

**FLAVIO PERNA JUNIOR**

**Efeito de aditivos alimentares sobre a produção de metano ruminal utilizando a técnica de fermentação ruminal *ex situ* (micro-rúmen), digestibilidade aparente total e excreção de nutrientes em bovinos**

---

Pirassununga - SP

2013

**FLAVIO PERNA JUNIOR**

**Efeito de aditivos alimentares sobre a produção de metano ruminal utilizando a técnica de fermentação ruminal *ex situ* (micro-rúmen), digestibilidade aparente total e excreção de nutrientes em bovinos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

**Departamento:**

Nutrição e Produção Animal

**Área de concentração:**

Nutrição e Produção Animal

**Orientador:**

Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues

De acordo: \_\_\_\_\_

Orientador

Pirassununga - SP

2013

**Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP**

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

## DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2894  
FMVZ

Perna Junior, Flavio

Efeito de aditivos alimentares sobre a produção de metano ruminal utilizando a técnica de fermentação ruminal *ex situ* (micro-rúmen), digestibilidade aparente total e excreção de nutrientes em bovinos. / Flavio Perna Junior. -- 2013.

100 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues.

1. Gases de efeito estufa. 2. Digestão. 3. Monensina. 4. Tanino. 5. Ruminantes. I. Título.

## CERTIFICADO DE BIOÉTICA



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

*Comissão de Ética no uso de animais*

### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo da produção de metano entérico sob a perspectiva de novas variáveis de fermentação ruminal", protocolado sob o nº 2335/2011, utilizando 8 (oito) bovinos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 21/9/2011.

We certify that the Research "Study of enteric methane production from the perspective of new variables of ruminal fermentation", protocol number 2335/2011, utilizing 8 (eight) bovine, under the responsibility Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 9/21/2011.

São Paulo, 21 de setembro de 2011.

Denise Tabacchi Fantoni  
Presidente

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: PERNA JR., Flavio

Título: Efeito de aditivos alimentares sobre a produção de metano ruminal utilizando a técnica de fermentação ruminal *ex situ* (micro-rúmen), digestibilidade aparente total e excreção de nutrientes em bovinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho, com o mesmo carinho e respeito aos meus pais,  
Flávio e Aparecida e, aos meus irmãos, Rogério, Everaldo e Adriana,  
alicerces da minha vida.*

*À VIDA!*

*“é bonita, é bonita e é bonita”*

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela saúde!

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e ao Departamento de Nutrição e Produção Animal pela oportunidade de realização do Mestrado.

Ao orientador, Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues, pelo incentivo, ensinamentos e caráter profissional, para o desenvolvimento da pesquisa.

Às Dr.<sup>as</sup> Carolina Tobias Marino e Fernanda Altieri Ferreira, por serem além de companheiras do grupo de pesquisa, grandes amigas. Muito obrigado pelo incentivo, ensinamentos e pela ajuda durante o experimento.

Aos professores do Departamento de Nutrição e Produção Animal - VNP, pelos ensinamentos durante as aulas e no meu dia a dia.

Aos funcionários e colaboradores do Departamento, responsáveis pelo indispensável suporte para o bom andamento de nossas atividades, em especial à Alessandra, Fábria e João Paulo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro ao projeto.

À empresa Veronese<sup>®</sup>, pelo fornecimento do produto testado.

Ao senhor Gilmar Edson. Botteon, responsável pelo setor de fistulados do VNP (FMVZ-USP), pelo carinho com os alunos e com os animais, pela disposição a sempre nos ensinar e pelos bons momentos compartilhados.

Aos estagiários que atuaram direta e indiretamente neste trabalho, em especial à parceira Dianita (Diana Carolina Zapata Vasquez).

Aos colegas dos Laboratórios de Cromatografia, Bioquímica e Bromatologia do VNP (FMVZ/USP), Ari Luiz de Castro, Gilson Luiz Alves de Godoy, Simi Luisa D. Aflalo,

Everson J. Lázaro, Ana Flavia Vitorino Elci e Renata.Conti, agradeço o aprendizado e auxílio na realização das análises laboratoriais.

À equipe do grupo de pesquisa e grandes amigos, Carolina Tobias Marino, Fernanda Altieri Ferreira, Lerner Arévalo Pinedo, Mauricio Furlan Martins, Eduardo Cuelar Orlandi Cassiano, Laura Alexandra R. Solórzano, Tarley Araújo de Barros. Muito obrigado por todos os momentos compartilhados e pelas boas risadas.

A todos os colegas de Pós-graduação, que estiveram conosco nesta fase.

Aos meus pais, Flavio Perna e Aparecida Scapin Perna, e aos meus irmãos, Rogério, Everaldo e Adriana, pelo amor e apoio incondicionais.

À “Srta Beatriz Matos Abdulklech”, namorada, companheira, incentivadora, que tem me suportado...rsrs.

A grande família de morada, Mauricio Furlan Martins (Xibungo), Eduardo Cuelar Orlandi Cassiano (Frodo), Caio Garibaldi, Rodrigo Gardinal (Komixão); à vizinhança, Maria Fernanda, Nara, Carlos (Cadu), Rafael (Cabide), Viviane (Vivi), Léa; aos agregados, Flavinho, Dudu, Tarley, enfim, por todos que por lá passaram e fizeram parte das boas conversas, comidas e risadas.

Nomes, datas e boas recordações desta maravilhosa etapa não faltam. Enfim, agradeço indistintamente a todos que participaram, direta e indiretamente, para o desfecho deste mestrado.

MUITO OBRIGADO!!!

## RESUMO

PERNA JR., F. **Efeito de aditivos alimentares sobre a produção de metano ruminal utilizando a técnica de fermentação ruminal *ex situ* (micro-rúmen), digestibilidade aparente total e excreção de nutrientes em bovinos.** [Effect of feed additives on ruminal methane production using the technique of *ex situ* ruminal fermentation (micro-rumen), total tract apparent digestibility of nutrients and excretion in cattle]. 2013. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

Problemática mundial levantada nas últimas duas décadas, a geração de gases de efeito estufa (GEE) tem parte devida à emissão de metano por ruminantes. O metano, um potente GEE, é produto final do processo fermentativo de bovinos e, por constituir perda no potencial produtivo destes, tem sido objeto de estudo por nutricionistas do mundo todo. Na busca por estratégias para diminuir essas perdas, diferentes dietas, aditivos e manejos nutricionais têm sido empregados. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos aditivos alimentares, monensina ou tanino, sobre a produção de metano ruminal em bovinos, utilizando-se a técnica de fermentação ruminal *ex situ* (micro-rúmen), e sobre os parâmetros da fermentação ruminal, a digestibilidade aparente total e a excreção de nutrientes da dieta. Seis vacas ( $873 \pm 81$  kg) canuladas no rúmen foram utilizadas e distribuídas a três dietas, que diferiram quanto ao aditivo utilizado, seguindo-se delineamento experimental em quadrado latino 3x3 replicado (n= 18 unidades experimentais): Controle (CON): sem aditivo; Monensina (MON): adição de 300 mg de monensina sódica por animal por dia; Tanino (TAN): adição de 100 g de extrato concentrado de tanino condensado obtido da Acácia-negra (*Acacia mearnsii*) por animal por dia. Cada período experimental foi constituído de 21 dias, sendo que, entre o dia 5 e o dia 15, 2 g do marcador óxido crômico por kg de MS de alimento consumido foi administrado via cânula ruminal, para determinação da digestibilidade aparente total da MS e suas frações, bem como da excreção dos nutrientes da dieta. O ensaio de digestibilidade foi constituído por duas fases, sendo os cinco primeiros dias para adaptação ao marcador e os cinco últimos para coleta de fezes. A excreção da MS e dos nutrientes, bem como a excreção de nitrogênio, foi calculada a partir dos dados de coeficiente de digestibilidade da MS e suas frações. Para cada período experimental, os últimos 6 dias foram destinados para coleta de dados do consumo de matéria seca (CMS). No dia 21 coletou-se líquido ruminal, antes, 3, 6, 9 e 12 h após a alimentação matinal, para determinação da concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e metano (CH<sub>4</sub>). As concentrações de CH<sub>4</sub> e AGCC foram determinadas por cromatografia gasosa. O pH ruminal foi mensurado por

um dispositivo contínuo de mensuração, durante 24 horas no 21º dia de cada período experimental. A técnica de fermentação *ex situ* consiste em incubar frascos tipo penicilina com conteúdo ruminal sólido e líquido, em banho termostático por 30 minutos, com posterior mensuração da produção de metano por cromatografia gasosa, sendo estimada a perda de energia relativa (PER). A PER avalia a eficiência da fermentação dos alimentos, ou seja, verifica a perda de metano quando comparada aos outros produtos da fermentação, tais como, ácido acético, propiônico e butírico. Os dados foram analisados pelo programa SAS (Versão 9.2, 2010) através do procedimento MIXED. No modelo, o efeito de tratamento foi considerado fixo e os efeitos de período, quadrado e animal dentro de quadrado considerados aleatórios. Não houve diferenças significativas ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos para o consumo, digestibilidade aparente total e excreção da MS, PB, EB, FDN, FDA, EE, ENN, MO ou P, nem na digestibilidade do NDT e na excreção de N. Não houve efeito significativo dos aditivos ( $P>0,05$ ) sobre a concentração de N-NH<sub>3</sub>, pH ruminal, para os ácidos acético, propiônico e butírico, nem para o AGCC total. Para a variável metano houve diferença significativa ( $P<0,05$ ), sendo que o tratamento com monensina foi responsável por reduzir a produção de metano em 10,7%, já o tanino reduziu em 8,0%, quando comparados ao tratamento controle. Observou-se que a PER foi diminuída significativamente em 20,3% e 23,8% ( $P=0,0387$ ) com a administração dos aditivos monensina e tanino, quando comparadas ao tratamento controle. Portanto, a utilização de monensina ou tanino, em dietas com proporção de volumoso e concentrado de 50%, demonstra ser uma interessante opção em dietas para bovinos, com vistas a eficiência energética dos animais, não interferindo sobre o consumo, digestibilidade e excreção dos nutrientes com consequente redução nas emissões de metano.

Palavras-chave: Gases de efeito estufa. Digestão. Monensina. Ruminantes. Tanino.

## ABSTRACT

PERNA JR., F. **Effect of feed additives on ruminal methane production using the technique of *ex situ* ruminal fermentation (micro-rumen), total tract apparent digestibility of nutrients and excretion in cattle.** [Efeito de aditivos alimentares sobre a produção de metano ruminal utilizando a técnica de fermentação ruminal *ex situ* (micro-rúmen), digestibilidade aparente total e excreção de nutrientes em bovinos]. 2013. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

Worldwide problem raised in the last two decades, the generation of greenhouse gases (GHG) is partly due to methane emission by ruminants. Methane, a powerful greenhouse gas, is the end product of the fermentation process in cattle, and as is considered a potential loss in their productive potential has been studied by nutritionists worldwide. In the search for strategies to decrease these losses, different diets, additives and nutritional management have been employed. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of feed additives monensin or tannins on ruminal methane production in cattle evaluated by the technique of *ex situ* ruminal fermentation (micro-rumen), and on rumen fermentation parameters, as well as, total tract apparent digestibility and excretion of nutrients. Six ruminally cannulated cows ( $873 \pm 81$  kg) were distributed to three diets that differed on the additive used, in a replicated 3x3 Latin square experimental design (n=18 experimental units): Control (CON): no additive; Monensin (MON) addition of 300 mg of monensin per animal per day; Tannin (TAN): addition of 100 g of concentrated extract condensed tannin obtained from black wattle (*Acacia mearnsii*) per animal per day. Each experimental period consisted of 21 days, and between day 5 and day 15, 2 g per kg DM consumed of the marker chromic oxide was administered via rumen cannula for determination of DM and its fractions apparent digestibility as well as, excretion of nutrients. Digestibility trial consisted of two phases, the first five days for adaptation to the marker and the last five for feces sampling. The excretion of DM and nutrients, as well as, nitrogen excretion was calculated from the data of DM digestibility and its fractions. In each trial, the last 6 days were used for data collection of dry matter intake (DMI). On day 21, ruminal fluid was collected before, 3, 6, 9 and 12 h after morning feeding to determine the concentration of short chain fatty acids (SCFA) and methane (CH<sub>4</sub>). The concentration of SCFA and CH<sub>4</sub> were determined by gas chromatography. Rumen pH was measured by a continuous measurement device for 24 hours on day 21 of each experimental period. The fermentation technique consists of *ex situ* incubation of penicillin flasks with liquid and solid rumen contents in water bath for 30

minutes, with subsequent measurement of methane production by gas chromatography, with final estimation of relative energy loss (REL). The REL evaluates the efficiency of feed fermentation, in other words, verifies methane loss when compared to the other fermentation products such as acetic, propionic and butyric acids. Data were analyzed using the MIXED procedure of SAS (Version 9.2, 2010). In the model, the effect of treatment was considered fixed and the effects of period, square, and animal within square were considered random. No significant differences ( $P>0.05$ ) between treatments were observed for dry matter intake, apparent digestibility and excretion of DM, CP, GE, NDF, ADF, EE, NFE, MO or P, nor TDN digestibility and N excretion. There was no significant effect ( $P>0.05$ ) of additives on rumen pH, concentration of total SCFA, acetic, propionic and butyric acids, as well as,  $\text{NH}_3\text{-N}$ . Monensin reduced ( $P<0.05$ ) methane production by 10.7%, whereas tannin reduced by 8.0%, when compared to control treatment. Relative energy loss was significantly decreased by 20.3% and 23.8% ( $P=0.0387$ ) with administration of monensin and tannin when compared to control. Therefore, the use of monensin or tannin in diets with forage to concentrate ratio of 50%, shows to be an interesting option in cattle diets aiming to improve energy efficiency in animals, not interfering on intake, digestibility and nutrient excretion with consequent reduction in methane emissions.

Keywords: Greenhouse gases. Digestion. Monensin. Tannin. Ruminants.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Esquema da análise de variância para delineamento em quadrado latino replicado.....	45
Tabela 2 -	Proporções de ingredientes e composição bromatológica estimada da dieta experimental, expressa em porcentagem da matéria seca (%MS).....	46
Tabela 3-	Efeito de aditivos alimentares sobre o consumo de matéria seca, expresso em quilograma por dia, porcentagem do peso vivo ou unidade de peso metabólico.....	57
Tabela 4 -	Variáveis de pH ruminal, em 24 horas, determinadas pela metodologia de mensuração contínua em bovinos suplementados com diferentes aditivos .....	59
Tabela 5 -	Efeito da inclusão de diferentes aditivos na dieta sobre a produção de N-NH <sub>3</sub> .....	61
Tabela 6-	Efeito da inclusão de diferentes aditivos na dieta sobre a produção de AGCC, de metano e sobre a PER.....	63
Tabela 7 -	Esquema da análise de variância para delineamento em quadrado latino replicado.....	80
Tabela 8 -	Proporções de ingredientes e composição bromatológica estimada da dieta experimental, expressa em porcentagem da matéria seca (% MS) .....	81
Tabela 9-	Efeito de aditivos alimentares sobre o consumo da MS e dos nutrientes em vacas secas canuladas no rúmen .....	85
Tabela 10 -	Efeito de aditivos alimentares sobre a digestibilidade aparente total da MS e suas frações em vacas secas canuladas no rúmen .....	86
Tabela 11 -	Efeito de aditivos alimentares sobre a excreção da MS e dos nutrientes em vacas secas canuladas no rúmen .....	92

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática de alguns processos no rúmen, com destaque para a fermentação microbiana (setas grossas) do alimento ingerido em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC, principalmente ácidos acético, propiônico e butírico) e de hidrogênio e dióxido de carbono (H <sub>2</sub> e CO <sub>2</sub> ).....	24
Figura 2 - Fotos ilustrativas das baias das instalações do Estábulo Experimental da FMVZ/USP .....	44
Figura 3 - Esquema dos dias de coleta para cada variável avaliada dentro de cada período experimental .....	47
Figura 4 - Ilustração da montagem das probes de mensuração contínua de pH ruminal.....	49
Figura 5 - Ilustração da colocação das probes de mensuração contínua de pH ruminal nos animais (a e b) .....	50
Figura 6 - Ilustração do preparo dos frascos .....	51
Figura 7 - Frascos em panela com água fervente .....	52
Figura 8 - Valores médios de pH ruminal mensurados através da metodologia de mensuração contínua em bovinos alimentados com diferentes aditivos. As setas representam o momento do fornecimento da alimentação. ....	59
Figura 9 - Concentração de nitrogênio amoniacal nos diferentes tempos de coleta de conteúdo ruminal antes, 3, 6, 9, 12 horas após a alimentação matinal. a) concentração (mg/dL) dos frascos sem incubação. b) concentração (mg/dL) dos frascos após 30 minutos de incubação. c) concentração da diferença (30 min – 0 min) estimada por hora (mg/dL/h).....	62
Figura 10 - Produção relativizada dos produtos da fermentação ruminal (mol/Kg/dia) para os diferentes tratamentos. ....	65
Figura 11 - Valores médios da produção de (a) Ácido Acético (mol/Kg/dia), (b) Propiônico (mol/Kg/dia), (c) Butírico (mol/Kg/dia), (d) AGCC Total (mol/Kg/dia), (e) Metano (mol/Kg/dia) e (f) PER (%) nos diferentes tempos de coleta do conteúdo ruminal.....	66
Figura 12 - Esquema dos dias de coleta para análise de digestibilidade aparente total da MS e suas frações e a excreção dos nutrientes, avaliadas dentro de cada período experimental. ....	82
Quadro 1- Esquema do delineamento de quadrado latino 3x3 replicado .....	45
Quadro 2 - Esquema do delineamento de quadrado latino 3x3 replicado.....	80

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....	15
CAPÍTULO 2 - REVISÃO DA LITERATURA .....	18
2.1 Ambiente ruminal e fermentação microbiana .....	18
2.2 Consumo de MS e digestibilidade aparente total .....	20
2.3 Emissão de metano: perspectiva ambiental e nutricional .....	21
2.4 Metanogênese em ruminantes .....	22
2.5 Estratégias nutricionais para diminuição de perda energética por produção de metano .....	25
2.6 Métodos para quantificação de metano .....	27
2.7 Quantificação de metano e relação com outras variáveis de fermentação ruminal .....	29
REFERÊNCIAS .....	31
CAPÍTULO 3 - EFEITO DE ADITIVOS ALIMENTARES SOBRE A PRODUÇÃO DE METANO RUMINAL EM BOVINOS .....	40
RESUMO .....	40
ABSTRACT .....	41
3.1 Introdução .....	42
3.2 Material e Métodos .....	43
3.3 Resultados e Discussão .....	56
3.4 Conclusões .....	67
REFERÊNCIAS .....	69
CAPÍTULO 4 - EFEITO DE ADITIVOS ALIMENTARES SOBRE A DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL E A EXCREÇÃO DE NUTRIENTES DA DIETA EM BOVINOS .....	75
RESUMO .....	75
ABSTRACT .....	76
4.1 Introdução .....	77
4.2 Material e Métodos .....	79
4.3 Resultados e Discussão .....	84
4.4 Conclusões .....	93
REFERÊNCIAS .....	94

## CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Apesar da reconhecida importância da agropecuária na produção de alimentos e geração de renda, atualmente muito se discute sobre o impacto ambiental das atividades pecuárias e agrícolas, principalmente relativo às mudanças climáticas. A pecuária brasileira, em especial, vem sendo criticada por emitir quantidades significativas de gases de efeito estufa (GEE). Tal crítica tem sido fundamentada nos baixos índices zootécnicos verificados em sistemas de exploração animal baseados em pastagens degradadas ou que se encontram abaixo do seu potencial de produção. A ineficiência desse modelo de exploração tem gerado maiores quantidades de GEE por quilo de carne e/ou de leite produzidos (IPCC, 2007).

O crescimento da população mundial e do seu poder aquisitivo tem promovido aumento acentuado da demanda por alimentos de origem animal. Projeta-se um aumento na produção mundial de carne de 229 milhões de toneladas em 1999-2001 para 465 milhões de toneladas em 2050; e na produção de leite de 580 para 1.043 milhões de toneladas nesse mesmo período (FAO, 2006). O Brasil ocupa posição de destaque na produção pecuária, sendo importante fornecedor de proteína animal para a população mundial.

O acúmulo de GEE na atmosfera terrestre levou a previsões de que as temperaturas da superfície global aumentarão entre 1 e 6°C durante o século 21. Dentre os vários GEE, a agropecuária contribui de forma significativa com a emissão de três deles: metano (CH<sub>4</sub>), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e óxido nitroso (N<sub>2</sub>O). O CH<sub>4</sub> compõe 16% do total das emissões globais de GEE (SCHEEHLE; KRUGER, 2006) e é bastante prejudicial, pois tem um potencial de aquecimento global 21 vezes maior do que o CO<sub>2</sub> (IPCC, 2007).

A produção de metano resulta da fermentação anaeróbia da matéria orgânica em ambientes alagados, campos de arroz cultivados por irrigação de inundação, fermentação entérica, tratamento anaeróbio de resíduos animais e queima de biomassa. O metano produzido em sistemas de produção de bovinos origina-se, principalmente, da fermentação entérica (85 a 90%), sendo o restante produzido a partir dos dejetos destes animais. Do metano produzido por fermentação entérica no rúmen, 95% é excretado por eructação e, daquele produzido no trato digestivo posterior, 89% é excretado através da respiração e apenas 11% pelo reto (MURRAY et al., 1976). O metano derivado da fermentação entérica de ruminantes representa cerca de ¼ das emissões antropogênicas desse gás (WUEBBLES; HAYHOE, 2002). Bovinos produzem de 150 a 420 litros de CH<sub>4</sub> por dia e ovinos de 25 a 55 L/dia (CZERKAWSKI, 1969; HOLTER; YOUNG, 1992; McALLISTER et al., 1996), o que

corresponde a emissões anuais de 39,1 a 109,5 kg e de 6,5 a 14,4 kg, respectivamente. A Índia e o Brasil lideram o ranking mundial de emissão total de metano entérico, com 14,5 e 10,3 Tg de CH<sub>4</sub>/ano, respectivamente. Quando é considerada apenas a emissão por bovinos, o Brasil é apontado como o maior emissor (9,6 Tg de CH<sub>4</sub>/ano), seguido da Índia (8,6 Tg de CH<sub>4</sub>/ano) e dos Estados Unidos da América (5,1 Tg de CH<sub>4</sub>/ano) (THORPE, 2009). Segundo resultados preliminares do Segundo Inventário Nacional de Emissões de GEE (MCT, 2009), no ano de 2005 a agropecuária foi responsável por 22% do total das emissões de metano no Brasil.

Além de ser caracterizado como um importante GEE, responsável por 3,5% do aquecimento global e representando 15% da produção de metano das atividades antrópicas, o metano de origem entérica tem relação direta com a eficiência da fermentação ruminal em virtude da perda de carbono e, conseqüentemente, perda de energia, influenciando o desempenho animal (COTTON; PIELKE, 1995). O conhecimento dos mecanismos de síntese de metano e os fatores que afetam sua produção são importantes. O desafio no sistema produtivo de ruminantes é desenvolver dietas e estratégias de manejo que minimizem a produção relativa de metano (metano/kg de leite, carne ou lã), possibilitando maior eficiência produtiva e redução da contribuição negativa da pecuária para o aquecimento global.

Desta forma, métodos foram desenvolvidos com o objetivo de quantificar a emissão de metano por ruminantes, sob diferentes condições (MURRAY et al., 1976; CAMMEL et al., 1980; McLEAN; TOBY, 1987; MILLER; KOES, 1988; FRANCE et al., 1993; JOHNSON et al., 1994). Apesar de tais métodos terem sido desenvolvidos sob a perspectiva da nutrição animal, ou seja, com o objetivo de se quantificar as perdas energéticas em ruminantes submetidos a diferentes dietas, esses foram bastante úteis sob outra ótica. A fim de se mensurar o montante de metano emitido pelos rebanhos mundiais, esses métodos foram fundamentais para a confecção de tabelas de inventários apresentados pelo Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC, 1997).

Entretanto, entende-se que cada método desenvolvido possui alguma inadequação ou inconveniente quando se objetiva a caracterização da fermentação ruminal como um todo. Miller e Koes (1988); Beauchemin e McGinn (2005) e Rodríguez et al. (2007), por exemplo, descreveram a construção e operação de sistemas calorimétricos para mensuração de metano e dióxido de carbono em ensaios metabólicos. Apesar de acurada, esta técnica tem como desvantagens alto custo de instalação e manutenção dos equipamentos, além de restringir os movimentos do animal, que inevitavelmente ficam tolhidos, não correspondendo ao seu estado natural e fisiológico (JOHNSON; JOHNSON, 1995). Ademais, há a necessidade de treinarem-se os animais a serem utilizados nos ensaios, tarefa que pode ser bastante laboriosa,

além de restringir o número de unidades experimentais, muitas vezes aquém do necessário, para realização do estudo.

Outro tipo de metodologia descrita para quantificação de emissão de metano por ruminantes é a que utiliza gases traçadores, sendo um dos mais utilizados o gás inerte hexafluoreto de enxofre (JOHNSON et al., 1994). A técnica consiste na inserção no rúmen de uma cápsula contendo o gás, que possui liberação controlada e conhecida do mesmo. É colocado no animal um cabresto com um dispositivo que coleta o ar erutado por 24 horas e, após este período, a emissão do metano é calculada com base na concentração do traçador e do metano amostrados e na emissão conhecida do hexafluoreto de enxofre (JOHNSON et al., 1994; PRIMAVESI et al., 2004). Esta metodologia veio sanar o problema da condição antinatural a qual era imposta aos animais mantidos dentro de câmaras calorimétricas, pois permite que os animais se movimentem e se alimentem normalmente (PRIMAVESI et al., 2004). Em contrapartida, tal técnica mensura apenas o metano erutado, não sendo possível quantificarem-se os AGCC, o que prejudica a compreensão do processo global da fermentação ruminal.

Sendo assim, compreende-se que, ao investigar-se a quantidade de metano produzida por unidade de tempo, é fundamental que seja investigada também a quantidade de AGCC, os principais produtos da fermentação ruminal. Não menos importante é o estudo da relação entre os produtos que serão utilizados como fonte energética pelo ruminante (AGCC) e os subprodutos da fermentação, que representam perda de energia ingerida (metano). Neste contexto, objetivou-se com o presente trabalho avaliar o efeito de diferentes aditivos alimentares sobre a fermentação ruminal e produção de metano entérico pela inovadora técnica *ex situ* de fermentação ruminal (micro-rúmen), assim como a digestibilidade aparente total e a excreção da matéria seca e dos nutrientes em bovinos, obtendo, desta maneira, uma compreensão mais abrangente do processo fermentativo no rúmen e de processos digestivos que podem estar envolvidos na ineficiência da produção animal.

## CAPÍTULO 2 - REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Ambiente ruminal e fermentação microbiana

O processo digestivo das espécies ruminantes compreende uma das relações simbióticas entre seres vivos mais bem sucedidas na natureza. Nesta relação, o ruminante provê ambiente ótimo ao crescimento dos microrganismos com pH, umidade e substrato adequados ao crescimento dos mesmos. Os microrganismos, em contrapartida, produzem os AGCC e proteína microbiana que serão aproveitados pelo ruminante como fonte de energia e proteína, respectivamente (RUSSELL, 2002). O principal órgão digestório dos ruminantes, o rúmen, é considerado uma câmara de fermentação que apresenta condições ambientais adequadas, tais como temperatura entre 38-41°C, pH entre 5,5-7,2, umidade entre 85-90%, osmolaridade entre 260-340 mOsm e ambiente anaeróbio. Além disso, há presença constante de substratos para fermentação oriundos da alimentação, um padrão de motilidade ruminal que permite a mistura do conteúdo e remoção periódica dos subprodutos de fermentação não utilizados pela microbiota através de absorção pelo epitélio ruminal (CARVALHO et al., 2003).

A maior parte dos nutrientes do alimento, principalmente as fontes energéticas e protéicas, é transformada em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), em massa microbiana e em gases, como metano (CH<sub>4</sub>), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e hidrogênio (H<sub>2</sub>) (BAKER, 1999). Os AGCC podem ser considerados um resíduo da fermentação para os microrganismos. Entretanto, para o ruminante, representam a principal fonte de energia. A energia presente nos AGCC representa em torno de 75 a 80% da energia originalmente presente nos carboidratos fermentados e contribuem em 50 a 70% da energia digestível do alimento (KOZLOSKI, 2002).

Os ruminantes possuem a capacidade para converter alimentos de baixa qualidade em proteína de alta qualidade (VARGA; KOLVER, 1997). O rúmen é considerado um ecossistema microbiano diverso e único, composto por quatro tipos de microrganismos ativos no seu interior: bactérias, protozoários, fungos e arqueias metanogênicas, sendo as bactérias constituintes de 60 a 90% da biomassa microbiana com cerca de 200 espécies (KOZLOSKI, 2002). As arqueias metanogênicas, responsáveis pela produção de CH<sub>4</sub>, formam um grupo distinto de microrganismos, possuindo co-fatores (coenzima M, F<sub>420</sub>, F<sub>430</sub>) e lipídeos (éteres

de isopranyl glicerol) únicos (McALLISTER et al., 1996). A parede celular destes microrganismos é composta por pseudomureína, proteína, glicoproteína ou heteropolisacarídeos e a sequência de nucleotídeos indica uma evolução inicial distinta das bactérias (ISHINO et al., 1998). A fermentação anaeróbia do alimento, principalmente de tipo fibroso, é possível devido ao sinergismo existente entre a população microbiana, permitindo a degradação pela ação de complexos de enzimas, como a  $\beta$ -1-4 celulase, agindo sobre a parede celular das plantas. No entanto, a fermentação do alimento e conversão em carne e leite pode ser pouco eficiente devido a fatores associados à digestibilidade das forrageiras (VARGA; KOLVER, 1997).

