimentos. Ainda segundo estes mesmos autores, as rações de pior qualidade nutricional produzem maiores proporções de metano e, geralmente, a porcentagem de energia bruta perdida na forma de metano diminui com o aumento no consumo de alimentos.

Em estudos com vacas leiteiras em produção, utilizando a ingestão de ingredientes como variáveis em equações de regressão para estimar a

produção de metano, KIRCHGEBNER et al. (1995) verificaram que o consumo de fibra bruta foi o fator mais importante. A influência da fibra bruta na produção de metano (79 g de metano por quilo de fibra bruta) ocorre pela estimulação das bactérias celulolíticas metanogênicas da microflora ruminal. Pelo contrário, rações contendo altas quantidades de carboidratos facilmente fermentáveis estão associadas com o consumo de hidrogênio para a síntese de propionato. A quantidade de metano produzido está relacionada com os produtos finais obtidos mediante a fermentação dos carboidratos (FAHEY & BERGER, 1993).

A relação inversa verificada entre as proporções de CH_4 e CO_2 na Tabela 5 é esperada, já que, para a produção de CH_4 , as bactérias metanogênicas utilizam o CO_2 presente no ambiente ruminal.

De maneira geral, quando os animais foram alimentados com o volumoso de melhor qualidade, a proporção dos gases oriundos da adição do substrato volumoso+concentrado ao líquido ruminal se assemelhou mais à proporção obtida com o substrato concentrado exclusivamente. Quando alimentados com o volumoso de pior qualidade nutricional, as proporções dos gases apresentaram valores intermediários aos verificados para os substratos volumoso ou concentrado exclusivamente. Assim, o padrão de fermentação ruminal quanto à produção de gás se altera na dependência da qualidade do volumoso da ração. A degradabilidade dos ingredientes pode não ser modificada, mas, provavelmente, o desempenho animal refletirá essas mudanças.

Os maiores coeficientes de variação ocorreram nas análises de O_2 , provavelmente devido a pequena participação deste gás no ambiente ruminal, o que tornou a sua quantificação mais difícil em comparação aos outros dois gases avaliados e, desta forma, mais sujeita à variações. Com exceção para o teor de O_2 no tratamento 30V:70C, quando foi utilizado o volumoso de melhor qualidade nutricional foi verificado efeito significativo ($P < 0,05$) de bloco experimental, denotando a importância de se bloquear os diferentes períodos experimentais dentro do delineamento experimental.

3.4.3. Produções de Metano, Dióxido de Carbono e de Oxigênio no Líquido Ruminal e Correlações com a Produção Total de Gás

Na Tabela 7 encontra-se as produções de metano, dióxido de carbono e oxigênio “in vitro” no líquido ruminal de bovinos submetidos a rações com diferentes relações volumoso:concentrado e volumosos de pior ou melhor qualidades nutricionais, enquanto que na Tabela 8 encontra-se as equações de regressão relacionando a produção total de gases com as produções e as proporções molares de metano, dióxido de carbono, oxigênio e nitrogênio, considerando os diferentes substratos adicionados ao líquido ruminal.

Analisando as equações de regressão, é verificado que com o aumento da produção total de gás durante o processo fermentativo, ocorreu, também, um aumento nas produções de metano e de dióxido de carbono, apesar de que, no caso do metano, haver exceção para o substrato “controle”.

Para os gases metano e dióxido de carbono, houve uma alta correlação entre produção total de gás e produção destes gases, enquanto que a correlação entre a produção total de gás e as proporções destes foi ligeiramente inferior.

Para o oxigênio e o nitrogênio, o aumento da produção total de gás conduziu a uma redução tanto na proporção destes no gás quanto nas suas produções individuais, com exceção para o substrato ração, que foi o que apresentou menores correlações, tanto para a produção de oxigênio como para a produção de nitrogênio (0,29 e 0,11, respectivamente). Para as proporções de dióxido de carbono, de oxigênio e de nitrogênio, o substrato ração também foi que apresentou menores valores de correlação em relação aos demais substratos avaliados.

Tabela 7. Produções de metano (mL CH₄), dióxido de carbono (mL CO₂) e oxigênio (mL O₂) “in vitro” no líquido ruminal de bovinos submetidos a rações com diferentes relações volumoso(V):concentrado(C) e volumosos de pior (FR) ou melhor qualidades nutricionais (FB).

Substrato	Tratamento Experimental						Média	CV (%)
	70V:30C		50V:50C		30V:70C			
	FR	FB	FR	FB	FR	FB		
mL CH ₄								
“Controle”	107 ^{Bc}	119 ^{Bc}	205 ^{ABc}	197 ^{ABb}	309 ^{Ab}	263 ^{Ab}	200	36,38
Volumoso (V)	248 ^{Bb}	314 ^{ABb}	317 ^{ABb}	325 ^{ABa}	335 ^{ABb}	394 ^{Aa}	322	19,03
Conc. ¹ (C)	404 ^{Ba}	412 ^{ABa}	421 ^{ABa}	434 ^{ABa}	519 ^{Aa}	466 ^{ABa}	442	14,46
V + C	293 ^{Bb}	354 ^{ABab}	389 ^{ABab}	431 ^{ABa}	490 ^{Aa}	429 ^{ABa}	398	20,75
Média	263	300	333	347	413	388	---	---
CV (%)	17,39	17,73	14,42	21,57	20,47	17,61	---	---
mL CO ₂								
“Controle”	36 ^{Cc}	50 ^{Cc}	122 ^{BCd}	125 ^{ABCc}	223 ^{ABc}	241 ^{Ac}	131	49,86
Volumoso (V)	147 ^{Bb}	217 ^{Bb}	250 ^{ABc}	281 ^{ABb}	302 ^{ABb}	399 ^{Ab}	266	35,38
Conc. (C)	374 ^{Ba}	399 ^{ABa}	498 ^{ABa}	438 ^{ABa}	618 ^{Aa}	595 ^{ABa}	478	26,62
V + C	229 ^{Cb}	348 ^{BCa}	374 ^{BCb}	405 ^{ABCa}	554 ^{ABa}	604 ^{Aa}	419	28,70
Média	197	253	311	312	430	470	---	---
CV (%)	28,21	22,04	19,62	23,57	11,58	13,50	---	---
mL O ₂								
“Controle”	6,48 ^{Aa}	4,81 ^{ABa}	3,84 ^{Ba}	3,27 ^{Bab}	3,14 ^{Bab}	3,99 ^{Ba}	4,34	28,33
Volumoso (V)	5,58 ^{Aa}	4,79 ^{ABa}	3,58 ^{Ca}	2,98 ^{BCb}	2,87 ^{BCb}	3,76 ^{ABCa}	3,95	27,07
Conc. (C)	5,16 ^{Aa}	4,72 ^{Aa}	3,83 ^{Aa}	3,83 ^{Aa}	4,55 ^{Aa}	4,16 ^{Aa}	4,37	19,25
V + C	4,64 ^{Aa}	4,44 ^{Aa}	3,63 ^{Aa}	3,61 ^{Aab}	3,65 ^{Aab}	3,51 ^{Ba}	3,99	18,65
Média	5,47	4,69	3,67	3,42	3,55	3,86	---	---
CV (%)	20,54	19,68	16,00	14,55	23,89	24,88	---	---

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, dentro de cada coluna e de cada gás, e de letras maiúsculas, dentro de cada linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). ¹Conc. = concentrado

Tabela 8. Equações de regressão relacionando a produção total de gás (valor X das equações, em mL) com as proporções (em %) e produções de metano, dióxido de carbono, oxigênio e nitrogênio (em mL), considerando os diferentes substratos adicionados ao líquido ruminal.

Substrato	Equação	Correlação (r)	Equação	Correlação (r)
% de Metano			mL de Metano	
"Controle"	$Y = 37,31 + 0,0269 X$	0,71	$Y = - 20,9 + 0,5508 X$	0,99
Volumoso (V)	$Y = 53,5 - 0,0062 X$	0,65	$Y = 32,59 + 0,4409 X$	0,99
Conc. (C)	$Y = 57,22 - 0,0132 X$	0,85	$Y = 109,47 + 0,3293 X$	0,97
V + C	$Y = 55,53 - 0,0118 X$	0,70	$Y = 51,06 + 0,3978 X$	0,98
% de Dióxido de Carbono			mL de Dióxido de Carbono	
"Controle"	$Y = 5,61 + 0,0665 X$	0,96	$Y = - 60,95 + 0,5185 X$	0,99
Volumoso (V)	$Y = 15,53 + 0,0391 X$	0,91	$Y = - 149,10 + 0,6647 X$	0,99
Conc. (C)	$Y = 29,52 + 0,0203 X$	0,81	$Y = - 160,56 + 0,6604 X$	0,98
V + C	$Y = 22,5 + 0,03 X$	0,94	$Y = - 141,1 + 0,6511 X$	0,99
% de Oxigênio			mL de Oxigênio	
"Controle"	$Y = 2,56 - 0,0039 X$	0,92	$Y = 3,13 - 0,0004 X$	0,30
Volumoso (V)	$Y = 1,62 - 0,0016 X$	0,86	$Y = 5,68 - 0,0039 X$	0,71
Conc. (C)	$Y = 0,82 - 0,0004 X$	0,47	$Y = 2,14 + 0,0026 X$	0,29
V + C	$Y = 1,16 - 0,0008 X$	0,95	$Y = 4,12 - 0,0006 X$	0,36
% de Nitrogênio			mL de Nitrogênio	
"Controle"	$Y = 54,46 - 0,0895 X$	0,92	$Y = 78,73 - 0,0694 X$	0,89
Volumoso (V)	$Y = 29,31 - 0,0313 X$	0,86	$Y = 112,65 - 0,105 X$	0,80
Conc. (C)	$Y = 12,68 - 0,0069 X$	0,48	$Y = 42,01 + 0,0171 X$	0,11
V + C	$Y = 20,81 - 0,0174 X$	0,95	$Y = 86,42 - 0,0492 X$	0,89

[†]Conc. = concentrado

3.4.4. Potenciais Hidrogeniônicos

Na Tabela 9 e na Figura 4 encontram-se os potenciais hidrogeniônicos (pH) médios devido à adição dos distintos substratos ao líquido ruminal de animais submetidos a rações com diferentes relações volumoso:concentrado e a volumosos de melhor ou pior qualidades nutricionais.

Para os valores de pH não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos experimentais após o período de incubação. Entretanto, entre os substratos, os "controles" apresentaram maiores valores em todos os tratamentos experimentais ($P < 0,05$), com exceção para as rações 30V:70C, que foram semelhantes aos substratos volumosos, independente da qualidade do volumoso utilizado na alimentação dos animais. Entre os demais substratos,

não foram verificadas diferenças. Interessante notar que os valores de pH dos substratos volumoso+concentrado foram próximos ao menor valor registrado para os substratos volumoso ou concentrado isoladamente, sendo que, considerando ser este uma mistura destes substratos (Tabela 1) e que as quantidades de material incubados foram iguais, esperava-se um valor mais intermediário, próximo à média, e não próximo ao menor dos valores verificados para os substratos em separado. Tal comportamento demonstra a complexidade das relações existentes no ambiente ruminal.

