

MAURÍCIO FURLAN MARTINS

**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**



Pirassununga

2012

MAURÍCIO FURLAN MARTINS

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

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

Pirassununga

2012

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.2727
FMVZ

Furlan, Martins Maurício

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 / Maurício Furlan Martins. -- 2012.
79 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2012.

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. Grãos de soja. 3. Lipídio. 4. Pectina. 5. Polpa cítrica. I. Título.

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

ERRATA

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. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Página	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Ficha catalográfica	1º	Furlan, Martins Maurício	Martins, Maurício Furlan



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito de fonte energética da dieta sobre a produção de metano no líquido ruminal", protocolado sob o nº 2259/2011, utilizando 6 (seis) 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 22/6/2011.

We certify that the Research "Effect of dietary energy source on methane production in ruminal fluid", protocol number 2259/2011, utilizing 6 (six) cattle, 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 06/22/2011.

São Paulo, 27 de junho de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MARTINS, Maurício Furlan

Título: 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

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 à minha família,
em especial minha mãe,
que sempre se preocupou com minha educação
e forneceu tudo para os meus estudos,
não importando o quão longe estava, sempre zelou por mim.*

Sei tudo que o amor
É capaz de me dar
Eu sei já sofri
Mas não deixo de amar
Se chorei ou se sorri
O importante
É que emoções eu vivi...
Emoções – Roberto Carlos

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Claribel e Ari, pelo apoio, financeiro e emocional, uma vez que sempre permanecem presentes em minha vida.

Aos meus irmãos, Luciano e Vergilio, pelo apoio e ajuda de sempre.

À minha avó Thereza pelas orações voltadas a mim.

Aos meus tios Dice, Mário e primos Kátia, Vitor e Luan pela força e apoio em todos os momentos.

Aos meus primos, Roberto e Solange, que sempre acreditaram em mim, torcendo por minhas vitórias.

À respectiva namorada, Isadora, muitíssimo obrigado por dividir sua vida comigo e aguentar firme minhas chatisses por tanto tempo, um anjo em minha vida.

À minha fiel amiga Xuxa (*in memoria*), sempre ao meu lado.

Em especial ao meu orientador Professor Paulo, que aceitou me orientar de olhos fechados, à sua dedicação e paciência, durante todo meu mestrado, por todo ensinamento, permitindo meu crescimento pessoal e profissional.

Às Pós Doutorandas Carolina e Fernanda, uma dupla inesquecível, sempre estiveram comigo, me ajudando nos momentos difíceis de minha vida em Pirassununga, não me deixando desanimar e ensinando, sempre com um sorriso no rosto. Ao Lerner que, com toda sua calma, me ajudou no experimento e dissertação.

À minha “teacher” de inglês, Vanessa, por me ensinar um modo novo de aprender, de uma forma divertida, tornando prazeroso algo que não se gosta tanto.

Ao Gilmar muito mais que um funcionario, um amigo, muito obrigado por me ajudar no meu experimento e conversas.

Os meus amigos de mestrado, Esther, Ju Diniz, Ju Praia, Ju Mega, Larissa (Lari), Tácia, Lara, Theresa, Nataly, Eduardo (HOVET), Melina, Beatriz, Paola (FZEA), Thiago, Barbara, Rafael, João Guilherme, Aninha (Ana Paula), Daniela (VRA). Obrigado por permitirem tê-los como amigos, me proporcionando momentos inesquecíveis, sendo eles de alegria ou tristeza. Vocês são especiais.

Aos amigos de graduação Cristiane, Maria Fernanda, Guilherme, Daniel e Thais, pelos momentos de descontração durante a graduação e mestrado.

À Laurinha, amiga e conpanheira de experiment. Obrigado por nossas conversas e apoio no experimento. Aos estagiários (Thamyres, Angélica e Diana) que contribuíram com o experimento.

Aos professores do Departamento de Nutrição Animal da FMVZ/USP, pela contribuição na minha formação.

À todos funcionários do VNP, João Paulo pela atenção e dedicação, Alessandra e Fábria, pela dedicação e ajuda quando precisei, às meninas da Higi Limp (Dona Maria, Suelen, Cecília, Daiane, Ju e *in memoria* à Dona Silvia), por manterem nosso Departamento e setor sempre limpos e os cafezinhos de todos os dias, os quais eram necessários.

Às meninas (vacas) Lalá, Azeitona, Vermelhinha, Darling, Caroço e Lolita, pelo comportamento tranquilo, permintindo o esvaziamento.

Aos vizinhos (Rafael, Cadu, Léa, Maria Fernanda, Nara e Thaís Helena) muito obrigado pelos almoços, jantãs, conversas e festas. Mais que vizinhos, são meus amigos.

Aos meninos da Pira Models (minha república), Frodo (Eduardo) e Perna, que além de morarem comigo são companheiros de mestrado, obrigado pela ajuda no experimento e pelas caronas. Rodrigo sempre feliz. Ao Caio, que aguenta firme minhas implicâncias. Ao Flavinho, que sempre será de casa, grande amigo. Vocês são mais que amigos, são meus irmãos.

Ao Tarley. Mais que um amigo, um irmão mais velho. Obrigado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa de estudo e financiamento do projeto.

De maneira especial, à DEUS, por colocar pessoas tão especiais em minha vida, permitindo superar todas as dificuldades e atingir meu objetivos.

MUITO OBRIGADO A TODOS!

RESUMO

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.** [Effect of energy sources of ruminal methane production using *ex-situ* ruminal fermentation technique in bovines]. 2012. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