Desta forma, o desenvolvimento dos microrganismos responsáveis pela fermentação depende de uma série de condições ambientais para realizarem suas funções a contento. Por exemplo, as bactérias fibrolíticas são prejudicadas em pH abaixo de 6, situação na qual bactérias produtoras de ácido lático começam a agir (OWENS; GOETSCH, 1993). O potencial redox no rúmen está usualmente entre 250-450 mV, refletindo ausência de oxigênio e o excesso de potencial redutor (VAN SOEST, 1994). Em consequência dessa característica do ambiente ruminal, as opções metabólicas dos microrganismos tornam-se limitadas, sendo obrigados a trabalhar com este excesso de equivalentes redutores (NADH), utilizando-os em uma variedade de reações. Para dispor desses compostos, eles reduzem todos os compostos disponíveis, sendo o CO<sub>2</sub> reduzido a metano, sulfatos e nitratos a sulfetos e amônia, e ácidos graxos insaturados a saturados. Apesar desse excesso de compostos redutores, o crescimento microbiano permanece limitado pela disponibilidade de ATP (OWENS; GOETSCH, 1993).

A manipulação da fermentação ruminal pode ser realizada tanto pela variação do substrato oferecido, como revestimento, processamento ou tratamento químico de proteínas, lipídios ou carboidratos (CHALUPA, 1975; FERGUSON, 1975; SCOTT; ASHES, 1993; HUNTINGTON, 1997), como também por ação de aditivos sobre a microbiota ruminal e suas atividades. Estes agentes químicos modulam determinadas vias metabólicas dos microrganismos ruminais, agindo como modificadores de fermentação (CHALUPA, 1977).

## 2.2 Consumo de MS e digestibilidade aparente total

A busca por ingredientes alternativos para a nutrição de ruminantes leva a constantes investigações da dinâmica de fermentação e digestão desses ingredientes nos processos que estão envolvidos na nutrição dos animais de produção (EZEQUIEL et al., 2006; FAYED et al., 2009). O consumo de alimentos e seus nutrientes é o fator mais importante na determinação do desempenho animal e pode ser influenciado pelas características do animal, do alimento e das condições de alimentação (VAN SOEST, 1994). Segundo o NRC (1996), existe alta correlação entre o consumo de matéria seca e a concentração energética da dieta, visto que, dietas com baixa digestibilidade, e portanto com menos energia limitam o consumo por enchimento do rúmen e diminuem a taxa de passagem, enquanto o consumo de dietas ricas em energia e de alta digestibilidade regulam a ingestão por atendimento das exigências energéticas do animal e por fatores metabólicos.

O consumo e digestibilidade dos nutrientes e a utilização destes nos diferentes compartimentos do trato digestivo é a estimativa que mais se aproxima do valor nutritivo verdadeiro dos alimentos. Segundo Mertens (1993), o consumo de alimentos é função do animal (peso vivo, nível de produção, tamanho), do alimento (FDN efetivo, volume, capacidade de enchimento, densidade energética, necessidade de mastigação) e das condições de alimentação (disponibilidade de alimentos, espaço no cocho, tempo de acesso ao alimento, frequência de alimentação). Hoover (1986), em trabalho de revisão, relatou alta correlação entre o consumo de matéria seca e o teor de FDN da forragem e de dietas com menos de 65% de concentrado ou mais de 32% de FDN, sendo o consumo definido pelo efeito de enchimento. Entretanto, Waldo (1986) ponderou que o ponto de transição entre os mecanismos reguladores de consumo não é fixo para uma diversidade de situações.

O coeficiente de digestibilidade de uma dieta é importante por indicar que nutrientes realmente estão disponíveis para o animal. A digestibilidade é afetada pela composição dos alimentos e da ração, preparo dos alimentos, fatores dependentes do animal, nível nutricional (McDONALD et al., 1993) e fatores ambientais, limitando o consumo voluntário para diminuição de produção de calor endógeno.

### 2.3 Emissão de metano: perspectiva ambiental e nutricional

O aumento da concentração de gases de efeito estufa (GEE), como o gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ), metano ( $\text{CH}_4$ ) e óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), devido a atividades antropogênicas, está fazendo com que a temperatura global do planeta se eleve pela maior retenção do calor proporcionada pelos mesmos. Esses gases, juntamente com o vapor d'água, permitem que a radiação solar, principalmente na forma de luz visível, atinja a superfície do planeta, porém bloqueiam parcialmente a radiação infravermelha que é emitida da superfície para a atmosfera, provocando um efeito estufa (IPCC, 2006). De acordo com Moss et al. (2000), até 2030 a temperatura do planeta terá aumentado entre 0,5 °C e 2,5 °C, enquanto que, para o painel das Nações Unidas sobre as Alterações Climáticas (UNFCCC), a temperatura poderá aumentar 4,0°C até 2100 (IPCC, 2007) no cenário mais pessimista.

A quantificação de perda de energia da dieta via eructação em animais ruminantes não é relato recente na literatura. Os primeiros estudos datam da década de 50 (FLATT et al., 1958; KLEIBER, 1958), sempre com o objetivo de investigar-se a ineficiência de determinadas dietas e descobrir-se meios para diminuí-la. A preocupação natural do nutricionista de ruminantes é obter a melhor eficiência alimentar possível, ou seja, a melhor relação entre ganho de peso e consumo de matéria seca, resultando em alta produtividade. Nesta busca, a diminuição de perda energética por eructação de gases, como o metano e dióxido de carbono, é importante, à medida que o animal pode perder de 2 a 12% da energia bruta contida na dieta apenas eructando esses gases (JOHNSON et al., 1993).

Na pecuária, os principais GEE emitidos à atmosfera são  $\text{CH}_4$  e  $\text{N}_2\text{O}$ . A produção de  $\text{CH}_4$  pelos ruminantes é considerada a terceira maior fonte do gás em escala global (PRIMAVESI et al., 2004), sendo a fermentação entérica a principal via produtora de metano nos animais (SIDIROPOULOS; TSILINGIRIDIS, 2009). Estima-se que no mundo as fermentações entéricas dos rebanhos produzam de 160 a 200 milhões de toneladas de metano por ano. O total de  $\text{CH}_4$  emitido pela pecuária (fermentação ruminal e dejetos) corresponde a 35-40% do total de metano antrópico emitido (STEINFELD et al., 2006).

As emissões se dão através da fermentação entérica e a partir de dejetos bovinos. A fermentação entérica resulta em grandes emissões de  $\text{CH}_4$  para a atmosfera, assim como as fezes (NOVAK; FIORELLI, 2010). Já a urina promove, principalmente, emissões de  $\text{N}_2\text{O}$  (CARTER, 2007). Além desses gases, a degradação dos dejetos no campo pode emitir dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), mesmo que em pequenas escalas (JICONG et al., 2006).

Para se ter uma idéia da relação entre aumento da produtividade e queda na emissão de GEE, Barioni et al. (2007) mostraram que, se a eficiência produtiva em bovinos de corte continuar aumentando às mesmas taxas dos últimos 15 anos, é provável que em 2025 a produção de carne seja 25% maior, com os níveis de emissão de GEE apenas 3% maiores, com uma redução de 18% na relação kg CH<sub>4</sub>/kg de carne produzida.

De acordo com o Protocolo de Quioto, países desenvolvidos altamente industrializados terão que reduzir 5,2% a emissão de GEE em relação aos níveis estimados para 1990, acordo assumido por diversos países em 1997. Segundo os projetos de Mecanismos de Desenvolvimento Limpo (MDL), cada tonelada equivalente de gás carbônico que deixar de ser emitida ou for removida da atmosfera por um país em desenvolvimento, como o Brasil, poderá ser negociada no mercado mundial, por meio da venda de RCE (Redução Certificada de Emissão). Este documento é validado por entidades creditadas pela ONU e organizações internas de cada país (CGEE, 2010). Neste contexto, o desenvolvimento de pesquisas que visam à obtenção de informações sobre o potencial de produção e emissão de metano pela pecuária, de acordo com os principais sistemas de produção animal, torna-se interessante para que seja possível manter e/ou melhorar os índices de produtividade e a preservação ambiental.

#### **2.4 Metanogênese em ruminantes**

A eructação de metano por bovinos começa aproximadamente quatro semanas após o nascimento, quando alimentos sólidos são retidos no sistema retículo-rúmen (ANDERSON et al., 1987). O ato da eructação previne condições fatais, como o timpanismo, patologia em que o animal não consegue expulsar os gases que se acumulam em seu rúmen, em virtude da fermentação dos substratos (VAN KRUININGEN, 1995). A metanogênese é um tipo de respiração anaeróbia em que um composto de carbono (como o CO<sub>2</sub>) funciona comoceptor de elétrons. Ela ocorre principalmente na ausência de sulfatos, nitratos, metais oxidados e, em especial, de oxigênio (o processo ocorre quando estes aceptores de elétrons, “mais favoráveis” que o composto de carbono, estão ausentes).

No rúmen, as arqueas metanogênicas, que são microrganismos anaeróbios estritos e principais responsáveis pela produção do metano, são encontradas intimamente associadas com protozoários ciliados (FINLAY et al., 1994). Podem ser encontradas tanto aderidas na

superfície celular dos protozoários, como na fase intracelular dos mesmos (USHIDA; JOUANY, 1996). Considerando que os protozoários ciliados têm um grande potencial de produção de hidrogênio no rúmen, essa associação indica uma relação simbiótica, em que as metanogênicas, por utilizarem o hidrogênio produzido pelos ciliados, favorecem a manutenção de um ambiente ruminal adequado ao desenvolvimento destes microrganismos (VAN SOEST, 1994).

As metanogênicas pertencem ao ramo *Archaea* e são, portanto, evolutivamente distintos dos *Eukarya* (protozoários, fungos, ruminantes) e *Bacteria*. Pesquisas recentes sobre diferentes arqueas em ruminantes, realizadas através da técnica molecular PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) com amplificação e comparação da sequência do gene 16SrRNA, sugerem que a maioria delas são metanogênicas pertencentes a diferentes espécies do gênero *Methanobrevibacter* (JANSSEN; KIRS, 2008). Destas, a maioria são representadas pelas espécies *M. ruminantium* e *M. gottschalki*, que constituem em oito ou mais espécies com base nas definições atuais dentro deste gênero. Outras metanogênicas ruminais dominantes pertencem a talvez quatro espécies do gênero *Methanosphaera* e pelo menos uma ao gênero *Methanomicrobium*. As demais pertencem aos gêneros *Methanosarcina*, *Methanomicrococcus*, *Methanobacterium* e *Methanoculleus*. Além disso, existem alguns grupos de arqueas que habitam o rúmen cuja fisiologia são desconhecidas. Nestes incluem um grupo chamado Rumen Cluster C, que pode representar uma grande parte da comunidade arqueal (JANSSEN; KIRS, 2008). O grupo Rumen Cluster C compreende 16% do total de arqueas ruminais, mas pode chegar a mais de 80%. No entanto, ainda é necessário provar que elas são metanogênicas.

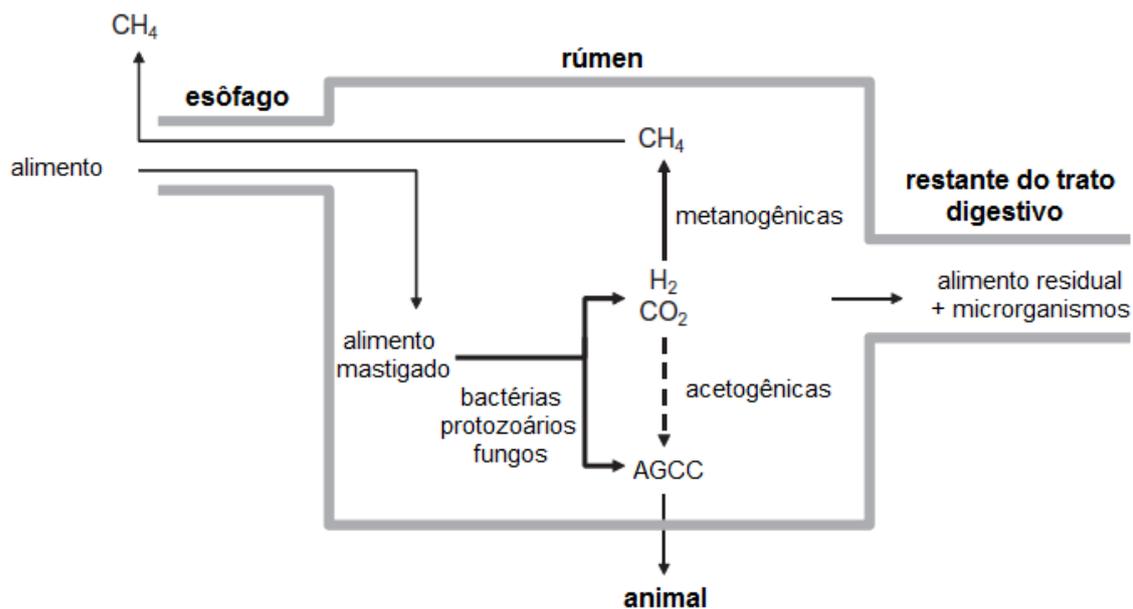
A fonte de energia mais importante para a produção de metano no rúmen é o H<sub>2</sub>, embora o formato e, em menor escala, o metanol também são produzidos e utilizados por metanogênicas. Diferentes espécies metanogênicas utilizam H<sub>2</sub> para reduzir o CO<sub>2</sub> a metano através de uma série de caminhos muito semelhantes contendo enzimas e co-fatores que não são encontrados em não-metanogênicas (THAUER et al., 2008). A figura 1 demonstra alguns processos ruminais, destacando a produção e utilização de diferentes gases.

A atividade das metanogênicas em consumir o H<sub>2</sub> do rúmen reduz sua concentração para níveis baixos (cerca de 1 µM de H<sub>2</sub> dissolvido), permitindo que a fermentação do alimento prossiga mais rapidamente. Isto significa que o animal recebe uma maior quantidade de AGCC em menor tempo (WOLIN, 1979). Espera-se que altas concentrações de H<sub>2</sub> no rúmen retarde a atividade dos microrganismos que fermentam o alimento, diminuindo potencialmente a conversão para AGCC (McALLISTER; NEWBOLD, 2008), sendo que o

desenvolvimento de microrganismos que produzem e utilizam  $H_2$  resulta numa fermentação mais rápida (REES et al., 1995; MORVAN et al., 1996).

Desta forma, a produção de metano nada mais é do que uma forma de remoção dos íons hidrogênio do rúmen, ambiente que, além de ser altamente reduzido, é também anaeróbio. Geralmente, à medida que a digestibilidade da dieta aumenta, a variabilidade na perda de metano aumenta e esta depende basicamente de dois mecanismos: quantidade de carboidratos fermentados no rúmen e suprimento de  $H_2$  disponíveis para produção de metano (JOHNSON; JOHNSON, 1995).

Figura 1- Representação esquemática de alguns processos no rúmen, com destaque para a fermentação microbiana (setas grossas) do alimento ingerido em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC, principalmente ácidos acético, propiônico e butírico) e de hidrogênio e dióxido de carbono ( $H_2$  e  $CO_2$ )



Fonte: Adaptado de Buddle et al. (2011).

→  
Os AGCC são absorvidos através da parede do rúmen e atuam como uma fonte de carbono e energia para o ruminante. O  $H_2$  é utilizado para gerar metano pelas metanogênicas ( $4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$ ), que é eructado e liberado na atmosfera pelo animal. O resíduo alimentar e os microrganismos do rúmen seguem pelo restante do aparelho digestivo (estômago verdadeiro ou abomaso e intestinos delgado e grosso) e são degradados posteriormente; a proteína microbiana constitui uma fonte significativa de nitrogênio para o ruminante. Acredita-se que as acetogênicas, que formam acetato a partir de hidrogênio ( $4H_2 + 2CO_2 \rightarrow \text{Ácido acético} + H_2O$ ), podem tornar-se significativas dissipadoras de hidrogênio na

ausência de metanogênicas (seta tracejada). As linhas grossas indicam o trato digestivo de ruminantes e os órgãos estão em negrito.

## **2.5 Estratégias nutricionais para diminuição de perda energética por produção de metano**

Ruminantes são dependentes de produtos da fermentação como os AGCC e, de forma a minimizarem-se as perdas energéticas da dieta por metanogênese, um processo fisiológico, diversas estratégias foram estudadas. Russell (2002) arrolou, dentre as principais características de uma fermentação ideal, a baixa produção de metano, visando-se ótima eficiência alimentar, ou seja, alta produção (ganho de peso, leite, gestação) e consumo baixo de matéria seca. De fato, Johnson et al. (1993) reportaram associação negativa entre emissão de metano e energia digestível, quando expressadas em porcentagem da energia bruta ingerida. Anos mais tarde, Nkrumah et al. (2006) relataram que novilhos com baixa conversão alimentar (baixa relação entre consumo de matéria seca e ganho de peso), e portanto mais eficientes, produziram menos metano do que novilhos menos eficientes. Isto posto, torna-se claro o objetivo de vários pesquisadores de possuir maior entendimento e controle sobre o metabolismo ruminal (SCHELLING, 1984), assim como estudarem-se estratégias para diminuição da produção de metano.

Técnicas nutricionais, como o uso de ionóforos, glicerol, tanino, saponinas, óleos essenciais (óleos de canola, óleo de alho, linhaça, girassol e etc.), lipídios, vacinas, anticorpos policlonais, técnicas de manejo de pastagens, melhoramento genético e sistemas eficientes de produção, têm sido utilizadas para manipular a fermentação ruminal e reduzir a emissão do gás metano entérico (MOHAMMED et al., 2004; BERNDT, 2010). Embora algumas estratégias alimentares tenham sido propostas para diminuir a emissão de metano provenientes de ruminantes, poucas têm mostrado diminuição persistente, principalmente *in vivo*.

A manipulação da fermentação ruminal pode ser realizada tanto pela variação do substrato oferecido, por exemplo, revestimento, processamento ou tratamento químico de proteínas, lipídios ou carboidratos (CHALUPA, 1975; FERGUSON, 1975; SCOTT; ASHES, 1993; HUNTINGTON, 1997), como também por ação de aditivos sobre a microbiota ruminal e suas atividades. Estes agentes químicos modulam determinadas vias metabólicas dos microrganismos ruminais, agindo como modificadores de fermentação (CHALUPA, 1977).

Um dos modificadores de fermentação ruminal mais utilizados atualmente por nutricionistas do mundo inteiro é a monensina sódica. Aprovada em 1976 pelo órgão americano Food and Drug Administration (FDA) para utilização em dietas para ruminantes, a monensina é uma substância classificada como ionóforo. Neste grupo também se encontram outros aditivos como a salinomocina e a lasalocida. O mecanismo básico de ação do ionóforo é a modificação do fluxo de íons através de membranas biológicas. Dentre outras ações, a monensina é capaz de inibir o crescimento das bactérias produtoras de  $H_2$  (como a *Selenomonas ruminantium*), substrato básico para a produção de metano (VAN NEVEL; DEMEYER, 1977). Reflexos da ação da monensina são aumento da produção de propionato (VAN MAANAN et al., 1978), redução da produção de metano *in vivo* e *in vitro* (BARTLEY et al., 1979), aumento da digestibilidade da matéria seca e do amido, assim como aumento da retenção de nitrogênio (SCHELLING, 1984) e aumento do fluxo de aminoácidos e digestão dos mesmos no duodeno (HAÏMOUD et al., 1995). Todavia, a legislação classifica os ionóforos como antibióticos, o que faz seu uso ser cada vez mais criticado pela sociedade consumidora. Apoiada no princípio da precaução, a União Europeia banuiu em 2006 os antibióticos como promotores de crescimento animal, estando os ionóforos incluídos na lista. A alegação se baseia na possível presença de resíduos no leite e na carne, além da maior probabilidade de aparecimento de resistência bacteriana aos antibióticos usados na medicina humana (OJEU, 2003). Contudo, ainda inexistem base científica justificando que ionóforos aumentam os riscos de transferência cruzada de resistência microbiana (CALLAWAY et al., 2003).

Outra estratégia que possibilita a redução da emissão de gases de efeito estufa por ruminantes é a inclusão de taninos. Os taninos são substâncias polifenólicas com variados pesos moleculares, sendo classificados em hidrolisáveis e condensados. A atividade antimetanogênica dos taninos presentes nas plantas tem sido atribuída, principalmente, ao grupo de taninos condensados. Taninos hidrolisáveis, embora também afetem a metanogênese, são considerados potencialmente tóxicos para os animais (FIELD et al., 1989). Os taninos formam complexos, principalmente, com proteínas e, em menor grau, com íons metálicos, aminoácidos e polissacarídeos, reduzindo a digestibilidade destes. Entretanto, a presença de baixas concentrações de taninos na dieta pode ser utilizada como potencial modulador da fermentação ruminal (MORAIS et al., 2006). A ação dos taninos condensados na metanogênese pode ser atribuída a um efeito indireto, pela redução na produção de  $H_2$ , como consequência da redução na digestibilidade da fibra, e por efeito inibitório direto na população metanogênica (WOODWARD et al., 2001).

Mezzomo (2010) realizou um experimento com o objetivo de avaliar o efeito da suplementação de 0,4% de taninos condensados sobre alguns parâmetros ruminais de bovinos de corte alimentados com dieta contendo 87% de concentrado. O autor observou que os valores de nitrogênio uréico na urina e nitrogênio total na urina foram menores com a inclusão de taninos condensados. Dessa forma, o desperdício de nitrogênio foi diminuído, otimizando a utilização do nitrogênio no ambiente ruminal e colaborando para a redução da excreção de nitrogênio no meio ambiente. Entretanto, embora a produção de metano não tenha sido mensurada nesta pesquisa, alguns pesquisadores tem relatado efeito positivo da suplementação com taninos condensados sobre a emissão de metano entérico (MAKKAR, 2003).

Tiemann et al. (2008) observaram que a inclusão de leguminosas com elevados teores de tanino (*Callinadra calothyrsus* e *Fleminga macrophylla*) provocou diminuição na emissão de metano por carneiros em até 24%, mas esse efeito foi associado à redução na digestibilidade da matéria orgânica e da fibra. Carneiros recebendo “Gamberin”, um produto contendo 49% de tanino condensado (extrato solidificado das folhas de *Uncaria gambir*), apresentaram significativa redução na perda de energia como metano (% da EB) e queda de 75% no número de protozoários ciliados (SARVANAN, 2000).

Ao avaliarem outros aditivos, desta vez naturais e não medicamentosos, pesquisadores começaram a estudar a inclusão de taninos em dietas para ruminantes, que em função da dose utilizada, podem promover desde o aumento de proteína metabolizável da dieta até o controle de alguns microrganismos patogênicos do trato intestinal (PORDOMINGO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008). Realmente, a metanogênese foi reduzida quando do uso de plantas ricas em taninos, tanto *in vitro* (LONGO et al., 2007), quanto *in vivo* em vacas leiteiras (WOODWARD et al., 2004), em cabras (PUCHALA et al., 2005) e em ovelhas (CARULLA et al., 2005), apesar de não ter ocorrido o mesmo efeito em novilhas taurinas (BEAUCHEMIN et al., 2007).

## 2.6 Métodos para quantificação de metano

Uma vez que é possível a manipulação da fermentação ruminal, cabe aos nutricionistas desenvolverem métodos para avaliação da mesma. Como principal produto da fermentação não utilizado pelo ruminante, o metano representa uma variável importante para avaliação da

eficiência da fermentação ruminal. Sistemas confiáveis de predição de produção de metano em uma série de diferentes situações (por exemplo, raça, estado fisiológico, tipo de dieta) podem ser utilizados para a formulação de dietas que propiciem perda mínima de energia por metano (MILLS et al., 2001).

Sendo assim, a quantificação da produção de metano é importante ferramenta ao nutricionista de ruminantes. Métodos para tal estão sendo estudados desde a década de 50, sendo as câmaras calorimétricas os primeiros sistemas descritos na literatura com esta finalidade (JOHNSON; JOHNSON, 1995). A utilização deste método foi de fundamental importância para coletarem-se os primeiros dados de emissão de metano por ruminantes, assim como para determinarem-se perdas por incremento calórico. Estas informações foram utilizadas para se estabelecerem equações que geraram as tabelas de exigências de energia líquida para gestação, ganho de peso e lactação (NRC, 2001). A principal vantagem do método calorimétrico é a acurácia; em contrapartida, é dispendioso e requer treinamento do animal para adequação às condições de restrição de movimento (JOHNSON; JOHNSON, 1995). Outros métodos semelhantes às câmaras calorimétricas foram estudados, como a *headbox* ou método do capuz (YOUNG et al., 1975; KELLY et al., 1994), em que apenas a cabeça do animal fica dentro de uma caixa completamente vedada. Coleta-se então todo ar expirado e eructado pelo animal e a emissão de metano é quantificada. Máscaras, com princípio semelhante, também foram desenvolvidas (KLEIBER, 1958; LIANG et al., 1989). As vantagens destes dois métodos em comparação à câmara calorimétrica é principalmente o custo, porém podem subestimar a produção de metano (LIANG et al., 1989).

Outro método que pode ser utilizado para quantificação da emissão de metano em ruminantes vale-se de traçadores ou indicadores. Estes podem ser radioisótopos do metano (MURRAY et al., 1976) ou gases inertes, como o hexafluoreto de enxofre, cuja utilização foi descrita pela primeira vez por Johnson et al. (1994). A grande vantagem da utilização dos métodos traçadores é que dispensam a contenção do animal, uma vez que são utilizados dispositivos denominados cangas (PRIMAVESI et al., 2004) ao redor do pescoço do animal, permitindo que o mesmo se alimente e se movimente normalmente. Em contrapartida, esta técnica mensura apenas o metano eructado, não sendo possível quantificarem-se os AGCC, o que prejudica a compreensão do processo global da fermentação ruminal.

O método *in vitro* é rápido e mais prático em relação aos métodos *in vivo*. Porém, como toda metodologia *in vitro*, é impossível mimetizar em um frasco a complexidade do rúmen. A própria dieta a qual o animal é submetido pode afetar os resultados (CHERNEY; SICILIANO; PELL, 1993). Adicionalmente, neste tipo de metodologia, é muito difícil

determinar precisamente quais produtos resultaram da fermentação da fração solúvel dos alimentos no rúmen dos animais, assim como é problemática a simulação da taxa de passagem (GASTALDI, 2003).

Recentes estudos relatam a utilização de um sistema de laser para a detecção de metano em bovinos (CHAGUNDA et al., 2009), sendo que a técnica vem sendo mais aplicada em condições comerciais de produção. Este sistema realiza a detecção do metano por medida de absorção de infravermelho de alta sensibilidade através do comprimento de ondas (ISEKI; MIYAJI, 2003), devido o metano ter duas fortes bandas de absorção, ou grupos de linhas de absorção, centrada em 3,3 milímetros e 7,6 mm. O uso de sistemas de laser em bovinos é relativamente recente e estudos iniciais a respeito demonstraram que sua utilização foi viável em vacas leiteiras e que os dados produzidos faziam sentido biológico em termos de consumo de ração, peso vivo e tipo de alimentação. No entanto, existem atualmente, poucos estudos sobre a utilização desta técnica (CHAGUNDA, 2013).

Uma nova técnica, denominada *ex-situ*, vem sendo desenvolvida pelo grupo de pesquisa da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no Campus Pirassununga, SP. A técnica consiste em incubar em banho termostático amostras de conteúdo ruminal dentro de frascos tipo penicilina (micro-rúmen). Assim, são simuladas as condições ruminais por um período de 30 minutos e, após este período, é feito o bloqueio da fermentação por autoclavagem. A vantagem deste método é a possibilidade da mensuração dos produtos finais da fermentação ruminal (CH<sub>4</sub> e AGCC), sendo possível relacionar as perdas energéticas de produção de metano em relação à energia total produzida. Outra vantagem desta técnica é que permite avaliar o perfil fermentativo do ruminante durante o dia, através de coletas de conteúdo ruminal em diferentes tempos de amostragem. Tal técnica foi descrita por Rodrigues (2012) e utilizada por Martins (2012) e por Perna Jr. (2013).

## **2.7 Quantificação de metano e relação com outras variáveis de fermentação ruminal**

Os métodos usuais de quantificação de metano, como a câmara calorimétrica e traçadores são bastante úteis para avaliação da produção total de metano pelo ruminante, em um determinado intervalo de tempo. Contudo, entende-se que a informação gerada pela quantificação da emissão de metano não é suficiente para a compreensão da eficiência do processo fermentativo. O processo fermentativo ruminal pode ser bloqueado pela simples

diminuição de pH ou temperatura o que, provavelmente, acarretaria em diminuição da produção de metano em virtude da alteração do meio, que se tornaria incompatível com a vida de determinadas bactérias. No entanto, o meio se tornaria inóspito também às bactérias celulolíticas, por exemplo, e provavelmente haveria queda na produção de AGCC também. Sendo assim, compreende-se que o estudo da quantificação de metano como ferramenta para avaliar-se a eficiência do processo fermentativo ruminal deve ser realizado de forma relativa às variáveis de fermentação, como a produção de AGCC, face aos possíveis confundimentos que a análise isolada de metano poderia gerar.