Tabela 9. Potenciais hidrogeniônicos médios dos líquidos ruminais após incubação com os distintos substratos por doze horas, em cada tratamento experimental.

Substrato	Tratamento Experimental						Média	CV (%)
	70V:30C		50V:50C		30V:70C			
	FR	FB	FR	FB	FR	FB		
“Controle”	7,07 ^{Aa}	6,98 ^{ABa}	5,97 ^{Ba}	6,51 ^{ABa}	6,00 ^{Ba}	6,00 ^{Ba}	6,42	8,88
Volumoso (V)	6,31 ^{Ab}	6,08 ^{Ab}	5,71 ^{Ab}	6,04 ^{Ab}	5,75 ^{Aab}	5,75 ^{Aab}	5,94	5,97
Conc. ¹ (C)	5,79 ^{Ac}	5,78 ^{ABb}	5,51 ^{ABc}	5,71 ^{ABb}	5,48 ^{Bb}	5,52 ^{ABb}	5,63	3,00
V + C	6,04 ^{Abc}	5,94 ^{ABb}	5,58 ^{BCbc}	5,84 ^{ABCb}	5,55 ^{BCb}	5,54 ^{Cb}	5,75	3,85
Média	6,30	6,19	5,69	6,03	5,69	5,70	---	---
CV (%)	4,19	4,75	1,74	4,60	4,30	2,64	---	---

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, dentro de cada coluna e de cada gás, e de letras maiúsculas, dentro de cada linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Segundo FAHEY & BERGER (1993), as bactérias metanogênicas são muito sensíveis às mudanças nas rações, onde alterações nas taxas de passagem e/ou de fermentação e/ou do pH são fatores que podem alterar a quantidade de hidrogênio disponível no rúmen e, desta forma, a formação de metano.

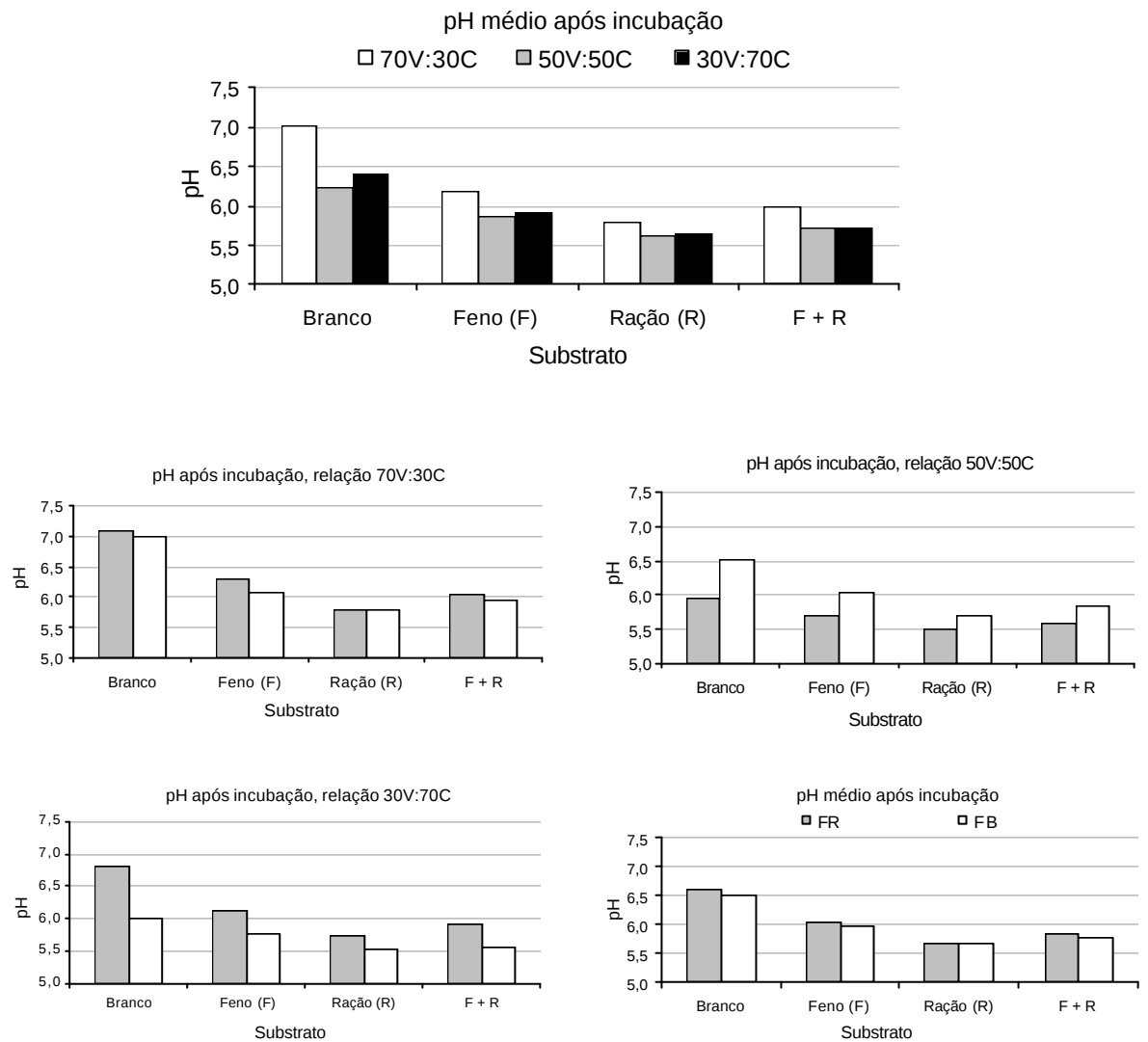


Figura 4. Potenciais hidrogeniônicos médios dos líquidos ruminais colhidos dos animais alimentados com rações com diferentes relações volumoso(V):concentrado (C) e volumosos de pior (FR) ou melhor qualidades nutricionais (FB), após incubação com os distintos substratos por doze horas.

3.5. Conclusões

Maiores porcentagens de concentrado nas rações resultaram em elevadas produções de gás “in vitro”, apresentando menores proporções de metano e de oxigênio e maiores de dióxido de carbono do que quando se utilizou alta porcentagem de volumoso.

Mesmo na ausência de qualquer substrato, o líquido ruminal ainda produziu gases “in vitro”, em especial metano.

Com o aumento da produção total de gás, houve um aumento nas produções de metano e de dióxido de carbono, apesar de ter ocorrido redução nos seus valores percentuais.

Com o oxigênio e o nitrogênio, o aumento da produção total de gás conduziu a redução dos mesmos, tanto na proporção quanto na produção.

3.6. Referências Bibliográficas

(AFRC) AGRICULTURAL FOOD RESEARCH COUNCIL. **Energy and protein requirements of ruminants**. Wallingford, UK: CAB International, 1993. 159p.

BENCHAAAR C.; POMAR, C.; CHIQUETTE, J. Evaluation of dietary strategies to reduce methane production in ruminants: a modeling approach. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 81, p. 563-574, 2001.

BEUVINK, J. M. W.; SPOELTRA, S. F. Interactions between substrate, fermentation end-products, buffering system and gas production upon fermentation of different carbohydrates by mixed rumen microorganisms “in vitro”. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 37, p. 505-509, 1992.

CHURCH, D. C.; POND, W. G. **Bases científicas para la nutrición y alimentación de los animales domésticos**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1977. 462 p.

FAHEY, G. C.; BERGER, L. L. Los carbohidratos en la nutrición de los rumiantes. In: CHURCH, C. D. (Ed.). **El rumiante: fisiología digestiva y nutrición**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1993. p. 305-337.

GALATI, R. L. et al. Concentraciones de los ácidos grasos volátiles en el rumen de bovinos alimentados con diferentes dietas y las estimadas de las emisiones del metano para el medio ambiente. In: CONGRESO NACIONAL DEL MEDIO AMBIENTE, 6., 2002. **Anais...**, 2002. 1 CD-ROM.

KIRCHGEBNER, M.; WINDISCH, W.; MÜLLER, H. L. Nutritional factors for the quantitative of methane production. In: ENGELHARDT, W. V. et al. (Eds.). Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RUMINANT PHYSIOLOGY, 8., 1995. **Proceedings...**, 1995, p. 333-348.

LASSEY, K. R. et al. Methane emissions measured directly from grazing livestock in New Zealand. **Atmospheric Environment**, v. 31, p. 2905-2914, 1997.

MAURICIO, R. M. et al. Uso de líquido do rúmen e fezes como fonte de inóculo para a técnica "in vitro" de produção de gás. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35., 1998. Botucatu. **Anais...** Botucatu: SBZ, 1998, v. 1, p. 314-316.

McDOWELL, L. R. et al. Tabelas de composição de alimentos da América Latina abreviada. Universidade da Flórida. Instituto de Ciências Alimentícias e Agropecuárias. Centro de Agricultura Tropical. Departamento de Zootecnia. 1974, p. 17.

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

MILLER, T. L. Ecology of methane production in the rumen. In: ENGELHARDT, W. V. et al. (Eds.). Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RUMINANT PHYSIOLOGY. 8., 1995. **Proceedings...**, 1995, p.317-329.

MOSS, A. R. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. **Annales de Zootechnie**, v. 49, p. 231-253, 2000.

RUSSELL, J. B. The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production "in vitro". **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 3222-3230, 1998.

SCHNEIDER, B. H. et al. The prediction of digestibility for feeds for which there are only proximate composition data. **Journal of Animal Science**, v. 11, p. 77-83, 1952.

SMACCHIA, A. M.; FIGALLO, R. M.; PIDELLO, A. Producción de metano en rumen "in vitro" de vacas lecheras en pastoreo de alfalfa: efectos tiempo de incubacion y substrato. In: REUNIÓN LATINOAMERICANA DE PRODUCCIÓN ANIMAL, 15., 2000. **Anais...**, 2000. 1 CD-ROM.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476 p.

WILKERSON, V. A. et al. The prediction of methane production of holstein cows by several equations. **Journal Dairy Science**, v. 78, p. 2402-2414, 1995.