Resumo: Problemática mundial levantada nas últimas duas décadas, a geração de gases de efeito estufa (GEE) tem como parcela contribuidora a 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 as perdas por metano, diferentes dietas, aditivos e manejos nutricionais têm sido empregados. Fontes lipídicas vegetais, como os grãos de soja, contêm alta porcentagem de ácidos graxos insaturados e este tipo lipídio pode colaborar para a diminuição da metanogênese. Em contrapartida, a inclusão de uma fonte rica em pectina (polpa cítrica) pode contribuir para aumento da produção de metano. Assim, objetivou-se com o presente experimento avaliar o efeito de diferentes fontes energéticas da dieta sobre a produção de metano e parâmetros fermentativos em bovinos. O delineamento adotado foi o quadrado latino 3x3 replicado, com período de 16 dias e 3 tratamentos: **Controle:** Dieta de baixo extrato etéreo (3,50% de EE); **Soja:** Dieta de alto extrato etéreo (inclusão de 15% de soja grão, com 5,30% de EE); **Polpa:** Dieta de baixo extrato etéreo e alta participação de pectina (inclusão de 15% de polpa cítrica, com 3,0% de EE). O consumo de matéria seca (CMS) foi obtido pela diferença do ofertado e a sobra da dieta nos últimos seis dias experimentais. O volume de líquido total, o volume de sólido total, o turnover de sólidos e a taxa de passagem ruminal foram obtidos pelo esvaziamento deste órgão, realizado no 11º e 12º dias experimentais, sendo realizado antes e 3 horas após a alimentação matutina. O conteúdo sólido foi retirado manualmente e o líquido com ajuda de bomba a vácuo, sendo estes pesados separadamente. Uma alíquota de 10% foi utilizada para determinar a matéria seca do conteúdo ruminal e corrigir o volume de sólido total. No 16º dia experimental, foi analisado o pH, com auxílio de uma probe de mensuração contínua. Neste mesmo dia foram realizadas coletas do conteúdo ruminal antes, 3, 6, 9 e 12 horas após a alimentação matinal, para a quantificação da produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Também coletou líquido ruminal, com auxílio de

bomba a vácuo, para análise de N-NH₃. A técnica empregada para mensurar a produção de AGCC e metano foi de fermentação ruminal *ex situ*, que consiste em incubar frascos tipo penicilina com conteúdo ruminal sólido e líquido, em banho termostático por 30 minutos. Em seguida, a mensuração de metano e AGCC foi realizada por cromatografia gasosa e estimada a perda de energia realtiva (PER). A PER avalia a eficiência da fermentação dos alimentos, ou seja, verifica a perda de metano quando comparada aos outros produtos da fermentação. Os tratamentos apresentaram efeito ($P < 0,05$) para CMS, Turnover de sólido e Taxa de Passagem. A dieta contendo Soja apresentou menores valores para estes parâmetros que as dietas Controle e Polpa. Os tratamentos não diferiram significativamente ($P > 0,05$) para o Volume Sólido Total. As variáveis pH médio e máximo, tempo de pH abaixo de 5,8; 6,0 e 6,2, assim como, área de pH abaixo de 5,8 e 6,2, não diferiram ($P > 0,05$) entre os tratamentos. Entretanto, o pH mínimo foi maior ($P < 0,05$) para dieta contendo Soja em relação à dieta Controle, sem diferença dos dois grupos para polpa cítrica. A área de pH abaixo de 6,0 foi menos elevada ($P < 0,05$) para o grupo soja quando comparado ao grupo controle, sem diferença dos dois grupos para polpa cítrica. Quanto ao nitrogênio amoniacal, não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos. As produções de AGCC totais, acetato e butirato (mMol/Kg/dia) foram mais elevadas na dieta à base de polpa cítrica e diminuída na dieta à base de grão de soja. Nenhuma dos tratamentos alterou a produção de metano ou a PER. A partir disto, essas fontes são indicadas para a utilização em dietas de bovinos, porém, a inclusão dos grãos de soja, alterou o CMS e sua inclusão resultou em mudanças no ambiente ruminal, alterando do perfil fermentativo, não demonstrando alterações na produção de metano e a PER. A inclusão de lipídios na dieta de bovinos pode diminuir a produção de metano, mas esse efeito não é específicos sobre as arqueas metanogênicas e, portanto, não altera a eficiência de fermentação ruminal. Já a pectina pode aumentar a produção de metano, por ter alta fermentabilidade ruminal, sem, contudo alterar a ineficiência deste processo.

Palavras-chave: gases de efeito estufa, grãos de soja, lipídio, pectina, polpa cítrica

ABSTRACT

MARTINS, M. F. **Effect of energy sources ruminal methane production using *ex-situ* ruminal fermentation technique in bovines.** [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. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

Worldwide issue raised in the last two decades, the generation of greenhouse gases (GGE) has, a contributor parcel in the methane emission by ruminants. Methane, a powerful GGE, is the final product of cattle fermentative process and, for representing productive potential loss, has been studied by nutritionist all over the world. In the search for strategies to reduce losses by methane, different diets, additives and nutritional management have been used. Vegetable lipid sources, such as soybean grain contain high content of unsaturated fatty acids and this type of lipid can contribute to methanogenesis reduction. On the other hand, the inclusion of a high pectin (citrus pulp) source in diets can contribute for methane production increase. In this sense, the objective of the present experiment was to evaluate different energy sources in diet on methane production and fermentation parameters in cattle. The design adopted was a replicated 3x3 Latin square with 16 day period and 3 treatments: **Control:** Low ether extract diet (3.50% of EE); **Soybean:** High ether extract diet (inclusion of 15% of soybean grain with 5.30% of EE); **Citrus pulp:** Low ether extract and high inclusion of pectin diet (inclusion of 15% of citrus pulp with 3.0% of EE). Dry matter intake (DMI) was obtained by the difference between the offered and the surplus of the diet at the last six experimental days. Rumen total liquid volume, total solid volume, solid turnover and ruminal passage rate were obtained by the emptying of this organ performed at days 11 and 12 of each experimental period, before and 3 hours after morning feeding. The solid content was manually removed and the liquid by vacuum pulp and both samples weighed separately. A sample of 10% was used to determine dry matter of rumen content and correct total solid volume. At day 16 of experimental period, ruminal pH was determined by a data logger of continuous measurement. At this day, ruminal content sampling was carried out before, 3, 6, 9 and 12 hours after morning feeding for short chain fatty acids (SCFA) production. Rumen fluid was also collected, through vacuum pulp, for ammonia nitrogen determination. The technique applied to measure methane and SCFA production was the *ex situ* rumen fermentation that consists on the

incubation of penicillin flasks with solid and liquid rumen content in a thermostatic bath for 30 min. After, methane and SCFA determinations were carried out by gas chromatography and the relative energy loss (REL) was estimated. The REL evaluates the efficiency of feed fermentation. In other words, verifies methane loss when compared to other fermentation products. It was observed effect of treatment ($P < 0.05$) for DMI, rumen solid turnover and passage rate. Soybean diet had lower values than control and citrus pulp diet in all these parameters. Treatments did not significantly differ ($P > 0.05$) for total solid volume. The variables mean and maximum ruminal pH, time with pH was under 5.8; 6.0 and 6.2, as well as, pH area under 5.8 and 6.2 did not differ ($P > 0.05$) between treatments. However, minimum pH was higher ($P < 0.05$) in soybean group when compared to control, without difference of two groups to citrus pulp. pH area under 6.0 was lesser ($P < 0.05$) in soybean group compared with control group, without difference of two groups to citrus pulp. For ammonia nitrogen determination, it was not observed difference ($P > 0.05$) between treatments. Total SCFA, acetate and butirate production (mMol/kg/day) were increased in citrus pulp diet and were decreased in soybean diet. No diet altered ($P > 0.05$) methane production or REL. The inclusion of lipids in the diet of cattle can reduce methane production, but this effect is not specific methanogenic archaea on and therefore does not alter the efficiency of rumen fermentation. Already pectin can increase the production of methane, having high fermentability rumen, without however changing the inefficiency of this process.