Na busca por uma abordagem mais abrangente sobre a fermentação ruminal, alguns autores reportaram a produção de metano de maneira relativa à ingestão de energia bruta (BEAUCHEMIN; MCGINN, 2005, 2006), à ingestão de matéria seca (PUCHALA et al.; 2005) ou à ingestão de energia digestível (MCGINN et al., 2004). Este tipo de estudo é indubitavelmente um avanço em relação à simples mensuração de metano como meio de avaliação da eficiência de fermentação. Contudo, seria mais natural que a produção de metano fosse quantificada relativamente à alguma medida de fermentação ruminal, como por exemplo, a energia liberada nos processos fermentativos sob a forma de AGCC e gases, uma vez que a geração destes produtos ocorrem concomitantemente no rúmen. Assim, entende-se que este tipo de medida relativa traria informações mais acuradas sobre um determinado momento da fermentação, sem se valer de outras variáveis que possuem variações naturais (por exemplo, consumo de matéria seca, consumo de matéria digestível), que poderiam influenciar os resultados e até gerar interpretações errôneas.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSON , K. L.; NAGARAJA, T. G.; MORRILL, J. L.; AVERY, T. B.; GALITZER S. J.; BOYER, J. E. Ruminant microbial development in conventionally or early-weaned calves. **Journal of Animal Science**, v. 64, n. 4, p.1215-1226, 1987.
- BAKER, S. K. Rumen methanogens and inhibition of methanogenesis. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 50, n. 8, p.1293-1298, 1999.
- BARIONI, L. G.; LIMA, M. A.; ZEN, S.; GUIMARÃES JÚNIOR, R.; FERREIRA, A. C. A baseline projection of methane emissions by the brazilian beef sector: preliminary results. In: GREENHOUSE GASES AND ANIMAL AGRICULTURE CONFERENCE, 2007, Christchurch. **Proceedings...** Christchurch, New Zealand, 2007. p. 32-33.
- BARTLEY, E. E.; HEROD, E. L.; BECHTLE, R. M.; SAPIENZE, D. A.; BRENT, B. E.; DAVIDOVICH, A. Effects of monensin or lasalocid with and without niacin or ampicillin on rumen fermentation and feed efficiency. **Journal of Animal Science**, v. 49, n. 4, p. 1066-1075, 1979.
- BEAUCHEMIN, K. A.; MCGINN, S. M. Methane emissions from beef cattle: effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 6, p. 1489-1496, 2006.
- BEAUCHEMIN, K. A.; MCGINN, S. M. Methane emissions from feedlot cattle fed barley or corn diets. **Journal of Animal Science**, v. 83, n. 3, p. 653-661, 2005.
- BEAUCHEMIN, K. A.; MCGINN, S. M.; MARTINEZ, T. F.; MCALLISTER, T. A. Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 8, p. 1990-1996, 2007.
- BERNDT, A. Estratégias nutricionais para redução de metano. In: IV CONGRESSO LATINO AMERICANO DE NUTRIÇÃO ANIMAL - CLANA, 2010, Estância de São Pedro, SP. Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2010. p. 295-306.
- BUDDLE, B. M.; DENIS, M.; ATTWOOD, G. T.; ALTERMANN, E.; JANSSEN, P. H.; RONIMUS, R. S.; PINARES-PATIÑO, C. S.; MUETZEL, S.; WEDLOCK, D. N. Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pasture. **The Veterinary Journal**, v. 88, p.11-17, 2011.
- CALLAWAY, T. R.; EDRINGTON, T. S.; RYCHLIK, J. L.; GENOVESE, K. J.; POOLE, T. L.; JUNG, Y. S.; BISCHOFF, K. M.; ANDERSON, R. C.; NISBET, D. J. Ionophores: their use as ruminant growth promotants and impact on food safety. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, Wymondham, v. 4, n. 1, p. 43-51, 2003.
- CAMMELL, S. B.; BEEVER, D. E.; SKELTON, K. V.; SPOONER, M. C. The construction of open circuit chambers for measuring gaseous exchange and heat production in sheep and young cattle. **Laboratory Practice**, v. 30, p.115, 1980.

CARTER, M. S. Contribution of nitrification and denitrification to N<sub>2</sub>O emissions from urine patches. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 2091-2102, 2007.

CARULLA, J. E.; KREUZER, M.; MACHMÜLLER, A.; HESS, H. D. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 56, n. 9, p. 961-970, 2005.

CARVALHO, F. A. N.; BARBOSA, F. A.; MCDOWELL, L. R. **Nutrição de Bovinos a Pasto**. 2. ed. Belo Horizonte: Papelform, 2003. p. 428.

CGEE. **Manual de capacitação sobre Mudança climática e projetos de mecanismo de desenvolvimento limpo (MDL)**. Ed. rev. e atual. - Brasília, DF: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE), 2010. 268 p.

CHAGUNDA, M. G. G. Opportunities and challenges in the use of the Laser Methane Detector to monitor enteric methane emissions from ruminants. In. The Animal Consortium 2013. **Animal**, v. 7, p. 394-400, 2013.

CHAGUNDA, M. G. G.; ROSS, D.; ROBERTS, D. J. On the use of a Laser Methane Detector in dairy cows. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 68, p. 157-160, 2009.

CHALUPA, W. Manipulating rumen fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 46, n. 3, p. 585-599, 1977.

CHALUPA, W. Rumen bypass and protection of proteins and amino acids. **Journal of Dairy Science**, v. 58, n. 8, p. 1198-1218, 1975.

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.

COTTON, W. R.; PIELKE, R. A. **Human impacts on weather and climate**. Cambridge: Cambridge University, 1995. 288 p.

CZERKAWSKI, J. W. Methane production in ruminants and its significance. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v. 11, p. 240- 282, 1969.

EZEQUIEL, J. M. B.; GALATI, R. L.; MENDES, A. R.; FATURI, C. Desempenho e características de carcaça de bovinos Nelore em confinamento alimentados com bagaço de cana-de-açúcar e diferentes fontes energéticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 5, p. 2050-2057, 2006.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAO statistical databases**. Rome: FAO, 2006. Disponível em <<http://faostat.fao.org>> Acesso em: 4 jun. 2010.

FAYED, A. M.; EL ASHRY, M. A.; HEND, A. A. Effect of feeding olive tree pruning by-products on sheep performance in Sinai. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 5, n. 4, p. 436-445, 2009.

FERGUSON, K. A. The protection of dietary proteins and aminoacids against microbial fermentation in the rumen. In: MCDONALD, W.; WARNER, A. C. I. (Ed.). **Digestion and Metabolism in the ruminant**. Armidale: University of New England Publish Unit, 1975. p. 448-464.

FIELD J. A.; KORTEKAAS, S.; LETTINGA, G. The tannin theory of methanogenic toxicity. **Biological Wastes**, v. 29, p. 241–262, 1989.

FINLAY, B. J.; ESTEBAN, G.; CLARKE, K. J.; WILLIAMS, A. G.; EMBLEY, T. M.; HIRT, R. P. Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. **FEMS Microbiology Letters**, Delft, v. 117, p. 157-161, 1994.

FLATT, W. P.; VAN SOEST, P. J.; SYKES, J. F.; MOORE, L. A. A description of the energy metabolism laboratory at the US. Department of Agriculture, Agricultural Research Center in Beltsville Maryland. In: SYMPOSIUM ON ENERGY METABOLISM: PRINCIPLES, METHODS AND GENERAL ASPECTS, 1., Statens Husdyrbrugsudvalg, Copenhagen, Denmark. 1958. 53 p.

FRANCE, J.; BEEVER, D. E.; SIDDON, R. C. Compartmental schemes for estimating methanogenesis in ruminants from isotope dilution data. **Journal of Theoretical Biology**, v. 164, p. 206-218, 1993.

GASTALDI, K. A. **Produção “in vitro” de metano, dióxido de carbono e oxigênio utilizando líquido ruminal de bovinos alimentados com diferentes rações**. 2003. 95 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, São Paulo, 2003.

GHG. **Green house Gas Protocol Initiative**. 1998. Disponível em: <<http://www.ghgprotocol.org>>. Acesso em: 12 fev. 2013.

HAÏMOUD, D. A.; VERNAY, M.; BAYOURTHE, C.; MONCOULON, R. Avoparcin and monensin effects on the digestion of nutrients in dairy cows fed a mixed diet. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 75, n. 3, p. 379-385, 1995.

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

HOOVER, W. H. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. **Journal of Dairy Science**, v. 69, n. 6, p. 2755-2766, 1986.

HUNTINGTON, G. B. Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 3, p. 852-867, 1997.

IPCC. INTERGOVERNAMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. Emissions from livestock and manure management. In: EGGLESTON, H. S.; BUENDIA, L.; MIWA, K.; NGARA, T.; TABANE, K. (Ed.). **IPCC Guidelines for nacional greenhouse gas inventories**. Hayama: IGES, 2006. p. 747-846.

IPCC. INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. Climate change 2007: the physical science basis. In: WORKING GROUP I TO THE FOURTH ASSESSMENT

REPORT OF THE INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE, 2007, United Kingdom and New York: Cambridge University Press, Cambridge, 2007.

IPCC. INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. IPCC/OECD/IEA Programme on national greenhouse gas inventories. In: EXPERT GROUP MEETING ON METHODS FOR THE ASSESSMENT OF INVENTORY QUALITY, 1997, Bilthoven. **Meeting Reports...** Bilthoven, 1997.

ISEKI, T.; MIYAJI, M. A portable remote methane detector using a tunable diode laser. In: WORLD GAS CONGRESS, 22., 2003, Tokyo. **Proceedings...** Tokyo, Japan. 2003.

ISHINO, Y.; KOMORI, K.; CANN, I. K. O.; KOGA, Y. A novel DNA polymerase family found in Archaea. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 2232-2236, 1998.

JANSSEN, P. H.; KIRS, M. Structure of the archaeal community of the rumen. **Applied Environmental Microbiology**, v. 74, p. 3619-3625, 2008.

JICONG, H.; YANHUA, X.; FENGDE, W.; RENJIE, D. Greenhouse Gas Emission from Livestock Waste: China Evaluation. **International Congress Series**. New York, 2006. v. 1203, p. 29-32.

JOHNSON, D. E.; HILL, T. M.; CARMEAN, B. R.; BRANINE, M. E.; LODMAN, D. W.; WARD, G. M. **Perspective on ruminant methane emission**. Fort Collins: Colorado State University, 1993.

JOHNSON, K.A.; HUYLEYER, M. T.; WESTBERG, H. H.; LAMB, B. K.; ZIMMERMAN, P. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a SF<sub>6</sub> tracer technique. **Environmental Science & Technology**, v. 28, p. 359-362, 1994.

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

KELLY, J. M.; KERRIGAN, B.; MILLIGAN, L. P.; MCBRIDE, B. W. Development of a mobile, open-circuit indirect calorimetry system. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 74, p. 65-71, 1994.

KLEIBER, M. A respiration apparatus for tracer trials with radiocarbon on cows, sows and sheep. In: SYMPOSIUM ON ENERGY METABOLISM: PRINCIPLES, METHODS AND GENERAL ASPECTS, 1., 1958. Statens Husdyrbrugsudvalg, Copenhagen, Denmark. 1958.

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

LIANG, J. B.; TERADA, F.; HAMAGUCHI, I. Efficacy of using the face mask technique for the estimation of daily heat production of cattle. In: VAN DER HONING, Y.; CLOSE, W. H. (Ed.). **Energy metabolism of farm animals**. Netherlands: Pudoc, Wageningen, 1989.

LONGO, C. **Avaliação in vitro de leguminosas taniníferas, tropicais para mitigação de metano entérico**. 2007. 153 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear em Agricultura-CENA, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

MAKKAR, H. P. S. Effect and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tanninrichfeeds. **Small Ruminant Research**, v. 49, p. 241-256, 2003.

MARTINS, M. F. **Efeito de diferentes fontes energéticas da dieta sobre a produção de metano ruminal utilizando a técnica de fermentação ruminal *ex situ* (micro-rúmen) em bovinos**. 2012. 61 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, São Paulo, 2012.

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

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

McDONALD, P. Evaluation of foods (D) protein. In: McDONALD, P.; EDWARDS, R.; GREENHALGH, J.F.D. (Ed.). **Nutrition animal**. 4. ed. Zaragoza: Acríbia, 1993. p. 29-57.

McGINN, S. M.; BEAUCHEMIN, K. A.; COATES, T.; COLOMBATTO, D. Methane emissions from beef cattle: effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 11, p. 3346-3356, 2004.

McLEAN, J.A.; TOBIN, G. **Animal and Human Calorimetry**. New York: Cambridge University Press, 1987. 352 p.

MCT. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA. **Inventário Brasileiro das Emissões e Remoções Antrópicas de Gases de Efeito Estufa**. Informações Gerais e Valores Preliminares, 2009. Disponível em: Acesso em: <<http://www.mct.gov.br>>. Acesso em: 18 fev. 2010.

MERTENS, D. R. Rate and extent of digestion. In: FORBES, J. M.; FRANCE, J. (Ed.). **Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism**. 2. ed. Wallingford: CAB International, 1993. p. 13-51.

MEZZOMO, R. Padrão nictemeral dos níveis de pH, nitrogênio amoniacal e ácido graxo volátil ruminal em bovinos alimentados com dietas de alto teor de grão suplementados com tanino condensado. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 47., 2010, Salvador. **Anais...** 2010. v. 1. p. 1-3.

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, n. 4, p. 1042-1047, 1988.

MILLS, J. A.; DIJKSTRA, J.; BANNIK, A.; CAMMELL, S. B.; KEBREAB, E.; FRANCE, J. A mechanistic model of whole-tract digestion and methanogenesis in the lactating dairy caow: model development, evaluation and application. **Journal of Animal Science**, v. 79, n. 6, p. 1584-1597, 2001.

- MOHAMMED, N.; ONODERA, R.; ITABASHI, H.; LILA, Z. A. Effects of ionophores, vitamin B6 and distiller's grains on *in vitro* tryptophan biosynthesis from indolepyruvic acid, and production of other related compounds by ruminal bacteria and protozoa. **Animal Feed Science and Technology**, v. 116, p. 301-311, 2004.
- MORAIS, J. A. S.; BERCHIELLI, T. T.; REIS, R. A. Aditivos. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 2006. p. 111-140.
- MORAIS, J. A. S.; BERCHIELLI, T. T.; REIS, R. A. Aditivos. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 2006. p. 111-140.
- MORVAN, B.; RIEU-LESME, F.; FONTY, G.; GOUET, P. In vitro interactions between rumen H<sub>2</sub>-producing cellulolytic microorganisms and H<sub>2</sub>-utilizing acetogenic and sulfate-reducing bacteria. **Anaerobe**, v. 2, p. 175-180, 1996.
- MOSS, A. R.; JOUANY, J. P.; NEWBOLD, J. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. **Annales de Zootechnie**, v. 49, p. 231-253, 2000.
- MURRAY, R. M.; BRYANT, A. M.; 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.
- NKRUMAH, J. D.; OKINE, E. K.; MATHISON, G. W.; SCHMID, K.; LI, C.; BASARAB, J. A.; PRICE, M. A.; WANG, Z.; MOORE, S. S. Relationships of feedlot feed efficiency, performance, and feeding behaviour with metabolic rate, methane production, and energy partitioning in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 1, p. 145-153, 2006.
- NOVAK, S. M.; FIORELLI, J. L. Greenhouse gases and ammonia emissions from organic mixed crop-dairy systems: a critical review of mitigation options. **Agronomy for Sustainable Development**, Dijon, v. 30, p. 215-223, 2010.
- NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7th ed. Washington: National Academies Press, 2001. 381 p.
- NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of beef cattle**. 7th ed. Washington, D.C.: National Academic Press, 1996.
- OJEU. Regulation (EC) N<sup>o</sup> 1831/2003 of the European parliament and the council of 22 september, 2003 on additives for use in animal nutrition. **Official Journal of the European Union**, L268, p. 29-43, 2003.
- OLIVEIRA, S. G.; BERCHIELLI, T. T.; NATARELLI, B.; MALHEIROS, E. B. Valor alimentício e aspectos econômicos de dietas com variação no teor de tanino e nível protéico em bovinos de corte. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 55, n. 5, p. 467-475, 2008.
- OWENS, F. N.; GOETSCH, A. L. Ruminal fermentation. In: CHURCH, D. C. (Ed.). **The Ruminant animal digestive physiology and nutrition**. 5. ed. New Jersey: Englewood, Cliffs, 1993. p. 145-171.

PERNA JR, F.; RODRIGUES, P. H. M.; PINEDO, L. A.; MARINO, C. T.; MARTINS, M. F.; CASSIANO, E.C.O.; CASTRO, A. L.; ABDULKLECH, B. M. Loss of energy from the methane in bovines fed with different additives, using the ex situ ruminal fermentation technique (micro-rumen). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BASILEIRA DE ZOOTECNIA, 50., 2013, Campinas. **Anais...** Campinas-SP: SBZ, 2013.

PORDOMINGO, A. J.; VOLPI LAGRECA, G.; STEFANAZZI, I. N.; PORDOMINGO, A. B. Efecto de la inclusión de taninos versus monensina y de soja cruda en dietas basadas en grano entero, sin fibra larga en engorde de vaquillonas a corral. **Boletín de Divulgación Técnica**, EEA Anguil, n. 90, p. 67-73, 2006.

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

PUCHALA, R.; MIN, B. R.; GOETSCH, A. L.; SAHLU, T. The effect of a condensed tannin-containing forage on methane emission by goats. **Journal of Animal Science**, v. 83, n. 1, p. 182-186, 2005.

REES, E. M. R.; LLOYD, D.; WILLIAMS, A. G. The effects of co-cultivation with the acetogen *Acetivomaculum ruminis* on the fermentative metabolism of the rumen fungi *Neocallimastix patriciarum* and *Neocallimastix* sp. strain L2. **FEMS Microbiology Letters**, v. 133, 175–180, 1995.

RODRIGUES, P. H. M.; PINEDO, L. A.; SOLORZANO, L. A. R.; PERNA JR, F.; MARTINS, M. F.; CASTRO, A. L.; GODOY, G. L. A.; MARINO, C. T. Descrição da metodologia ex-situ de estudo da fermentação ruminal (micro-rúmen) com vistas à mensuração da produção de metano. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BASILEIRA DE ZOOTECNIA, 49., 2012, Brasília. **Anais...** Brasília – DF, 2012.

RODRÍGUEZ, N. M.; CAMPOS, W. E.; LACHICA, M. L.; BORGES, I.; GONÇALVES, L. C.; BORGES, A. L. C. C.; SALIBA, E. O. S. A calorimetry system for metabolism trials. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootécnica**, v. 59, n. 2, p. 495-500, 2007.

RUSSELL, J. B. **Rumen Microbiology and its role in ruminant nutrition**. Ithaca: RUSSELL, J.B, 2002, 119 p.

SARVANAN, T. S. **Effect of bromochloromethane on methanogenesis, nutrient utilization and growth rate of lambs**. 2000. (Masters Thesis) - Indian Veterinary Research Institute, Izatnagar, India. 2000.

SCHEEHLE, E. A.; KRUGER, D. Global anthropogenic methane and nitrous oxide emissions. **The Energy Journal**, v. 3, p. 33–44, 2006. (Special issue).

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

SCOTT, T. W.; ASHES, J. R. Dietary lipids for ruminants: protection, utilization and effects on remodelling of skeletal muscle phospholipids. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 44, n. 3, p. 495-508, 1993.

- SIDIROPOULOS, C.; TSILINGIRIDIS, G. Trends of livestock-related NH<sub>3</sub>, CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>O and PM emissions in Greece. **Water, Air and Soil Pollution**, Heidelberg, v. 199, p. 277-289, 2009.
- STEINFELD, H.; GERBER, P.; WASSENAAR, T. D.; CASTEL, V.; ROSALES, M. M.; DE HANN, C. **Livestock's Long Shadow: Environmental Issues and Options**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2006.
- THAUER, R. K.; KASTER, A. K.; SEEDORF, H.; BUCKEL, W.; HEDDERICH, R. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, 579–591, 2008.
- THORPE, A. Enteric fermentation and ruminant eructation: the role (and control?) of methane in the climate change debate. **Climatic change**, v. 93, p. 407-431, 2009.
- TIEMANN, T. T.; LASCANO, C. E.; WETTSTEIN, H. R.; MAYER, A. Effect of the tropical tannin-rich shrub legumes *Calliandra calothyrsus* and *Flemingia macrophylla* on methane emission and nitrogen and energy balance in growing lambs. **Animal**, v. 2, p. 790–799, 2008.
- USHIDA, K.; JOUANY, J. P. Methane production associated with rumen-ciliated protozoa and its effect on protozoan activity. **Letters Applied Microbiology**, v. 23, p. 129-132, 1996.
- VAN KRUININGEN, H. J. Gastrointestinal system. In: CARLTON, W.W.; MCGAVIN, M. D. **Thomson's special veterinary pathology**. 2. ed. Philadelphia: Mosby, 1995. p. 1-80.
- VAN MAANAN, R. W.; HERBEIN, J. H.; MCGILLIARD, A. D.; YOUNG, J. W. Effects of monensin in in vivo rumen propionate production and blood ketones in cattle. **Journal of Nutrition**, v. 108, p. 1002-1007, 1978.
- VAN NEVEL, C. J.; DEMEYER, D. I. Determination of rumen microbial growth in vitro from <sup>32</sup>P – labeled phosphate incorporation. **British Journal of Nutrition**, v. 38, p. 101-114, 1977.
- VAN NEVEL, C. J.; DEMEYER, D. I. Effect of monensin on rumen metabolism in vitro. **Applied Environmental Microbiology**, v. 34, p. 251-257, 1977.
- VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca, New York: Cornell University Press, 1994. 476 p.
- VARGA, G. A.; KOLVER, E. S. Microbial and animal limitations to fiber digestion and utilization. **Journal of Nutrition**, v. 127, n. 5, p. 819-823, 1997.
- WALDO, D. R. Effect of forage quality on intake and forage-concentrate interactions. **Journal of Dairy Science**, v. 69, n. 4, p. 617-631, 1986.
- WOLIN, M. J. The rumen fermentation: a model for microbial interactions in anaerobic ecosystems. **Advance Microbiology Ecology**, v. 3, p. 49-77, 1979.

WOODWARD, S. L.; WAGHORN, G. C.; LABOYRE, P. Condensed tannins in birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) reduce methane emissions from dairy cows. **Proceedings New Zealand Society of Animal Production**, v. 64, p. 160–164, 2004.

WOODWARD, S. L.; WAGHORN, G. C.; ULYATT, M. J.; LASSEY, K. R. Early indications that feeding *Lotus* will reduce methane emissions from ruminants. **Proceedings New Zealand Society of Animal Production**, v. 61, p. 23-26, 2001.

WUEBBLES, D. J.; HAYHOE, K. Atmospheric methane and global change. **Earth-Science Review**, v. 57, p. 177–210, 2002.

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.

### **CAPÍTULO 3 - EFEITO DE ADITIVOS ALIMENTARES SOBRE A PRODUÇÃO DE METANO RUMINAL EM BOVINOS**

#### **RESUMO**

O metano, um potente GEE, é produto final do processo fermentativo de bovinos e, por constituir perda no potencial produtivo destes, tem sido objeto de estudo por nutricionistas do mundo todo. Assim, o objetivo do presente experimento foi de avaliar o efeito de diferentes aditivos alimentares sobre a produção de metano ruminal em bovinos, utilizando-se a técnica de fermentação ruminal *ex situ* (micro-rúmen). Seis vacas ( $873 \pm 81$  kg) canuladas no rúmen foram utilizadas e distribuídas a três dietas, que diferiram quanto ao aditivo, seguindo-se delineamento experimental em quadrado latino 3x3 replicado (n= 18 unidades experimentais): Controle (CON): sem aditivo; Monensina (MON): adição de 300 mg de monensina sódica por animal por dia; Tanino (TAN): adição de 100 g de extrato concentrado de tanino condensado obtido da Acácia-negra (*Acacia mearnsii*) por animal por dia. Cada período experimental foi constituído de 21 dias, onde 15 dias foram utilizados para adaptação à dieta e os últimos 6 dias para coleta de dados do consumo de matéria seca (CMS). No 21º dia experimental, foi mensurado o pH, com auxílio de uma probe de mensuração contínua e realizadas coletas do conteúdo ruminal antes, 3, 6, 9 e 12 horas após a alimentação matinal, para a quantificação da produção de AGCC, CH<sub>4</sub> e N-NH<sub>3</sub>. A técnica de fermentação *ex situ* consiste em incubar frascos tipo penicilina com conteúdo ruminal sólido e líquido, em banho termostático por 30 minutos, com posterior mensuração da produção de metano por cromatografia gasosa, sendo estimada a perda de energia relativa (PER). A PER avalia a eficiência da fermentação dos alimentos, ou seja, verifica a perda de metano quando comparada aos outros produtos da fermentação, tais como, ácido acético, propiônico e butírico. Os dados foram analisados pelo programa SAS (Versão 9.2, 2010) através do procedimento MIXED. No modelo, o efeito de tratamento foi considerado fixo e os efeitos de período, quadrado e animal dentro de quadrado considerados aleatórios. Não houve efeito significativo dos aditivos ( $P>0,05$ ) sobre a concentração de N-NH<sub>3</sub>, pH ruminal, para os ácidos acético, propiônico e butírico, nem para o AGCC total. Para a variável metano houve diferença significativa ( $P<0,05$ ), sendo que o tratamento com monensina foi responsável por reduzir a produção de metano em 10,7%, já o tanino reduziu em 8,0%, quando comparado ao tratamento controle. Observou-se que a PER foi diminuída significativamente em 20,3% e 23,8% ( $P=0,0387$ ) com a administração dos aditivos monensina e tanino, quando comparadas ao tratamento controle. Portanto, a utilização de monensina ou tanino, em dietas com proporção de volumoso e concentrado de 50%, demonstra ser uma interessante opção em dietas para bovinos, com vistas a eficiência energética dos animais, com conseqüente redução nas emissões de metano.

Palavras-chave: Fermentação ruminal. Gases efeito estufa. Monensina. Ruminantes. Tanino.

## EFFECT OF FEED ADDITIVES ON RUMINAL METHANE PRODUCTION IN CATTLE

### ABSTRACT

Methane, a powerful greenhouse gas, is the end product of fermentation process of cattle, and as it is considered a significant loss in their productive potential, has been studied by nutritionists worldwide. Therefore, the objective of this experiment was to evaluate the effect of different feed additives on ruminal methane production in cattle, using the technique of *ex situ* ruminal fermentation (micro-rumen). Six ruminally cannulated cows ( $873 \pm 81$  kg) were distributed to three diets, which differed in the additive used, in a replicated 3x3 Latin square experimental design (n=18 experimental units): Control (CON): no additive; Monensin (MON): addition of 300 mg of monensin per animal per day; Tannin (TAN): addition of 100 g of concentrated extract condensed tannin obtained from black wattle (*Acacia mearnsii*) per animal per day. Each experimental period consisted of 21 days, where 15 days were used for diet adaptation and the last 6 days for dry matter intake (DMI) data collection. On experimental day 21, rumen pH was analyzed by a continuous measurement probe. Rumen contents samples taken before, 3, 6, 9 and 12 hours after the morning feeding, to quantify SCFA, CH<sub>4</sub> and NH<sub>3</sub>-N production. The fermentation technique consists of *ex situ* incubation of penicillin flasks with liquid and solid rumen contents in water bath for 30 minutes, with subsequent measurement of methane production by gas chromatography, with final estimation of relative energy loss (REL). The REL evaluates the efficiency of feed fermentation, in other words, verifies methane loss when compared to the other fermentation products such as acetic, propionic and butyric acids. Data were analyzed using SAS (version 9.2, 2010) by MIXED procedure. In the model, treatment effect was considered fixed and the effects of period, square, and animal within square were considered random. There was no significant effect ( $P>0.05$ ) of additives on rumen pH, as well as, the concentration of NH<sub>3</sub>-N, acetic, propionic and butyric acids and total SCFA. For variable methane significant difference ( $P<0.05$ ) was observed, where monensin treatment was responsible for methane production reduction by 10.7%, whereas tannin inclusion reduced by 8.0%, when compared to the control treatment. Relative energy loss (REL) was significantly decreased ( $P=0.0387$ ) by 20.3% and 23.8% with tannin and monensin administration when compared to control treatment. Therefore, the use of monensin or tannin in diets with forage to concentrate ratio of 50 % showsto be an interesting option in cattle diets aiming to improve energy efficiency of animals, with consequent reduction in methane emissions.

Keywords: Greenhouse gas. Monensin. Ruminants. Ruminal fermentation. Tannins.

### 3.1 Introdução

Estabelecer um sistema de produção de ruminantes de maneira rentável e sustentável, atrelado à estimativas de crescimento da população mundial e por demanda de alimentos, que garanta o bem-estar animal e que seus produtos, incluindo os resíduos, não representem risco à saúde ou ao meio ambiente é o grande desafio atual.

Uma estratégia para manter os níveis de produção sem reduzir os rendimentos é a utilização de aditivos na dieta, com permissão legal de seu uso, e cuja eficiência seja representativa na resposta animal (CAJA et al., 2003). Para tanto, tais aditivos geralmente atuam na modulação da fermentação ruminal.

A manipulação da fermentação ruminal é tema de muitos estudos realizados por nutricionistas de todo o mundo. Calsamiglia et al. (2007) consideram algumas rotas como objetivos da modulação da fermentação microbiana ruminal de alguns aditivos: aumentar a degradação da fibra e do amido; estimular a produção de propionato; inibir a produção de metano; controlar a concentração de lactato e o pH ruminal. Tal técnica pode ser realizada tanto pela variação do substrato oferecido, como revestimento, processamento ou tratamento químico de proteínas, lipídios ou carboidratos (CHALUPA, 1975; FERGUSON, 1975; SCOTT; ASHES, 1993; HUNTINGTON, 1997), como também, por ação de aditivos sobre a microbiota ruminal e suas atividades. Estes agentes químicos modulam determinadas vias metabólicas dos microrganismos ruminais, agindo como modificadores de fermentação (CHALUPA, 1977).

Na busca por estratégias para aumento da eficiência alimentar de ruminantes, aditivos como a monensina foram muito estudados. Desde sua aprovação pelo órgão Norte-Americano Food and Drug Administration em 1976, este antibiótico ionóforo capaz de inibir o crescimento de bactérias ruminais produtoras de H<sub>2</sub> (VAN NEVEL; DEMEYER, 1977; BERGEN; BATES, 1984) vem sendo utilizado largamente, tanto na dieta de novilhos confinados, quanto para vacas de alta produção leiteira, devido ao aumento de eficiência alimentar associado ao seu uso (GOODRICH et al., 1984; DUFFIELD et al., 2008). Porém, com as cada vez mais rigorosas normas de segurança alimentar impostas por agências regulatórias de vários países, alternativas ao uso de antibióticos melhoradores de fermentação ruminal (como monensina, salinomicina, tilosina) vêm sendo estudadas. Um exemplo de potenciais modificadores da fermentação ruminal são alguns compostos presentes em plantas tropicais, como os taninos. Realmente, a metanogênese foi reduzida quando do uso de plantas

ricas em taninos, tanto *in vitro* (LONGO et al., 2007), quanto *in vivo* em vacas leiteiras (WOODWARD et al., 2004), em cabras (PUCHALA et al., 2005) e em ovelhas (CARULLA et al., 2005), apesar de não ter ocorrido o mesmo efeito em novilhas taurinas (BEAUCHEMIN et al., 2007).