4. CAPÍTULO 4 - PARTICIPAÇÃO DE CADA INGREDIENTE CONCENTRADO DA RAÇÃO NA PRODUÇÃO “IN VITRO” DE METANO, DIÓXIDO DE CARBONO, OXIGÊNIO E NITROGÊNIO NO LÍQUIDO RUMINAL DE BOVINOS ALIMENTADOS COM DIFERENTES RAÇÕES

Participação de Cada Ingrediente Concentrado da Ração na Produção “in vitro” de Metano, Dióxido de Carbono, Oxigênio e Nitrogênio no Líquido Ruminal de Bovinos Alimentados com Diferentes Rações

4.1. RESUMO - Este trabalho objetivou avaliar os efeitos dos ingredientes do concentrado de diferentes rações para bovinos sobre a produção “in vitro” de gás e as proporções de metano, dióxido de carbono, oxigênio e nitrogênio. Foram utilizadas seis rações, constituídas por três relações volumoso:concentrado (70, 50 ou 30% de volumoso, na matéria seca) e de dois volumosos de capim-coastcross de diferentes qualidades nutricionais. Os líquidos ruminais foram colhidos de três animais canulados no rúmen adaptados aos alimentos estudados. O tempo de fermentação foi de doze horas e as produções de gases (em mL) foram efetuadas em gasômetros especialmente projetados. As análises dos mesmos foram efetuadas em cromatógrafo gasoso. A utilização do volumoso de melhor qualidade nutricional proporcionou maior produção total de gás “in vitro” ($P < 0,05$) quando associado ao substrato milho na ração 70V:30C (1046 mL *versus* 851 mL, respectivamente) e tendeu a ser menor ($P > 0,05$) para o substrato casca do grão de soja na ração 50V:50C (720 mL *versus* 856 mL, respectivamente). Para o substrato “controle” foram verificadas maiores proporções de metano e de oxigênio e menor de dióxido de carbono. O substrato milho resultou em menores proporções de metano e de oxigênio e maior de dióxido de carbono ($P < 0,05$), independente da qualidade do volumoso utilizado na alimentação dos animais, entretanto resultou em maiores produções médias de metano e de dióxido de carbono, seguido, em ordem decrescente, pelos substratos

concentrado, farelo de girassol, casca do grão de soja e “controle”. O volumoso de pior qualidade nutricional proporcionou maior produção de metano para todos os substratos avaliados.

Palavras-chave: fermentação, meio ambiente, nutrição, rúmen, ruminantes

4.2. Introdução

Até no final da década de 80, na avaliação de alimentos para animais ruminantes, se assumia que existia equilíbrio entre proteína microbiana e suprimento energético, levando-se à conclusão de que os nutrientes disponíveis acima do requerimento para manutenção seriam utilizados com igual eficiência pelo animal (LENG, 1993). Porém, especialmente no caso de ruminantes alimentados com forragens, observações experimentais não comprovaram tais teorias. Foi, então, constatado que a disponibilidade de nutrientes para os microrganismos ruminais é um fator primordial que define o limite superior de produção (McALLISTER et al., 1996).

Caso ocorra uma menor eficiência de crescimento microbiano, resultando em menor síntese de proteína microbiana, ocorrerá uma baixa relação proteína:energia nos nutrientes absorvidos e, conseqüentemente, maior produção de metano. Portanto, a produção de metano em relação à produtividade do ruminante depende de dois fatores: a) eficiência fermentativa no rúmen e; b) eficiência de conversão do alimento em produtos animais que, não somente é dependente da eficiência fermentativa, mas também do balanço de nutrientes absorvidos após a fermentação.

Bovinos submetidos a rações de baixa qualidade perdem de 15 a 18% da energia digestível na forma de metano, ao passo que o fornecimento de rações balanceadas reduz a emissão de metano para 7% (LENG, 1990; LENG, 1993; McALLISTER et al., 1996). Resultados semelhantes podem ser obtidos com o uso de ionóforos (LANA & RUSSELL, 1997), porém, por se tratar de uma classe especial de antibióticos, seu uso continuado tem gerado reações

contrárias por parte de grupos de defesa de consumidores nos países industrializados.

Em uma extensa revisão sobre a produção de metano por ruminantes, MOSS (2000) relatou que algumas características dos alimentos podem alterar a produção de metano. Desta forma, a utilização de ingredientes que resultem em menores produções de metano e que atendam as exigências nutricionais dos animais de maneira eficiente deve ser objeto de estudo.

A eficiência de utilização do alimento por unidade de produto animal poderá ser aumentada com a aplicação de estratégias de alimentação baseadas em princípios nutricionais, podendo contribuir para uma estabilização, ou mesmo redução, da concentração de gases resultantes dos processos digestivos presentes na atmosfera. A concentração de determinados gases na atmosfera tem sido alvo de muitas discussões em todo o mundo e cresce de importância, sendo objeto de negociações entre países. Atualmente, teve destaque na mídia mundial a Convenção das Nações Unidas sobre mudanças do clima, signatários do Protocolo de Kyoto, que culminou em diretrizes a serem seguidas pelos países participantes, objetivando a redução da emissão dos principais gases produtores do “efeito estufa” na atmosfera, entre estes, o metano e o dióxido de carbono.

Segundo levantamento realizado pela Embrapa Meio Ambiente (LIMA et al., 1999), no Brasil, para o ano de 1994, 91% do metano gerado a partir de fontes agrícolas seriam provenientes da fermentação no trato digestivo de ruminantes e mais 4% seriam oriundos do tratamento de resíduos animais.

O metano contribui com, aproximadamente, 19% do aquecimento global causado por atividades humanas (DRENNEN & CHAPMAN, 1992; McALLISTER et al., 1996), porém, este gás é quatro a seis vezes mais potente em gerar calor (efeito termogênico) que o dióxido de carbono (McALLISTER et al., 1996). Devido a esse maior efeito termogênico, a concentração de metano, que tem crescido, nos últimos 30 anos, cerca de 1% ao ano, poderia ser estabilizada por uma redução de suas emissões de 10 a 20%, comparada com uma redução similar de 80 a 85% de dióxido de carbono (LENG, 1993).

Ainda que todos os ruminantes no planeta produzirem apenas 10 a 15% do total das emissões globais de metano, estes representariam uma das poucas fontes deste gás que podem ser manipuladas (VAN SOEST, 1994). Outras fontes significativas de metano são tabuleiros de arroz inundado, pântanos e fontes geo-termais, sendo que a maioria destas últimas são encontradas no fundo dos oceanos.

Garantindo ótimas condições ruminais para o crescimento microbiano, assim como ajustando as rações para que haja o correto balanço de nutrientes absorvidos, o ruminante irá demonstrar seu potencial de produção e, ao mesmo tempo, contribuirá para a estabilização do efeito estufa pela redução da emissão de metano. Para que ambos efeitos sejam atingidos, é necessário garantir o uso de soluções tecnológicas que viabilizem a adoção de rações balanceadas em função da dinâmica da microbiota ruminal.

Com a intenção de se reduzir gastos com a alimentação animal, diversos subprodutos obtidos a partir da industrialização de matérias-primas como milho, soja e girassol, passaram a ser mundialmente estudados e, atualmente, estas novas fontes tem obtido importância no que diz respeito ao impacto ambiental. Cada dejetos ou subproduto representa fatores limitantes peculiares quanto a sua viabilização como alimento para os animais, porém, todos são classificados em duas categorias: volumosos ou concentrados, sendo os concentrados classificados em protéicos e energéticos. Entretanto, esta simples classificação não é suficiente, pois envolve um grande grupo de componentes heterogêneos de nutrientes, sendo necessário, para maior segurança, caracterizá-los quanto a taxa e extensão de digestão, conhecendo os seus produtos finais, assim como os possíveis impactos ambientais (GALATI et al., 2002).

Diante do exposto, este trabalho objetivou avaliar a contribuição dos diferentes ingredientes utilizados na confecção dos concentrados de rações para bovinos (milho, casca do grão de soja e farelo de girassol), em rações com diferentes relações volumoso:concentrado e utilizando de volumosos de duas qualidades nutricionais, sobre a produção total de gás e as proporções e produções de metano, dióxido de carbono, oxigênio e nitrogênio.

4.3. Material e Métodos

Foram utilizados três bovinos mestiços (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*) canulados no rúmen, com peso médio de 450 kg e aproximadamente três anos de idade. O experimento foi conduzido em duas etapas de três períodos, onde cada animal recebeu ao acaso uma das seis rações experimentais. Cada período teve duração de dez dias, sendo sete de adaptação e três de colheitas, que foram feitas no oitavo e no décimo dia, usadas como repetição.

Seis rações foram confeccionadas, uma para cada tratamento experimental (Tabela 1), com diferentes relações volumoso(V):concentrado(C) (70V:30C, 50V:50C ou 30V:70C) e diferentes volumosos de capim-coastcross (*Cynodon dactylon* L. Pers., cultivar coastcross), um considerado de pior e outro de melhor qualidades nutricionais (Tabela 2), ambos moídos em partículas de aproximadamente 2 cm.

Tabela 1. Composição das rações experimentais fornecidas diariamente aos animais.

Ração experimental		Ingrediente (em kg de matéria natural)					
Relação V:C ¹	Qualidade do volumoso	Feno	Milho moído	Casca de soja	Farelo de girassol	Uréia	Sal mineral
70:30	FR ²	7,00	1,00	1,33	0,67	0,07	0,04
	FB ³	7,00	1,00	1,33	0,67	0,00	0,04
50:50	FR	5,00	3,08	1,28	0,64	0,07	0,04
	FB	5,00	3,08	1,28	0,64	0,02	0,04
30:70	FR	3,00	5,09	1,27	0,64	0,06	0,04
	FB	3,00	5,09	1,27	0,64	0,03	0,04

¹Relação V:C = relação volumoso:concentrado; ²FR = feno de pior qualidade nutricional;

³FB = feno de melhor qualidade nutricional

As rações apresentavam a mesma relação (31,7) entre energia metabolizável fermentável no rúmen (Mcal) e proteína degradável (g) (Tabela 3). Os animais receberam as rações em duas refeições diárias, de 4,5 kg de matéria seca (MS) cada, às 7h30min e às 18h30min. A quantidade de alimento fornecida foi estabelecida em função do consumo máximo diário verificado na

ração com a maior porcentagem do volumoso de pior qualidade nutricional, de forma a não permitir sobra.

Tabela 2. Composição bromatológica e qualitativa dos ingredientes das rações experimentais.

Ingrediente	Matéria seca (%)	Na matéria seca ¹							
		Em %						Em Mcal/kg	
		PB	PD	NDT	EE	FDN	FDA	EM	EMfe ²
Feno pior	92,4	4,0	2,2	51	1,6	81,9	47,9	1,76	1,70
Feno melhor	91,8	10,4	6,2	56	2,2	76,4	43,6	2,07	1,99
Milho moído	89,1	10,0	7,5	89	3,7	28,0	2,8	3,65	3,52
Casca do grão de soja	90,9	13,3	10,2	84	2,3	72,5	50,0	3,26	3,18
Farelo de girassol	91,8	30,8	12,3	66	3,3	55,2	39,2	2,40	2,28
Uréia	99,0	282	282	0	0	0	0	0	0
Sal mineral	95,0	0	0	0	0	0	0	0	0

¹PB = Proteína Bruta; PD = Proteína Degradável; NDT = Nutrientes Digestíveis Totais estimados;

EE = Extrato Etéreo; FDN = Fibra em detergente Neutro; FDA = Fibra em Detergente Ácido;

EM = Energia Metabolizável; EMfe = Energia Metabolizável Fermentável;

²Estimada pela seguinte fórmula: EMfe = EM - (0,035 x EE) (AFRC, 1993)

Tabela 3. Parâmetros nutricionais das diferentes rações experimentais, na matéria seca.