Keywords: citrus pulp, greenhouse gas, lipid, pectin, soybeans

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotos ilustrativas das baias das instalações do Estábulo Experimental da FMVZ/USP.....	38
Figura 2 - Esquema dos dias de coleta para cada variável avaliada dentro de cada período experimental	40
Figura 3 - Ilustração da montagem das probes de mensuração contínua de pH ruminal	44
Figura 4 - Ilustração da colocação das probes de mensuração contínua de pH ruminal nos animais (a e b).....	45
Figura 5 Ilustração dos conteúdos ruminais	46
Figura 6 – Ilustração do preparo dos frascos	47
Figura 7 - Valores médios de pH ruminal mensurados através da metodologia de mensuração contínua em bovinos alimentados com diferentes fontes energéticas. As setas representam o momento do fornecimento da alimentação	56
Figura 8 - Valores médios da concentração de nitrogênio amoniacal em bovinos alimentados com diferentes fontes energéticas. As setas representam o momento do fornecimento da alimentação.....	58
Figura 9 - Produção relativizada dos produtos da fermentação ruminal (em Mol/Kg/dia) para os diferentes tratamentos.	61
Figura 10 - Valores médios da produção de ácido acético (em Mol/Kg/dia) nos diferentes tempos de coleta do conteúdo ruminal. As setas representam o momento do fornecimento da alimentação.	62
Figura 11 - Valores médios da produção de ácido propiônico (em Mol/Kg/dia) nos diferentes tempos de coleta do conteúdo ruminal. As setas representam o momento do fornecimento da alimentação.....	63
Figura 12 - Valores médios da produção de ácido butírico (em Mol/Kg/dia) nos diferentes tempos de coleta do conteúdo ruminal. As setas representam o momento do fornecimento da alimentação.	63
Figura 13 - Valores médios da produção de ácido AGCC Totais (em Mol/Kg/dia) nos diferentes tempos de coleta do conteúdo ruminal. As setas representam o momento do fornecimento da alimentação.....	64
Figura 14 - Valores médios da produção de metano (em Mol/Kg/dia) nos diferentes tempos de coleta do conteúdo ruminal. As setas representam o momento do fornecimento da alimentação.....	64

Figura 15 Valores médios da produção de PER (Perda de Energia Relativa, em Mol/Kg/dia) nos diferentes tempos de coleta do conteúdo ruminal. As setas representam o momento do fornecimento da alimentação..... 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Esquema do delineamento de quadrado latino 3x3 replicado	39
Tabela 2 - Proporções de ingredientes e composição bromatológica estimada das dietas experimentais, expressas em porcentagem da matéria seca (% MS)	40
Tabela 3 - Efeito das diferentes fontes de energia da dieta sobre o consumo de matéria seca e a dinâmica ruminal em bovinos	53
Tabela 4 - Variáveis de pH ruminal em bovinos alimentados com diferentes fontes energéticas	56
Tabela 5 - Efeito da inclusão de diferentes fontes energéticas na dieta sobre a produção de AGCC, metano e PER	60

LISTA DE ABREVIACOES

μ l – microlitro

AGCC – ácidos graxos de cadeia curta

Ca – Cálcio

CH₄ – Metano

CMS – Consumo de Matéria Seca

CNE – Carboidratos não estruturais

CO₂ – dióxido de carbono

CON – Controle

Conc. – Concentração

EE – Extrato etéreo

EL₁ – Energia líquida de lactação

EPM – Erro padrão da média

FDA – Fibra em detergente ácido

FDN – Fibra em detergente neutro

FDNe – Fibra em detergente neutro efetiva

FMVZ – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Fr. – Frasco

g – gramas

h – horas

H₂ – hidrogênio

Inter. – Interação entre tratamento e hora

Kg – quilogramas

L – litros

m – metros

Met – metano

mg – miligramas

mg/mL – miligrama por mililitro

min – minutos

mL – mililitros

mM – miliMol

MS – Matéria seca

MSSol – % da Matéria Seca do Sólido

N – Normal
N₂ – nitrogênio
NDT – Nutrientes digestíveis totais
N-NH₃ – nitrogênio amoniacal
P – Fósforo
PaSol – Passagem de Sólidos
PB – Proteína bruta
PDR – Proteína degradável no rúmen
PER – perda de energia relativa
PNDR – Proteína não degradável no rúmen
POL – Polpa
Prod. – produção
Qmet – quantidade de massa de metano produzida
s – segundo
SOJ – Soja
T0 – tempo zero, branco
T30 – tempo 30 minutos, incubado
TaxPa – Taxa de Passagem
Trat. – Tratamento
TurSol – Turnover sólido
USP – Universidade de São Paulo
V – Voltz
VNP – Departamento de Nutrição e Produção Animal
VolLiqTot – Volume Líquido Total
VolSolTot – Volume Sólido Total