Os taninos são substâncias polifenólicas com variados pesos moleculares, sendo classificados em hidrolisáveis e condensados. A atividade antimetanogênica dos taninos presentes nas plantas tem sido atribuída, principalmente, ao grupo de taninos condensados. Taninos hidrolisáveis, embora também afetem a metanogênese, são considerados potencialmente tóxicos para os animais (FIELD et al., 1989). Os taninos formam complexos, principalmente, com proteínas e, em menor grau, com íons metálicos, aminoácidos e polissacarídeos, reduzindo a digestibilidade destes. Entretanto, a presença de baixas concentrações de taninos na dieta pode ser utilizada como potencial modulador da fermentação ruminal (MORAIS et al., 2006). A ação dos taninos condensados na metanogênese pode ser atribuída a um efeito indireto, pela redução na produção de H<sub>2</sub>, como consequência da redução na digestibilidade da fibra, e por efeito inibitório direto na população metanogênica (WOODWARD et al., 2001).

Como hipótese científica deste trabalho foi proposto que a perda energética relativa (PER) é menor em animais alimentados com dietas contendo algum aditivo, neste caso a monensina ou tanino, visto que podem modular a fermentação ruminal. O presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito de diferentes aditivos na dieta de bovinos sobre a fermentação ruminal. Para tal, foi proposta uma variável, a PER, que relacionasse os produtos da fermentação (AGCC e metano) a partir de uma nova técnica (metodologia *ex situ* de estudo de fermentação ruminal).

## 3.2 Material e Métodos

### **Animais e instalações**

O experimento foi realizado no Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), campus de Pirassununga, nas instalações do Estábulo Experimental e Laboratório de Nutrição Animal e Bromatologia. Para avaliação do consumo de matéria seca, concentração

ruminal do nitrogênio amoniacal, mensuração de pH ruminal, produção ruminal de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e da produção de metano, foram utilizadas seis vacas não gestantes e não lactantes, com peso vivo médio de  $873 \pm 81$  kg e portadoras de cânula ruminal com 10 cm de diâmetro e 7,5 cm de espessura. Os animais foram mantidos em instalação coberta, provida de baias individuais com cochos de cimento e bebedouros automáticos comuns a cada dois animais (Figura 2). Também possuíam camas de areia, que proporcionam maior conforto e bem-estar aos animais.

Figura 2 - Fotos ilustrativas das baias das instalações do Estábulo Experimental da FMVZ/USP



Fonte: Arquivo pessoal

### **Tratamentos e delineamento experimental**

Seis vacas foram distribuídas a uma das três dietas experimentais, isoenergéticas (1,55 Mcal de  $EL_1$ /kg de MS) e isoproteicas (12,0% de PB), formuladas com o programa *Spartan Dairy Ration Evaluator/Balancer*, versão 3.0.3., diferindo de acordo com o aditivo alimentar utilizado, sendo:

- 1) Controle: Dieta sem adição de aditivos;
- 2) Monensina: Dieta com adição de 300 mg/animal/dia de monensina sódica, o que corresponde a 3 g/animal/dia do produto comercial Rumensin - Elanco<sup>®</sup>;
- 3) Tanino: Dieta com adição de 100 g/animal/dia de extrato concentrado de tanino condensado obtido da casca da Acácia Negra (*Acacia mearnsii*) comercializado pela empresa Veronese<sup>®</sup>.

O delineamento experimental utilizado foi o quadrado latino 3x3 replicado, ou seja, dois quadrados latinos contemporâneos, sendo que a unidade experimental foi o animal dentro de cada período. Logo, o experimento contou com 18 unidades experimentais referentes a 3

animais, 3 períodos e 2 quadrados (Quadro 1). A tabela da análise de variância encontra-se abaixo (Tabela 1).

Quadro 1- Esquema do delineamento de quadrado latino 3x3 replicado

Quadrado 1			Quadrado 2			
Animal	715	698	020	631	627	631
Período I	Controle	Tanino	Monensina	Controle	Tanino	Monensina
Período II	Tanino	Monensina	Controle	Monensina	Controle	Tanino
Período III	Monensina	Controle	Tanino	Tanino	Monensina	Controle

Tabela 1 - Esquema da análise de variância para delineamento em quadrado latino replicado

Causas de variação	Graus de Liberdade
Tratamentos	2
Período	2
Animal dentro de quadrado	4
Quadrado	1
Resíduo A	8
Total de unidades experimentais	17

### Manejo nutricional e período experimental

Os alimentos foram oferecidos *ad libitum*, duas vezes ao dia, às 08:00 e 16:00 h, na forma de ração completa com proporção volumoso:concentrado de 50:50. Como as dietas de baixa quantidade de fibra estão associadas a baixas emissões de metano (JOHNSON; JOHNSON, 1995), foi utilizada uma dieta com 50% de volumosos com a pretensão de que a produção de metano entérico não fosse reduzida e pudesse mascarar o efeito dos aditivos utilizados.

A fonte de volumoso utilizada foi a silagem de milho e o concentrado consistiu-se de milho grão moído, farelo de soja, sal comum, fosfato bicálcico, calcário e suplemento mineral. Na manhã seguinte ao oferecimento eram retiradas e pesadas as sobras. Ofertou-se a dieta para garantir sobras de 5 a 10% do ofertado. As proporções dos diversos ingredientes das dietas experimentais e a composição bromatológica das mesmas estão descritas na tabela 2. Os aditivos, monensina sódica e tanino condensado, foram adicionados diretamente no cocho. Como fonte de tanino condensado foi utilizado o extrato da casca da Acácia-negra (*Acacia mearnsii*), um pó amorfo com 68% de pureza sendo o restante composto por outros

fenóis e cinzas, o que garantiu uma dieta com o aditivo tanino condensado de 4g/kg de MS ingerida (0,4% da dieta).

Tabela 2 - Proporções de ingredientes e composição bromatológica estimada da dieta experimental, expressa em porcentagem da matéria seca (% MS)

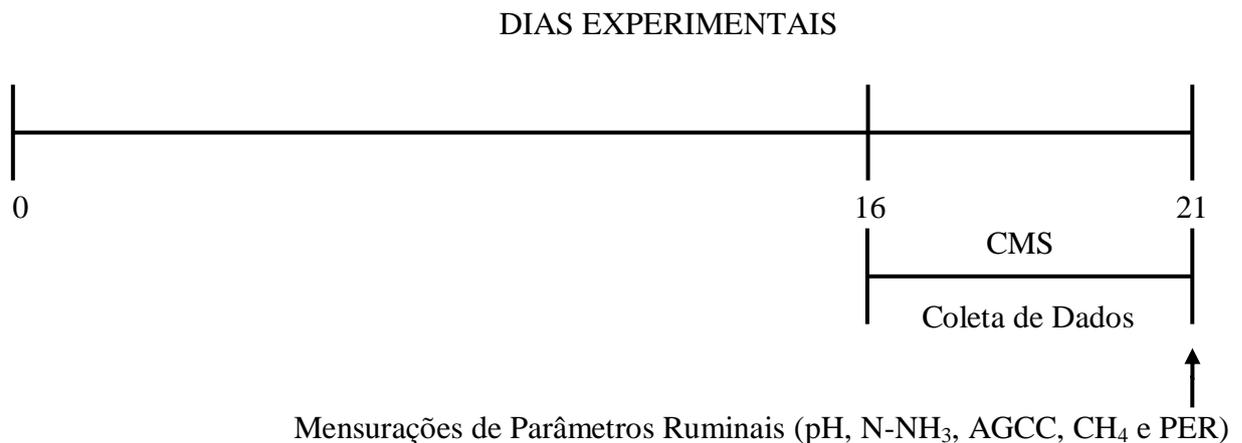
<b>Ingredientes</b>	<b>(% MS)</b>
Silagem de milho	50,00
Milho grão moído	34,70
Farelo de soja	12,20
Sal comum	0,50
Fosfato bicálcico	0,10
Calcário	0,50
Suplemento mineral <sup>1</sup>	2,00
<b>Composição bromatológica</b>	
Matéria seca <sup>2</sup> (%)	53,10
PB <sup>2</sup> (% MS)	11,60
PDR <sup>3</sup> (% PB)	65,10
PNDR <sup>3</sup> (% PB)	34,90
FDN <sup>2</sup> (% MS)	27,10
FDNe <sup>3</sup> (% MS)	22,60
FDA <sup>2</sup> (% MS)	14,40
CNE <sup>2</sup> (% MS)	46,10
AMIDO <sup>3</sup> (% MS)	39,30
MM <sup>2</sup> (% MS)	7,60
Ca <sup>2</sup> (% MS)	0,85
P <sup>2</sup> (% MS)	0,51
EE <sup>2</sup> (% MS)	3,50
NDT <sup>3</sup> (% MS)	67,30
EL <sub>r</sub> <sup>3</sup> (Mcal/dia)	1,55

<sup>1</sup> Suplemento mineral e vitamínico, quantidade por Kg de produto: 200 g de cálcio, 60 g de fósforo, 20 g de enxofre, 20 g de magnésio, 70 g de sódio, 15 mg de cobalto, 700 mg de cobre, 700 mg de ferro, 40 mg de iodo, 1.600 mg de manganês, 19 mg de selênio, 2.500 mg de zinco, 200.000 UI de vitamina A, 50.000 UI de vitamina D<sub>3</sub>, 1.500 UI de vitamina E. <sup>2</sup>Análises bromatológicas, determinadas no Laboratório de Nutrição Animal e Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga; <sup>3</sup>Estimado segundo o programa Spartan Dairy Ration Evaluator/Balancer, versão 3.0.3.

Cada um dos três períodos foi composto por 21 dias, sendo 20 dias de adaptação às respectivas dietas e o 21º dia destinado à coleta de conteúdo ruminal para estudo dos

parâmetros fermentativos (pH, N-NH<sub>3</sub>, AGCC, CH<sub>4</sub> e PER). Os animais foram pesados no primeiro e último dia de cada período experimental. O consumo de matéria seca (CMS) foi avaliado nos seis últimos dias experimentais. O esquema das coletas está representado na figura 3. A utilização de monensina por longos períodos, com efeito sobre a inibição da produção de metano *in vivo*, não tem sido consistente (RUMPLER et al., 1986; JOHNSON; JOHNSON, 1995; SAUER et al., 1998). Após 30 dias de uso, os níveis de metano retornaram aos valores pré-suplementação com ionóforo, provavelmente devido a uma habilidade da microflora ruminal adaptar-se aos ionóforos (NEWBOLD et al., 1993; JOHNSON; JOHNSON, 1995). Para tanto, no presente experimento, os animais receberam monensina por um período de 21 dias, garantindo que não houve-se adaptação da microflora ruminal ao ionóforo e possível perda de seu potencial inibidor da produção de metano.

Figura 3 - Esquema dos dias de coleta para cada variável avaliada dentro de cada período experimental



Fonte: Arquivo pessoal

### Consumo de matéria seca

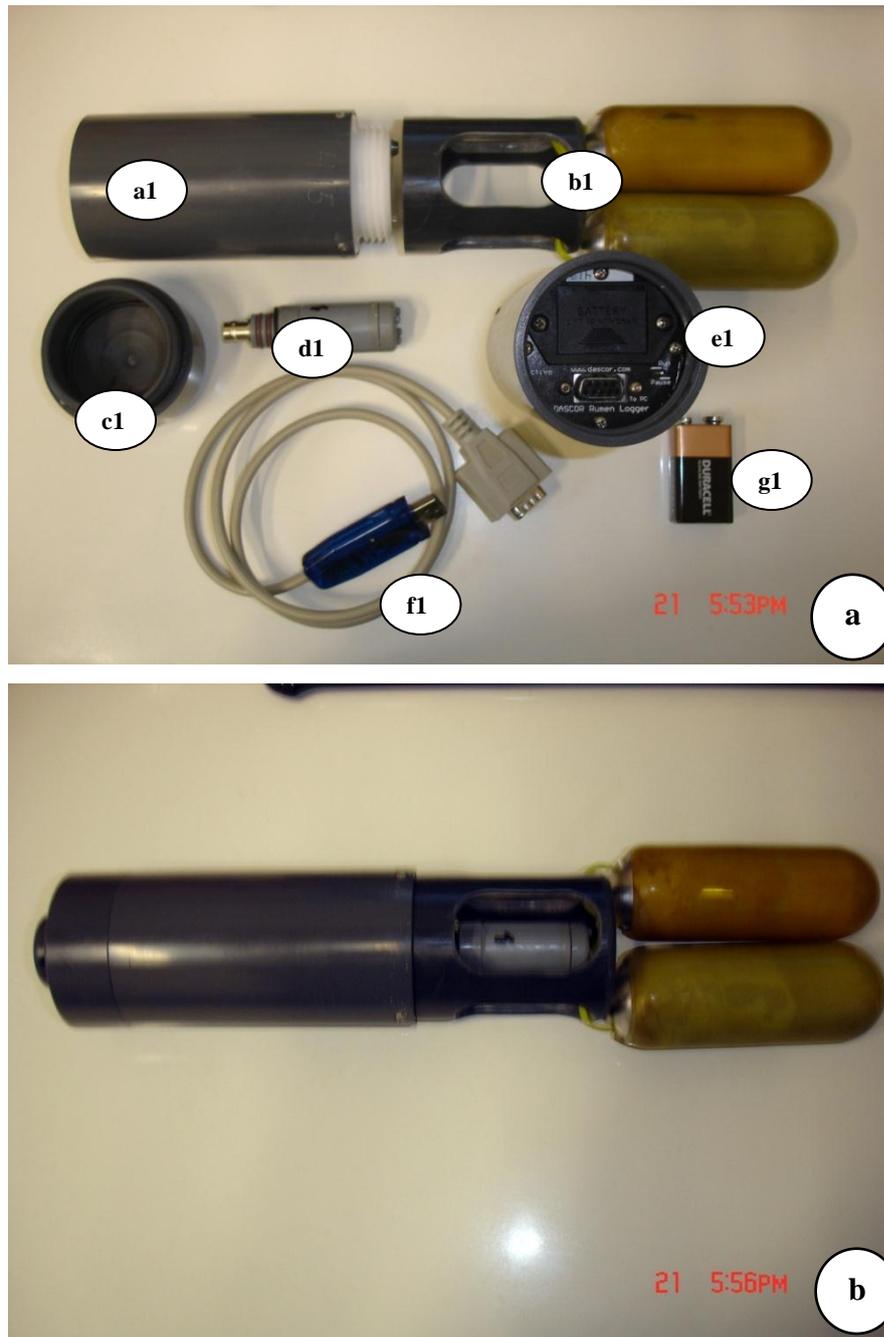
O CMS foi avaliado nos últimos seis dias experimentais de cada período, pela diferença entre a quantidade de alimento ofertada e as sobras, multiplicada pela porcentagem de matéria seca (MS) da dieta. Nos mesmos dias, junto com o CMS, foram realizadas amostragens dos alimentos utilizados nas dietas, para análises dos valores de MS, matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE) e fósforo (P), segundo AOAC (1995), e fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina, segundo Van Soest (1994).

### **Mensuração contínua de pH ruminal**

O pH ruminal foi obtido pelo método de mensuração contínua através de um data logger. Este equipamento registra o pH, a temperatura e o potencial oxi-redox no rúmen de bovinos canulados por diversos dias. O sistema foi desenvolvido utilizando um data logger (modelo T7-1 LRCpH, Dascor, Escondido, CA), uma bateria alcalina de 9 Volts e um cabo para conexão ao computador. Este material é abrigado em uma cápsula de PVC resistente à água (Figura 4). O eletrôdo de pH (modelo S655CDHT, Dascor, Escondido, CA) é coberto por uma proteção de 38-mm de diâmetro com quatro furos de 25-mm, que foram desenvolvidos para permitir a passagem de partículas e líquido, enquanto protege o eletrôdo de entrar em contato com o epitélio ruminal. Dois pesos, cada um com 900 g, foram acoplados ao fundo do eletrôdo para manter a “probe” no saco ventral do rúmen (Figura 5). A conexão da “probe” ao computador permite a programação da mesma para diferentes intervalos de mensuração, bem como o descarregamento dos dados mensurados diretamente em uma planilha no formato xls (Excel Microsoft Office, 2010).

A partir desse sistema de monitoração, o pH ruminal foi mensurado por 24 h durante o 21º dia de cada período experimental, em intervalos de 10 min. Através desta mensuração foram calculadas as variáveis: pH médio, pH mínimo, pH máximo, tempo em que o pH permaneceu abaixo de 5,8; 6,0 e 6,2 (em minutos) e área de pH abaixo de 5,8; 6,0 e 6,2, segundo a equação apresentada por Moya et al. (2011). Antes e após a colocação das “probes” nos animais, as mesmas foram calibradas em soluções de pH 7,0 e 4,0. A calibração dos dados permitiu o cálculo de uma equação de regressão antes e após o teste para ajuste dos dados mensurados.

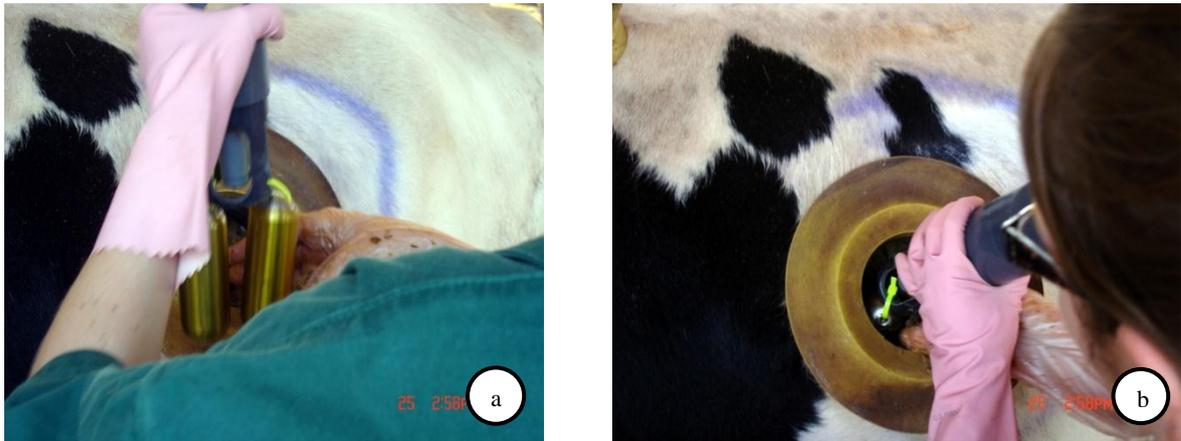
Figura 4 - Ilustração da montagem das probes de mensuração contínua de pH ruminal



Legenda: (a) peças constituintes da probe: (a1) cano de PVC com data logger; (b1) pesos acoplados para manter a probe na mesma posição no rúmen; (c1) tampa do data logger; (d1) sensor de pH; (e1) sistema eletrônico para armazenamento dos dados; (f1) cabo para conexão ao computador; (g1) bateria 9 Volts e a probe pronta para ser colocada no rúmen (b).

Fonte: Arquivo pessoal

Figura 5 - Ilustração da colocação das probes de mensuração contínua de pH ruminal nos animais (a e b)



Fonte: Arquivo pessoal

### **Metodologia (ex situ) de determinação da produção de AGCC, Metano e Perda de Energia Relativa (PER)**

#### **Preparo dos Frascos**

Todos os frascos do tipo penicilina (100 mL) utilizados nos experimentos foram lavados manualmente com água, em seguida enxaguados com água destilada e secos em estufa a 65°C. Após a secagem, os frascos foram identificados e pesados em balança analítica.

#### **Coleta e preparo das amostras**

No 21º dia de oferecimento das dietas, a coleta de conteúdo ruminal foi realizada antes, 3, 6, 9 e 12 horas após o arraçoamento matutino. A amostragem de conteúdo ruminal consistiu de 300 ml de conteúdo sólido ruminal, que foi coletado manualmente através da cânula, e 300 ml de líquido ruminal, coletadas com auxílio de uma sonda acoplada à bomba de vácuo. Conteúdo líquido e sólido foram retirados de três pontos diferentes (porção frontal, mediana e caudal), para melhor representação do rúmen. Os conteúdos, líquido adicionado ao sólido, foram homogeneizados em um liquidificador por aproximadamente 20 segundos. Após cada coleta, foram inseridos 50 mL de conteúdo ruminal em frascos de vidros tipo penicilina, previamente preparados.

O conteúdo ruminal homogeneizado foi colocado nos frascos de penicilina, com auxílio de uma seringa previamente cortada e preparada para avolumar 50 mL de conteúdo

ruminal. Pressionou-se o conteúdo coletado (50 mL), através de um funil para dentro do frasco de penicilina de 100 mL, com o auxílio de um bastão fino de vidro. Após a alocação do conteúdo dentro do frasco, os mesmos foram lacrado com rolhas de borracha e lacre de alumínio, com a ajuda de um alicate de recrave e identificado com selos de segurança. Em seguida, foi realizada a substituição do ar atmosférico por dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) (Figura 6). O processo de “lavagem” com  $\text{CO}_2$  teve por finalidade a expulsão de todo ar atmosférico contido dentro do frasco, a fim de se evitar prejuízo à população microbiana anaeróbia.

Figura 6 – Ilustração do preparo dos frascos



Legenda: Administração do conteúdo ruminal nos frascos (a), frasco arrolhado sendo lacrado com lacre de alumínio com auxílio do alicate de recrave (b), substituição do ar atmosférico por dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) (c) e frasco vedado e identificado (d).

Fonte: Arquivo pessoal

Foram utilizados 4 frascos por coleta, sendo dois denominados brancos e dois incubados. Os frascos incubados, após a “lavagem” com  $\text{CO}_2$ , foram levados ao banho termostático, onde permaneceram a  $39^\circ\text{C}$ , por 30 minutos. Depois foram levados à panela de pressão com água fervente a aproximadamente  $97^\circ\text{C}$  (Figura 7). Em seguida, a panela foi

fechada e, quando iniciada a pressão, cronometrou-se 15 minutos, a fim de bloquear a atividade microbiana na amostra por esterilização sob pressão e temperatura.

Figura 7 – Frascos em panela com água fervente



Fonte: Arquivo pessoal

Decorrido os 15 minutos sob pressão, esperava-se o resfriamento dos frascos, a fim de se evitar a despressurização dos mesmos. Em seguida, esses foram levados ao Laboratório de Cromatografia, para a mensuração da pressão e volume dos frascos, após atingirem temperatura de 25°C, e subsequente quantificação das concentrações de metano.

Os frascos brancos, após a substituição do ar atmosférico por CO<sub>2</sub>, foram levados à panela de pressão, para bloquear a atividade microbiana do mesmo modo que os frascos incubados a 39°C por 30 minutos.

### **Quantificação do gás metano**

Para a realização da quantificação da concentração de metano o Laboratório de Cromatografia foi climatizado em temperatura de 25°C e esperou-se que os frascos atingissem essa temperatura. A leitura do volume do gás produzido pela amostra proveniente da fermentação ruminal incubada em frascos de penicilina (micro-rúmen) foi mensurada utilizando um transdutor (Datalogger universal - modelo logger AG5000) conectado a um leitor digital e a uma válvula de três saídas. Para a mensuração, a agulha acoplada foi introduzida à válvula através da tampa de borracha. Logo em seguida, o volume foi mensurado, arrastando os gases acumulados na parte superior do frasco de penicilina com o uso da seringa conectada na terceira saída do transdutor até chegar a uma leitura de pressão zero.

Após, 0,5 ml de amostra gasosa contida no frasco de penicilina foi injetada no cromatógrafo a gás por meio de seringa especial para uso de amostras gasosas com capacidade para 1000 µl (Seringa do tipo *Gas-Tight*). A quantificação foi realizada pela técnica de cromatografia gasosa, segundo Kaminski et al. (2003). O cromatógrafo a gás utilizado foi equipado com coluna de aço inoxidável de 3,5m de comprimento e 1/8 de polegadas de diâmetro empacotada com a fase estacionária Porapak N<sup>®</sup> (Supelco<sup>®</sup>) e detetor de ionização de chama (FID), mantido a 280 °C. O forno do cromatógrafo a gás foi mantido a 40°C durante as análises e a temperatura do injetor foi de 200 °C. A calibração do cromatógrafo a gás era realizada com material de referência padrão, que consiste na mistura gasosa composta por 4% metano e 96% de ar atmosférico, partindo de uma mistura gasosa, com 50% de metano em ar sintético (Linde Gás<sup>®</sup>), com base na proporção mol/mol. O gás de arraste foi o N<sub>2</sub> de alta pureza, mantido em fluxo de 30 mL/minuto. O número de repetições por amostra foi aquele necessário para que a diferença entre leituras fosse inferior a 5%.

A concentração de metano da amostra foi calculada comparando a área do pico formado pela intensidade dessa corrente (área da amostra) com a área do pico formado pela solução contendo o ácido padrão (área do padrão).

### **Quantificação dos AGCC**

O volume do líquido do conteúdo ruminal dentro dos frascos (micro-rúmen) foi calculado pela diferença de pesos entre o peso do frasco contendo a amostra após a estufa (65°C por 15 dias e 105°C por 1 dia) e o peso do frasco contendo a amostra antes da estufa.

Para a quantificação da concentração de AGCC, foi retirada uma alíquota da fração líquida do conteúdo ruminal adicionado ao frasco de penicilina após a mensuração do metano. Esta fração líquida foi colocada em tubos de ensaio e centrifugada por 15min, em rotação de 5000 rpm. Terminada a centrifugação, foi retirado 1,0 mL do sobrenadante e acondicionado em tubo de ensaio de vidro contendo 0,2 mL de ácido fórmico PA. Estes foram armazenados em refrigerador a 4°C e posteriormente realizada a quantificação dos AGCC acético, propiônico e butírico. A quantificação foi realizada pela técnica de cromatografia gasosa, segundo Erwin et al. (1961), com utilização de um cromatógrafo a gás (Thermo Scientific<sup>®</sup>, modelo Focus GC) com injetor automático de amostras (Thermo Electron Corporation<sup>®</sup>, modelo AS-3000) equipado com coluna de vidro de 2 m de comprimento e 1/5 de polegada de diâmetro interno empacotada com fase estacionária 80/120 Carbo-pack<sup>®</sup> B-DA/4%

Carbowax<sup>®</sup> 20M (Supelco<sup>®</sup>) e detetor de ionização de chama (FID) mantido à 270°C. O forno do cromatógrafo a gás foi mantido a 190°C durante as análises e a temperatura do injetor foi de 220 °C. O gás de arraste foi o H<sub>2</sub> de alta pureza, mantido em fluxo de 30 mL/minuto. O número de repetições por amostra foi aquele necessário para que a diferença entre leituras fosse inferior a 5%.

A concentração de AGCC da amostra foi calculada comparando a área do pico formado pela intensidade dessa corrente (área da amostra) com a área do pico formado pela solução contendo o ácido padrão (área do padrão).

### **Cálculos da produção de AGCC, CH<sub>4</sub> e da PER**

A quantificação do metano produzido desde o momento da injeção do conteúdo ruminal no frasco de penicilina até o momento de sua inativação por autoclavagem foi obtida pela multiplicação entre o volume de gás no frasco e a concentração de metano, quantificada por cromatografia gasosa. Sendo assim, obteve-se que:

$$\text{Prod.CH}_4 = (\text{Conc.CH}_4 \times \text{Volume gás total})_{T_{30}} - (\text{Conc.CH}_4 \times \text{Volume gás total})_{T_0}$$

Onde:

Prod. CH<sub>4</sub> = Produção de metano no momento compreendido entre a injeção do líquido ruminal no frasco de penicilina até a inativação por pressão;

Conc.CH<sub>4</sub> = Concentração de CH<sub>4</sub> (mmol);

Volume gás total: somatória do volume obtido da seringa e o volume do headspace do frasco de penicilina (mL);

T<sub>30</sub> = Tempo de 30 min de incubação

T<sub>0</sub> = Tempo de 0 min de incubação (frasco branco)

Os valores obtidos nos frascos foram corrigidos para as condições de pressão e temperatura local, através da equação geral dos gases.

Sendo assim, a produção de AGCC desde o momento da injeção da amostra no frasco de penicilina até a inativação por autoclavagem foi dada por:

$$\text{Prod. AGCC} = (\text{Conc. AGCC} \times \text{Vol. Liq. Total})_{T_{30}} - (\text{Conc. AGCC} \times \text{Vol. Liq. Total})_{T_0}$$

Onde:

Prod. AGCC = Produção de AGCC no momento compreendido entre a injeção do líquido ruminal no frasco de penicilina até a inativação por autoclavagem;

Conc.AGCC = Concentração de AGCC (mmol);

Vol. Liq. Total: volume líquido no frasco de penicilina obtido por diferença de pesagem antes e depois da estufa (mL);

T<sub>30</sub> = Tempo de 30 min de incubação

T<sub>0</sub> = Tempo de 0 min de incubação (frasco branco)

Posteriormente, as produções de CH<sub>4</sub> e AGCC foram expressas com base no conteúdo sólido incubado nos frascos (gramas ou quilos), conteúdo esse que é obtido pela diferença de pesagem entre o peso do frasco contendo a amostra após a estufa (65°C por 15 dias e 105° por 1 dia ) e o peso do frasco vazio.

Após a quantificação dos produtos da fermentação na amostra contida no frasco de penicilina (metano ou AGCC), cada produto foi multiplicado pelo seu calor de combustão, a fim de se expressar a produção de metano em porcentagem da energia oriunda da fermentação produzida. Assim, a perda de energia relativa (PER) foi a razão entre a energia contida no metano produzido e a somatória da energia contida em todos os produtos da fermentação quantificados (metano e AGCC), expressa em porcentagem. Logo:

$$PER (\%) = 100 \times \left( \frac{\text{Energia do CH}_4}{\text{Energia do CH}_4 + \text{C}_2 + \text{C}_3 + \text{C}_4} \right)$$

Onde:

CH<sub>4</sub> = metano;

C<sub>2</sub> = ácido acético;

C<sub>3</sub> = ácido propiônico;

C<sub>4</sub> = ácido butírico.

### **Metodologia de determinação da concentração de Nitrogênio Amoniacal**

Foram retirados 2 mL de cada frasco da coleta seriada (antes, 3, 6, 9 e 12 h após alimentação matinal no 21° dia de cada período experimental) colocados em tubos de ensaio contendo 1,0 mL de solução de ácido sulfúrico 1N e armazenado em freezer até a realização

das análises por colorimetria, segundo método descrito por Kulasek (1972) e adaptado por Foldager (1977) para determinação da concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>).