Qualidade do volumoso	Relação volumoso (V):concentrado (C)					
	70V:30C		50V:50C		30V:70C	
	FR	FB	FR	FB	FR	FB
% PB ¹	9,7	12,1	10,8	12,5	12,0	13,0
% NDT ²	59,5	63,2	67,4	70,1	75,3	76,8
Relação PB:NDT	6,15	5,24	6,22	5,59	6,29	5,92
Relação PD ³ :NDT	8,96	8,63	8,62	8,44	8,40	8,31
Relação PD:EMfe ⁴	31,42	31,42	31,39	31,39	31,44	31,44

FR = Feno de pior qualidade nutricional; FB = Feno de melhor qualidade nutricional;

¹Proteína Bruta; ²Nutrientes Digestíveis Totais; ³Proteína Degradável;

⁴Energia Metabolizável Fermentável

No cálculo dos teores de nutrientes digestíveis totais (NDT) utilizados nas Tabelas acima, foram utilizadas as equações de regressão para as classes de alimentos 1 e 4 propostas por SCHNEIDER et al. (1952) para a espécie bovina.

A classe 1 inclui todas as forrageiras e volumosos cortados e secos (forrageiras secas e grosseiras (volumosos), volumoso de leguminosa ou não

leguminosa, palha, forragem (parte aérea sem espigas, palhas e inflorescências) e outros produtos com mais de 18% de fibra, cascas). Além disso, produtos como a casca de amendoim, casca de caroços de algodão e de aveia também são classificados como volumosos e incluídos neste classe (McDOWELL et al., 1974). Para esta classe, a seguinte fórmula foi utilizada para estimar o teor de NDT:

$$\text{NDT} = 92,464 - 3,338(\text{FB}) - 6,945(\text{EE}) - 0,762(\text{ENN}) + 1,115(\text{PB}) + 0,031(\text{FB})^2 - 0,133(\text{EE})^2 + 0,036(\text{FB})(\text{ENN}) + 0,207(\text{EE})(\text{ENN}) + 0,1(\text{EE})(\text{PB}) - 0,022(\text{EE})^2(\text{PB})$$

A classe de alimentos 4 inclui os alimentos energéticos, tais como grãos de cereais, com baixos teores de celulose, frutas, nozes e raízes, além de outros produtos com menos de 20% de proteína bruta e menos de 18% de fibra bruta (McDOWELL et al., 1974). Para esta classe, a seguinte fórmula foi utilizada para estimar o teor de NDT:

$$\text{NDT} = -202,686 - 1,357(\text{FB}) + 2,638(\text{EE}) + 3,003(\text{ENN}) + 2,347(\text{PB}) + 0,046(\text{FB})^2 + 0,647(\text{EE})^2 + 0,041(\text{FB})(\text{ENN}) - 0,081(\text{EE})(\text{ENN}) + 0,553(\text{EE})(\text{PB}) - 0,046(\text{EE})^2(\text{PB})$$

O experimento foi conduzido em seis períodos, onde, em cada um destes, cada animal recebeu uma das seis rações experimentais, determinado ao acaso. Cada período durou dez dias, sendo sete dias de adaptação e três de colheita, sendo duas colheitas: uma no oitavo dia e outra no décimo (repetição).

As colheitas de líquido ruminal e os processamentos dos mesmos desde a incubação até às mensurações quantitativas e qualitativas dos gases produzidos e os cálculos para as Condições Normais de Temperatura e Pressão (CNTP) foram efetuados conforme exposto no Capítulo 2. Neste caso, para cada animal foram usadas cinco garrafas com 800 mL de líquido ruminal em cada uma das duas colheitas (repetições) por período experimental. Na primeira garrafa foram adicionados 10 g de milho triturado; na segunda, 10 g de casca do grão de soja; na terceira, 10 g de farelo de girassol; na quarta, 10 g do respectivo concentrado da ração a que o animal doador do líquido ruminal

estava sendo submetido e; na quinta garrafa, nada se adicionou, sendo utilizada como “controle”.

Para a análise estatística dos dados, para cada substrato avaliado (milho, casca do grão de soja, farelo de girassol, concentrado ou “controle”) foi utilizado o delineamento em quadrado latino com seis períodos (tratamentos experimentais). Para a avaliação dos diferentes substratos dentro de um mesmo tratamento experimental, foi utilizado o delineamento em blocos casualizados, com cinco tratamentos (diferentes substratos) e seis repetições (animais), onde os blocos controlaram os efeitos dos diferentes períodos experimentais. As análises em quadrado latino foram efetuadas com auxílio da planilha eletrônica EXCEL da Microsoft®, enquanto que para as em Blocos Casualizados, foi utilizado o programa computacional ESTAT, desenvolvido pelo Pólo Computacional do Departamento de Ciências Exatas da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, campus de Jaboticabal, SP.

4.4. Resultados e Discussão

4.4.1. Produção Total de Gás

Na Tabela 4 encontra-se a produção total de gás “in vitro” (em mL) devido a adição de diferentes substratos no líquido ruminal de bovinos submetidos a rações com diferentes relações volumoso:concentrado e volumosos de pior ou melhor qualidades nutricionais.

Para o substrato “controle” na ração 50V:50C, o alto coeficiente de variação verificado (18,75%), provavelmente, não permitiu a ocorrência de diferença significativa entre os líquidos ruminais colhidos dos animais alimentados com os volumosos de melhor ou de pior qualidades nutricionais, mesmo havendo uma diferença média de 18% entre os valores em favor do volumoso de pior qualidade nutricional (484 mL *versus* 397mL, respectivamente). A produção de gás nos “controles” foi expressiva para os

líquidos ruminais provenientes de rações com 30% de volumoso, tanto com a utilização do volumoso de pior como de melhor qualidades nutricionais na alimentação dos animais. O substrato “controle” apresentou menor produção total de gás “in vitro” em todos os tratamentos experimentais ($P<0,05$), com média de 412 mL.

Tabela 4. Produção total de gás “in vitro” (em mL) devido a adição de diferentes substratos no líquido ruminal de bovinos submetidos a rações com diferentes relações volumoso(V):concentrado(C) e volumosos de pior (FR) ou melhor qualidades nutricionais (FB).

Substrato	Tratamento experimental						Média	CV (%)
	70V:30C		50V:50C		30V:70C			
	FR	FB	FR	FB	FR	FB		
“Controle”	226 ^{Cd}	245 ^{Cd}	484 ^{ABd}	397 ^{Bd}	536 ^{Ac}	583 ^{Ac}	412	18,75
Casc. soja ¹	641 ^{CDc}	588 ^{Dc}	856 ^{Ac}	720 ^{BCc}	754 ^{ABCb}	805 ^{ABb}	727	8,76
Milho	851 ^{Ba}	1046 ^{Aa}	1006 ^{Aa}	1022 ^{Aa}	1044 ^{Aa}	1087 ^{Aa}	1009	7,52
F. girassol ²	731 ^{Cbc}	747 ^{Cb}	947 ^{ABb}	840 ^{BCb}	1008 ^{Aa}	946 ^{ABab}	870	9,07
Concentrado	782 ^{Cab}	813 ^{BCb}	990 ^{Aab}	1060 ^{Aa}	941 ^{ABa}	1082 ^{Aa}	945	9,21
Média	646	688	856	808	857	900	--	--
CV (%)	8,59	9,60	3,23	7,52	10,10	12,79	--	--

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, dentro de cada coluna, e de letras maiúsculas, dentro de cada linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

Casc. soja ¹ = Casca do grão de soja; F. girassol ² = Farelo de girassol.

A utilização do volumoso de melhor qualidade nutricional, em comparação ao pior, proporcionou maior produção total de gás “in vitro” ($P<0,05$) para o substrato milho na ração 70V:30C (1046 mL *versus* 851 mL, respectivamente) e menor ($P>0,05$) para o substrato casca do grão de soja na ração 50V:50C (720 mL *versus* 856 mL, respectivamente). Para os demais substratos não foram verificadas diferenças significativas devido às diferentes relações volumoso: concentrado utilizadas.

A qualidade nutricional do volumoso não afetou a produção de gás nos “controles”, embora os valores sejam crescentes com o aumento na proporção de concentrados nas rações.

A casca do grão de soja apresentou valores máximos de produção de gás nas rações com 50% de concentrado quando o volumoso de pior qualidade nutricional foi utilizado na alimentação dos animais e com 70% de concentrado.

As mais baixas produções de gás para a casca do grão de soja foram obtidos com a elevada proporção de volumoso, independente da qualidade nutricional.

Para o ingrediente milho, quando se utilizou rações com 70% de volumoso, provavelmente, a qualidade do volumoso influenciou a produção de gás, sendo superior no melhor. Para os demais ingredientes, não foram constatadas observações semelhantes.

Esses resultados indicam que existe tendência a que os componentes do concentrado isoladamente produzam mais gás quando o concentrado totaliza mais do que 50% da ração, mesmo para a casca do grão de soja e para o farelo de girassol, que possuem elevada concentração de fibra em suas composições.

De maneira geral, as diferenças devido à incubação de um mesmo substrato (ingrediente) nos líquidos ruminais dos animais alimentados com os volumosos de melhor ou de pior qualidades nutricionais foram pequenas, apresentando uma diferença média de 6%. Diante dos resultados visualizados nesta Tabela, não ficou evidente o aumento na produção de gás devido a utilização dos volumosos de melhor ou de pior qualidades nutricionais na alimentação dos animais.

Entre os ingredientes avaliados como substratos, a casca do grão de soja foi o que apresentou menor produção total de gás “in vitro”, com média de 727 mL, sendo inferior aos demais em todos os tratamentos experimentais ($P < 0,05$), com exceção para a relação 70V:30C nos animais que receberam o volumoso de pior qualidade nutricional e para a relação 30V:70C nos que receberam o volumoso de melhor qualidade nutricional, onde apresentaram produção total de gás “in vitro” semelhante ao farelo de girassol (641 mL *versus* 731 mL e 805 mL *versus* 946 mL, respectivamente). A produção total de gás “in vitro” do ingrediente farelo de girassol foi semelhante a do concentrado, com exceção para a relação 50V:50C nos animais que receberam o volumoso de melhor qualidade nutricional, quando apresentou menor produção ($P < 0,05$) (840 mL *versus* 1060 mL). Com exceção para a ração 70V:30C nos animais alimentados com o volumoso de melhor qualidade nutricional, as produções de

gás “in vitro” proporcionada pelo substrato milho foram semelhantes às proporcionadas pelo substrato concentrado.