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 Emissão de Metano: Perspectiva Ambiental e Nutricional	21
2.2 Fermentação Ruminal.....	22
2.3 Breve Caracterização da Microbiota Ruminal.....	23
2.4 Metanogênese	24
2.5 Fatores que Influenciam a Fermentação Ruminal	25
2.5.1 Dieta	25
2.5.2 pH	28
2.6 Estratégias Nutricionais para Diminuição da Perda Energética através do Metano	31
2.7 Metodologias de Mensuração de Metano	33
3 HIPÓTESES	36
4 OBJETIVOS	37
5 MATERIAL E MÉTODOS	38
5.1 Animais e Instalações	38
5.2 Tratamentos e Delineamento Experimental.....	39
5.3 Manejo Nutricional e Período Experimental	39
5.4 Consumo de Matéria Seca (CMS).....	42
5.5 Dinâmica Ruminal.....	42
5.6 Mensuração Contínua de pH.....	43
5.7 Metodologia de Determinação da Concentração de Nitrogênio Amoniacal	45
5.8 Metodologia (Ex-Situ) de Determinação da Produção de AGCC, Metano e Perda de Energia Relativa (PER).....	45
5.8.1 Preparo dos Frascos	46
5.8.2 Coleta e Preparo das Amostras	46
5.8.3 Quantificação do Gás Metano	48
5.8.4 Quantificação dos AGCC	49
5.8.5 Cálculos da Produção de AGCC, CH ₄ e PER.....	50
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES	53
6.1 Consumo e Dinâmica Ruminal.....	53
6.2 Mensuração Contínua de pH Ruminal.....	55
6.3 Nitrogênio Amoniacal	58
6.4 Produção de Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC), Metano e Perda de Energia Relativa de Metano (PER).....	59
7 CONCLUSÕES.....	68
REFERENCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

O ruminante possui uma grande vantagem em relação ao monogástrico, afinal seu processo digestivo é capaz de liberar a energia contida no material celulósico dos volumosos por fermentação dos carboidratos por enzimas da microbiota do sistema retículo-rúmen. Porém, a fermentação dos carboidratos resulta em não somente ácidos graxos de cadeias curtas (AGCC), acético, propiônico e butírico, que serão utilizados como fonte de geração de energia para o ruminante, mas também em produtos menos desejáveis, como calor e os gases metano e dióxido de carbono. Assim, a produção destes gases representa perda de energia ao animal, estimada em 2 a 12% da energia bruta do alimento ingerido (JOHNSON; JOHNSON, 1995).

Um ruminante adulto pode produzir até 17 litros de metano por hora (RUSSELL, 2002) e este gás não pode ser metabolizado pelo animal nem pela microbiota ruminal. O ato da expulsão destes gases, a 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). Desta forma, a maior parte deste gás é removida do rúmen por expiração ou eructação (MOSS, 1993), sendo então liberada no meio ambiente.

Isto posto, nas últimas décadas discutiu-se muito a respeito da produção de metano por ruminantes, pois este gás está ligado diretamente ao fenômeno de efeito estufa do globo terrestre (COTTON; PIELKE, 1995). O gás metano possui poder de absorção de radiação infravermelha cerca de 23 vezes maior que o dióxido de carbono (WUEBBLES; HAYHOE, 2002) e, apresentando 10 anos de vida na atmosfera, contribui com aproximadamente 18% de todo o potencial de aquecimento que ocorre atualmente no globo (CLARK et al., 2001). Sendo assim, é natural que as atenções de comitês, como a Agência Americana de Proteção Ambiental (USEPA) e a World Meteorological Organization, esta ligada à Organização das Nações Unidas, voltem-se à questão da emissão de gás metano, seja de fontes ligadas às atividades agropecuárias ou não, e busquem medidas que possam ser adotadas para prevenção do superaquecimento do globo terrestre.

Na busca por uma compreensão mais abrangente do processo da 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.

A manipulação da fermentação ruminal visando à melhor eficiência alimentar (diminuição de perdas energéticas da dieta via metanogênese) tem sido bastante estudada nas últimas décadas. A utilização de estratégias, como inclusão de aditivos alimentares (BEAUCHEMIN; MCGINN, 2006; BEAUCHEMIN et al., 2007; CALSAMIGLIA et al., 2007) e diferentes combinações de ingredientes em dietas para ruminantes (BEAUCHEMIN; MCGINN, 2005; LONGO, 2007; CHRISTOPHERSEN; WRIGHT; VERCOE, 2008), tem apresentado resultados expressivos. Neste contexto, fontes vegetais de lipídios, como os grãos de soja, podem colaborar para a diminuição da metanogênese na fermentação ruminal (CZERWASKI et al., 1966), ainda que não se saiba exatamente por meio de qual mecanismo (JENKINS, 1993). Em contrapartida, a inclusão de uma fonte rica em pectina (como a polpa cítrica), um carboidrato de rápida fermentação, pode contribuir para aumento da produção de metano, uma vez que o aumento da participação deste ingrediente na dieta foi associado à maior relação acético:propiónico (PINZON; WING, 1976).

2 REVISÃO DE LITERATURA

A seguir serão revisados os principais tópicos relacionados à metanogênese e sua relação com diferentes tipos de dieta.

2.1 Emissão de Metano: Perspectiva Ambiental e Nutricional

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., 1958¹ apud JOHNSON; JOHNSON, 1995; KLEIBER., 1958² apud JOHNSON; JOHNSON, 1995), 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).

Contudo, com a descoberta de que o metano é potente gás de efeito estufa com altíssima capacidade de absorção de radiação infravermelha (WUEBBLES; HAYHOE, 2002), outra frente de pesquisa foi sendo explorada, devido à potencial contribuição deste gás nas mudanças climáticas e aquecimento global (JOHNSON; JOHNSON, 1995). Desta forma, inventários têm sido publicados por órgãos competentes em diversos países, principalmente após a assinatura do Protocolo de Kioto, no qual 59 países se comprometeram a diminuir e controlar as emissões de

¹ 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: G. Torbek and H. Aersoe (Ed.) 1. **Symposium on energy metabolism: Principles, methods and general aspects.** Statens Husdyrbrugsudvalg, Copenhagen, Denmark. 1958. 53 p.

² Kleiber, M.. A respiration apparatus for tracer trials with radiocarbon on cows, sows and sheep. In: G. Torbek and H. Aersoe (Ed.) 1. **Symposium on energy metabolism: principles, methods and general aspects.** Statens Husdyrbrugsudvalg, Copenhagen, Denmark. 1958.

poluentes. Em face deste, a confecção das tabelas com dados de emissão de metano e dióxido de carbono se tornou essencial para monitoramento deste compromisso, assumido por diversos países em 1997.