Com estes dados foi determinada a concentração de N-NH<sub>3</sub> ruminal no momento de cada coleta e após os 30 minutos de incubação dos frascos, possibilitando o cálculo, por diferença (balanço), da produção de N-NH<sub>3</sub> neste intervalo de tempo, sendo estimada sua produção por hora, para uma melhor compreensão e interpretação dos dados obtidos. Logo:

$$\text{Balanço de N-NH}_3 \text{ (mg/dL/h)} = (\text{Conc. 30 min (mg/dL)} - \text{Conc. 0 min (mg/dL)}) \times 2$$

### **Análises estatísticas**

Os dados de CMS obtidos nos últimos seis dias de cada período experimental e as diversas variáveis de fermentação ruminal foram analisados pelo programa Statistical Analysis System (SAS, 2010) utilizando o procedimento MIXED, sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias comparada pelo teste de Levene. Caso fossem heterogêneas utilizou-se o teste corrigido de Welch. Estes dados foram submetidos à análise de variância, que contemplou como causas de variação o efeito de tratamento, como fator fixo, efeito de período, efeito de animal dentro de quadrado e efeito de quadrado, como efeitos aleatórios. O efeito de tratamento foi separado pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os dados de AGCC, CH<sub>4</sub>, N-NH<sub>3</sub> e PER foram analisados com o mesmo modelo, porém foi adicionado o fator medidas repetidas no tempo, referentes aos diferentes momentos de coleta. Tal análise foi realizada utilizando-se o procedimento MIXED do SAS (2010). A análise por tempo somente foi realizada quando as interações entre efeito de tempo e efeito de tratamentos foram significativas.

## **3.3 Resultados e Discussão**

### **Consumo de matéria seca**

Quanto aos valores referentes ao consumo de matéria seca (MS), expresso em quilograma por dia (kg/dia), em porcentagem do peso vivo (% PV) ou por unidade de peso metabólico (g/kg de PV<sup>0,75</sup>), apresentados na tabela 3, não houve diferenças significativas (P>0,05) entre os tratamentos.

Tabela 3- Efeito de aditivos alimentares sobre o consumo de matéria seca, expresso em quilograma por dia, porcentagem do peso vivo ou unidade de peso metabólico

Variáveis	Tratamentos			EPM	Probabilidade
	Controle	Monensina	Tanino		
CMS (kg/animal/dia)	18,02	16,89	17,03	0,44	0,3376
CPV (% PV)	2,09	1,94	1,96	0,06	0,1520
CPM (g/kg de PV <sup>0,75</sup> )	113,07	105,36	106,36	2,96	0,1928

CMS= Consumo de matéria seca; CPV= Consumo de matéria seca em relação ao peso vivo; CPM= Consumo de matéria seca por unidade de peso metabólico.

No presente ensaio experimental, a utilização de monensina não influenciou o consumo alimentar. Resultados semelhantes foram obtidos por Zinn et al. (1994) e Oliveira et al. (2005), independentemente do nível de monensina utilizado, e também por Marino et al. (2011) que não observaram diferenças significativas utilizando o mesmo nível de monensina (3g/ani/dia) deste experimento.

Beauchemin et al. (2007), utilizando extrato de tanino de quebracho (mínimo de 90% de taninos condensados) para bovinos, nas quantidades de 0, 1, e 2% do CMS, não obtiveram efeitos significativos sobre o consumo ou digestibilidade da MS e da energia.

### **Mensuração contínua de pH ruminal**

O pH ruminal está estreitamente relacionado com a composição da dieta, podendo variar de 4,5 a 7,0 dependendo da mesma. Altos níveis de alimentos prontamente fermentescíveis promovem aumento na taxa de fermentação, podendo diminuir o pH, o que favorece o desenvolvimento de bactérias produtoras de ácido lático. O acúmulo de ácido lático contribui ainda mais para a queda de pH, fator determinante na ocorrência de distúrbios metabólicos, como a acidose ruminal (HUNGATE, 1966). É esperado que esta queda de pH atinja seu ápice entre 3-4 h após a alimentação, período correspondente ao pico de fermentação da última refeição. Esta observação foi constatada neste experimento, onde os menores valores de pH foram observados às 4 h após a alimentação.

As variáveis obtidas através da mensuração contínua do pH ruminal estão descritas na tabela 4. Não foi observado efeito significativo ( $P>0,05$ ) dos tratamentos sobre quaisquer das variáveis de pH ruminal avaliadas.

O fato de não haver efeito significativo ( $P>0,05$ ) dos aditivos para as médias do pH ruminal pode ser explicado pelo tempo de adaptação às respectivas dietas e pelo fato de os animais terem recebido dietas isoenergéticas e isoproteicas duas vezes por dia, na forma de ração completa. Além disso, podemos considerar a relação volumoso:concentrado da dieta

(50:50). Isto favoreceu a fermentação ruminal e, conseqüentemente, o consumo de matéria seca não apresentou diferenças entre os tratamentos, sugerindo uma razoável relação entre consumo de matéria seca e o pH ruminal.

O pH ruminal inferior a seis (6) tem sido associado à redução na digestão da FDN (MERTENS, 1979). No entanto, tal fato ocorreu por pouco tempo, dentro de um período de 24 horas de mensuração (183, 68 e 63 minutos, para os tratamentos controle, monensina e tanino, respectivamente), possivelmente devido à qualidade e à proporção de volumosos e concentrados utilizados (50:50), os quais não interferiram negativamente no processo fermentativo ruminal deste experimento.

No presente experimento, todos os tratamentos foram eficazes em manter o pH ruminal no pico de fermentação, após a alimentação. O pH médio para os diferentes tratamentos está apresentado na figura 8. Experimentos *in vitro* (SCHELLING, 1984) e *in vivo* (NAGARAJA et al., 1982) demonstraram que a monensina foi eficaz em manter ou restaurar o pH nos períodos críticos após a alimentação. Com o aumento dos níveis de monensina (0; 0,4; 0,8 e 1,2 mg/Kg de PV) foi observado aumento linear no pH ruminal de bezerros que recebiam ração peletizada (SALLES; LUCCI, 2000). Oliveira et al. (2005a) observaram que, em bovinos alimentados com dietas com baixo ou alto teores de proteína, a suplementação com monensina elevou o pH ruminal. Já Shell et al. (1983), trabalhando com novilhos que recebiam dietas de alto concentrado, observaram que a monensina não foi efetiva na elevação dos valores de pH. Não foi constatada alteração de pH em dietas de alta proporção de forragem, onde a monensina foi administrada para vacas em lactação (HAÏMOUD et al., 1995), vacas secas (HAÏMOUD et al., 1996), novilhas (OLIVEIRA et al., 2005b), ovinos (GARCÍA et al., 2000), bem como em cordeiros alimentados com duas diferentes fontes protéicas (POOS et al., 1979).

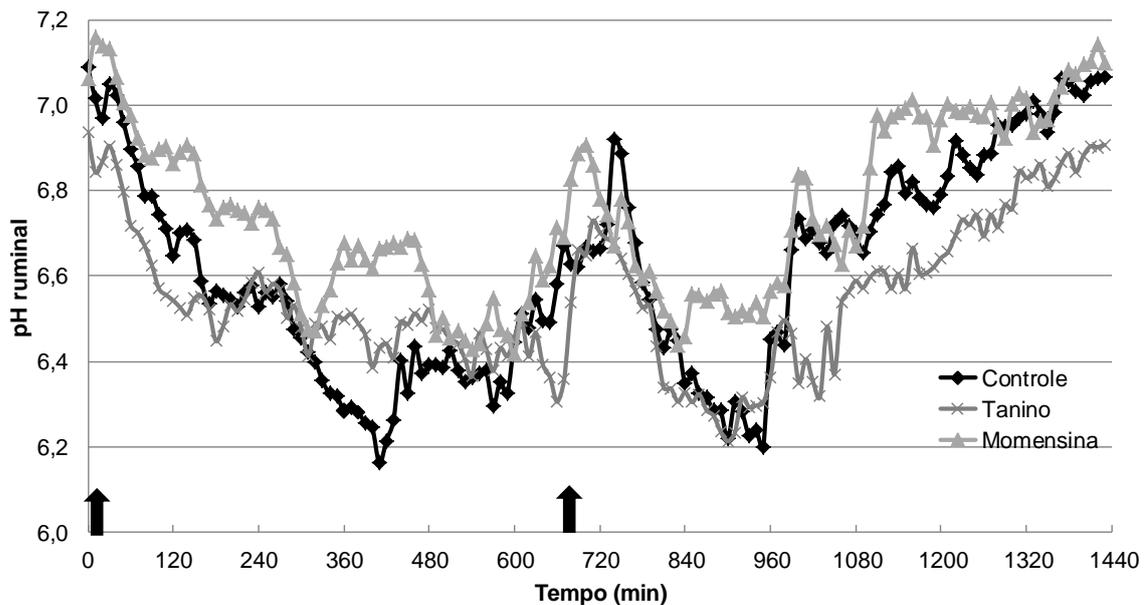
O pH parece possuir um papel fundamental na formação do complexo tanino-proteína, sendo que o pH com variação entre 3,5 a 7,0 favorável a esta formação. Em caso de pH superior a 8,0, o complexo tende a ser desfeito rapidamente e, em pH 1,0 a 3,0, cerca de 90% da proteína está na forma livre (LEINMÜLLER et al., 1991). Nos ruminantes, a formação do complexo é favorecida no rúmen, onde o pH se encontra em torno de 6,0 a 6,5, dissociando-se ao chegar ao abomaso, onde o pH está em torno de 2,0, permitindo a ação de peptidases (LEINMÜLLER et al., 1991). De acordo com o exposto, os dados para as diferentes variáveis de pH, observados na tabela 4, demonstram que o pH ruminal encontrado possivelmente tenha favorecido a formação do complexo tanino-proteína, dificultando a degradação da proteína no rúmen e possibilitando a sua passagem para o abomaso.

Tabela 4 - Variáveis de pH ruminal, em 24 horas, determinadas pela metodologia de mensuração contínua em bovinos suplementados com diferentes aditivos

Variáveis	Tratamentos				Probabilidade
	Controle	Monensina	Tanino	EPM <sup>1</sup>	
pH médio	6,62	6,75	6,55	0,07	0,2889
pH máximo	7,18	7,25	7,01	0,06	0,0842
pH mínimo	5,88	6,04	5,99	0,11	0,5550
Tempo de pH abaixo de 5,8 (min)	98,33	28,33	26,67	28,76	0,5474
Tempo de pH abaixo de 6,0 (min)	183,33	68,33	63,33	40,94	0,3498
Tempo de pH abaixo de 6,2 (min)	255,00	105,00	153,33	53,49	0,5080
Área de pH abaixo de 5,8 (h.pH/dia)	0,06	0,05	0,05	0,02	0,9938
Área de pH abaixo de 6,0 (h.pH/dia)	0,23	0,20	0,19	0,08	0,9740
Área de pH abaixo de 6,2 (h.pH/dia)	1,88	0,56	0,54	0,47	0,4225

<sup>1</sup>: EPM: Erro padrão da média.

Figura 8 - Valores médios de pH ruminal mensurados através da metodologia de mensuração contínua em bovinos alimentados com diferentes aditivos. As setas representam o momento do fornecimento da alimentação



### Concentração de nitrogênio amoniacal ruminal (N-NH<sub>3</sub>)

Não foram observados efeitos de interação entre tratamento e tempo sobre a concentração ruminal de nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) para os tempos de 0 ou 30 minutos, bem como sobre o balanço. Também não foram observados efeitos dos tratamentos sobre estas variáveis. Corroborando para os achados deste estudo, Ramanzin et al. (1997) observaram que a suplementação com monensina não influenciou a concentração ruminal de

nitrogênio amoniacal em vacas lactantes alimentadas com dietas de relação volumoso:concentrado de 70:30 ou 50:50. Campbell et al. (1997) não observaram diferença na concentração ruminal de nitrogênio amoniacal em novilhos alimentados com alta proporção de grãos, com ou sem fornecimento de monensina. Já Yang e Russell (1993) observaram diminuição da concentração ruminal de nitrogênio amoniacal com suplementação de monensina. Resultados semelhantes foram descritos em ovinos (POOS et al., 1979), em vacas em lactação (HAÏMOUD et al., 1995; RUIZ et al., 2001) e em vacas secas (HAÏMOUD et al., 1996).

A tabela 5 demonstra os valores médios do efeito dos aditivos sobre a concentração de nitrogênio amoniacal ruminal. De acordo com o NRC (1989), é necessária concentração de 5 mg/dL de N amoniacal no líquido ruminal para que haja maximização da digestão da matéria seca neste órgão. De outra forma, Leng (1990) sugeriu que, para maximizar a digestão ruminal sob condições tropicais, o nível de nitrogênio amoniacal ruminal deve ser superior a 10 mg/dL. Os valores médios observados para os diferentes tratamentos está acima da concentração de 5,0 mg/dL, no entanto, próximo de 10 mg/dL, como citado acima, para que ocorra a máxima produção de proteína microbiana. No presente experimento, o pico da concentração de N-NH<sub>3</sub> ruminal ocorreu 3 h após a alimentação. Picos de concentração de nitrogênio amoniacal aproximadamente 2 h após a refeição também foram relatados por Owens e Zinn (1988) e Porcionato et al. (2004).

A presença de baixas concentrações de taninos na dieta pode ser usada como potencial modulador da fermentação ruminal. A síntese de proteína microbiana, geralmente, é aumentada na presença de taninos. Um decréscimo na taxa de digestão ruminal acarretada pelos taninos pode contribuir para uma melhor sincronização da liberação dos nutrientes e, conseqüentemente, aumento na eficiência da síntese microbiana (GETACHEW et al., 2000). Apesar de os taninos diminuírem a disponibilidade dos nutrientes, eles causam uma mudança na partição desses, carreando a maior proporção dos nutrientes disponíveis para a síntese de massa microbiana e menor para a produção de AGCC. O decréscimo na população de protozoários no rúmen também contribui para uma menor reciclagem de nitrogênio ruminal.

O maior desempenho animal, que pode ser observado quando a dieta contém baixos níveis de taninos, tem sido atribuído à proteção da proteína do alimento da degradação no rúmen e à maior eficiência de síntese microbiana, levando a um aumento no fluxo de aminoácidos para o sangue (WAGHORN; SHELTON, 1997).

Tabela 5 - Efeito da inclusão de diferentes aditivos na dieta sobre a produção de N-NH<sub>3</sub>

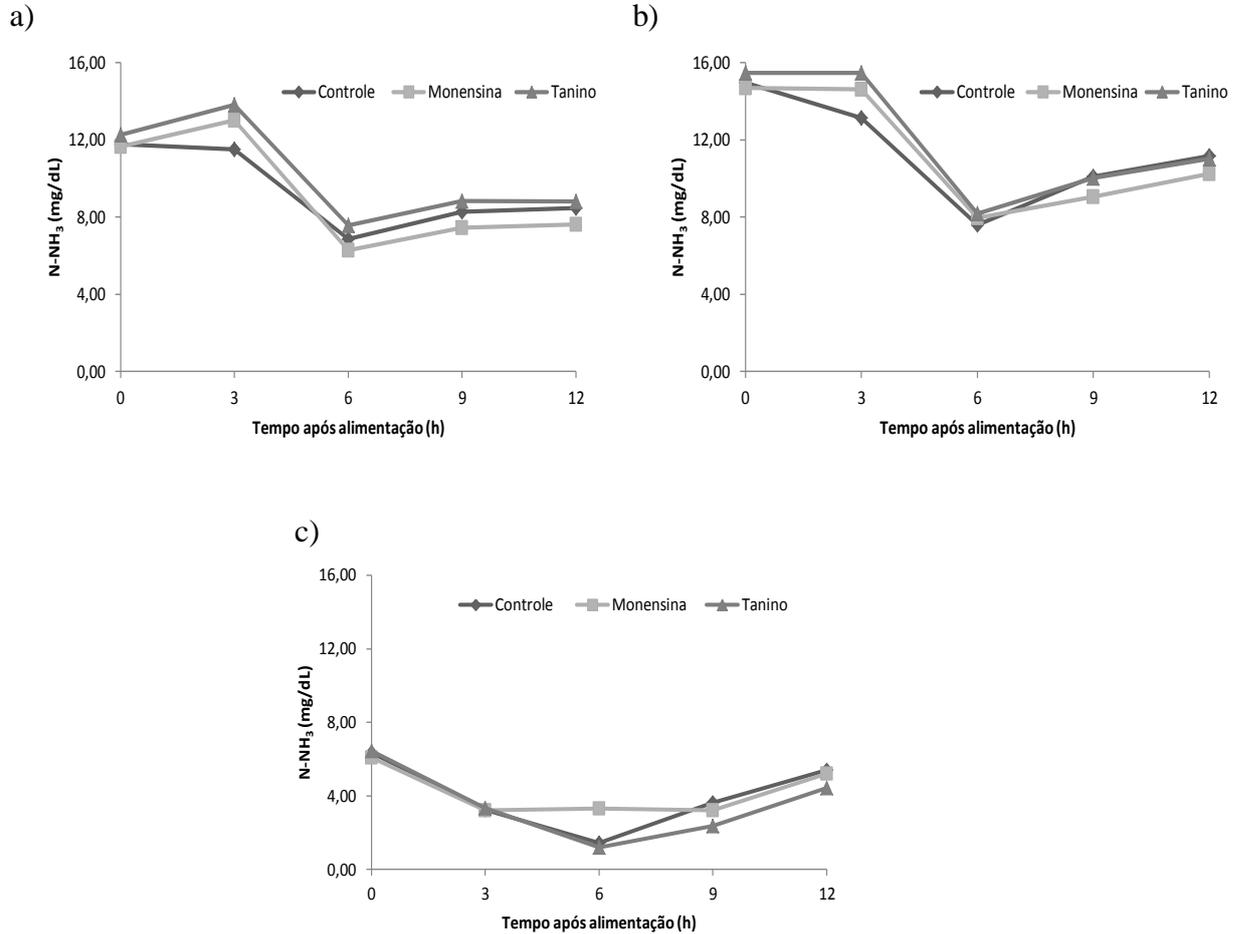
Variável	Tratamentos				Probabilidade		
	Controle	Monensina	Tanino	EPM <sup>1</sup>	Trat.	Tempo	Trat.*Tempo <sup>2</sup>
N-NH <sub>3</sub>							
0 min (mg/dL)	9,38	9,20	10,25	0,36	0,1162	<,0001	0,9793
30 min (mg/dL)	11,39	11,31	12,04	0,42	0,3472	<,0001	0,9570
Balanço (mg/dL/h)	4,02	4,21	3,56	0,27	0,8405	0,0334	0,5062

<sup>1</sup>EPM = Erro padrão da média, <sup>2</sup>Interação entre tratamento e tempo.

O efeito benéfico dos taninos, além da proteção contra degradação da proteína ruminal, também pode se estender refletindo-se em maior eficiência de síntese de proteína microbiana (MAKKAR, 2003), com aumento no fluxo de nitrogênio não amoniacal para o intestino (SLIWINSKI et al., 2002). A redução na taxa de digestão dos alimentos pelos taninos pode otimizar o sincronismo na liberação de nutrientes (fonte de energia e nitrogênio), maximizando a produção de proteína pelos microrganismos. Entretanto, McSweeney et al. (2001) citaram que o maior fluxo de proteína digestível da dieta para o intestino delgado pode ser contrabalançado pelo aumento de perdas endógenas de proteína, decorrente da interação entre taninos condensados dissociados e proteínas estruturais da mucosa intestinal.

Ao observar os gráficos (a) e (b), da figura 9, constata-se que houve um discreto aumento da concentração de N-NH<sub>3</sub> até 3 horas após a alimentação, possivelmente devido a uma maior degradação do alimento pelos microrganismos ruminais e conseqüente liberação de N-NH<sub>3</sub>. Em seguida, até o tempo de 6 horas, encontrou-se uma menor concentração de N-NH<sub>3</sub>, possivelmente devido à ocorrência de um aumento da síntese microbiana, consumindo parte do N-NH<sub>3</sub> disponível. Para os tempos de 9 e 12 horas após alimentação os níveis de N-NH<sub>3</sub> apresentaram pouca variação, indicando uma estabilização do ambiente ruminal e do processo fermentativo. O gráfico (c), da figura 9, representa a concentração de N-NH<sub>3</sub> obtida pela diferença entre a concentração encontrada após incubação por 30 min e a concentração no momento de coleta (0 min), sendo esta estimada para o tempo de uma hora (mg/dL/h). Apesar de não haver diferença significativa entre tratamentos (P>0,05), tal gráfico indica que houve um decréscimo no potencial de produção de N-NH<sub>3</sub> por hora, até o tempo de 6 horas após alimentação, restabelecendo, em seguida, seu potencial de produção até o tempo de 12 horas. O menor balanço positivo da produção de N-NH<sub>3</sub> ruminal encontrado 6 horas após a alimentação provavelmente se deveu à forte atividade fermentativa ruminal, com intensa síntese de proteína microbiana, oriunda da maior disponibilidade de energia originária dos carboidratos da dieta.

Figura 9 - Concentração de nitrogênio amoniacal nos diferentes tempos de coleta de conteúdo ruminal antes, 3, 6, 9, 12 horas após a alimentação matinal. a) concentração (mg/dL) dos frascos sem incubação. b) concentração (mg/dL) dos frascos após 30 minutos de incubação. c) concentração da diferença (30 min – 0 min) estimada por hora (mg/dL/h)



### Produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), de Metano e Perda de Energia Relativa de Metano (PER)

A utilização da nova técnica *ex situ* (micro-rúmen) gera um grande número de informações para as produções de AGCC e de CH<sub>4</sub>, além de uma nova variável, a perda de energia relativa (PER) de metano em relação aos demais produtos da fermentação ruminal, os AGCC. Devido à originalidade da técnica, há escassez de informações sobre a produção destes parâmetros. Assim, os mesmos serão discutidos com base na concentração de AGCC e emissão de metano por kg de MS do conteúdo ruminal (Tabela 6).

Tabela 6- Efeito da inclusão de diferentes aditivos na dieta sobre a produção de AGCC, de metano e sobre a PER

Variáveis	Tratamentos			EPM <sup>1</sup>	Probabilidade		
	Controle	Monensina	Tanino		Trat.	Tempo	Trat.*Tempo <sup>2</sup>
Acético							
0 min (mmol/L)	72,42	69,63	69,38	0,8764	0,1392	0,7933	0,0064
30 min (mmol/L)	81,08	80,47	81,27	0,7187	0,2953	0,0175	0,2531
Diferença (mmol/L)	8,66	10,83	11,89	0,6625	0,1212	0,0778	0,5131
Produção (mmol/g/h)	0,19	0,24	0,25	0,0143	0,1167	0,6683	0,4608
Produção (mol/kg/dia)	4,60	5,82	6,16	0,3452	0,1346	0,0129	0,5417
Produção (g/kg/dia)	275,79	349,05	369,95	20,710	0,1343	0,0130	0,5425
EB <sup>3</sup> (kcal/kg/dia)	962,51	1218,18	1291,11	72,279	0,1343	0,0130	0,5425
Propiônico							
0 min (mmol/L)	17,88	20,94	18,13	0,3763	0,1050	0,0008	0,2060
30 min (mmol/L)	20,62	24,80	21,25	0,3951	0,0647	<,0001	0,4501
Diferença (mmol/L)	2,75	3,85	3,11	0,1894	0,1818	0,0349	0,6077
Produção (mmol/g/h)	0,061	0,085	0,068	0,0039	0,0787	0,3493	0,6872
Produção (mol/kg/dia)	1,47	2,04	1,61	0,0945	0,0894	0,0102	0,5644
Produção (g/kg/dia)	108,48	151,32	119,18	6,9976	0,0891	0,0103	0,5624
EB <sup>3</sup> (kcal/kg/dia)	540,22	753,59	593,51	34,848	0,0891	0,0103	0,5624
Butírico							
0 min (mmol/L)	10,93	11,03	13,81	0,2572	0,2437	<,0001	0,1835
30 min (mmol/L)	12,98	13,46	14,35	0,2552	0,0938	<,0001	0,1107
Diferença (mmol/L)	2,04	2,43	2,54	0,1199	0,3316	0,0505	0,2856
Produção (mmol/g/h)	0,045	0,053	0,054	0,0025	0,2849	0,6012	0,6191
Produção (mol/kg/dia)	1,08	1,28	1,31	0,0582	0,3722	0,0429	0,2873
Produção (g/kg/dia)	95,08	113,02	115,10	5,1149	0,3724	0,0426	0,2806
EB <sup>3</sup> (kcal/kg/dia)	566,67	673,56	686,01	30,484	0,3724	0,0426	0,2806
AGCC Total							
0 min (mmol/L)	101,23	101,61	99,33	1,3372	0,5279	0,9046	0,0259
30 min (mmol/L)	114,67	118,73	116,87	1,1393	0,5784	0,0001	0,2100
Diferença (mmol/L)	13,48	17,12	17,54	0,9162	0,1682	0,0589	0,4538
Produção (mmol/g/h)	0,30	0,38	0,38	0,0199	0,2109	0,2603	0,5124
Produção (mol/kg/dia)	7,14	9,15	8,76	0,4673	0,1356	0,0035	0,5868
Produção (g/kg/dia)	479,35	613,38	583,47	30,651	0,1417	0,0037	0,5771
EB <sup>3</sup> (kcal/kg/dia)	2069,40	2645,33	2570,63	129,45	0,1729	0,0119	0,4388
Metano							
0 min (mmol/Frasco)	0,037 <sup>a</sup>	0,031 <sup>b</sup>	0,035 <sup>a</sup>	0,0009	0,0109	<,0001	0,3447
30 min (mmol/Frasco)	0,142	0,124	0,134	0,0023	0,1048	0,0019	0,2634
Produção (mmol/Frasco)	0,107	0,093	0,099	0,0018	0,2476	0,0001	0,4398
Produção (mmol/g/h)	0,057 <sup>a</sup>	0,050 <sup>b</sup>	0,051 <sup>b</sup>	0,0008	0,0057	0,0187	0,5146
Produção (mol/kg/dia)	1,34 <sup>a</sup>	1,19 <sup>b</sup>	1,23 <sup>b</sup>	0,0199	0,0003	0,0035	0,9282
Produção (g/kg/dia)	21,39 <sup>a</sup>	19,11 <sup>b</sup>	19,68 <sup>b</sup>	0,3191	0,0003	0,0038	0,9344
EB <sup>3</sup> (kcal/kg/dia)	281,46 <sup>a</sup>	251,43 <sup>b</sup>	259,01 <sup>ab</sup>	4,1990	0,0489	<,0001	0,9032
PER <sup>4</sup> (%)	13,57 <sup>a</sup>	10,82 <sup>b</sup>	10,34 <sup>b</sup>	0,4494	0,0387	0,2259	0,1426

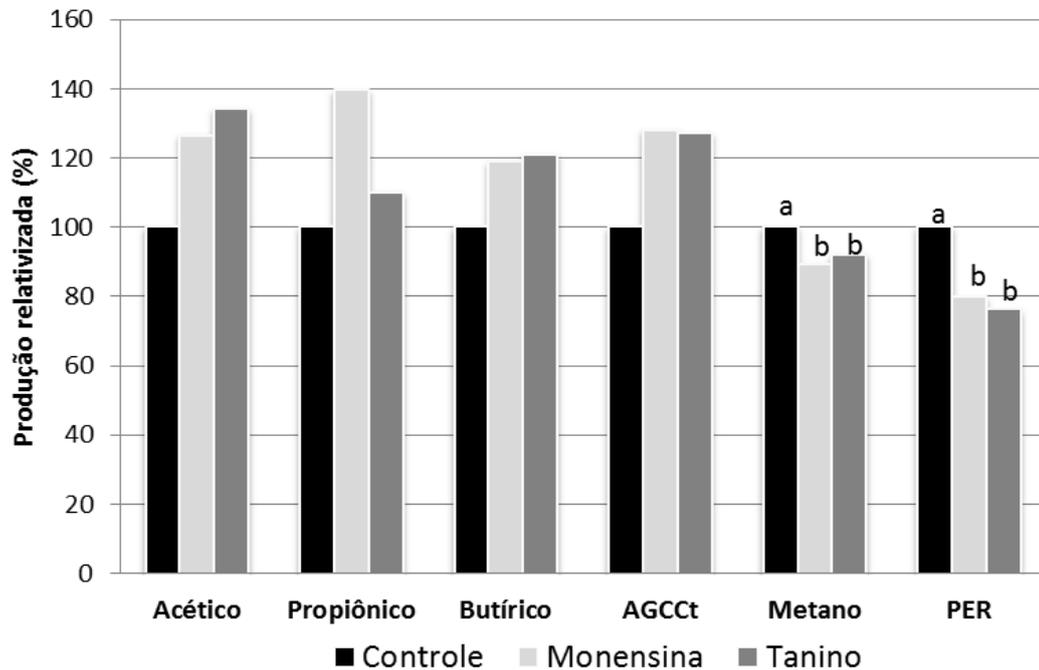
<sup>1</sup>EPM = Erro padrão da média, <sup>2</sup>Interação entre tratamento e tempo, <sup>3</sup>EB = Energia Bruta, <sup>4</sup>PER = Perda de energia relativa do metano em relação aos demais produtos da fermentação ruminal. <sup>abc</sup>Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Variações na produção e proporções molares de AGCC são determinadas principalmente pelo substrato fermentado e pH do fluido ruminal (RUSSELL, 1998). Experimentos *in vitro* e *in vivo* indicam que a monensina diminui a produção de metano. Essa

redução está mais relacionada com a inibição das bactérias que produzem e fornecem H<sub>2</sub> (principalmente aquelas produtoras de acetato e butirato) e formato para a metanogênese, do que um efeito direto sobre as arqueas metanogênicas, uma vez que essas são mais resistentes aos ionóforos do que aquelas que fornecem os substratos. Uma média de seis estudos indicou que a monensina pode diminuir a emissão de metano em 25% (VAN NEVEL; DEMEYER, 1995), podendo variar de 4% a 31% (SCHELLING, 1984; RUMPLER et al., 1986).