Na Tabela 4 pode ser verificado também aumento da produção média de gás conforme aumentou a porcentagem de concentrado na ração dos animais, independente da qualidade nutricional do volumoso utilizado na alimentação dos mesmos, sendo este aumento mais evidente no substrato “controle” e menos no substrato milho, que apresentou menor produção total de gás apenas nos animais alimentados com o volumoso de pior qualidade nutricional na ração 70V:30C em comparação a todos os outros tratamentos experimentais ($P<0,05$). O substrato milho resultou em maior produção total de gás “in vitro”, em valores médios, seguido pelos substratos concentrados, farelo de girassol e casca do grão de soja (1009 mL, 945 mL, 870 mL e 727 mL, respectivamente) e o substrato “controle” resultou na menor produção total média de gás “in vitro” (412 mL).

Nesta avaliação foram verificados baixos coeficientes de variação, considerando estudos desta natureza, sugerindo uma boa repetibilidade dos dados e, conseqüentemente, uma boa confiabilidade da metodologia desenvolvida e empregada no trabalho (mais detalhes sobre a metodologia são encontrados no Capítulo 2).

4.4.2. Proporções de Metano, Dióxido de Carbono e Oxigênio no

Gás Produzido

Quanto às proporções de metano, dióxido de carbono e de oxigênio nos gases produzidos “in vitro” (Figura 1 e Tabela 5), para o substrato “controle” foram verificadas maiores proporções de metano e de oxigênio e menor de dióxido de carbono nas rações 70V:30C, tanto no líquido ruminal oriundo dos animais alimentados com o volumoso de pior qualidade nutricional quanto nos alimentados com o volumoso de melhor qualidade nutricional ($P<0,05$). Para o substrato milho, foram observados comportamentos inversos, apresentando menores proporções de metano e de oxigênio e maior de dióxido de carbono

($P < 0,05$), independente da qualidade do volumoso utilizado na alimentação dos animais doadores do líquido ruminal.

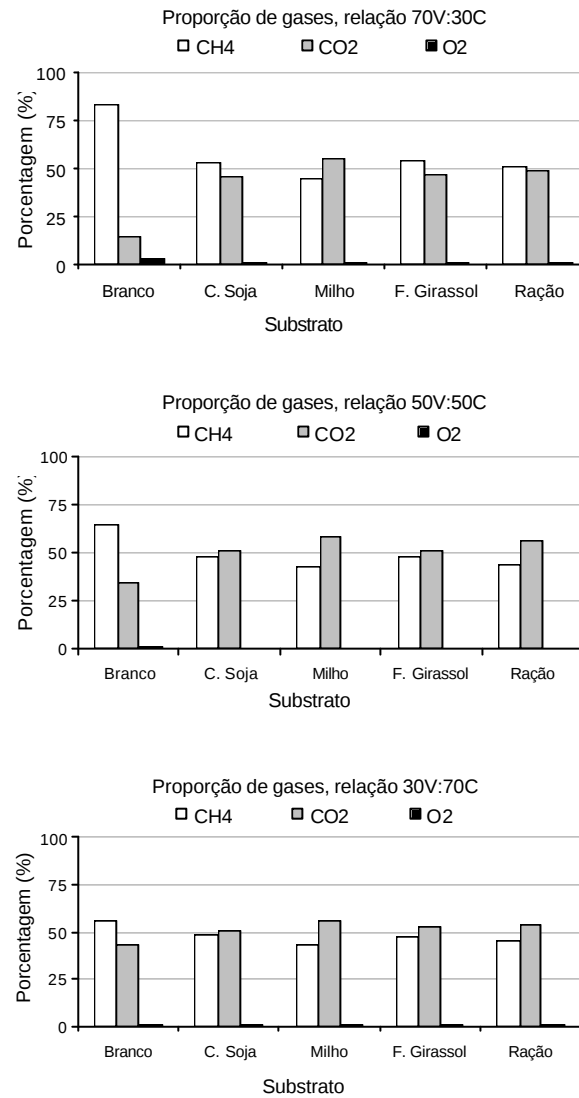


Figura 1. Proporções médias de metano (% CH₄), dióxido de carbono (% CO₂) e oxigênio (% O₂) "in vitro" devido a adição de diferentes substratos no líquido ruminal de bovinos submetidos a rações com diferentes relações volumoso(V):concentrado(C) e volumosos de pior (FR) ou melhor qualidades nutricionais (FB).

Tabela 5. Proporções de metano (% CH₄), dióxido de carbono (% CO₂) e oxigênio (% O₂) “in vitro” devido a adição de diferentes substratos no líquido ruminal de bovinos submetidos a rações com diferentes relações volumoso(V):concentrado(C) e volumosos de pior (FR) ou melhor qualidades nutricionais (FB).

Substrato	Tratamento Experimental						Média	CV (%)
	70V:30C		50V:50C		30V:70C			
	FR	FB	FR	FB	FR	FB		
% CH ₄								
“Controle”	87,2 ^{Aa}	78,0 ^{Aa}	62,8 ^{Ba}	57,9 ^{BCa}	61,3 ^{Ba}	50,4 ^{Ca}	66,3	8,37
Casc. soja ¹	53,9 ^{Ab}	50,9 ^{Ab}	47,0 ^{Ab}	49,2 ^{Ab}	48,4 ^{Ab}	47,1 ^{Aab}	49,4	10,04
Milho	48,2 ^{Ab}	39,6 ^{Bc}	42,2 ^{ABb}	41,1 ^{ABc}	48,6 ^{Ab}	40,2 ^{Abc}	43,3	10,99
F. girassol ²	55,1 ^{Ab}	46,8 ^{ABbc}	47,0 ^{ABb}	43,9 ^{Bc}	46,5 ^{Bb}	42,6 ^{Bbc}	47,0	10,20
Concentrado	47,5 ^{ABb}	48,5 ^{Ab}	44,7 ^{ABb}	39,4 ^{Bc}	50,3 ^{Ab}	43,8 ^{ABbc}	45,7	10,55
Média	58,4	52,8	48,7	46,3	51,0	44,9	--	--
CV (%)	10,75	8,67	7,16	5,85	8,77	7,30	--	--
% CO ₂								
“Controle”	17,4 ^{Cd}	20,6 ^{Cc}	39,3 ^{Bc}	41,3 ^{Bc}	37,6 ^{Bb}	50,8 ^{Ab}	34,5	12,52
Casc. soja ¹	45,3 ^{Abc}	48,4 ^{Ab}	52,5 ^{Ab}	50,3 ^{Ab}	49,8 ^{Aa}	52,6 ^{Ab}	49,8	9,29
Milho	53,3 ^{BCa}	62,1 ^{Aa}	57,4 ^{ABCa}	58,5 ^{ABCa}	51,1 ^{Ca}	59,5 ^{ABa}	57,0	8,28
F. girassol ²	44,3 ^{Bc}	52,5 ^{ABb}	52,6 ^{ABb}	55,7 ^{Aa}	53,2 ^{ABa}	59,4 ^{Aa}	53,0	9,59
Concentrado	51,9 ^{Bab}	50,8 ^{Bb}	53,4 ^{ABb}	60,2 ^{Aa}	49,4 ^{Ba}	55,9 ^{ABab}	53,6	8,52
Média	42,4	46,9	51,0	53,2	48,2	55,6	--	--
CV (%)	10,13	10,54	4,26	5,08	9,64	6,66	--	--
% O ₂								
“Controle”	3,74 ^{Aa}	1,57 ^{Ba}	1,03 ^{Ba}	0,82 ^{Ba}	0,63 ^{Ba}	0,56 ^{Ba}	1,39	56,48
Casc. soja ¹	0,88 ^{Ab}	0,69 ^{ABb}	0,43 ^{BCb}	0,35 ^{Cb}	0,44 ^{BCab}	0,30 ^{Cb}	0,52	32,33
Milho	0,64 ^{Ab}	0,47 ^{Bb}	0,42 ^{BCb}	0,35 ^{CDb}	0,36 ^{CDb}	0,31 ^{Db}	0,43	12,08
F. girassol ²	0,61 ^{Ab}	0,48 ^{ABb}	0,43 ^{ABb}	0,30 ^{Bb}	0,37 ^{Bb}	0,30 ^{Bb}	0,41	25,52
Concentrado	0,63 ^{Ab}	0,55 ^{Ab}	0,41 ^{Bb}	0,34 ^{BCb}	0,39 ^{Bb}	0,28 ^{Cb}	0,43	13,50
Média	1,30	0,75	0,55	0,43	0,44	0,35	--	--
CV (%)	58,55	25,82	31,68	20,93	27,48	31,80	--	--

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, dentro de cada coluna e de cada gás, e de letras maiúsculas, dentro de cada linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). Casc. soja¹ = Casca do grão de soja; F. girassol² = Farelo de girassol.

O “controle” sempre apresentou maior proporção de metano e de oxigênio e menor de dióxido de carbono do que o concentrado e seus ingredientes e, com exceções para a proporção de metano, nos animais alimentados com a ração 30V:70C e com o volumoso de melhor qualidade nutricional, e para a proporção de oxigênio, nas rações 70V:30C, independente da qualidade do volumoso utilizado na alimentação dos animais.

Analisando os valores médios, verifica-se tendência dos líquidos ruminais oriundos dos animais alimentados com o volumoso de pior qualidade

nutricional resultarem em produções de gases com maiores teores de metano e de oxigênio e menores de dióxido de carbono, ocorrendo exceções para o substrato concentrado na ração 70V:30C e para o substrato casca do grão de soja na ração 50V:50C, onde os líquidos ruminais oriundos dos animais alimentados com o volumoso de melhor qualidade nutricional resultaram em produção de gás com maiores proporções de metano e menores de dióxido de carbono.

Entre os substratos casca do grão de soja, milho, farelo de girassol e concentrado, não foram verificadas diferenças para as proporções de metano nos líquidos ruminais doados pelos animais alimentados com o volumoso de pior qualidade nutricional. O substrato casca do grão de soja não foi influenciado pelos distintos tratamentos experimentais, fornecendo teores de metano semelhantes.