É sabido que há três principais fontes de todo o metano emitido no globo terrestre: terrestre: naturais (pântanos, oceanos e populações de cupins), ligadas à geração de energia e dejetos (queima de gás, carvão, lagoas de dejetos e aterros sanitários) e ligadas à atividade agropecuária (arrozais e rebanhos). Aproximadamente, dos 480 teragramas de metano emitidos no globo terrestre por ano, 16% são devidos à atividade pecuária (IPCC, 1992). Deste montante, 73% são originários dos rebanhos de animais ruminantes (GIBBS; JOHNSON, 1994³ apud JOHNSON; JOHNSON, 1995), pois o processo digestivo dos carboidratos por estes animais gera, fisiologicamente, o metano como subproduto (CUNNINGHAM; KLEIN, 2008).

Sendo assim, todo metano gerado pelos rebanhos bovinos, ovinos e caprinos no mundo não é desprezível e, face à preocupação quanto ao aquecimento global e eficiência das dietas, torna-se cada vez mais relevante o monitoramento da emissão deste gás por ruminantes, assim como estratégias que minimizem a eructação e conseqüente emissão do mesmo ao meio ambiente.

2.2 Fermentação Ruminal

Os ruminantes possuem estômago composto, onde primeiramente ocorre a digestão fermentativa e, em seguida, a digestão enzimática. O trato digestivo pode ser dividido em duas partes, de acordo com a produção de enzimas pelo animal: uma parte aglandular (proventrículo) e outra glandular, semelhante ao estômago dos monogástricos. O proventrículo é constituído por três compartimentos: rúmen, retículo e omaso. Nos dois primeiros, ocorre a fermentação microbiana (bactérias, protozoários e fungos), onde são hidrolisados as proteínas, lipídios e carboidratos. A separação de partículas maiores é realizada pelo orifício retículo-omasal, propiciando um tempo de permanência maior da mesma no rúmen-retículo e melhorando a fermentação. A parte glandular do estômago dos

³ Gibbs, M., and D. E. Johnson. 1994. Methane emissions from the digestive processes of livestock. In: **Int. Anthropogenic Methane Emissions Estimates for 1990**. U.S. EPA 230-R-93-010. 1994.

ruminantes corresponde ao abomaso, onde ocorre a digestão do conteúdo ruminal pela secreção do suco gástrico (SILVA; LEÃO, 1979).

Este processo digestivo compreende uma relação simbiótica entre o ruminante e os microrganismos. 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).

Desta forma, o desenvolvimento dos microrganismos responsáveis pela fermentação dependem 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 láctico começam a agir (OWENS; GOETSCH, 1993). Assim, de forma geral, a microbiota ruminal necessita de um ambiente que apresente pH ruminal entre 5,5 a 7,2, temperatura entre 38 e 41°C, faixa de osmolaridade entre 260 e 340 mOsm e potencial redox entre -250 e 450 mV (VALADARES FILHO; SANTOS PINA, 2011).

2.3 Breve Caracterização da Microbiota Ruminal

Segundo Van Soest (1994), os microrganismos responsáveis pela fermentação ruminal são bactérias (60-90% da massa microbiana ruminal), protozoários (10-40%) e fungos (5-10%). Os microrganismos estão distribuídos no líquido ruminal, aderidos à fração sólida do conteúdo ou ainda ligados à parede do rúmem (ARCURI; LOPES; CARNEIRO, 2011).

As bactérias ruminais são agrupadas de acordo com o tipo de fermentação e podem ser classificadas em: fermentadoras de carboidratos estruturais, não-estruturais, proteolíticas, lácticas, lipolíticas e anaeróbias facultativas. Os protozoários auxiliam na fermentação ingerindo partículas insolúveis e solúveis (grânulos de amido) do fluido ruminal, o que pode ser bastante útil para homeostase do órgão em uma situação de acidose ruminal secundária a dietas com alto teor de grãos (RUSSELL, 2002). Os fungos colonizam as fibras presentes no rúmem com

produção de grandes quantidades de celulasas e xilanasas da alta atividade (KOZLOSKI et al., 2002)

2.4 Metanogênese

O processo de produção de metano no rúmen, conhecido por metanogênese, começa aproximadamente quatro semanas após o nascimento do animal ruminante, quando alimentos sólidos são retidos no sistema retículo-rúmen (ANDERSON et al., 1987). A metanogênese ocorre principalmente devido à condição anaeróbia do meio ruminal (BALDERSTON; PAYNE, 1976), ao principal aceptor de H₂, o dióxido de carbono, estar presente em quantidade suficiente neste meio (BRYANT, 1979) e devido à capacidade enzimática da microbiota, envolvida desde a fermentação dos carboidratos complexos (celulose) até a produção de acetato, H₂ e dióxido de carbono, substratos para a metanogênese (BRYANT, 1979). Ademais, a remoção de H₂ do meio é fator primordial para o crescimento bacteriano e degradação da matéria orgânica (BRYANT, 1979).

Desta forma, a produção de metano nada mais é do que uma forma de remoção dos íons hidrogênio do rúmen para que este se mantenha em condições ótimas, a fim de que o processo de fermentação ruminal ocorra adequadamente. Porém, este processo resulta em perda energética, que pode variar de 2 a 12% da energia bruta do alimento ingerido (JOHNSON; JOHNSON, 1995).

Como principais produtoras de metano, as arqueas são microrganismos anaeróbios estritos e podem sofrer inibição devido a fatores que diminuem a quantidade de íons de hidrogênio. São encontrados em diversos habitats anaeróbios, desde sedimentos marinhos e aquáticos, rúmen e intestino grosso de herbívoros e outros mamíferos (US EPA, 2000). As principais espécies de arqueas metanogênicas são a *Methanobrevibacter ruminantium* e *Methanosacina barkeri*. Estas para se desenvolverem, utilizam H₂, CO₂, formato e acetato, gerando metano como produto final. O envolvimento dessas bactérias na transferência de hidrogênio interespecies é uma importante interação que altera o balanço fermentativo (WOLIN, 1974).

No ambiente ruminal, as metanogênicas estão intimamente associadas com protozoários ciliados (FINLAY et al., 1994), pois estão aderidas à superfície ou na fase

intracelular dos protozoários (USHIDA; JOUANY, 1996). Os protozoários ciliados e as metanogênicas tem uma relação simbiótica, onde aqueles potencializam a produção de hidrogênio e estas utilizam o H₂ produzido, favorecendo a manutenção de um ambiente ruminal adequado (VAN SOEST, 1994).

2.5 Fatores que Influenciam a Fermentação Ruminal

A fermentação dos substratos, gerando AGCC, é um processo complexo que sofre influência de diversos fatores.

2.5.1 Dieta

A composição da dieta é um fator determinante da fermentação ruminal, afinal sua composição irá determinar quais substratos estarão disponíveis para degradação pelos microrganismos.