No presente experimento, a monensina aumentou a produção (g/kg/dia) numérica de acético, propiônico, butírico e AGCC totais em 26,6%, 38,9%, 18,9% e 28,0%, respectivamente. Esse produto também diminuiu, significativamente ( $P < 0,05$ ), a produção de metano em 10,7%. Já o tanino aumentou a produção (g/kg/dia) numérica de acético, propiônico, butírico e AGCC totais em 34,1%, 0,6%, 21,1% e 21,7%, respectivamente, e a produção de metano foi diminuída, significativamente ( $P < 0,05$ ), em 8,0%. Embora somente as diferenças de produção de metano fossem estatisticamente significativas ( $P = 0,0003$ ), quando se avaliou a PER observou-se que esta foi diminuída significativamente em 20,3% e 23,8% ( $P = 0,0387$ ) com a administração dos aditivos monensina e tanino (Tabela 6). Possivelmente este resultado seja efeito da associação entre os metabólitos fermentativos, pois a PER é uma relação da energia do CH<sub>4</sub> com a energia dos AGCC produzidos. Fato este que pode ser observado na Figura 10, onde demonstra-se os produtos da fermentação ruminal (mol/kg/dia) e da PER (%), para os diferentes aditivos, em relação ao tratamento controle, comprovando que os aditivos monensina ou tanino foram estatisticamente significativos em reduzir a produção de metano entérico, assim como a PER. Segundo Woodward et al. (2001), a ação dos taninos condensados na metanogênese pode ser atribuída a um efeito indireto, pela redução na produção de H<sub>2</sub>, como consequência da redução na digestibilidade da fibra, e por efeito inibitório direto na população de arqueas metanogênicas. A monensina foi responsável por aumentar a produção numérica de ácido propiônico e reduzir a de acético, quando comparada à dieta com tanino, fato este desejável à otimização da fermentação ruminal. No entanto, quando observada a produção total de AGCC, ambos os tratamentos obtiveram produções semelhantes, devido o tanino aumentar, numericamente, mais a produção de acético que a de propiônico, em comparação ao tratamento com monensina. Entende-se que essas variações observadas sejam devido ao efeito da inibição de algumas cepas de bactérias pelo ionóforo, na dieta com monensina, ou pelo efeito da administração de tanino condensado na dieta com a formação de complexos tanino-proteína no rúmen.

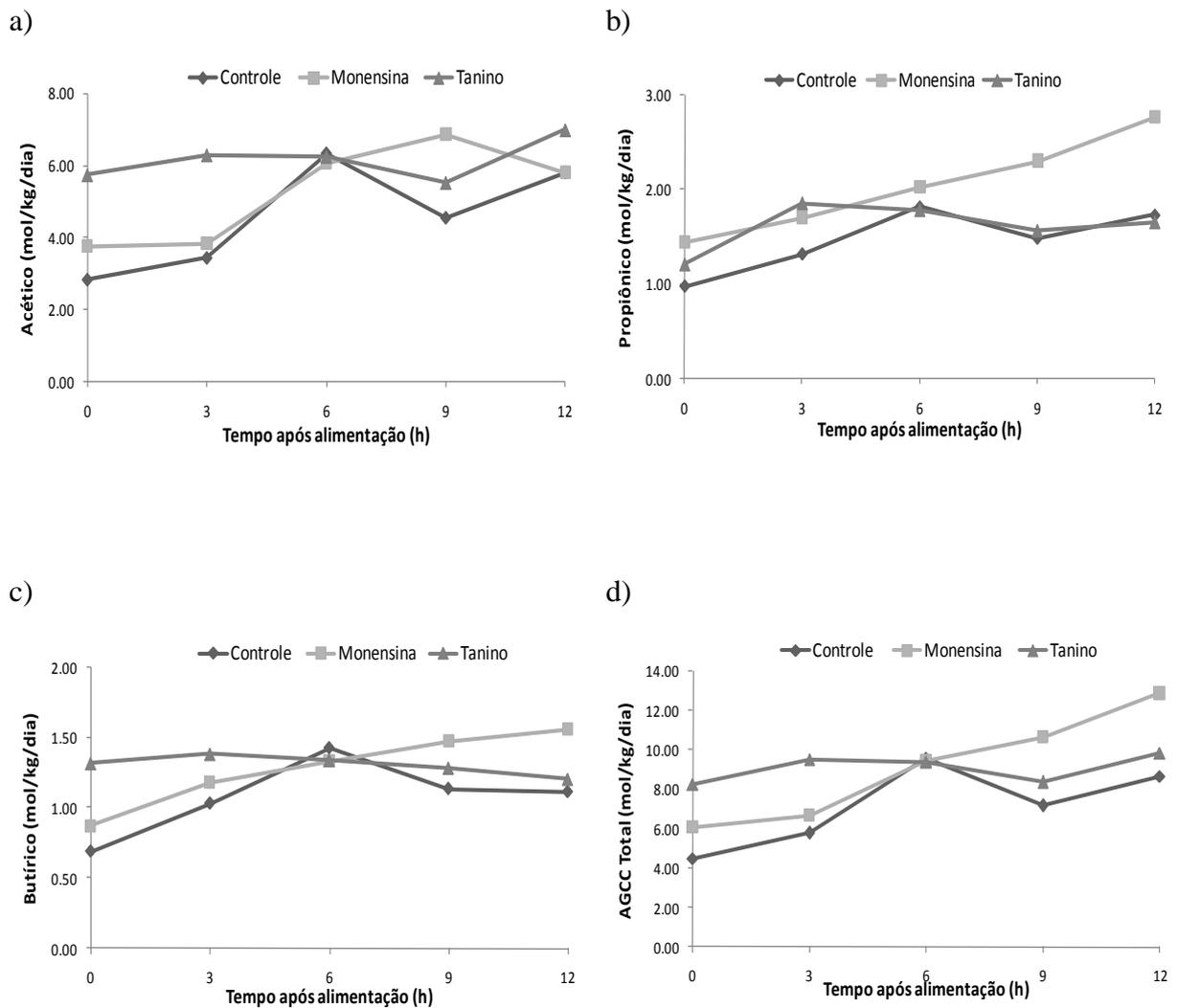
Figura 10 - Produção relativizada (Controle foi considerado como 100%) dos produtos da fermentação ruminal (mol/Kg/dia) para os diferentes tratamentos



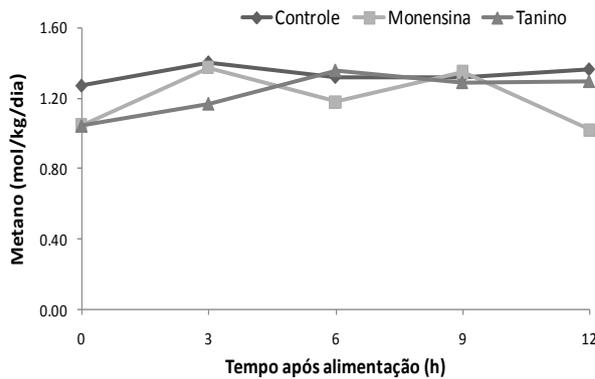
Beauchemin et al. (2007), utilizando níveis de 0, 1 e 2% de extrato de tanino condensado de quebracho vermelho (*Schinopsis quebracho-colorado*), com 91% de pureza, para bovinos de corte, não obtiveram redução nas emissões de metano entérico como esperado. Carulla et al. (2005) relataram que as emissões de metano por ovelhas foram reduzidas, quando alimentadas com extrato de taninos condensados de *Acacia mearnsii*, sendo que a suplementação da dieta com 2,5% de taninos condensados reduziu a produção de metano em aproximadamente 12%, em parte, devido a uma redução de 5% na digestibilidade da FDN. Para minimizar o efeito negativo de taninos condensados sobre a digestibilidade da fibra, um nível inferior de suplementação foi utilizada no experimento de Beauchemin et al. (2007), sendo o mesmo propósito utilizado para o presente experimento. Vários outros estudos têm relatado que a alimentação com forragens contendo tanino condensado para ruminantes reduz as emissões de metano (WAGHORN et al., 2002; WOODWARD et al., 2002; PINARES-PATIÑO et al., 2003; WOODWARD et al., 2004; PUCHALA et al., 2005). A fonte de tanino contido utilizados nesses estudos foram a sulla (*Hedysarum coronarium*, com 2,7-6,8% de taninos condensados), trevo vermelho (*Trifolium pretense*, com 0,3% de taninos condensados), grande trevo (*Lotus pedunculatus*, com 5,3% de taninos condensados) e Sericea lespedeza (*Lespedeza cuneata*, com 17,7% de taninos condensados).

Para as produções de ácidos acético (Figura 11a), propiônico (Figura 11b) e butírico (Figura 11c), assim como a de AGCC totais (Figura 11d) em mol/kg/dia, não foi observado efeito de interação entre tratamento e tempo de coleta ( $P>0,05$ ), nem efeito principal de tratamento ( $P>0,05$ ). Para a variável metano (Figura 11e) foram observados efeitos principais de tratamento ou tempo de coleta ( $P<0,05$ ). Já a variável PER (Figura 11e) apresentou efeito significativo para os tratamentos ( $P=0,0387$ ), quando comparados à dieta controle.

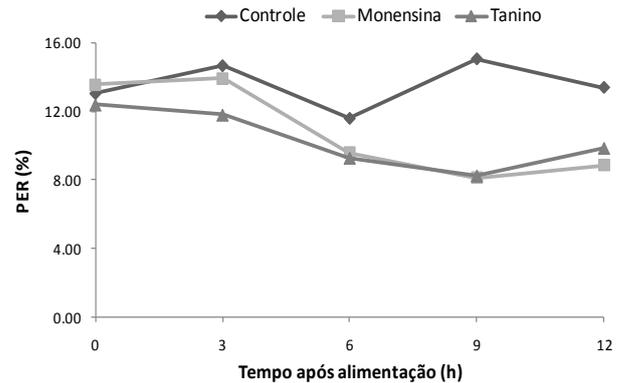
Figura 10- Valores médios da produção de (a) Ácido acético (mol/Kg/dia), (b) propiônico (mol/Kg/dia), (c) butírico (mol/Kg/dia), (d) AGCC total (mol/Kg/dia), (e) Metano (mol/Kg/dia) e (f) PER (%) nos diferentes tempos de coleta do conteúdo ruminal



e)



f)



Primavesi et al. (2004) relatam que a emissão de  $\text{CH}_4$  (g/h) por bovinos sem restrição alimentar, baseados em forrageiras tropicais, é superior à de bovinos alimentados com forrageiras de clima temperado, sendo que as forrageiras de baixa qualidade têm a taxa de ingestão reduzida e, conseqüentemente, é reduzida a taxa de emissão de  $\text{CH}_4$  por bovinos. Afirmam também que animais de sangue taurino geram menos  $\text{CH}_4$  que bovinos de sangue zebuino.

Outras formas para a diminuição das emissões de metano, que devem ser lembradas, são a inclusão de leguminosas, alteração da proporção volumoso:concentrados, adição de ionóforos e estágio de maturação da forrageira nas dietas de ruminantes. O grupo genético e estado fisiológico também influenciam (PRIMAVESI et al., 2004; NASCIMENTO, 2007; POSSENTI et al., 2008).

### 3.4 Conclusões

A utilização da nova metodologia de estudo da fermentação ruminal (metodologia *ex situ*) demonstrou-se eficiente para uma melhor compreensão da nutrição de ruminantes, sendo uma nova alternativa de estudo para pesquisadores e nutricionistas envolvidos com a nutrição animal.

A utilização dos aditivos monensina sódica (300 mg/animal/dia) ou tanino condensado (0,4% da dieta), extraído da casca da Acácia-negra (*Acacia mearnsii*), com pureza de 68%, não alteraram o consumo de matéria seca, o pH ruminal, a concentração de  $\text{N-NH}_3$ , a concentração dos ácidos acético, propiônico, butírico e AGCC total, no conteúdo ruminal. A

monensina ou tanino são eficientes na redução da produção de metano, sendo responsáveis por reduzir significativamente a produção em 10,7% e 8,0%, respectivamente, quando comparados ao tratamento controle. A perda energética relativa (PER) foi diminuída significativamente em 20,3% e 23,8% com a administração dos aditivos monensina ou tanino, quando comparados ao tratamento controle. Para tanto, supõe-se que houve uma redução da população das *Arqueas* metanogênicas, reduzindo a produção de metano, com um aumento ou manutenção da população dos demais microrganismos causando uma maior produção de AGCC, por fim tais ocorrências promoveram uma melhora na eficiência de produção de energia para o animal.

Portanto, a utilização de monensina ou tanino, em dietas com proporção de volumoso e concentrados de 50%, demonstram ser uma interessante opção em dietas para bovinos, com vistas à eficiência energética dos animais, com conseqüente redução nas emissões de metano. No entanto, ainda são necessários mais estudos, principalmente *in vivo*, sobre a quantidade e tipo de tanino utilizado, garantindo uma maior confiabilidade sobre o seu potencial de ação.

## REFERÊNCIAS

- AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analyses**. 16. ed. Washington: AOAC, 1995. 1051 p.
- BEAUCHEMIN, K. A.; MCGINN, S. M.; MARTINEZ, T. F.; MCALLISTER, T. A. Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 8, p. 1990-1996, 2007.
- BERGEN, W. G.; BATES, D. B. Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action. **Journal of Animal Science**, v. 58, n. 6, p. 1465-1466, 1984.
- CAJA, G.; GONZÁLEZ, E.; FLORES, C.; CARRO, M. D.; ALBANELL, E. Alternativas a los antibióticos de uso alimentario em ruminantes: probióticos, enzimas y ácidos orgânicos (I). **Produccion Animal**, v. 193, p. 2, 2003.
- CALSAMIGLIA, S.; BUSQUET, M.; CARDOZO, P. W.; CASTILLEJOS, L.; FERRET, A. Invited Review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 6, p. 2580-2595, 2007.
- CAMPBELL, C. G.; TITGEMEYER, E. C.; COCHRAN, R. C.; NAGARAJA, T. G.; BRABDT JR, R. T. Free amino acid supplementation to steers: effects on ruminal fermentation and performance. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 1167-1178, 1997.
- CARULLA, J. E.; KREUZER, M.; MACHMÜLLER, A.; HESS, H. D. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 56, n. 9, p. 961-970, 2005.
- CHALUPA, W. Manipulating rumen fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 46, n. 3, p. 585-599, 1977.
- CHALUPA, W. Rumen bypass and protection of proteins and amino acids. **Journal of Dairy Science**, v.58, n.8, p.1198-1218, 1975.
- DUFFIELD, T. F.; RABIEE, A. R.; LEAN, I. J. A Meta-Analysis of the Impact of Monensin in Lactating Dairy Cattle. Part 2. Production Effects. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 4, p. 1347-1360, 2008.
- ERWIN, E. S.; MARCO, G. J.; EMERY, E. M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, v. 44, n. 9, p. 1768-1771, 1961.
- FERGUSON, K. A. The protection of dietary proteins and aminoacids against microbial fermentation in the rumen. In: MCDONALD, W.; WARNER, A. C. I. (Ed.). **Digestion and metabolism in the ruminant**. Armidale: University of New England Publish Unit, 1975. p. 448-464.

FIELD J. A.; KORTEKAAS, S.; LETTINGA, G. The tannin theory of methanogenic toxicity. **Biological Wastes**, v. 29, p. 241–262, 1989

FOLDAGER, J. **Protein requirement and non protein nitrogen for high producing cow in early lactation**. 1977. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Michigan State University, East Lansing, MI. 1977.

GARCÍA, C. C. G.; MENDOZA, M. G. D.; GONZÁLEZ, M. S.; COBOS, P. M.; ORTEGA, C. M. E.; RAMIREZ, L. R. Effect of a yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) and monensin on ruminal fermentation and digestion in sheep. **Animal Feed Science Technology**, v. 83, n. 2, p. 165-170, 2000.

GETACHEW, G.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Tannins in tropical browses: effects on in vitro microbial fermentation and microbial protein synthesis in media containing different amount of nitrogen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3581, 2000.

GOODRICH, R. D.; GARRETT, J. E.; GAST, D. R.; KIRICK, M. A.; LARSON, D.A.; MEISKE, J.C. Influence of monensin on the performance of cattle. **Journal of Animal Science**, v. 58, n. 6, p.1484-1498, 1984.

HAÏMOUD, D. A.; BAYOURTHE, C.; MONCOULON, R.; VERNAY, M. Avoparcin and monensin effects on digestive function in cows fed a high forage diet. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 70, n. 2, p. 181-189, 1996.

HAÏMOUD, D. A.; VERNAY, M.; BAYOURTHE, C.; MONCOULON, R. Avoparcin and monensin effects on the digestion of nutrients in dairy cows fed a mixed diet. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 75, n. 3, p. 379-385, 1995.

HUNGATE, R. E. **The rumen and its microbes**. New York: Academic Press Inc., 1966.

HUNTINGTON, G. B. Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 3, p. 852-867, 1997.

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

KAMINSKI, M.; KARTANOWICZ, R.; JASTRZEBSKI, D.; KAMINSKI, M. M. Determination of carbon monoxide, methane and carbon dioxide in refinery hydrogen gases and air by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 989, p. 277–283, 2003.

KULASEK, G. A. A micromethod for determination of urea in plasma, whole blood cells using urease and phenol reagent. **Pol Arch Weter**, v. 15, p. 801-810, 1972.

LEINMÜLLER, E.; STEINGASS, H.; MENKE, K. Tannin in ruminant feedstuffs. **Animal Research and Development**, v. 33, p. 9-62, 1991.

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

LONGO, C. **Avaliação in vitro de leguminosas taniníferas, tropicais para mitigação de metano entérico.** 2007. 153 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear em Agricultura-CENA, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

MAKKAR, H. P. S. Effect and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tanninrichfeeds. **Small Ruminant Research**, v. 49, p. 241-256, 2003.

MARINO, C. T.; OTERO, W. G.; RODRIGUES, P. H. M.; DICOSTANZO, A.; MILLEN, D. D.; PACHECO, R. L. D.; DILORENZO, N.; MARTINS, C. L.; ARRIGONI, M. D. B. Effects of adding polyclonal antibody preparations on ruminal fermentation patterns and digestibility of cows fed different energy sources. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 3228-3235, 2011.

McSWEENEY, C. S.; PALMER, B.; McNEILL, D. M.; KRAUSE, D. O. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, p. 83-93, 2001.

MERTENS, D. R. **Effects of buffers upon fiber digestion.** Piscataway, NJ: Church and Dwight Co., Inc., 1979. 138 p.

MORAIS, J. A. S.; BERCHIELLI, T. T.; REIS, R. A. Aditivos. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de ruminantes.** Jaboticabal: FUNEP, 2006. p. 111-140.

MOYA, D.; MAZZENGA, A.; HOLTSHAUSEN, L.; COZZI, G.; GONZÁLEZ, L. A.; CALSAMIGLIA, S.; GIBB, D. G.; MCALLISTER, T. A.; BEAUCHEMIN, K. A.; SCHWARTZKOPF-GENSWEIN, K. Feeding behavior and ruminal acidosis in beef cattle offered a total mixed ration or dietary components separately. **Journal Animal Science**, v. 89, p. 520–530, 2011.

NAGARAJA, T. G.; AVEY, T. B.; BARTLEY, E. E. Effect of lasalocid, monensin or thiopectin on lactic acidosis in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 54, p. 649-658, 1982.

NASCIMENTO, C. F. M. **Emissão de metano por bovinos Nelore ingerindo *Brachiaria brizantha* em diferentes estádios de maturação.** 2007. 67 p. Tese (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2007

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Requeriments dairy cattle.** 6. ed. Washington, D.C.: Academic Press, 1989. 90 p.

OLIVEIRA, M. V. M.; LANA, R. P.; FREITAS, A. W. P.; EIFERT, E. C.; PEREIRA, J. C.; VALADARES FILHO, S. C.; PÉREZ, R. O. Parâmetros ruminal, sanguíneo, e urinário e digestibilidade de nutrientes em novilhas leiteiras recebendo diferentes níveis de monensina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, p. 2143-2154, 2005.

OLIVEIRA, M. V. M.; LANA, R. P.; FREITAS, A. W. P.; EIFERT, E. C.; PEREIRA, J. C.; VALADARES FILHO, S. C.; PÉREZ, R. O. Parâmetros ruminal, sanguíneo, e urinário e digestibilidade de nutrientes em novilhas leiteiras recebendo diferentes níveis de monensina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, p. 2143-2154, 2005b.

- OLIVEIRA, M. V. M.; LANA, R. P.; JHAM, G. N.; PEREIRA, J. C.; PÉREZ, R. O.; VALADARES FILHO, S. C. Influência da monensina no consumo e na fermentação ruminal em bovinos recebendo dietas com teores baixo e alto de proteína. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, p. 1763-1774, 2005a.
- OWENS, F. N.; ZINN, R. **El ruminante: fisiología digestiva e nutrición**. Zaragoza: Acribia, 1988. p. 255-281.
- PINARES-PATIÑO, C. S.; ULYATT, M. J.; WAGHORN, G. C.; LASSEY, K. R.; BARRY, T. N.; HOLMES, C. W.; JOHNSON, D. E. Methane emission by alpaca and sheep fed on Lucerne hay or grazed on pastures of perennial ryegrass/white clover or birdsfoot trefoil. **Journal of Agriculture Science**, Cambridge, v. 140, p. 215-226, 2003.
- POOS, M. I.; HANSON, T. L.; KLOPFENSTEIN, T. J. Monensin effects on diet digestibility, ruminal protein bypass and microbial protein synthesis. **Journal of Animal Science**, v. 48, p. 1516-1524, 1979.
- PORCIONATO, M. A. F.; BERCHIELLI, T. T.; FRANCO, G. L.; ANDRADE P.; SILVEIRA, R. N.; SOARES, W. V. B. Digestibilidade, degradabilidade e concentração amoniacoal no rúmen de bovinos alimentados com polpa cítrica peletizada normal ou queimada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, p. 258-266, 2004.
- POSSENTI, R. A.; FRANZOLIN, R.; SCHAMMAS, E. A.; DEMARCHI, J. J.; FRIGUETTO, R. T. S.; LIMA, M. A. Efeitos de dietas contendo *Leucaena leucocephala* e *Saccharomyces cerevisiae* sobre a fermentação ruminal e a emissão de gás metano em bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 8, p. 1509-1516, 2008.
- PRIMAVESI, O.; FRIGHETTO, R. T. S.; PEDREIRA, M. S.; LIMA, M. A.; BERCHIELLI, T. T.; BARBOSA, P. F. Metano entérico de bovinos leiteiros em condições tropicais brasileiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 3, p. 277-283, 2004.
- PUCHALA, R.; MIN, B. R.; GOETSCH, A. L.; SAHLU, T. The effect of a condensed tannin-containing forage on methane emission by goats. **Journal of Animal Science**, v. 83, n. 1, p. 182-186, 2005.
- RAMANZIN, M.; BAILONI, L.; SCHUIAVON, S.; BITTANTE, G. Effect of monensin on milk production and efficiency of dairy cows fed two diets differing in forage to concentrate ratios. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1136-1142, 1997.
- RUIZ, R.; ALBRECHT, G. L.; TEDESCHI, L. O. Effect of monensin on the performance and nitrogen utilization of lactating dairy cows consuming fresh forage. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 7, p. 1717-1727, 2001.
- RUMPLER, W.V.; JOHNSON, D. E.; BATES, D. B. The effect of high dietary cation concentration on methanogenesis by steers fed diets with and without ionophores. **Journal of Animal Science**, v. 62, p. 1737, 1986.
- 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, n. 12, p. 3222-3230, 1998.

- SALLES, M. S. V.; LUCCHI, C. S. Monensina para bezerros ruminantes em crescimento acelerado. 2. Digestibilidade e parâmetros ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 2, p. 582-588, 2000.
- SAS. **User's Guide**. Statistics. Version 9.2 Edition. Cary. NC.: SAS Inst., Inc., 2010.
- SAUER, F. D.; FELLNER, V.; KINSMAN, R. Methane output and lactation response in Holstein cattle with monensin or unsaturated fat added to the diet. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 906, 1998.
- SCHELLING, G. T. Monensin mode of action in the rumen. **Journal of Animal Science**, v. 58, n. 6, p. 1518-1527, 1984.
- SCOTT, T. W.; ASHES, J. R. Dietary lipids for ruminants: protection, utilization and effects on remodelling of skeletal muscle phospholipids. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 44, n. 3, p. 495-508, 1993.
- SHELL, L. A.; HALE, W. H.; THEURER, B.; SWINGLE, R. S. Effect of monensin on total volatile fatty acid production by steers fed a high grain diet. **Journal of Animal Science**, v. 57, p. 178-185, 1983.
- SLIWINSKI, B. J.; SOLIVA, C. R.; MACHMÜLLER, K. M. Efficacy of plant extracts rich in secondary constituents to modify rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 101, p. 101-114, 2002.
- VAN NEVEL, C. J.; DEMEYER, D. I. Feed additives and other interventions for decreasing methane emissions. In: WALLACE, R. J.; CHESSON, A. (Ed.). **Biotechnology in animal feeds and animal feeding**. Weinheim: VCM, 1995. p. 329-349.
- VAN NEVEL, C. J.; DEMEYER, D. I. Effect of monensin on rumen metabolism in vitro. **Applied Environmental Microbiology**, v. 34, p. 251-257, 1977.
- VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca, New York: Cornell University Press, 1994. 476 p.
- WAGHORN, G. C.; TAVENDALE, M. H.; WOODFIELD, D. R. Methanogenesis from forages fed to sheep. **Proceedings New Zealand Society of Animal Production**, v. 64, p. 159-165, 2002.
- WAGHORN, G. C.; SHELTON, I. D. Effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* on the nutritive value of pasture for sheep. **Journal of Agriculture Science**, v. 128, p. 365, 1997.
- WOODWARD, S. L.; WAGHORN, G. C.; ULYATT, M. J.; LASSEY, K. R. Early indications that feeding *Lotus* will reduce methane emissions from ruminants. **Proceedings New Zealand Society of Animal Production**, v. 61, p. 23, 2001.
- WOODWARD, S. L.; WAGHORN, G. C.; LASSEY, K. R.; LABOYRE, P. Does feeding *sulla* (*Hedysarum coronarium*) reduce methane emissions from dairy cows? **Proceedings New Zealand Society of Animal Production**, v. 6, p. 227-230, 2002.

WOODWARD, S. L.; WAGHORN, G. C.; LABOYRE, P. Condensed tannins in birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) reduce methane emissions from dairy cows. **Proceedings New Zealand Society of Animal Production**, v. 64, p. 160–164, 2004.

YANG, C. M. J.; RUSSELL, J. B. The effect of monensin supplementation on ruminal ammonia accumulation in vivo and the numbers of aminoacid fermenting bacteria. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 12, p. 3470-3476, 1993.

ZINN, R. A.; PLASCENCIA, A.; BARAJAS, R. Interaction of forage level and monensin in diets for feedlot cattle on growth performance and digestive function. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 2209-2215, 1994.

## **CAPÍTULO 4 - EFEITO DE ADITIVOS ALIMENTARES SOBRE A DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL E A EXCREÇÃO DE NUTRIENTES DA DIETA EM BOVINOS**

### **RESUMO**

Na busca por estratégias para diminuir as perdas referentes à emissão de metano por ruminantes, diferentes dietas, aditivos e manejos nutricionais têm sido empregados. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes aditivos alimentares sobre o consumo, a digestibilidade aparente total e a excreção de nutrientes da dieta em bovinos. Seis vacas ( $873 \pm 81$  kg) canuladas no rúmen foram utilizadas e distribuídas a três dietas, que diferiram quanto ao aditivo, seguindo-se o delineamento experimental em quadrado latino 3x3 replicado (n= 18 unidades experimentais): Controle (CON): sem aditivo; Monensina (MON): adição de 300 mg de monensina sódica por animal por dia; Tanino (TAN): adição de 100 g de extrato concentrado de tanino condensado obtido da Acácia-negra (*Acacia mearnsii*) por animal por dia. Para determinação do consumo e da digestibilidade aparente total da MS e suas frações, bem como da excreção dos nutrientes da dieta, foi utilizado o marcador óxido crômico. Cada período experimental foi constituído de 15 dias, onde do dia 5 até o dia 15 de oferecimento das dietas foi administrado, via cânula ruminal, 2 g do marcador óxido crômico por kg de MS de alimento consumido. O ensaio de digestibilidade foi constituído por duas fases, sendo os cinco primeiros dias para adaptação ao marcador e os cinco últimos para coleta de fezes. A excreção da MS e dos nutrientes, bem como a excreção de Nitrogênio, foi calculada a partir dos dados de coeficiente de digestibilidade da MS e suas frações. Os dados foram analisados pelo programa SAS (Versão 9.2, 2010) através do procedimento MIXED. No modelo, o efeito de tratamento foi considerado fixo e os efeitos de período, quadrado e animal dentro de quadrado considerados aleatórios. Não houve efeito de aditivo ( $P>0.05$ ) sobre o consumo, digestibilidade aparente total e excreção da MS, PB, EB, FDN, FDA, EE, ENN, MO ou P, nem na digestibilidade do NDT e na excreção de N. Portanto, a utilização dos aditivos monensina ou tanino, nas dosagens utilizadas, não interferem sobre o consumo, digestibilidade e excreção dos nutrientes, em dietas para bovinos com proporção volumoso concentrado de 50%.

Palavras-chave: Digestibilidade. Excreção. Monensina. Ruminantes. Tanino.