Considerando que o substrato concentrado é uma mistura dos ingredientes casca do grão de soja, milho e farelo de girassol (Tabela 2), em uma visão mais simplista, seria esperado valores de produção total de gás, assim como de proporções de metano, dióxido de carbono e oxigênio pelo menos intermediários aos menores e maiores valores observados para os distintos ingredientes. Entretanto, tal fato não foi verificado para a produção total de gás na ração 50V:50C no líquido ruminal dos animais alimentados com o volumoso de pior qualidade nutricional; para as proporções de metano nas rações 70V:30C e 30V:70C, de dióxido de carbono na 30V:70C e de oxigênio na 50V:50C nos líquidos ruminais dos animais alimentados com o volumoso de pior qualidade nutricional; e nas proporções de metano e de dióxido de carbono na 50V:50C e de oxigênio na 30V:70C nos líquidos ruminais dos animais alimentados com o volumoso de melhor qualidade nutricional. Tais resultados sugerem a impossibilidade de se estimar corretamente os valores nutricionais dos diversos ingredientes utilizados como alimentos para animais ruminantes de maneira isolada, provavelmente, por causa das interações que ocorrem no ambiente ruminal devido a adição de dois ou mais ingredientes simultaneamente.

De maneira resumida, foi verificado que os líquidos ruminais dos animais alimentados com o volumoso de pior qualidade nutricional resultaram em maiores proporções de metano e de oxigênio e menores de dióxido de carbono do que os líquidos ruminais dos animais alimentados com o de melhor qualidade nutricional. Comparando as Tabelas 4 e 5, pode ser observado que as relações entre a produção total de gás e as proporções de metano e de oxigênio apresentaram, na maioria dos dados analisados, comportamentos inversos, ou seja, onde existiu uma menor produção de gás, este gás apresentou maior proporção de metano, independente do substrato que foi fermentado ou da qualidade do volumoso utilizado na alimentação do animal doador do líquido ruminal. Entretanto, para o dióxido de carbono foi observada uma relação direta, havendo aumento da proporção deste gás com o aumento da produção total de gás.

Maiores coeficientes de variação foram verificados na análise do oxigênio, especialmente no substrato “controle” (56,48%) e no tratamento com a ração 70V:30C quando utilizou o líquido ruminal de animais alimentados com o volumoso de pior qualidade nutricional (58,55%). Estes maiores coeficiente de variação ocorreram, provavelmente, devido aos menores teores deste gás no ambiente ruminal, o que torna a sua quantificação mais delicada e, conseqüentemente, mais sujeita a variações.

4.4.3. Produção Média de Metano, Dióxido de Carbono e Oxigênio

Na Tabela 6 encontra-se as produções de metano, dióxido de carbono e oxigênio “in vitro” no líquido ruminal de bovinos submetidos a rações com diferentes relações volumoso:concentrado e volumosos de pior ou melhor qualidades nutricionais como inoculante de diferentes substratos.

Tabela 6. Produções de metano (mL CH₄), dióxido de carbono (mL CO₂) e oxigênio (mL O₂) “in vitro” no líquido ruminal de bovinos submetidos a rações com diferentes relações volumoso(V):concentrado(C) e volumosos de pior (FR) ou melhor qualidades nutricionais (FB), como inoculante de diferentes substratos.

Substrato	Tratamento Experimental						Média	CV (%)
	70V:30C		50V:50C		30V:70C			
	FR	FB	FR	FB	FR	FB		
mL CH ₄								
“Controle”	195 ^{Cb}	168 ^{Cc}	277 ^{Ac}	233 ^{Bd}	279 ^{Ad}	287 ^{Ac}	240	7,59
Casc. soja ¹	347 ^{ABCa}	291 ^{Db}	385 ^{Ab}	310 ^{CDc}	361 ^{ABc}	335 ^{BCDb}	338	7,40
Milho	389 ^{BCa}	363 ^{Ca}	422 ^{ABab}	417 ^{ABa}	460 ^{Aa}	436 ^{ABa}	414	6,84
F. girassol ²	375 ^{BCa}	368 ^{Ca}	418 ^{Aab}	385 ^{ABCb}	423 ^{Aab}	410 ^{ABa}	396	5,63
Concentrado	371 ^{Ba}	371 ^{Ba}	429 ^{Aa}	389 ^{ABb}	417 ^{Ab}	416 ^{Aa}	399	5,89
Média	335	312	386	347	388	377	--	--
CV (%)	7,25	6,27	6,34	4,48	6,17	7,00	--	--
mL CO ₂								
“Controle”	45 ^{Dc}	54 ^{Dd}	191 ^{BCd}	164 ^{Cd}	231 ^{Bc}	296 ^{Ab}	164	14,25
Casc. soja ¹	289 ^{Cb}	273 ^{Cc}	450 ^{Ac}	358 ^{Bc}	390 ^{ABb}	376 ^{Bb}	356	10,18
Milho	430 ^{Ba}	597 ^{Aa}	594 ^{Aa}	585 ^{ABa}	605 ^{Aa}	643 ^{Aa}	576	15,29
F. girassol ²	361 ^{BCab}	350 ^{Cbc}	469 ^{Ac}	461 ^{ABb}	464 ^{ABb}	547 ^{Aa}	442	13,50
Concentrado	402 ^{Ba}	373 ^{Bb}	531 ^{Ab}	587 ^{Aa}	402 ^{Bb}	600 ^{Aa}	482	10,42
Média	305	329	447	431	418	492	--	--
CV (%)	13,91	16,66	5,76	8,42	17,03	13,88	--	--
mL O ₂								
“Controle”	8,24 ^{Aa}	4,57 ^{Ba}	4,19 ^{Bab}	3,16 ^{Bab}	3,23 ^{Ba}	3,06 ^{Ba}	4,41	20,77
Casc. soja ¹	5,00 ^{Ab}	4,66 ^{ABa}	3,71 ^{ABCbc}	3,17 ^{BCab}	3,21 ^{BCa}	2,23 ^{Cb}	3,66	23,54
Milho	4,84 ^{Ab}	4,69 ^{ABa}	4,24 ^{ABCa}	4,03 ^{ABCa}	3,83 ^{BCa}	3,43 ^{Ca}	4,18	11,76
F. girassol ²	4,38 ^{Ab}	4,02 ^{Aa}	3,31 ^{Bc}	2,67 ^{Cb}	3,08 ^{BCa}	3,00 ^{BCab}	3,41	9,21
Concentrado	4,89 ^{Ab}	4,51 ^{ABa}	3,75 ^{BCabc}	3,55 ^{Cab}	3,26 ^{Ca}	3,08 ^{Ca}	3,84	13,31
Média	5,47	4,49	3,84	3,31	3,32	2,96	--	--
CV (%)	14,50	16,77	7,96	15,65	15,16	15,99	--	--

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, dentro de cada coluna e de cada gás, e de letras maiúsculas, dentro de cada linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). Casc. soja¹ = Casca do grão de soja; F. girassol² = Farelo de girassol.

Os líquidos ruminais oriundos dos animais alimentados com o volumoso de pior qualidade nutricional, proporcionaram maior produção de metano do que aqueles oriundos dos animais alimentados com o de melhor qualidade nutricional para todos os substratos e relações volumoso:concentrado avaliadas, com exceção para o substrato “controle” na relação 30V:70C, onde o líquido ruminal oriundo dos animais alimentados com o volumoso de pior qualidade nutricional proporcionou uma produção de metano numericamente inferior, entretanto não significativa (279 mL *versus* 287 mL).

As maiores diferenças entre os tratamentos experimentais foram verificadas para os “controles”, observando-se, para este substrato, menores produções de metano e de dióxido de carbono nas rações 70V:30C e maiores nas 30V:70C.

O aumento da porcentagem de concentrados na ração resultou em maiores produções de metano e de dióxido de carbono e menor de oxigênio, com exceção para as rações 50V:50C e 30V:70C, para os substratos casca do grão de soja e concentrado nos líquidos ruminais oriundos dos animais alimentados com o volumoso de pior qualidade nutricional; para as produções de dióxido de carbono entre as rações 50V:50C e 30V:70C, para os substratos casca do grão de soja, farelo de girassol e concentrado nos líquidos ruminais dos animais alimentados com o volumoso de pior qualidade nutricional e entre as rações 70V:30C e 50V:50C para o substrato milho no líquido ruminal oriundo dos animais alimentados com o volumoso de melhor qualidade nutricional.

Observando ainda a Tabela 6, foi verificado que a ração com maior porcentagem de volumoso (70V:30C) apresentou tendência a uma menor produção de metano e de dióxido de carbono e maior de oxigênio, mesmo as rações com relações similares entre energia metabolizável e proteína degradável no rúmen.

O substrato milho foi o que resultou em maiores produções médias de metano e de dióxido de carbono, seguido, em ordem decrescente, pelos substratos concentrado, farelo de girassol, casca do grão de soja e pelo “controle”. Quanto ao oxigênio, a maior produção média foi verificada para o substrato “controle”, seguido, em ordem decrescente, pelos substratos milho, concentrado, casca do grão de soja e farelo de girassol.

Diferentes carboidratos presentes nos ingredientes afetam a relação acetato:propionato e, diante disto, afetam também a produção de hidrogênio. Por exemplo, poucas bactérias que fermentam amido produzem hidrogênio (Stewart & Bryant, 1988, citados por HEGARTY, 1999). Por causa da baixa tolerância das bactérias metanogênicas ao baixo pH, que a proporção da energia bruta perdida como metano diminui quando rações a base de forragens

são substituídas parcialmente por concentrados ricos em amido (BLAXTER & CLAPPERTON, 1965).

É válido ressaltar que as maiores produções de gases, quando houve aumento na porcentagem de concentrado nas rações, ocorreu, principalmente, devido ao aumento da produção de gases dos “controles”. Descontando estes aumentos verificados nos “controles” dos aumentos verificados nos distintos substratos, estas diferenças tendem a não existir mais. Portanto, neste caso, as maiores produções de gases observadas nos substratos fermentados nos líquidos ruminais dos animais alimentados com maior porcentagem de concentrado não ocorreram, provavelmente, apenas devido a uma possível maior degradação destes substratos e também a uma diferença já pré-existente nos líquidos ruminais dos animais submetidos aos diferentes tratamentos experimentais.

4.4.4. Potenciais Hidrogeniônicos e Correlações com as Produções de Gases

Na Figura 2 e na Tabela 7 encontram-se os potenciais hidrogeniônicos (pH) médios devido à adição de milho, casca do grão de soja, farelo de girassol, volumoso ou nenhum substrato (“controle”) ao líquido de rúmen de animais submetidos a rações com diferentes relações volumoso:concentrado e com volumosos de pior ou melhor qualidades nutricionais.

Para os valores de pH não foram verificadas diferenças significativas entre os distintos tratamentos experimentais após o período de incubação para nenhum dos substratos avaliados. Entretanto, entre os substratos, os “controles” apresentaram maiores valores ($P < 0,05$) em todos os tratamentos experimentais, sendo que entre os demais substratos, não foram verificadas diferenças significativas. Nota-se que os valores de pH dos substratos concentrados foram próximos ao menor valor registrado para os seus ingredientes (casca do grão de soja, milho ou farelo de girassol), sendo que, considerando ser este uma mistura destes ingredientes (Tabela 1) e que as quantidades de material incubados foram iguais, esperava-se um valor mais

intermediário, próximo à média, e não próximo ao menor dos valores verificados para os ingredientes em separado. Tal comportamento demonstra a complexidade das relações existentes no ambiente ruminal.