Os produtos ofertados para a ingestão dos ruminantes são os alimentos concentrados, ricos em energia, e os volumosos, ricos em material fibroso e carboidratos complexos. Estes serão fermentados pelos microrganismos, fornecendo aos ruminantes os ácidos graxos de cadeia curta. Mertens (1992) propõe que os carboidratos sejam classificados por suas características nutricionais em fibrosos (hemicelulose e celulose) ou não-fibrosos. Os carboidratos fibrosos são frações da parede celular das plantas, de degradação ruminal lenta realizada por bactérias hemicelulolíticas e celulolíticas. Os não-fibrosos são compostos por açúcares simples, amido e pectina. Os açúcares e o amido são partes do conteúdo celular, porém a pectina faz parte da parede celular. Estes possuem degradação rápida realizada por bactérias sacarolíticas, amilolíticas, dextrinolíticas e pectinolíticas.

Assim, o tipo de substrato fermentado é o que determina o tipo de AGCC produzido (MURPHY et al., 1982). Os principais são: acético, propiônico e butírico, correspondendo a 95 % dos ácidos produzidos no rúmen (CARVALHO et

al., 2003), podendo suprir cerca de 60 a 80 % da exigência energética dos ruminantes. Estes são absorvidos através do epitélio ruminal e, a partir da corrente sanguínea, seguem para os diversos tecidos para serem metabolizados (TEIXEIRA, 1998).

A fermentação ruminal é resultado de atividades físicas e microbiológicas que transformam os substratos da dieta em diversos produtos, como ácidos graxos de cadeia curta, proteína microbiana, vitaminas do complexo B, metano (CH₄), dióxido de carbono (CO₂) e amônia. Promotora desta fermentação, a população microbiana ruminal é mantida pela ingestão contínua de alimentos, adição de tampões produzidos pelo ruminante, eliminação dos ácidos produzidos e dos resíduos dos alimentos não digestíveis (OWENS; GOETSCH, 1993).

No processo fermentativo também são produzidos outros gases, como CO₂ (60%, aproximadamente), CH₄ (30 a 40%), quantidades variáveis de N₂ e outros. A produção de CH₄ no rúmen é oriunda da redução de CO₂, H₂ e formato pelas arqueas no processo de metanogênese (VALADARES FILHO; PINA, 2011). Esta produção de gases caracteriza perda energética ao ruminante, uma vez que o carbono destas moléculas é perdido por eructação e não fixado sob a forma de AGCC (JOHNSON et al., 1993).

Os carboidratos não estruturais nas dietas de ruminantes são açúcares simples solúveis e também carboidratos complexos, como amido e pectina. A fermentação de açúcares e amido resulta em maiores quantidades de propionato, enquanto que a pectina em acético, gerando maior liberação de íons de H⁺. Outra fonte energética muito utilizada nas dietas de ruminantes são os lipídios, que podem conter diferentes quantidades de ácidos graxos saturados e insaturados, os quais podem inibir a fermentação ruminal (DOREAU; FERLAY, 1995; HOBSON; STEWART, 1997).

A pectina é um carboidrato composto por polímeros de ácido galacturônico e compõe a estrutura da parede celular dos vegetais. Este composto é quase totalmente (90-100%) degradado no rúmen (VAN SOEST, 1994). O padrão de fermentação da pectina difere do amido e pode resultar em diferentes valores de pH ruminal, em decorrência da proporção dos AGCC formados e da velocidade da fermentação (BEM-GHEDALIA et al., 1989; LEIVA; HALL; VAN HORN, 2000). A utilização da polpa cítrica nas dietas pode contribuir para o aumento da produção de metano, pois foi associado à maior relação acético:propiónico e maior perda energética da dieta por metanogênese (PINZON; WING, 1976; MOE; TYRELL, 1979).

Dentre os alimentos energéticos, a polpa cítrica é alternativa interessante na dieta de bovinos. Esta é fonte rica em energia advinda principalmente dos carboidratos presentes em sua composição, podendo constituir-se no principal alimento energético para bovinos. A polpa é um co-produto originado a partir da fabricação do suco de laranja, sendo composta de cascas, sementes e bagaço (WING, 1982). Sua composição bromatológica consiste em 6 a 8% de proteína bruta (PB), 59% de carboidrato não fermentável (CNF), 12,5 a 40,2% de açúcares solúveis e 25,2 a 43,7% de pectina (HALL, 2001; NRC, 2001), com 78 a 82% de nutrientes digestíveis totais (NDT). Seu principal carboidrato é a pectina, qual apresenta rápida degradação ruminal (NOCEK; TAMMINGA, 1991). Apesar de possuírem cerca de 85% de sua composição em carboidratos, milho e polpa diferem essencialmente na composição destes, sendo amido e pectina seus principais carboidratos, respectivamente (NRC, 2001).

O uso da polpa cítrica tem sido pesquisado como importante fonte de fibra efetiva na alimentação de bovinos leiteiros, já que possui elevado conteúdo em fibra e similar concentração energética aos cereais (COOMER; AMOS, 1992; STERN; ZIERMER, 1993). Van Soest (1994) afirma que a pectina, apesar de rapidamente fermentável no rúmen, gera acetato como produto final, como ocorre com a fermentação da celulose. Assim, a substituição do milho por polpa pode promover efeitos benéficos, principalmente em relação ao ambiente ruminal, em razão da substituição da fermentação láctica pela acética e do efeito tamponante da pectina, resultando em melhores condições para digestão da fibra da forragem em dietas ricas em concentrado (VAN SOEST, 1994). Em contrapartida, o uso de fonte rica em pectina, como a polpa, pode contribuir para aumento da produção de metano, uma vez que o aumento do nível deste ingrediente na dieta já foi associado à maior relação acético:propiónico e maior perda energética da dieta por metanogênese (PINZON; WING, 1976; MOE; TYRRELL, 1979).

Dentre estes fatores que exercem efeitos sobre a metanogênese, a utilização de alimentos com alta participação de extrato etéreo (lipídios) na dieta pode ser estratégia interessante, conforme pontuado por Johnson e Johnson (1995). Fontes lipídicas vegetais, como os grãos de soja, contêm alta porcentagem de ácidos graxos insaturados (USDA, 1998) e este tipo de lipídio pode colaborar para a diminuição da metanogênese na fermentação ruminal. Segundo o NRC (2001), os

grãos de soja são considerados as sementes mais ricas em proteína e energia, contendo aproximadamente 39% de proteína bruta e 19% de extrato etéreo.