## **EFFECT OF FEED ADDITIVES ON TOTAL TRACT APPARENT DIGESTIBILITY AND EXCRETION OF NUTRIENTS IN CATTLE**

### **ABSTRACT**

In the search for strategies to decrease the losses related to methane emissions by ruminants, different diets, additives and nutritional management have been employed. The aim of this study was to evaluate the effect of different additives on intake, apparent digestibility and excretion of dietary nutrients in cattle. Six ruminally cannulated cows ( $873 \pm 81$  kg) were distributed to three diets, which differed in the additive used, in a replicated 3x3 Latin square experimental design (n = 18 experimental units): Control (CON): no additive; Monensin (MON): addition of 300 mg of monensin per animal per day; Tannin (TAN): addition of 100 g of concentrated extract condensed tannin obtained from black wattle (*Acacia mearnsii*) per animal per day. For determination of intake and apparent digestibility of DM and its fractions, as well as, excretion of nutrients, chromic oxide was used as a marker. Each experimental period consisted of 15 days, where from day 5 to 15 of diets offering, 2 g of the marker chromic oxide was administered per kg DM of food consumed through rumen cannula. The digestibility trial consisted of two phases, the first five days for adaptation to the marker and the last five for feces sampling. The excretion of DM and nutrients, as well as, the excretion of nitrogen was calculated from the data of digestibility of DM and its fractions. Data were analyzed using SAS (version 9.2, 2010) by MIXED procedure. In the model, treatment effect was considered fixed and the effects of period, square, and animal within square were considered random. There was no additive effect ( $P > 0.05$ ) on intake, apparent digestibility and excretion of DM, CP, GE, NDF, ADF, EE, NFE, OM or P, nor in TDN digestibility and excretion of N. Therefore, the use of additives, monensin or tannin, in the doses adopted do not interfere with the consumption, digestibility and excretion of nutrients in cattle diets with forage to concentrate ratio of 50 %.

Keywords: Digestibility. Excretion. Monensin. Ruminants. Tannin.

## 4.1 Introdução

O consumo e digestibilidade dos nutrientes e a utilização destes nos diferentes compartimentos do trato digestivo é a estimativa que mais se aproxima do valor nutritivo verdadeiro dos alimentos. O conhecimento das características dos alimentos e seu balanceamento na formulação de rações torna-se uma ferramenta fundamental, a fim de suprir as necessidades dos animais, explorando sua máxima capacidade digestiva, de modo a atingir seu potencial genético para o aproveitamento da dieta. Existe hoje uma variedade de alimentos que podem ser utilizados na alimentação de ruminantes. Entretanto, seu valor nutricional e sua qualidade são determinados por complexa interação entre os nutrientes e os microrganismos do trato digestivo, nos processos de digestão, absorção, transporte e utilização de metabólitos, além da própria condição fisiológica do animal (MARTINS et al., 2000).

Desde o final do século XVIII, estudos relatavam que os microrganismos presentes no rúmen fermentavam celulose e obtinham como produtos ácidos graxos de cadeia curta, metano e dióxido de carbono (BERGMAN, 1990). Desde então, a comunidade científica busca entender os processos metabólicos que ocorrem no ambiente ruminal, além de procurar estratégias para a manipulação da fermentação ruminal com intuito de melhorar a eficiência de utilização das dietas empregadas (MARINO, 2008). A busca por ingredientes alternativos para a nutrição de ruminantes leva a constantes investigações da dinâmica de fermentação e digestão desses ingredientes nos processos que estão envolvidos na nutrição dos animais de produção (FAYED et al., 2009).

A digestão é um processo de conversão de macromoléculas do alimento para compostos simples que podem ser absorvidos a partir do trato gastrointestinal enquanto que a digestibilidade constitui um importante parâmetro do valor nutritivo de um alimento (OLIVEIRA et al., 1991). A digestibilidade de um alimento reflete sobre seu aproveitamento pelos microrganismos do rúmen e expressa a capacidade do animal em utilizar, em maior ou menor escala, seus nutrientes. Para tal, o coeficiente de digestibilidade de uma dieta é importante por indicar que nutrientes realmente estão disponíveis para o animal, além de descrever o valor nutritivo dos alimentos (VAN SOEST, 1994).

Ensaio de digestibilidade da matéria seca e suas frações tornam-se uma importante ferramenta de avaliação do aproveitamento de dietas pelo animal, além de estarem intimamente relacionados com os eventos ruminais.

Um dos modificadores de fermentação ruminal mais utilizados atualmente por nutricionistas do mundo inteiro é a monensina sódica. Aprovada em 1976 pelo órgão americano Food and Drug Administration (FDA) para utilização em dietas para ruminantes, a monensina é uma substância classificada como ionóforo. Neste grupo também se encontram outros aditivos como a salinomocina e a lasalocida. O mecanismo básico de ação do ionóforo é a modificação do fluxo de íons através de membranas biológicas. Dentre outras ações, a monensina é capaz de inibir o crescimento das bactérias produtoras de H<sub>2</sub> (como a *Selenomonas ruminantium*), substrato básico para a produção de metano (VAN NEVEL; DEMEYER, 1977). Reflexos da ação da monensina são aumento da produção de propionato (VAN MAANAN et al., 1978), redução da produção de metano *in vivo* e *in vitro* (BARTLEY et al., 1979), aumento da digestibilidade da matéria seca e do amido, assim como aumento da retenção de nitrogênio (SCHELLING, 1984) e aumento do fluxo de aminoácidos e digestão dos mesmos no duodeno (HAÏMOUD et al., 1995). Todavia, a legislação classifica os ionóforos como antibióticos, o que faz seu uso ser cada vez mais criticado pela sociedade consumidora.

Na nutrição animal, geralmente, os taninos são vistos como prejudiciais, pois podem provocar redução da ingestão de matéria seca (MS) devido à adstringência, fazem ligações com as proteínas da dieta, se complexam com enzimas digestivas, fazem interações negativas com o trato digestivo e possuem efeitos tóxicos diretos (CABRAL FILHO et al., 2005). No entanto, essas situações apenas têm sido observadas quando a dieta consumida pelo animal contém níveis acima de 3% de tanino condensado na base da matéria seca (MAKKAR, 2003). Quando administrados em níveis adequados podem, exercer efeitos benéficos na utilização de nutrientes, na saúde e na produção animal, reduzindo a taxa de degradabilidade ruminal da proteína (FRUTOS et al., 2000; HERVÁS, 2001; LELIS; GONÇALVES, 2001; BATTESTIN et al., 2004; HERVÁS et al., 2004), a incidência de timpanismo ruminal (CLARKE; REID, 1972), a emissão de gases via eructação (PUCHALA et al., 2005; BEAUCHEMIN et al., 2007) e exercendo função anti-helmíntica (MIN; HART, 2003). Waghorn e Shelton (1995), utilizando níveis de taninos condensados em torno de 0,5% da MS da dieta, não encontraram decréscimo no consumo voluntário dos animais, sugerindo que esses níveis seriam aconselhados para utilização como aditivo alimentar para ruminantes.

Tem-se como hipótese que aditivos utilizados na alimentação de bovinos, atuam na modulação da fermentação ruminal trazendo benefícios ao ruminante. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito dos aditivos monensina ou tanino sobre o consumo, a

digestibilidade aparente total da MS da dieta e suas frações, bem como sobre a excreção dos nutrientes da dieta em bovinos.

## 4.2 Material e Métodos

### Animais e instalações

O experimento foi realizado no Departamento de Nutrição e Produção Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, campus de Pirassununga, nas instalações do Estábulo Experimental e do Laboratório de Bromatologia.

Para avaliação do consumo e da digestibilidade aparente total da MS e suas frações, bem como a excreção dos nutrientes da dieta, foram utilizadas seis vacas não gestantes e não lactantes, com peso vivo médio de  $873 \pm 81$  kg e portadoras de cânula ruminal com 10 cm de diâmetro e 7,5 cm de espessura. Os animais foram mantidos em instalação coberta, provida de baias individuais com cochos de cimento e bebedouros automáticos comuns a cada dois animais, e também de camas de areia, a fim de proporcionar maior conforto e bem-estar aos animais.

### Tratamentos e delineamento experimental

Seis vacas foram distribuídas a uma das três dietas experimentais, isoenergéticas (1,55 Mcal de  $EL_1$ /kg de MS) e isoproteicas (12,0% de PB), formuladas com o programa *Spartan Dairy Ration Evaluator/Balancer*, versão 3.0.3, diferindo de acordo com o aditivo alimentar utilizado, sendo:

- 1) Controle: Dieta sem adição de aditivos;
- 2) Monensina: Dieta com adição de 300 mg/animal/dia de monensina sódica, o que corresponde a 3 g/animal/dia do produto comercial Rumensin - Elanco<sup>®</sup>;
- 3) Tanino: Dieta com adição de 100 g/animal/dia de extrato concentrado de tanino condensado obtido da casca da Acácia-negra (*Acacia mearnsii*) comercializado pela empresa Veronese<sup>®</sup>.

O delineamento experimental utilizado foi o quadrado latino 3x3 replicado, ou seja, dois quadrados latinos contemporâneos, sendo que a unidade experimental foi o animal dentro

de cada período. Logo, o experimento contou com 18 unidades experimentais referentes a 3 animais, 3 períodos e 2 quadrados (Quadro 2). A tabela da análise de variância encontra-se abaixo (Tabela 7).

Quadro 2 - Esquema do delineamento de quadrado latino 3x3 replicado

Quadrado 1				Quadrado 2		
Animal	715	698	020	631	627	631
Período I	Controle	Tanino	Monensina	Controle	Tanino	Monensina
Período II	Tanino	Monensina	Controle	Monensina	Controle	Tanino
Período III	Monensina	Controle	Tanino	Tanino	Monensina	Controle

Tabela 7 - Esquema da análise de variância para delineamento em quadrado latino replicado

Causas de variação	Graus de Liberdade
Tratamentos	2
Período	2
Animal dentro de quadrado	4
Quadrado	1
Resíduo A	8
Total de unidades experimentais	17

### Manejo nutricional e período experimental

Os alimentos foram oferecidos *ad libitum*, duas vezes ao dia, às 08:00 e 16:00 h, na forma de ração completa com proporção volumoso:concentrado de 50:50. A fonte de volumoso utilizada foi a silagem de milho e o concentrado consistiu-se de milho grão moído, farelo de soja, sal comum, fosfato bicálcico, calcário e suplemento mineral. Ofertou-se a dieta para garantir sobras de 5 a 10% do ofertado. Na manhã seguinte ao oferecimento, foram retiradas e pesadas as sobras. As proporções dos diversos ingredientes das dietas experimentais e a composição bromatológica das mesmas estão descritas na tabela 8. Os aditivos, monensina sódica e tanino condensado, foram adicionados diretamente sobre o alimento contido no cocho. Como fonte de tanino condensado foi utilizado o extrato da casca da Acácia-negra (*Acacia mearnsii*), um pó amorfo com 68% de pureza sendo o restante composto por outros fenóis e cinzas, o que garantiu uma dieta com o aditivo tanino condensado de 4g/kg de MS ingerida (0,4% da dieta).

Tabela 8 - Proporções de ingredientes e composição bromatológica estimada da dieta experimental, expressa em porcentagem da matéria seca (% MS)

<b>Ingredientes</b>	<b>(% MS)</b>
Silagem de milho	50,00
Milho grão moído	34,70
Farelo de soja	12,20
Sal comum	0,50
Fosfato bicálcico	0,10
Calcário	0,50
Suplemento mineral <sup>1</sup>	2,00
<b>Composição bromatológica</b>	
Matéria seca <sup>2</sup> (%)	53,10
PB <sup>2</sup> (% MS)	11,60
PDR <sup>3</sup> (% PB)	65,10
PNDR <sup>3</sup> (% PB)	34,90
FDN <sup>2</sup> (% MS)	27,10
FDNe <sup>3</sup> (% MS)	22,60
FDA <sup>2</sup> (% MS)	14,40
CNE <sup>2</sup> (% MS)	46,10
AMIDO <sup>3</sup> (% MS)	39,30
MM <sup>2</sup> (% MS)	7,60
Ca <sup>2</sup> (% MS)	0,85
P <sup>2</sup> (% MS)	0,51
EE <sup>2</sup> (%MS)	3,50
NDT <sup>3</sup> (% MS)	67,30
EL <sub>t</sub> <sup>3</sup> (Mcal/dia)	1,55

<sup>1</sup> Suplemento mineral e vitamínico, quantidade por Kg de produto: 200 g de cálcio, 60 g de fósforo, 20 g de enxofre, 20 g de magnésio, 70 g de sódio, 15 mg de cobalto, 700 mg de cobre, 700 mg de ferro, 40 mg de iodo, 1.600 mg de manganês, 19 mg de selênio, 2.500 mg de zinco, 200.000 UI de vitamina A, 50.000 UI de vitamina D<sub>3</sub>, 1.500 UI de vitamina E. <sup>2</sup>Análises bromatológicas, determinadas no Laboratório de Nutrição Animal e Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga; <sup>3</sup>Estimado segundo o programa Spartan Dairy Ration Evaluator/Balancer, versão 3.0.3.

Cada um dos três períodos foi composto por 15 dias, sendo que, para a análise da digestibilidade aparente total e a excreção da MS e dos nutrientes da dieta, constituíram-se duas fases entre o dia 5 até o dia 15 de oferecimento das dietas, sendo os cinco primeiros dias para adaptação ao marcador óxido crômico e os cinco últimos para administração e coleta de fezes. Os animais foram pesados no primeiro e último dia de cada período experimental. O consumo de matéria seca (CMS) foi avaliado nos cinco últimos dias experimentais. A figura 12 representa o esquema dos dias de coleta de dados para a determinação da digestibilidade



(EE), fósforo (P) e energia bruta (EB), segundo AOAC (1995), e fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina (LIG), conforme Van Soest (1994).

### **Digestibilidade aparente total**

A digestibilidade aparente total da MS da dieta e suas frações (PB, EE, EB, extrativo não nitrogenado - ENN, FDN, FDA, e MO) foram determinadas por meio do marcador óxido crômico ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ), segundo Bateman (1970). Para tal, entre o dia 5 até o dia 15 de oferecimento das dietas de cada período experimental, foram administrados duas vezes ao dia, via cânula ruminal, 2 g do marcador óxido crômico por kg de MS de alimento consumido, através de envelopes confeccionados em papel absorvente. O ensaio de digestibilidade foi constituído por duas fases, sendo os cinco primeiros dias para adaptação ao marcador e os cinco últimos para coleta de fezes.

Para análise da composição das amostras de fezes, foi retirada uma alíquota de 200 g por animal diretamente do reto, duas vezes ao dia, a qual foi acondicionada em embalagem plástica, identificada para cada animal e período experimental sendo armazenada em freezer a  $-20^\circ\text{C}$  até o momento do processamento e análise.

Durante esse mesmo período foram coletadas, duas vezes ao dia, aproximadamente 200 g de amostra de cada alimento oferecido na ração total e armazenadas em embalagens plásticas previamente identificadas. Posteriormente, foram mantidas em freezer ( $-20^\circ\text{C}$ ) até o momento da análise. Ao final do experimento as amostras dos alimentos e das fezes foram homogeneizadas e colocadas em bandejas de alumínio por animal e por período e foram secas em estufa com circulação forçada de ar a  $65^\circ\text{C}$  por 72h. As amostras foram trituradas em moinho, utilizando-se peneira com crivos de 1mm, e acondicionadas em potes fechados para posterior determinação da concentração de óxido crômico, segundo Conceição et al. (2007).

O extrativo não-nitrogenado (ENN) dos alimentos e das dietas foi calculado pela fórmula  $\%ENN = 100 - (\%PB + \%EE + \%FDN + \%MM)$  e o teor de nutrientes digestíveis totais (NDT) pela fórmula  $NDT = (PBD + FDND + ENND) + (2,25 \times EED)$ , adaptado de Sniffen et al. (1992), em que PBD = proteína bruta digestível, FDND = fibra em detergente neutro digestível, ENND = extrativo não-nitrogenado digestível e EED = extrato etéreo digestível.

### **Excreção da matéria seca e dos nutrientes**

A excreção da MS e dos nutrientes, bem como a excreção do Nitrogênio (ExN), foi calculada a partir dos dados de coeficiente de digestibilidade da MS e suas frações, multiplicando o consumo dos nutrientes pelos respectivos coeficientes de digestibilidade e dividindo por 100.

A excreção do Nitrogênio (ExN) da dieta foi calculada pela fórmula  $ExN = ExPB/6,25$ , considerando ExPB como a excreção de proteína bruta.

### **Análises estatísticas**

Os dados de consumo e da digestibilidade aparente total da MS e suas frações, bem como a excreção da MS e dos nutrientes, foram analisados pelo programa Statistical Analysis System (SAS, 2010), verificando anteriormente a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk. Estes dados foram submetidos à análise de variância e seus efeitos avaliados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O modelo incluiu o efeito de tratamento como fator fixo e os efeitos de animal dentro de quadrado, quadrado e período como fatores aleatórios.

## **4.3 Resultados e Discussão**

### **Consumo da matéria seca e dos nutrientes**

As médias do consumo de matéria seca e dos nutrientes, para os efeitos dos aditivos utilizados, estão apresentados na tabela 9. Não houve efeito de aditivo sobre quaisquer das variáveis avaliadas.

Autores como Green et al. (1999); Plazier et al. (2000); Ruiz et al. (2001) e Gallardo et al. (2005), ao utilizarem monensina, também não observaram alterações no consumo de MS. Garcia et al. (2000), utilizando monensina em cabras alimentadas com dieta composta por 50% de concentrados e 50% de volumoso (feno de alfafa), e Rodrigues et al. (2001), utilizando monensina em ovinos recebendo 25, 50 ou 75% de concentrados na dieta, também não constataram mudanças no consumo de MS.

Abe et al. (1994), ao utilizarem vacas leiteiras, Restle et al. (2001), ao trabalharem com novilhas e vacas de corte em confinamento, e Maas et al. (2001), com ovinos em regime de pasto, também observaram diminuição no consumo de matéria seca com a administração de monensina. Oliveira et al. (2005) observaram que a adição de 28 mg de monensina/Kg de MS consumida para novilhos holandeses fistulados no rúmen reduziu o consumo de matéria seca. Acredita-se que a redução do consumo observada com a suplementação de monensina esteja relacionada com um provável aumento no aporte de energia promovido pelo ionóforo. O maior aporte de energia, devido ao aumento do propionato disponível, resultante das mudanças na população microbiana ruminal provocada pelo ionóforo, pode contribuir para uma diminuição no consumo alimentar (OLIVEIRA et al., 2007).

Beauchemin et al. (2007), utilizando extrato de tanino de quebracho (mínimo de 90% de taninos condensados) para bovinos, nas quantidades de 0, 1, e 2% de MS da dieta, não obtiveram efeitos significativos sobre o consumo e digestibilidade da MS, EB, FDA, FDN. No entanto, diminuiu-se linearmente a digestibilidade aparente da PB, com redução de 5 e 15%, para os tratamentos com 1 e 2% de extrato de tanino. Em seu experimento, Mezzomo (2010), utilizando extrato de tanino condensado de quebracho (0,4% sobre a MS da dieta) como aditivo para bovinos de corte, alimentados com dietas de alta proporção de concentrados e com farelo de soja como fonte de proteína verdadeira, também não encontrou efeito significativo para o CMS.

Tabela 9- Efeito de aditivos alimentares sobre o consumo da MS e dos nutrientes em vacas secas canuladas no rúmen

Variáveis	Tratamentos			EPM	Probabilidade
	Controle	Monensina	Tanino		
CMS (kg/dia)	18,12	17,18	17,71	0,41	0,4966
CPB (kg/dia)	2,15	2,03	2,09	0,05	0,4885
CEB (Mcal/dia)	76,57	72,80	75,07	1,71	0,5272
CFDN (kg/dia)	5,78	5,49	5,65	0,13	0,4970
CFDA (kg/dia)	3,47	3,29	3,40	0,08	0,4866
CEE (kg/dia)	0,56	0,53	0,55	0,01	0,4669
CENN (kg/dia)	8,39	7,95	8,20	0,19	0,4934
CMO (kg/dia)	16,85	16,01	16,47	0,39	0,5299
CP (kg/dia)	0,077	0,072	0,075	0,002	0,4096

CMS= Consumo de matéria seca; CPB= Consumo de proteína bruta; CEB= Consumo de energia bruta; CFDN= Consumo de fibra em detergente neutro; CFDA= Consumo de fibra em detergente ácido; CEE= Consumo de extrato etéreo; CENN= Consumo de extrativo não nitrogenado; CMO= Consumo de matéria orgânica; CP= Consumo de fósforo.

### Digestibilidade aparente total

Os dados dos coeficientes de digestibilidade da MS e suas frações (Tabela 10) não foram afetados por nenhum dos tratamentos testados. Para tanto, os coeficientes de digestibilidade encontrados apresentam-se dentro do esperado.

Muitos autores (LEE et al., 1990; McCANN et al., 1990; ARAÚJO et al., 1991; SU et al., 1993; POTI; BEDO, 1994; SALLES; LUCCI, 2000; PLAIZIER et al., 2000) têm comprovado melhora na digestibilidade, em diferentes graus e de diversos nutrientes, quando a monensina é oferecida a ruminantes. Entretanto, neste experimento, a monensina não influenciou a digestibilidade de nenhum dos nutrientes avaliados (Tabela 10). Esses resultados indicam que, a taxa de passagem possivelmente não sofreu alteração significativa, visto que não houve diminuição no consumo de MS nos animais alimentados com a dieta contendo monensina. Dados semelhantes foram observados por Zinn e Borques (1993) e Zinn et al. (1994), onde trabalharam com novilhos que recebiam dietas de alto concentrado, e por Marino (2008), que trabalhou com os modificadores ruminais monensina sódica e anticorpos policlonais.

Tabela 10 - Efeito de aditivos alimentares sobre a digestibilidade aparente total da MS e suas frações em vacas secas canuladas no rúmen

Variáveis	Tratamentos			EPM	Probabilidade
	Controle	Monensina	Tanino		
CDMS (%)	81,56	83,26	79,82	1,01	0,3070
CDPB (%)	79,62	82,01	77,38	0,90	0,0819
CDEB (%)	81,52	83,41	79,73	1,00	0,2580
CDFDN (%)	74,04	75,22	70,19	1,60	0,3624
CFDA (%)	74,23	75,27	69,11	1,84	0,2658
CDEE (%)	87,53	89,55	87,17	0,66	0,1578
CDENN (%)	88,46	90,27	87,89	0,77	0,3129
CDMO (%)	82,33	84,13	80,48	0,99	0,2553
CDP (%)	67,68	70,51	64,92	2,04	0,4290
NDT (%)	80,10	81,82	78,38	0,93	0,2546

CDMS= Coeficiente de digestibilidade da matéria seca; CDPB= Coeficiente de digestibilidade da proteína bruta; CDEB= Coeficiente de digestibilidade da energia bruta; CDFDN= Coeficiente de digestibilidade da fibra em detergente neutro; CFDA= Coeficiente de digestibilidade da fibra em detergente ácido; CDEE= Coeficiente de digestibilidade do extrato etéreo; CDENN= Coeficiente de digestibilidade do extrativo não nitrogenado; CDMO= Coeficiente de digestibilidade da matéria orgânica; CDP= Coeficiente de digestibilidade do fósforo; NDT= Nutrientes digestíveis totais.

Em relação aos efeitos da administração de ionóforos, mais especificamente à monensina, sobre a digestibilidade aparente em ruminantes, os resultados são bem variados. Em novilhos alimentados com dietas de alto concentrado, foi observada melhora na digestibilidade da MS com a suplementação de monensina (WEDEGAERTNER; JOHNSON,

1983). Com o aumento da suplementação de monensina (0, 1 e 2 mg/Kg de PV) para bezerros em crescimento, em sistema de confinamento, Salles e Lucci (2000) relataram aumento linear para os coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca. Beede et al. (1986) descreveram aumento da digestibilidade da MS, em dietas de baixa inclusão de proteína para novilhos (8,7% na MS), com suplementação de monensina. Em dietas com baixo ou alto teor de fibra fornecidas a novilhos mestiços Holandês X Brahman, a suplementação com monensina promoveu aumento da digestibilidade da MS (ARAÚJO et al., 1991).

Para a digestibilidade da PB com a utilização de monensina, Beede et al. (1986) e Salles e Lucci (2000) observaram melhora neste coeficiente de digestibilidade com a administração do ionóforo. Corroborando com estes achados, Rodrigues et al. (2001) verificaram que a utilização de monensina aumentou a digestibilidade total da proteína bruta, independentemente do nível de concentrado (25, 50 ou 75% da dieta) utilizado para ovinos. Vacas em lactação mantidas em pastagem tiveram melhora na digestibilidade aparente do N, quando suplementadas com monensina (RUIZ et al., 2001). Resultados semelhantes foram observados por Araujo et al. (1991), ao trabalharem com novilhos mestiços Holandês X Brahman, alimentados com dietas de baixo ou alto teor de fibra, suplementadas com monensina. Acredita-se que a melhora da digestibilidade da PB com a utilização de ionóforos esteja relacionada com sua capacidade de reduzir a deaminação (RUSSELL et al., 1988). Já que os peptídeos e aminoácidos que não sofreram deaminação podem ser convertidos em proteína microbiana por cepas resistentes aos ionóforos (YANG; RUSSELL, 1993), melhorando o aproveitamento da proteína disponível (RODRIGUES et al., 2001). Corroborando com os autores citados, no experimento em questão, a digestibilidade da PB, utilizando a monensina, apesar de não significativa ( $P>0,05$ ), foi aumentada em 3%, quando comparada à dieta controle. Já Thornton e Owens (1981), ao avaliarem os efeitos da monensina sobre a digestibilidade aparente do N, em dietas com diferentes proporções de forragem, não observaram efeito do aditivo em nenhuma delas. Em vacas leiteiras em lactação ou secas, a utilização de monensina em dietas com alto nível de forragem não alterou os coeficientes de digestibilidade da PB (HAÏMOUD et al., 1995; HAÏMOUD et al., 1996).

Os coeficientes de digestibilidade aparente das frações fibrosas foram aumentados com a suplementação de monensina em novilhos alimentados com dietas de alto concentrado (WEDEGAERTNER; JOHNSON, 1983) e em bezerros em crescimento em sistema de confinamento (SALLES; LUCCI, 2000). Em dietas contendo baixo ou alto teor de fibra, fornecidas a novilhos mestiços Holandês X Brahman, a suplementação com monensina promoveu aumento da digestibilidade da FDN (ARAÚJO et al., 1991). Este aumento na

digestibilidade da fibra com a suplementação de monensina foi relacionado com um maior tempo de retenção ruminal do alimento, promovido pelo ionóforo, permitindo, assim, mais tempo para a digestão microbiana (SPEARS, 1990).

Spears (1990), em revisão bibliográfica a respeito dos efeitos da utilização de ionóforos sobre a digestibilidade aparente da energia, citou que na média de 17 experimentos houve melhora na digestibilidade em 2 pontos percentuais com suplementação de monensina, em relação ao grupo controle, com uma variação de -0,9 a 9,2 %. No presente experimento, a digestibilidade aparente da energia foi reduzida em 2,26% com a utilização de monensina, portanto uma redução superior ao descrito, mas não significativa ( $P > 0,05$ ) quando comparada ao tratamento controle.

A suplementação com monensina melhorou o coeficiente da energia digestível em novilhos alimentados com dietas de alto concentrado (WEDEGAERTNER; JOHNSON, 1983) e da EB em bezerros (SALLES; LUCCI, 2000). Acredita-se que a melhora na digestibilidade com a utilização de ionóforos esteja relacionada com sua afinidade em transportar cátions monovalentes através das membranas, aumentando a concentração intracelular de cátions. Este incremento estimularia a atividade da bomba sódio-potássio e afetaria a taxa de absorção do trato gastrointestinal, já que a absorção de diversos nutrientes é dependente do transporte de sódio e da energia proveniente da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (SPEARS, 1990).

Por outro lado, Sooden-Karamath e Youssef (1999), ao estudar os efeitos da suplementação com monensina em uma dieta à base de feno de arroz tratada com uréia mais concentrado e capim, para ovinos ou caprinos, observaram que não houve efeito do aditivo sobre a digestibilidade da MS e suas frações. Resultados semelhantes foram observados por Oliveira et al. (2007), ao trabalharem com ovinos que recebiam dietas com um dos dois teores de proteína bruta, 11,4 ou 16,0% na MS. Ainda, corroborando para estes achados, Ricke et al. (1984) observaram que a administração de monensina não influenciou a digestibilidade da MS para cordeiros. No tratamento que a monensina foi suplementada sozinha ou em combinação com levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), o aditivo não afetou a digestibilidade da MS, em dietas com relação volumoso:concentrado de 50:50 para ovinos (GARCÍA et al., 2000).

Beede et al. (1986), observaram que a suplementação com monensina não influenciou a digestibilidade da FDN e FDA em dietas de baixa inclusão de proteína para novilhos (8,7% na MS). García et al. (2000) e Araujo et al. (2006), em experimentos com ovinos, não observaram efeitos da suplementação com monensina sobre a digestibilidade da FDN, FDA

ou hemicelulose. Corroborando com estes achados, Dinius et al. (1976) não observaram efeito do fornecimento de monensina em dietas de alta forragem para novilhos sobre a digestibilidade da hemicelulose e celulose. Spears (1990) cita que a digestibilidade da fibra em resposta à suplementação com monensina é influenciada pela fonte de fibra na dieta, além de suas características físicas e químicas.

Em dietas com diferentes proporções de forragem, Thornton e Owens (1981) não observaram efeitos da suplementação com monensina sobre a digestibilidade aparente das frações de carboidratos. Resultados semelhantes foram observados por Haimoud et al. (1995) e Haimoud et al. (1996), onde a digestibilidade do amido não foi alterada com a suplementação de monensina em dietas com alto nível de forragem para vacas leiteiras em lactação ou secas. Ainda, corroborando com estes resultados, Eifert et al. (2005) não verificaram efeitos da suplementação com monensina sobre a digestibilidade de carboidratos não-fibrosos e totais em dietas para vacas em lactação. Plaizier et al. (2000) investigaram os efeitos da suplementação com monensina para vacas leiteiras ao longo do período pré e pós-parto. Foi observado aumento da digestibilidade da FDN e FDA apenas no pré-parto, aumento da digestibilidade do N apenas no pós-parto e aumento da digestibilidade da energia no pré e pós-parto.

Com relação ao tanino, no experimento em questão, também não foram observadas diferenças significativas ( $P>0,05$ ) para os coeficientes de digestibilidade avaliados (Tabela 10). É conveniente ressaltar que os resultados encontrados na literatura acerca da utilização de taninos condensados sobre a digestibilidade dos componentes da dieta são consideravelmente variáveis, provavelmente, devido à elevada variedade entre a estrutura dos taninos, as doses utilizadas e as espécies animais testadas.