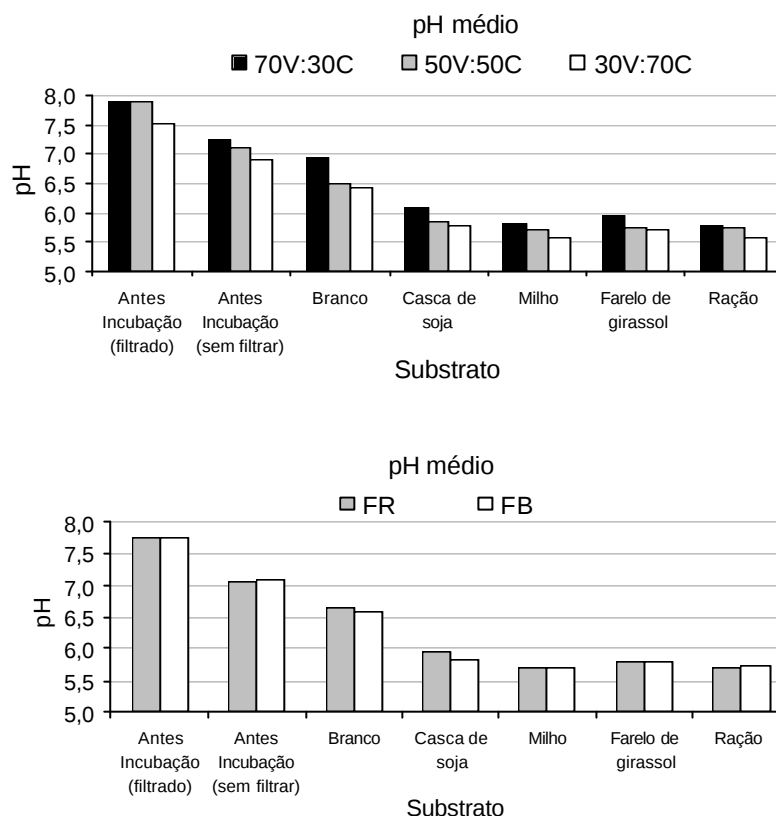


Figura 2. Potenciais hidrogeniônicos médios dos líquidos ruminais de animais submetidos a rações com diferentes relações volumoso(V):concentrado(C) e volumosos de pior (FR) ou melhor qualidades nutricionais (FB) antes da incubação dos substratos, sem filtrar ou filtrado, e após doze horas de incubação “in vitro” dos distintos substratos (milho, casca do grão de soja, farelo de girassol ou concentrado) e filtrado.

Comparando-se os valores de pH ruminal após as doze horas de incubação “in vitro” com os desaparecimentos “in situ” no mesmo tempo de incubação, de cada ingrediente, e com as digestibilidades aparentes da matéria seca das rações (Tabelas 8 e 9, respectivamente), verifica-se que não houve uma relação específica direta entre os valores médios. Entretanto, no caso da casca do grão de soja, fica evidente que o maior valor de pH apresentado, em comparação aos outros ingredientes ocorreu devido, provavelmente, ao seu menor desaparecimento ruminal. Quanto às digestibilidades aparentes da

matéria seca, verifica-se que as rações que apresentaram maiores valores médios de pH ruminal (70V:30C) tiveram as menores digestibilidades.

Tabela 7. Potenciais hidrogeniônicos médios dos líquidos ruminais de animais submetidos a rações com diferentes relações volumoso(V):concentrado(C) e volumosos de pior (FR) ou melhor qualidades nutricionais (FB) após doze horas de incubação “in vitro” dos distintos substratos (milho, casca do grão de soja, farelo de girassol ou concentrado).

Substrato	Tratamento Experimental						Média	CV (%)
	70V:30C		50V:50C		30V:70C			
	FR	FB	FR	FB	FR	FB		
“Controle”	6,84 a	6,99 a	6,47 a	6,50 a	6,50 a	6,36 a	6,61	11,18
Casc. soja ¹	5,91 b	6,22 b	5,83 b	5,84 b	5,81 b	5,75 b	5,89	5,60
Milho	5,75 b	5,84 b	5,67 b	5,76 b	5,55 b	5,62 b	5,70	3,37
F. girassol ²	5,86 b	6,00 b	5,72 b	5,79 b	5,74 b	5,72 b	5,81	4,00
Concentrado	5,78 b	5,79 b	5,71 b	5,80 b	5,54 b	5,60 b	5,70	2,89
Média	6,03	6,17	5,88	5,94	5,83	5,81	--	--
CV (%)	2,74	6,09	4,59	3,69	5,98	3,79	--	--

Médias seguidas de letras diferentes, dentro de cada coluna, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Médias dentro de cada linha não diferem pelo teste de Tukey.

Tabela 8. Desaparecimentos da matéria seca do milho, da casca do grão de soja, do farelo de girassol (em %) em cada tratamento experimental após doze horas de incubação *in situ*.

Tratamento	Milho	Casca do grão de soja	Farelo de girassol
30V:70C	53,88	54,51	61,70
50V:50C	61,26	44,30	56,95
70V:30C	53,27	45,04	60,20

Na comparação das Tabelas 7, 8 e 9, é válido ressaltar que os alimentos com baixa taxa de produção de gases geralmente apresentam maiores valores de digestibilidades “in vivo” do que os sugeridos pela metodologia (MENKE, 1979).

Tabela 11. Correlações entre as variáveis estudadas para os animais alimentados com o volumoso de pior qualidade nutricional.

	% CH4	% CO2	% O2	% N2	mL CH4	mL CO2	mL O2	mL N2	pH
mL	-0,800	0,946	-0,904	-0,884	0,970	0,989	-0,621	-0,897	-0,938
% CH4	-	-0,795	0,632	0,591	-0,641	-0,869	0,578	0,721	0,800
% CO2	-	-	-0,971	-0,959	0,917	0,942	-0,634	-0,894	-0,944
% O2	-	-	-	0,996	-0,930	-0,871	0,613	0,869	0,901
% N2	-	-	-	-	-0,920	-0,848	0,572	0,853	0,883
mL CH4	-	-	-	-	-	0,928	-0,592	-0,877	-0,911
mL CO2	-	-	-	-	-	-	-0,661	-0,910	-0,929
mL O2	-	-	-	-	-	-	-	0,862	0,603
mL N2	-	-	-	-	-	-	-	-	0,853

Tabela 12. Correlações médias entre as variáveis estudadas para os animais alimentados com os volumosos de melhor ou pior qualidades nutricionais.

	% CH4	% CO2	% O2	% N2	mL CH4	mL CO2	mL O2	mL N2	pH
mL	-0,809	0,920	-0,845	-0,847	0,968	0,990	-0,244	-0,768	-0,923
% CH4	-	-0,810	0,657	0,599	-0,647	-0,871	0,322	0,575	0,696
% CO2	-	-	-0,966	-0,955	0,891	0,924	-0,397	-0,822	-0,909
% O2	-	-	-	0,985	-0,866	-0,833	0,479	0,844	0,869
% N2	-	-	-	-	-0,889	-0,821	0,375	0,830	0,890
mL CH4	-	-	-	-	-	0,928	-0,220	-0,790	-0,940
mL CO2	-	-	-	-	-	-	-0,311	-0,783	-0,898
mL O2	-	-	-	-	-	-	-	0,699	0,272
mL N2	-	-	-	-	-	-	-	-	0,797

Tanto nos animais alimentados com o volumoso de melhor qualidade nutricional como nos alimentados com o de pior qualidade nutricional, as variáveis produção de oxigênio (em mL) e produção de nitrogênio (em mL) apresentaram baixas correlações com as demais analisadas, principalmente nos alimentados com o volumoso de melhor qualidade nutricional. Em ambos os casos, as correlações verificadas entre as variáveis produção total de gás (mL) e pH com as demais variáveis analisadas foram altas, indicando serem estas importantes e muito úteis para estimar as demais, ainda mais considerando a facilidade e praticamente ausência de custo para as suas obtenções através da metodologia desenvolvida e descrita no Capítulo 2.

A ausência de grandes diferenças entre as correlações obtidas nos animais alimentados com os volumosos de diferentes qualidades nutricionais

sugere não existir grandes alterações qualitativas nos produtos finais da fermentação ruminal devido às diferenças existentes entre distintos volumosos, permitindo a utilização dos valores médios apresentados na Tabela 12. Entretanto, tais resultados necessitam de mais estudos para validação.

Utilizando fluido ruminal colhido em animais alimentados com rações a base de forragens, VAN KESSEL & RUSSELL (1969) observaram que, “in vitro”, bactérias metanogênicas ruminais perdem a habilidade para utilizar o hidrogênio em pH baixo, resultando em aumento no teor de hidrogênio na fase gasosa quando o pH encontrava-se abaixo de 5,5. Assim, rações a base de forragens e pH baixo levaram a uma redução na produção de metano independente da produção de propionato.

O uso do hidrogênio disponível no rúmen para produção de acetato (através das bactérias acetogênicas) é interessante para a nutrição animal, pois o acetato é absorvido e utilizado pelo organismo como a principal fonte de carbono e de energia pelos ruminantes, enquanto que o metano representa perda de energia. Diante disto, diversas tentativas têm sido realizadas para reduzir a produção de metano no processo digestivo fermentativo e aumentar a acetogênese pela comunidade microbiana ruminal. A concentração de bactérias acetogênicas no líquido ruminal é semelhante a das bactérias metanogênicas (LEEDLE & GREENING, 1988). Entretanto, Prins & Lankhorst (1977), citados por MOSS (2000), não observaram formação de acetato da redução do $^{14}\text{CO}_2$ no conteúdo ruminal.

De maneira contrária às bactérias metanogênicas, as acetogênicas são capazes de utilizar outras fontes, além do hidrogênio, para suprir suas necessidades energéticas, não competindo fortemente pelo hidrogênio, podendo proporcionar altas concentrações de bactérias metanogênicas e quase que ausência de bactérias acetogênicas no meio ruminal.

LANA et al. (1998) verificaram que a redução do pH ruminal limitou a produção de metano. MALESTEIN et al. (1981) sugeriram que a administração de grandes quantidades de concentrados com elevado teores de nutrientes facilmente fermentáveis, em geral, reduziram rapidamente o pH do fluido ruminal e mudaram os padrões dos ácidos graxos voláteis no rúmen. O oposto

foi observado quando administrou-se alimentos ricos em fibra, caracterizados pela menor degradação ruminal, causando reduções menos drásticas nos níveis de pH ruminal.