Contudo, ainda não se sabe exatamente se a alta participação de ácidos graxos insaturados na dieta associados à menor produção de metano se deve ao fato do próprio ácido graxo insaturado representar um sumidouro alternativo de hidrogênio no rúmen ou se há diminuição total da fermentação ruminal, o que acarretaria em queda na produção de metano, mas também de AGCC, segundo consideração de Jenkins (1993).

Quando fornecidas fontes lipídicas na dieta de ruminantes, os microrganismos do rúmen promovem a hidrólise dos triglicérides e a biohidrogenação dos ácidos graxos livres (JENKINS, 1993). Contudo, quando em excesso na dieta, lipídios podem afetar a digestão ruminal e o maior efeito é a redução da digestibilidade da fibra, da produção de metano e da relação acetato:propionato, principalmente se os níveis de ácidos graxos insaturados forem elevados (DOREAU; FERLAY, 1995; HOBSON; STEWART, 1997). Tais efeitos podem ser decorrentes das reduções no crescimento de bactérias, especialmente as celulolíticas gram positivas, e de protozoários (TAMMINGA; DOREAU, 1991), além do recobrimento físico da fibra com estes lipídios (HOBSON; STEWART, 1997; JENKINS; MCGUIRE, 2006). Todavia, DePeters et al. (1987) e Knapp et al. (1991) afirmaram que a alimentação de bovinos com ácidos graxos poliinsaturados oriundos de sementes integrais exercem efeito mínimo sobre a fermentação ruminal, uma vez que o lipídio é liberado lentamente da semente, de onde está naturalmente encapsulado e protegido, para o meio ruminal.

2.5.2 pH

A proliferação de determinadas espécies de microrganismos que habitam o rúmen sofrem grande influência do pH ruminal, modificando, assim, o perfil de fermentação, motilidade e absorção ruminais (NAGARAJA; TITGEMEYER, 2007). O valor de pH igual a 5,0 cessa o crescimento principalmente de protozoários e bactérias celulolíticas, devido às altas concentrações de H^+ (GOAD; GOAD; NAGARAJA, 1998; OWENS et al., 1998).

As concentrações e velocidade de absorção de ácidos graxos de cadeia curta e as quantidades de saliva produzidas ocasionam variações do pH. Ao longo do dia, devido às atividades metabólicas do rúmen, ocorrem oscilações cíclicas do pH ruminal (CHURCH, 1993). A atividade das bactérias celulolíticas é inibida em um pH igual ou inferior a 6,0, além de poder afetar a degradação da proteína em virtude das alterações ocorridas na atividade microbiana (RUSSELL; WILSON, 1996). Também pode ocorrer redução da produção de metano e de amônia, devido ao aumento da proporção molar do propionato, pela microbiota amilolítica. Este fato ocorre devido à necessidade de sequestrar os íons de H^+ para a produção de ácido propiônico, diminuindo a ação das arqueas metanogênicas (VAN KESSEL; RUSSELL, 1996). Isto também reduz a amônia livre, pois estes microrganismos utilizam o nitrogênio para a síntese de proteína microbiana (ARCURI; LOPES; CARNEIRO, 2011).

Com o aumento do pH ruminal, observa-se diminuição das concentrações totais dos AGCC, juntamente com o aumento da relação acetato:propionato e das concentrações de amônia no rúmen. Isto indica perda de eficiência energética e possível degradação de proteína de alto valor biológico (ARCURI; LOPES; CARNEIRO, 2011; VALADARES FILHO; PINA, 2011).

Orskov (1986) relata que o abaixamento do pH ruminal ocorre, principalmente, após a ingestão rápida de alimento, devido à rápida taxa de fermentação. Diversos autores citam que o pH ruminal é mais alcalino em dietas contendo maior teor de fibra ou carboidratos estruturais e predominância de bactérias celulolíticas. Quando se eleva o teor de concentrados, ricos em carboidratos não estruturais, o pH ruminal tende a se tornar mais ácido. O crescimento de microrganismos celulolíticos ou fermentadoras de carboidratos não estruturais são inibidos em pH abaixo de 6,0, prevalecendo microrganismos amilolíticos (SCHWARTZKOPF-GENSWEIN et al., 2003; NUSSIO; CAMPOS; LIMA, 2011; VALADARES FILHO; PINA, 2011).

Os tampões são utilizados para neutralizar o excesso de ácidos produzidos no rúmen, ou seja, para manter a homeostase do órgão, evitando flutuações no pH. Geralmente consistem na combinação de um ácido fraco e seu sal (HUTJENS, 1991). Devido à importância da manutenção do pH para a sobrevivência da microbiota ruminal, o organismo do ruminante possui um sistema tampão natural, a

produção de saliva. Esta é produzida pela glândula parótida estimulada pelo nervo vago, que por sua vez é estimulado pelo atrito da fibra na parede ruminal durante a movimentação do bolo digestivo (CUNNINGHAM, 2001). De fato, alimentos ricos em fibras, com tamanho de partícula grande, induzem secreções de maiores quantidades de saliva (FURLAN, MACARI; FARIA FILHO, 2011). A saliva é uma solução alcalina de pH igual a 8,1 composta de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e de potássio (Na_2HPO_4) mais mucina, ureia e água (FURLAN; MACARI; FARIA FILHO, 2011). Sua função é manter o pH ruminal entre 5,5 e 7,2 para que os processos fermentativos se permaneçam ativos (TEIXEIRA, 1998).

2.5.3 Consumo de Matéria Seca e Taxa de Passagem

A partir da ingestão do alimento, o animal irá absorver os nutrientes necessários para manutenção, ganho de peso, lactação e reprodução. A quantidade total de nutrientes absorvidos dependerá do consumo dos alimentos que os contém e também da digestibilidade dos mesmos. A digestibilidade está relacionada com a cinética e taxa de passagem da digesta pelo trato (SILVA, 2011).

Segundo Van Soest (1994), o consumo de alimentos e nutrientes pode ser influenciado por características do animal, do alimento e condições de alimentação. A taxa de passagem do alimento pelo trato digestivo é influenciada pelo nível de consumo, tamanho das partículas, qualidade nutricional dos ingredientes e relação volumoso:concentrado da dieta (HOOVER; STOKES, 1991).