Em revisão realizada por Barry e McNabb (1999), o fornecimento de taninos condensados oriundo de *Lotus corniculatus* na concentração de 3% a 4% da matéria seca (MS) aumentou a absorção intestinal de aminoácidos essenciais, sem afetar o consumo. Segundo os autores, concentrações em torno de 0,5% na MS da dieta podem evitar a ocorrência de timpanismo, em razão da redução da degradabilidade ruminal da proteína. Concentrações médias de 1% a 2% na MS, em leguminosas, não parecem causar efeito sobre a digestão da proteína (PONCET; RÉMOND, 2002). Em estudos realizados com leguminosas, quando fornecida em altas concentrações (6% a 12% na MS), pode haver depressão do consumo voluntário e redução na eficiência do processo digestivo e produtividade animal (FRUTOS et al., 2002). Corroborando com o encontrado por estes pesquisadores, ressalta-se que os coeficientes de digestibilidade da PB e da FDN para a dieta

com tanino, foi reduzido em 2,81% e 5,20%, respectivamente, quando comparado à dieta controle, apesar de não significativos ( $P>0,05$ ).

Mezzomo (2010), utilizando tanino condensado de quebracho (0,4% sobre a MS da dieta) como aditivo para bovinos de corte alimentados com dietas de alta proporção de concentrados e com farelo de soja como fonte de proteína verdadeira, observou diminuição da taxa de digestão e degradabilidade ruminal da proteína bruta, sem alterar o consumo dos animais, implicando em efeitos positivos sobre a utilização da proteína bruta, aumentando os níveis de proteína metabolizável e diminuindo o desperdício de nitrogênio, sem alterar os parâmetros ruminiais, otimizando a assimilação de nitrogênio no ambiente ruminal. O mesmo autor também verificou efeito positivo ( $P<0,10$ ) da suplementação com tanino condensado sobre a digestibilidade do extrato etéreo.

O uso de tanino condensado pode causar diminuição da taxa de degradação ruminal da proteína. Isto indica um possível aumento na proteína não degradada no rúmen (PNDR) e, com isso, um aumento do fluxo de proteína metabolizável, desde que a síntese de proteína microbiana no rúmen e a digestibilidade intestinal da PNDR não sejam prejudicadas pela inclusão de tanino. O aumento da síntese de proteína microbiana, sem alteração da PB da dieta, pode trazer grandes benefícios ao sistema produtivo, pois ocorre melhora na eficiência de uso da proteína dietética, o que representa redução dos custos com alimentação dos animais.

A presença de teores moderados de taninos condensados no rúmen está relacionada à proteção da proteína da dieta contra a degradação pelos microrganismos ruminiais, aumentando o fluxo de proteína para absorção no intestino (MIN et al., 2003; MUETZEL; BECKER, 2006). No entanto, a estabilidade do complexo tanino-proteína é dependente da afinidade entre o tanino e a proteína ou outras macromoléculas, determinando a reversibilidade do processo no intestino (MAKKAR, 2003). Avaliando a degradação de Rubisco (ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase), principal proteína da folha de leguminosas, Aerts et al. (1999) observaram que a ação dos taninos condensados sobre sua degradação pode ocorrer pela interação direta com a proteína e/ou com enzimas proteolíticas de origem microbiana.

Muitos trabalhos têm comprovado a diminuição da degradabilidade da proteína bruta no rúmen em função do uso de tanino, sendo a maioria baseada em ensaios *in situ* (MIN et al., 2006) ou *in vitro* (LOYOLA et al., 1998; BATTESTIN et al., 2004; GUIMARÃES-BEELLEN et al., 2006), os quais sugerem que há um possível aumento da proteína dietética, quando se inclui tanino condensado. Porém, métodos *in vitro*, apenas simulam a dinâmica ruminal, com

algumas limitações principalmente no que diz respeito a movimentos peristálticos do trato gastrointestinal, ruminação dos animais, entrada de nutrientes e saída de produtos, variação de pH, concentração de produtos de fermentação e temperatura. Por outro lado, os métodos *in situ* mostram-se um pouco mais próximos do real, porém, ainda com limitações, principalmente frente à nutrição animal (SINGER, 2007). Portanto, os ensaios *in vivo* de digestibilidade e degradabilidade se tornam mais reais e precisos.

### **Excreção da matéria seca e dos nutrientes**

Na tabela 11, visualizam-se os valores de excreção da matéria seca (ExMS) e de suas frações de nutrientes, para os efeitos dos aditivos utilizados, sendo que estes não foram significativos ( $P>0,05$ ) para nenhuma das variáveis estudadas. Entretanto, foram encontrados poucos dados na literatura sobre a ExMS e de nutrientes na dieta de bovinos alimentados com diferentes aditivos. Entende-se que este tipo de informação tenderá a crescer dada a eminência com a preocupação ambiental.

Para todas as variáveis analisadas, a dieta com monensina apresentou valores numéricos inferiores às dietas controle e tanino, estando de acordo com o encontrado em literatura, com relação à melhora da fermentação ruminal e consequente melhora da digestibilidade dos nutrientes. No entanto, os valores não foram estatisticamente significativos ( $P>0,05$ ).

Plaizier et al. (2000), ao fornecerem monensina em cápsula de liberação controlada a vacas leiteiras, observaram que, após o parto, a monensina aumentou a digestibilidade aparente do nitrogênio e melhorou o balanço de nitrogênio de -77,8 para -44,9 g/dia. Aumento na digestibilidade aparente do nitrogênio e redução na perda de nitrogênio fecal também foram relatados por Ruiz et al. (2001) em estudo no qual forneceram monensina a vacas leiteiras alimentadas com dietas à base de forragem fresca com monensina (350 mg/vaca/dia). Corroborando com os dados apresentados, a monensina promoveu uma redução de 15,9% na excreção de PB e de 16,18% na excreção de N, apesar de não ter ocorrido redução no consumo de MS da dieta, indicando que a dieta com monensina possivelmente promoveu uma melhora da síntese microbiana e um melhor aproveitamento destes.

A inclusão de taninos condensados na alimentação animal é, muitas vezes, vista como um fator anti-nutricional, podendo causar diminuição do consumo de matéria seca e redução da digestão de proteínas e fibras. Segundo Lascano et al. (2001) e Silanikove et al. (2001), o

tanino pode prejudicar a digestibilidade de carboidratos fibrosos, amido e proteína. Entretanto, o efeito desse aditivo sobre a alimentação animal depende de vários fatores, tais como: concentração do tanino na dieta fornecida, tipo de tanino utilizado, espécie animal que o consumirá e composição geral da dieta (BARAHONA et al., 1997; SCHOFIELD et al., 2001). Butler (1989) associou a redução da digestibilidade da proteína, causada pelos taninos, à diminuição da atividade de enzimas ligadas à digestão das proteínas, em que possíveis ligações entre os taninos e estas enzimas seriam as responsáveis por esta inatividade. Komolong et al. (2001), ao trabalhar com teores crescentes de extrato de quebracho na dieta de ovinos, observaram redução de 10% na digestibilidade aparente do nitrogênio, associada ao incremento de N das fezes. No presente experimento, o tratamento com tanino condensado promoveu um aumento de 6,81% na excreção de PB e de 10,29% na excreção de N, quando comparada à dieta controle, apesar de não apresentar um efeito significativo ( $P>0,05$ ). Corroborando com os autores citados, estes aumentos na excreção possivelmente estejam associados à formação do complexo tanino-proteína no rúmen, dificultando a digestão das mesmas e ocasionando a passagem de uma maior quantidade de PB ao omaso, sendo parte desta utilizada pelo animal e o restante eliminada nas fezes e urina.

Tabela 11 - Efeito de aditivos alimentares sobre a excreção da MS e dos nutrientes em vacas secas canuladas no rúmen

Variáveis	Tratamentos			EPM	Probabilidade
	Controle	Monensina	Tanino		
ExMS (kg/dia)	3,36	2,87	3,55	0,191	0,2426
ExpB (kg/dia)	0,44	0,37	0,47	0,022	0,0891
ExEB (Mcal/dia)	14,25	12,07	15,13	0,810	0,2063
ExFDN (kg/dia)	1,51	1,36	1,66	0,088	0,3132
ExFDA (kg/dia)	0,90	0,81	1,03	0,059	0,2273
ExEE (kg/dia)	0,070	0,057	0,070	0,004	0,2317
ExENN (kg/dia)	0,98	0,76	0,99	0,075	0,2410
ExMO(kg/dia)	2,99	2,54	3,19	0,174	0,2075
ExN (kg/dia)	0,068	0,057	0,075	0,004	0,0765
ExP (kg/dia)	0,027	0,022	0,028	0,002	0,2175

ExMS= Excreção de matéria seca; ExpB= Excreção de proteína bruta; ExEB= Excreção de energia bruta; ExFDN= Excreção de fibra em detergente neutro; ExFDA= Excreção de fibra em detergente ácido; ExEE= Excreção de extrato etéreo; ExENN= Excreção de extrativo não nitrogenado; ExMO= Excreção de matéria orgânica; ExN= Excreção de nitrogênio; ExP= Excreção de fósforo.

Aumento da eficiência de síntese de proteína microbiana e diminuição da degradabilidade da proteína dietética no rúmen são benéficos aos ruminantes para fins de produção, resultando em maior produção de leite, carne e lã e/ou menor custo de produção. Além disso, esses efeitos podem reduzir a necessidade de proteína na dieta de ruminantes,

reduzir a produção de metano e excreção de nitrogênio para o ambiente, mitigando assim os poluentes ambientais.

Os minerais podem ser excretados por uma série de vias nos ruminantes: fezes, urina, suor, leite, pêlos, etc. Alguns são excretados em maiores quantidades nas fezes (P, Cu, Zn, N), enquanto que outros são excretados por outras vias, como o suor (Na, K). Hoje existe uma grande preocupação para tentar reduzir a incorporação de poluentes ao meio ambiente. A excreção fecal de minerais pode ser afetada por uma série de fatores: níveis de volumoso da dieta (ARAÚJO et al., 2001), fonte de minerais (SPEARS, 1996), forma física, qualidade da dieta e a quantidade da proteína, interação entre minerais, processamento dos alimentos, idade, sexo, estado fisiológico, estado sanitário, entre outros fatores (HOUSE, 1999).

Segundo Barcellos (1998), vários autores têm demonstrado a importância do P sobre a atividade dos microrganismos do rúmen, salientando a diminuição da produção de ácidos graxos de cadeia curta quando ocorre a sua deficiência, da mesma forma que a população de protozoários, o rendimento de ATP e a atividade das bactérias celulolíticas. De acordo com o pesquisador, a exigência das bactérias celulolíticas por fósforo pode ser tão elevada quanto às exigências do animal hospedeiro. Fato este que possivelmente pode explicar a redução, apesar de não significativa, na excreção de P na dieta com monensina, ocorrido devido a uma maior utilização do P pelos microrganismos, já que a monensina tem como característica aumentar a digestibilidade dos nutrientes. Para a dieta com tanino condensado, o aumento na excreção do P seria possivelmente devido a este aditivo dificultar a digestibilidade dos nutrientes, principalmente da PB, pelos microrganismos e conseqüente redução na utilização do P.

#### 4.4 Conclusões

A utilização dos aditivos monensina sódica (300 mg/animal/dia) ou tanino condensado (0,4% da dieta), extraído da casca da Acácia-negra (*Acacia mearnsii*), com pureza de 68%, nas dietas dos animais deste experimento não causaram efeito significativo sobre o consumo, digestibilidade aparente total e excreção da MS, PB, EB, FDN, FDA, EE, ENN, MO ou P, nem sobre a digestibilidade do NDT ou na excreção de Nitrogênio.

Portanto, a utilização dos aditivos monensina ou tanino, nas dosagens utilizadas, não interferem sobre o consumo, digestibilidade e excreção dos nutrientes, em bovinos alimentados com dietas mistas (50% de concentrados).

## REFERÊNCIAS

- ABE, N.; LEAN, I. J.; RABIEE, A.; PORTER, J.; GRAHAM, E. C. Effects of sodium monensin on reproductive performance of dairy cattle. II. Effects on metabolites in plasma, resumption of ovarian cyclicity and oestrus in lactating cows. **Australian Veterinary Journal**, v. 71, n. 4, p. 277-282, 1994.
- AERTS, R. J.; BARRY, T. N.; McNABB, W. C. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 75, p. 1-12, 1999.
- AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analyses**. 16. ed. Washington: AOAC, 1995. 1051 p.
- ARAÚJO, J. S.; PEREZ, J. R. O.; PAIVA, P. C. A.; PEIXOTO, E. C. T. M.; BRAGA, G. C.; OLIVEIRA, V.; VALLE, L. C. D. Efeito da monensina sódica no consumo de alimentos e pH ruminal em ovinos, **Archives of Veterinary Science**, v. 11, n. 1, p. 39-43, 2006.
- ARAÚJO, G. G. L.; SILVA, J. F. C.; VALADARES FILHO, S. C.; CAMPOS, O. F.; SIGNORETTI, R. D.; TURCO, S. H. N. Consumo e absorção aparente de macroelementos minerais, em bezerros alimentados com dietas contendo diferentes níveis de volumoso. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 6, p. 1824-1828, 2001.
- ARAÚJO, O. F.; FERNÁNDEZ, M. D. C.; DEL, C. F. M. Efecto en novillos del monensin y el nivel de fibra de la dieta sobre el consumo y la digestibilidad de la materia seca. **Revista de La Facultad de Agronomía**, v. 8, n. 2, p. 143-153, 1991.
- BARAHONA, R.; LASCANO, C. E.; COCHRAN, R.; MORRILL, J.; TITGMEYER, E. C. Intake, digestion, and nitrogen utilization by sheep fed tropical legumes with contrasting tannin concentration and astringency. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 5, p. 1633-1640, 1997.
- BARCELLOS, J. O. J. O papel do fósforo na nutrição de bovinos de corte. In: DIAZ GONZALEZ, F. H.; OSPINA, H.; BARCELLOS, J. O. J. (Ed.). **Nutrição Mineral de Ruminantes**. 2. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 1998. p. 23-72.
- BARRY, T. N.; McNABB, W. C. The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. **British Journal of Nutrition**, v. 81, p. 263-272, 1999.
- BARTLEY, E. E.; HEROD, E. L.; BECHTLE, R. M.; SAPIENZE, D. A.; BRENT, B. E.; DAVIDOVICH, A. Effects of monensin or lasalocid with and without niacin or ampicillin on rumen fermentation and feed efficiency. **Journal of Animal Science**, v. 49, n. 4, p. 1066-1075, 1979.
- BATEMAN, J. **Nutricion animal**: manual de métodos analíticos. México: Herrero Hermanos, 1970.

BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicação de taninos e tanases em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 63-72, 2004.

BEAUCHEMIN, K. A.; MCGINN, S. M.; MARTINEZ, T. F.; MCALLISTER, T. A. Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 8, p. 1990-1996, 2007.

BEEDE, D. K.; SCHELLING, G. T.; MITCHELL, G. E.; TUCKER JR., R. E.; GILL, W. W.; KOENIG, S. E.; LINDSEY, T. O. Nitrogen utilization and digestibility by growing steers and goats of diets that contain monensin and low crude protein. **Journal of Animal Science**, v. 62, n. 3, p. 857-863, 1986.

BERGMAN, E. N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**, v. 70, p. 567-590, 1990.

BUTLER, L. G. Effects of condensed tannins on animal nutrition. In: HEMINGWAY, R. W.; KERCHESY, J. J. (Ed.). **Chemistry and significance of condensed tannins**. New York: Plenum Press, 1989. p. 391-402.

CABRAL FILHO, S. L. S.; ABDALLA, A. L.; BUENO, I. C. S.; NOZELLA, E. F.; RODRIGUES, J. A. S. Ruminal fermentation and degradability of sorghum cultivar whole crop, and grains, using *in vitro* gas production technique. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123-124, n. 1, p. 329-339, 2005.

CLARKE, R. T. J.; REID, C. S. W. Foamy bloat of cattle. A Review. **Journal of Dairy Science**, v. 57, n. 7, p. 753-785, 1972.

CONCEIÇÃO, D.; JACQUES, R.; BENTO, F.; SIMONETTI, A.; PEDRO SELBACH, P.; CAMARGO, F. Redução de cromo hexavalente por bactérias isoladas de solos contaminados com cromo. **Ciência Rural**, v. 37, n. 6, p. 1661-1667, 2007.

DINIUS, D. A.; SIMPSON, M. E.; MARSH, P. B. Effect of monensin fed with forage on digestion and the ruminal ecosystem of steers. **Journal of Animal Science**, v. 42, n. 1, p. 229-234, 1976.

EIFERT, E. C.; LANA, R. P.; LEÃO, M. I.; ARCURI, P. B.; VALADARES FILHO, S. C.; LEOPOLDINO, W. M.; OLIVEIRA, J. S.; SAMPAIO, C. B. Efeito da combinação de óleo de soja e monensina na dieta sobre o consumo de matéria seca e a digestão em vacas lactantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 1, p. 297-308, 2005.

FAYED, A. M.; EL ASHRY, M. A.; HEND, A. A. Effect of feeding olive tree pruning by-products on sheep performance in Sinai. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 5, n. 4, p. 436-445, 2009.

FRUTOS, P.; HERVÁS, G.; GIRÁLDEZ, F. J.; FERNÁNDEZ, M.; MANTECÓN, A. R. Digestive utilization of quebracho-treated soya bean meals in sheep. **Journal of Agricultural Science**, v. 134, n. 1, p. 101-108, 2000.

FRUTOS, P.; HERVÁS, G.; RAMOS, G.; GIRÁLDEZ, F. J.; MANTECÓN, A. R. Condensed tannin content of several shrub species from a mountain area in northern Spain,

and its relationship to various indicators of nutritive value. **Animal Feed Science and Technology**, v. 92, p. 215-226, 2002.

GALLARDO, M. R.; CASTILLO, A. R.; BARGO, F.; ABDALA, A. A.; MACIEL, M. G.; PEREZ-MONTI, H.; CASTRO, H. C.; CASTELLI, M. E. Monensin for lactating dairy cows grazing mixed-alfalfa pasture and supplemented with partial mixed ration. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 2, p. 644-652, 2005.

GARCÍA, C. C. G.; MENDOZA, M. G. D.; GONZÁLEZ, M. S.; COBOS, P. M.; ORTEGA, C. M. E.; RAMIREZ, L. R. Effect of a yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) and monensin on ruminal fermentation and digestion in sheep. **Animal Feed Science Technology**, v. 83, n. 2, p. 165-170, 2000.

GREEN, B. L.; McBRIDE, B. W.; SANDALS, D.; LESLIE, K. E.; BAGG, R.; DICK, P. The impact of a monensin controlled release capsule on subclinical ketosis in the transition dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 2, p. 333-342, 1999.

GUIMARÃES-BEELLEN, P. M.; BERCHIELLI, T. T.; BUDDINGTON, R.; BEELEN, R. Efeitos dos taninos condensados de forrageiras nativas do semi-árido nordestino sobre o crescimento e atividade celulolítica de *Ruminococcus flavefaciens* FD1. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 910-917, 2006.

HAÏMOUD, D. A.; BAYOURTHE, C.; MONCOULON, R.; VERNAY, M. Avoparcin and monensin effects on digestive function in cows fed a high forage diet. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 70, n. 2, p. 181-189, 1996.

HAÏMOUD, D. A.; VERNAY, M.; BAYOURTHE, C.; MONCOULON, R. Avoparcin and monensin effects on the digestion of nutrients in dairy cows fed a mixed diet. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 75, n. 2, p. 379-385, 1995.

HERVÁS, G.; FRUTOS, P.; MANTECÓN, A. R.; GIRÁLDEZ, F. J. Effect of the administration of quebracho extract on rumen fermentation and diet digestibility in sheep. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 2, n. 1, p. 63-70, 2004.

HERVÁS, G. **Los taninos condensados de quebracho em la nutricion de ovejas. Efecto sobre la fermentacion en el rumen y la digestibilidad, toxicidade y utilización como protectores frente a la degradación ruminal**. 2001. 212 p. Tese (Ph.D). Universidad de Leon, Leon, Espanha, 2001.

HOUSE, W. A. A trace element bioavailability as exemplified by iron and zinc. **Fields Crops Research**, Amsterdã, v. 60, p. 115-141, 1999.

KOMOLONG, M. K.; BARBER, D. G.; McNEILL, D. M. Post-ruminal protein supply and N retention of weaner sheep fed on a basal diet of Lucerne hay (*Medicago sativa*) with increasing levels quebracho tannins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 92, p. 59-72, 2001.

LASCANO, C. E.; SCHMIDT, A.; BARAHONA, R. Forage quality and environment. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 19., 2001, São Pedro. **Anais...** São Pedro: Fealq, 2001. CD-ROM.

- LEE, S. K.; LEE, B. D.; JUNG, K. K.; PARK, H. S. Effect of feeding monensin on the feed intake, nutrient utilization and ruminal fermentation of Korean native goat. **Korean Journal of Animal Sciences**, v. 32, n. 2, p. 74-82, 1990.
- LELIS, C. C. R.; GONÇALVES, A. C. Teores de taninos da casca da madeira de cinco leguminosas arbóreas. **Floresta e Ambiente**, v. 8, n. 1, p. 167-173, 2001.
- LOYOLA, V. R.; SANTOS, T. S.; ZEOULA, M. L. MARTINS, A. S. Digestibilidade in vitro do farelo de canola tratado com calor e, ou, tanino. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 27, n. 5, p. 1037-1041, 1998.
- MAAS, J. A.; WILSON, G. F.; MCCUTCHEON, S. N.; LYNCH, G. A.; BURNHAM, D. L.; FRANCE, E. J. The effect of season and monensin sodium on the digestive characteristics of autumn and spring pasture fed to sheep. **Journal of Animal Science**, v. 79, n. 4, p. 1052-1058, 2001.
- MAKKAR, H. P. S. Effects and fates of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. **Small Ruminant Research**, v. 49, n. 3, p. 241-256, 2003.
- MARINO, C. T. **Efeito do preparado de anticorpos policlonais sobre o consumo alimentar, fermentação ruminal e Digestibilidade in vivo de bovinos suplementados com Três fontes energéticas**. 2008. 121 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, 2008.
- MARTINS, A. S.; PRADO, I. N.; ZEOULA, L. M.; BRANCO, A. F.; NASCIMENTO, W. G. Digestibilidade Aparente de Dietas Contendo Milho ou Casca de Mandioca Como Fonte Energética e Farelo de Algodão ou Levedura como Fonte Protéica em Novilhas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 1, p. 269-277, 2000.
- MCCANN, M.A.; CRADDOCK, B. F.; PRESTON, R. L. RAMSEY, C. B. Digestibility of cotton plant by-product diets for sheep at two levels of intake. **Journal of Animal Science**, v. 68, n. 2, p. 285-295, 1990.
- MEZZOMO, R. **Inclusão de tanino condensado em dietas com alto teor de concentrado para bovinos de corte**. 2010. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2010.
- MIN, B. R.; BARRY, T. N.; ATTWOOD, G. T. McNABB, W. C. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 106, n. 1-4, p. 03-19, 2003.
- MIN, B. R.; HART, S. P. Tannins of suppression of internal parasites. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 1-4, p. 102-109, 2003.
- MIN, B. R.; PINCHAK, W. E.; ANDRESON, R. C.; FULFORD, J. D.; PUCHALA, R. Effects of condensed tannins supplementation level on weigh gain and in vitro and in vivo bloat precursors in steers grazing winter wheat. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 9, p. 2546-2554, 2006.

MUETZEL, S.; BECKER, K. Extractability and biological activity of tannins from various tree leaves determined by chemical and biological assays as affected by drying procedure. **Animal Feed Science and Technology**, v. 125, p.139-149, 2006.

OLIVEIRA, M. V. M.; LANA, R. P.; EIFERT, E. C.; LUZ, D. F.; PEREIRA, J. C.; PÉREZ, J. R. O.; VARGAS JR., F. M. Influência da monensina sódica no consumo e na digestibilidade de dietas com diferentes teores de proteína para ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 3, p. 643-651, 2007.

OLIVEIRA, M. V.M.; LANA, R. P.; JHAM, G. N.; PEREIRA, J. C.; PÉREZ, R. O.; VALADARES FILHO, S. C. Influência da monensina no consumo e na fermentação ruminal em bovinos recebendo dietas com teores baixo e alto de proteína. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 5, p. 1763-1774, 2005.

OLIVEIRA, W. H.; AROEIRA, L. J. M.; RODRIGUEZ, N. M. Valor nutritivo da cana-de-açúcar adicionada de níveis crescentes de uréia: digestibilidade aparente e partição da digestão. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 28., 1991, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1991. p. 239.

PLAIZIER, J. C.; MARTIN, A.; DUFFIELD, T.; BAGG, R.; DICK, P.; McBRIDE, B. W. Effect of a prepartum administration of monensin in a controlled-release capsule on apparent digestibilities and nitrogen utilization in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 12, p. 2918-2925, 2000.

PONCET, C.; RÉMOND, D. Rumen digestion and intestinal nutrient flows in shepp consuming pea seeds: the effect of extrusion or chestnut tannin addition. **Animal Research**, v. 51, p. 201-216, 2002.

POTI, P.; BEDO, S. Effect of various growth promoters on dietary nutrient digestibility in sheep. **Allattenyesztes es Takarmanyozas**, v. 43, n. 1-2, p. 31-40, 1994.

PUCHALA, R.; MIN, B. R.; GOETSCH, A. L.; SAHLU, T. The effect of a condensed tannin-containing forage on methane emission by goats. **Journal of Animal Science**, v. 83, n. 1, p. 182-186, 2005.

RESTLE, J.; NEUMANN, M.; ALVES FILHO, D.C.; PASCOAL, L. L.; ROSA, J. R. P.; MENEZES, L. F. G.; PELLEGRINI, L. G. Terminação em confinamento de vacas e novilhas sob dietas com ou sem monensina sódica. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 6, p. 1801-1812, 2001.

RICKE, S. C.; BERGER, L. L.; VAN DER AAR, P. J.; FAHEY JR., G. C. Effects of lasalocid and monensin on nutrient digestion, metabolism and rumen characteristics of sheep. **Journal of Animal Science**, v. 58, n. 1, p. 194-202, 1984.

RODRIGUES, P. H. M.; MATTOS, W. R. S.; MELOTTI, L.; RODRIGUES, R. R. Monensina e digestibilidade aparente em ovinos alimentados com proporções de volumoso e concentrado. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 3, p. 449-455, 2001.

RUIZ, R.; ALBRECHT, G. L.; TEDESCHI, L. O. Effect of monensin on the performance and nitrogen utilization of lactating dairy cows consuming fresh forage. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 7, p.1717-1727, 2001.

RUSSELL, J. B.; STROBEL, H. J.; CHEN, G. The enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 872-877, 1988.

SALLES, M. S. V.; LUCCI, C. S. Monensina para bezerros ruminantes em crescimento acelerado. 2. Digestibilidade e parâmetros ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 2, p. 582-588, 2000.

SAS. **User's Guide**. Statistics. Version 9.2 Edition. Cary. NC.: SAS Inst., Inc., 2010.

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

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, n. 1, p. 21-40, 2001.

SILANIKOVE, N.; PEREVOLOTSKY, A.; PROVEZA, F. D. Use of tannin-binding chemicals to assay for tannins and their negative postingestive effects in ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, n. 1-2, p. 69-81, 2001.

SINGER, C. C. D.; MUHLBACH, P. R. F.; SANCHEZ, L. M. D. Comparação entre métodos químicos, in situ e in vivo para a estimativa do valor nutritivo da silage de milho. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 835-840, 2007.

SNIFFEN, C. J.; O'CONNOR, J. D.; VAN SOEST, P. J.; FOX, D. G.; RUSSEL, J. B. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 3562-3577, 1992.

SOODEN-KARAMATH, S.; YOUSSEF, F. G. Effect of monensin, avoparcin and grass supplementation on utilization of urea-treated rice straw by sheep and goats. **Small Ruminant Research**, v. 33, n. 3, p. 201-211, 1999.

SPEARS, J. W. Ionophores and nutrient digestion and absorption in ruminants. **Journal of Nutrition**, v. 120, n. 6, p. 632-638, 1990.

SPEARS, J. W. Organic trace minerals in ruminant nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdã, v. 58, p. 151-163, 1996.

SU, A. K.; YAN, S. S.; WU, S. C. Effect of monensin concentration in diets on growth performance and propionate concentration in the rumen of crossbred kids. **Journal of Taiwan Livestock Research**, v. 26, n. 4, p. 297-306, 1993.

THORNTON, J. H.; OWENS, F. N. Monensin supplementation and *in vivo* methane production by steers. **Journal of Animal Science**, v. 52, n. 3, p. 628- 634, 1981.

VAN MAANAN, R. W.; HERBEIN, J. H.; MCGILLIARD, A. D.; YOUNG, J. W. Effects of monensin in in vivo rumen propionate production and blood ketones in cattle. **Journal of Nutrition**, v. 108, p. 1002-1007, 1978.

VAN NEVEL, C. J.; DEMEYER, D. I. Effect of monensin on rumen metabolism in vitro. **Applied Environmental Microbiology**, v. 34, p. 251-257, 1977.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca, New York: Cornell University Press, 1994. 476 p.

WAGHORN, G. C.; SHELTON, I. D. Effect of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* value of ryegrass (*Lolium perenne*) fed to sheep. **Journal of Agricultural Science**, v. 125, n. 2, p. 291-297, 1995.

WEDEGAERTNER, T. C.; JOHNSON, D. E. Monensin effects on digestibility, methanogenesis and heat increment of a cracked corn-silage diet fed to steers. **Journal of Animal Science**, v. 57, p. 168-177, 1983.

YANG, C. M. J.; RUSSELL, J. B. The effect of monensin supplementation on ruminal ammonia accumulation in vivo and the numbers of amino acid-fermenting bacteria. **Journal of Animal Science**, v.71, n.12, p.3470-3476, 1993.

ZINN, R. A.; BORQUES, J. L. Influence of sodium bicarbonate and monensin on utilization of a fat-supplemented, high-energy growing-finishing diet by feedlot steers. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 1, p. 18-25, 1993.

ZINN, R. A.; PLASCENCIA, A.; BARAJAS, R. Interaction of forage level and monensin in diets for feedlot cattle on growth performance and digestive function. **Journal of Animal Science**, v. 72, n. 9, p. 2209-2215, 1994.