Tanto o metano como o amônio podem ser inibidos pelos valores de pH ruminal mais baixos. Assim, a retenção de energia e de proteínas podem ser aumentadas diminuindo as perdas indesejáveis para o meio ambiente (GALATI et al., 2002).

4.5. Conclusões

A maior porcentagem de concentrados na alimentação dos animais, resultou, geralmente, em maiores produções de metano e de dióxido de carbono.

As maiores diferenças entre os tratamentos experimentais foram verificadas para o substrato “controle”.

O substrato milho resultou em maiores produções médias de metano e de dióxido de carbono, seguido, em ordem decrescente, pelos substratos concentrado, farelo de girassol, casca do grão de soja e “controle”.

As rações com maiores porcentagens de volumoso apresentaram tendência a menor produção de metano e de dióxido de carbono e maior de oxigênio.

O volumoso de pior qualidade nutricional proporcionou maior produção de metano para todos os substratos avaliados.

4.6. Referências Bibliográficas

(AFRC) AGRICULTURAL FOOD RESEARCH COUNCIL. **Energy and protein requirements of ruminants**. Wallingford, UK: CAB International, 1993. 159p.

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

DRENNEN, T. E.; CHAPMAN, D. Negotiating a response to climate change: role of biological emissions. **Contemporary Policy Issues**, v. 10, p. 49-57, 1992.

GALATI, R. L. et al. Concentraciones de los acidos grasos volatiles en el rumen de bovinos alimentados com diferentes dietas y las estimadas de las emisiones del metano para el medio ambiente. In: CONGRESO NACIONAL DEL MEDIO AMBIENTE, 6., 2002. **Anais...**, 2002. 1 CD-ROM.

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

LANA, R. P.; RUSSELL, J. B.; VAN AMBURGH, M.E. The role of pH in regulating methane and ammonia production. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 2190-2196, 1998.

LANA, R. P.; RUSSELL, J. B. Effect of forage quality and monensin on the ruminal fermentation of fistulated cows fed continuously at a constant intake. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 224-229, 1997.

LEEDLE, J. A. Z.; GREENING, R. C. Postprandial changes in methanogenic and acidogenic bacteria in the rumen of steers fed high or low forage diets once daily. **Applied Environment Microbiology**, v. 54, p. 50-506, 1988.

LENG, R. A. Factors affecting the utilization of "poor quality" forages by ruminants particularly under tropical conditions. **Nutrition Research Reviews**, v. 3, p. 277-303, 1990.

____. Quantitative ruminant nutrition - a green science. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 44, p. 363-380, 1993.

LIMA, M. A.; BOEIRA, R. C.; CASTRO, V. L. Inventário das emissões de gases de efeito estufa provenientes das atividades agrícolas no Brasil. In: **Mudanças Climáticas Globais e a Agropecuária Brasileira**, Junho 1999, Campinas: Embrapa Meio Ambiente, 1999. p. 33.

MALESTEIN, A. et al. Concentrate feeding and ruminal fermentation. I. Influence of the frequency of feeding concentrates on rumen acid composition, feed intake and milk production. **Journal of Agricultural Science**, v. 29, p. 239-248, 1981.

McALLISTER, T. A. et al. Environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 76, p. 231-243, 1996.

McDOWELL, L. R. et al. Tabelas de composição de alimentos da América Latina abreviada. Universidade da Flórida. Instituto de Ciências Alimentícias e Agropecuárias. Centro de Agricultura Tropical. Departamento de Zootecnia. 1974, p. 17.

MENKE, K. H. et al. Estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuff from the gas production when they are incubated with rumen liquor "in vitro". **Journal Agricultural Science**, v. 93, p. 217-222, 1979.

MOSS, A. R. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. **Annales de Zootechnie**, v. 49, p. 231-253, 2000.

SCHNEIDER, B. H. et al. The prediction of digestibility for feeds for which there are only proximate composition data. **Journal of Animal Science**, v. 11, p. 77-83, 1952.

VAN KESSEL, J. S.; RUSSELL, J. B. The effect of pH on ruminal methanogenesis. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 20, p. 205-210, 1969.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476 p.

5. CAPÍTULO 5 - IMPLICAÇÕES

O estudo da ecologia microbiana do trato gastrointestinal evoluiu rapidamente nos últimos anos, principalmente devido à introdução de técnicas de biologia molecular. A eficiência de utilização da parede celular deverá ser aumentada utilizando-se microrganismos geneticamente modificados, enzimas produzidas industrialmente, para serem utilizadas como insumos na preparação de rações, ou, ainda, plantas modificadas geneticamente para menor produção de compostos secundários. Entretanto, o conhecimento gerado até o momento tem mostrado claramente que o caminho mais seguro em direção a aumentos na produtividade de ruminantes em rações com predominância de forragem é através do balanço de nutrientes, que considera a eficiência do ecossistema ruminal e a disponibilidade dos nutrientes dietéticos após o rúmen. Este balanço poderá ser alcançado utilizando rações preparadas com alimentos locais, que não sejam competitivos com alimentos humanos, ou subprodutos, através de modelos matemáticos e soluções tecnológicas sustentáveis. O uso disseminado de rações balanceadas para a otimização da microbiota ruminal poderá reduzir a produção de metano, consequentemente, reduzindo a contribuição da pecuária ao efeito estufa.

Para o desenvolvimento de estratégias para reduzir a emissão de metano por ruminantes, é necessário que sua produção seja quantificada em circunstâncias variadas, considerando que diferenças na quantidade de metano emitida por bovinos dependem, principalmente, do tipo e da quantidade de carboidratos ingeridos e, consequentemente, das modificações na microflora ruminal.

Para uma correta interpretação dos dados oriundos de experimentos desta natureza, é fundamental compreender que uma maior proporção de um determinado gás em um tratamento experimental (análise qualitativa) nem sempre está relacionado com uma maior produção deste gás (análise quantitativa) em comparação à outro tratamento experimental que apresentou menor proporção deste mesmo gás, pois proporções relativas não são quantidades absolutas; por exemplo, a quantidade total de gás produzida numa

ração altamente calórica costuma ser muito maior do que a produzida numa ração rica em fibra, assim como a produção total de metano, por exemplo, deve ser maior na primeira, mesmo estando, neste caso, em menor proporção do que na segunda.

Quando se compara dados de produção de gás “in vitro” com dados “in vivo”, alguns pontos importantes devem ser considerados: é muito difícil determinar precisamente quais produtos resultarão da fermentação da fração solúvel dos alimentos no rúmen dos animais. Nos animais, a redução do tamanho das partículas dos alimentos ocorre pela mastigação, processo este fisicamente diferente do processo de moagem mecânica; da mesma forma, a simulação da taxa de passagem no sistema “in vitro” é problemática. Mas, apesar destas limitações, os dados de produção de gás podem contribuir para o entendimento da digestão ruminal e descrição dos diferentes alimentos e, desta forma, auxiliar na predição do desempenho animal de maneira mais exata, por permitir detectar diferentes qualidades dos alimentos que não puderam ser detectadas pelas determinações tradicionais.

O sistema “in vitro” possui as vantagens de se estar medindo o resultado direto do metabolismo microbiano, ao invés de se registrar o desaparecimento do substrato, e de permitir o monitoramento a intervalos de tempos pré-determinados sem interferir no processo fermentativo, permitindo um estudo mais preciso da cinética de fermentação ruminal.

Quando se avalia um sistema contínuo, como no caso da degradação dos alimentos no rúmen, seriam inadequadas as determinações das concentrações dos produtos finais da fermentação ou simplesmente a mensuração quantitativa e qualitativa do substrato remanescente após um determinado período de incubação. Neste contexto, a técnica de produção de gás “in vitro” é uma importante metodologia auxiliar, apresentando alta capacidade operacional e baixo custo, no qual os perfis dos gases produzidos podem ser gerados utilizando sistemas semi ou totalmente automatizados. O conhecimento dos produtos finais da fermentação (quantitativamente e qualitativamente) e dos resíduos não fermentados, permitem estimar a taxa, a extensão e a eficiência do processo fermentativo ruminal.

Neste experimento não foram mensurados a produção total e o perfil do gás produzido no trato digestivo posterior, isto é, intestinos delgado e grosso. Considerando que nestes compartimentos os nutrientes para bactérias do ceco e/ ou cólon provêm de polissacarídeos não digeridos e de secreções e tecidos endógenos (predominantemente células epiteliais) (BUTINE et al., 1989; COLEMAN et al., 1996), apresentando uma composição física e química mais constante e menos influenciada pela ração a que o animal foi submetido. Além disso, como visto anteriormente, esta produção é pequena comparada à que ocorre no rúmen, chegando, por exemplo, no máximo a 12% no caso do metano.

Quanto à metodologia utilizada neste trabalho, as altas correlações verificadas entre algumas das variáveis estudadas, destacando a produção total de gás (em mL) e o pH, constituem em fontes valiosas de informações em experimentos desta natureza. Considerando a facilidade e praticamente ausência de custo para a obtenção destas variáveis através da metodologia desenvolvida e descrita no Capítulo 2, é possível que a mesma possa contribuir para a produção científica, entretanto, mais experimentos são necessários para comprovar sua eficiência e confiabilidade.

Recentemente, foi verificado por SAADOUN & CABRERA (2000) que o nível de emissão de metano por ovinos sob pastejo, nas mesmas condições experimentais, variou muito e a causa desta foi a diferença existente entre os animais, onde, aproximadamente, 5% apresentaram alta emissão de metano e 5% baixa. JUDD et al. (1999) também verificaram grande variação individual na emissão diária de metano por ovinos, sugerindo que outros fatores, além dos ingredientes e das quantidades dos distintos ingredientes utilizados na confecção das rações, interferem na sua produção e precisam ser melhor elucidados por futuros experimentos. A determinação das causas destas variações podem fornecer importantes informações para se estabelecer maneiras para o controle da emissão de metano por ruminantes e, conseqüentemente, maximização da produção.

Portanto, mais trabalhos são necessários a fim de se constatar a eficiência do método de produção de gás “in vitro” com outros tipos de alimentos volumosos ou concentrados, considerando que o pH é um fator limitante.

5.1. Referências Bibliográficas

BUTINE, T. J.; LEEDLE, J. A. Z. Enumeration of selected anaerobic bacterial groups in cecal and colonic contents of growing-finishing pigs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 1112-1116, 1989.

COLEMAN, M. E.; DREESEN, D. W.; WIEGERT, R. G. A simulation of microbial competition in the human colon ecosystem. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 3632-3639, 1996.

JUDD, M. J. et al. Net methane emissions from grazing sheep. **Global Change Biology**, v. 5, p. 647-657, 1999.

SAADOUN, A.; CABRERA, M. C. Los métodos de simulación de la digestión y del metabolismo. El modelo celular. In: REUNIÓN LATINOAMERICANA DE PRODUCCIÓN ANIMAL, 15., 2000. **Anais...**, 2000. 1 CD-ROM.