O NRC (1996) reporta alta correlação inversa entre o consumo de matéria seca e alta concentração energética das dietas. Já em dietas com baixa digestibilidade e menos energia (alta quantidade de fibras) há a limitação do consumo por enchimento do rúmen (VAN SOEST, 1994), sendo que neste tipo de dieta há diminuição da taxa de passagem. Dietas ricas em energia e de alta digestibilidade regulam o consumo por atendimento das exigências energéticas do animal e por fatores metabólicos (FORBES, 1995).

Silva (2011) relata que a ingestão é inversamente proporcional à capacidade de enchimento das forragens, principalmente em dietas com o maior teor de fibra em detergente neutro (FDN) do que outros parâmetros químicos. Entretanto, Mertens (1994)

observa que a FDN como único parâmetro é inadequado, pois o feito de saciedade pelo enchimento ruminal ou trato gastrointestinal varia com o tamanho, fragilidade da partícula, extensão e taxa da digestão da FDN.

Os efeitos da ingestão sobre a taxa de passagem de fluído são muito maiores do que sobre a taxa de passagem das partículas. O estado fisiológico do animal (por exemplo gestação), exercício, temperatura, frequência de alimentação e o período do dia também determinam o consumo de matéria seca, alterando o volume ruminal ou a motilidade e, consecutivamente, a taxa de passagem de partículas (OWENS; GOETSCH, 1993).

A taxa de passagem é determinada pela densidade do alimento, tamanho da partícula e taxa de digestão. Isto porque, a passagem do alimento vai depender da sua localização no rúmem. Este fator é determinado, principalmente, porque alimentos com maior densidade ou com maior taxa de digestão localizam-se, geralmente, na porção inferior do estrato ruminal próximo à entrada para o omaso (VALADARES FILHO; PINA, 2011).

As taxas de passagem dos alimentos podem variar de acordo com o teor de concentrados e volumosos da dieta, sendo que, quanto maior a participação de concentrados e líquidos na dieta, maiores serão as taxas de passagem de partículas relacionados às dietas ricas em volumosos, possibilitando maior CMS e fornecendo maior quantidade de substrato para fermentação (OWENS; GOETSCH, 1993).

O consumo de matéria seca influencia diretamente na taxa de passagem. Além disso, a composição da dieta (proporção volumoso:concentrado), a densidade do alimento, composição química ou física da dieta, a ingestão de água e a presença de sais ou tamponantes também influenciam.

2.6 Estratégias Nutricionais para Diminuição da Perda Energética através do Metano

A busca pela diminuição da perda energética por eructação de gases (metano e dióxido de carbono) tem sido objeto de diversos estudos, à medida que o animal sofre perda considerável da energia bruta contida na dieta apenas eructando esses gases.

Diversos métodos foram desenvolvidos com o objetivo de quantificar-se a emissão de metano por ruminantes, sob diferentes condições (MURRAY et al., 1976; CAMMEL et al., 1980; 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, tais métodos foram fundamentais para a confecção das tabelas de inventários (Intergovernmental Panel on Climate Change - IPCC, 1997).

É sabido que diversos fatores exercem efeitos sobre a produção de metano na fermentação ruminal, como ingestão voluntária de alimentos, tipo de carboidratos na dieta, processamento das forragem, adição de lipídios e manipulação da fermentação ruminal pelo uso de aditivos (JOHNSON; JOHNSON, 1995). Segundo McAllister et al. (1996), o grande desafio para nutricionistas é o desenvolvimento de estratégias para aperfeiçoar o funcionamento do rúmen, atenuando a produção de metano, sem causar impacto negativo sobre a produtividade animal.

A utilização de estratégias que envolvem a inclusão de aditivos alimentares (BEAUCHEMIN; MCGINN, 2006; BEAUCHEMIN et al., 2007; CALSAMIGLIA et al., 2007) e diferentes combinações de ingredientes em dietas para ruminantes (LONGO, 2007; BEAUCHEMIN; MCGINN, 2005; CHRISTOPHERSEN et al., 2008) tem apresentado resultados expressivos.

Joblin (1999) afirmou que a gestão de H_2 no rúmen é o fator mais importante a ser considerado na elaboração de estratégias para controlar as emissões de CH_4 por ruminantes. Deve, portanto, ser possível reduzir a emissão de CH_4 por inibição das reações geradoras de H_2 ou promovendo alternativas que façam uso de rotas de escoamento de H_2 durante a fermentação.

Altas proporções de amido nas dietas diminuem a produção de CH_4 por unidade de matéria orgânica fermentável no rúmen devido ao aumento da produção de propionato. Porém, dietas com alta quantidade de volumoso favorece a produção de acetato e aumenta a produção de CH_4 por unidade de matéria orgânica fermentável (JOHNSON; JOHNSON, 1995).

Johnson e Johnson (1995) relatam que altas proporções de concentrados ($\geq 90\%$) podem reduzir para 2 a 3% o metano em relação ao consumo de energia. McAllister et al. (1996) comentam que o aumento da ingestão de concentrados entre 40 a 68 g de MS por

peso metabólico pode diminuir a produção de metano cerca de 9,2-5,3% por ingestão de energia.

Ao adicionar gorduras às dietas de gado leiteiro ocorre um aumento da densidade energética da dieta, aumentando a produção de leite e também modificando o teor de ácidos graxos da gordura do leite (MURPHY; CONNOLLY; MCNEILL, 1995; ASHES et al., 1997). Diversos autores mostraram que os lípidios deprimem a produção de CH₄ (DONG et al., 1997; MACHMULLER; KREUZER 1999; DOHME et al., 2000). Isto ocorre devido à hidrólise dos triglicerídeos e à biohidrogenação dos ácidos graxos livres realizadas pelos microrganismos do rúmen (JENKINS, 1993). Outra forma de diminuir a metanogênese é com o uso dos ionóforos, os quais são antibióticos bacteriostáticos e são denominados assim por sua capacidade de transportar íons, formando um complexo lipossolúvel com cátions, permitindo, assim, sua passagem através de membranas lipídicas das bactérias ruminais (EIFERT et al., 2005). O mais conhecido e estudado ionoforo é a monensina. Esta é adicionada às dietas de ruminantes para melhorar a eficiência das mesmas. Esses autores (MATHISON et al., 1998; MOSS; JOUANY; NEWBOLD, 2000) demonstraram que este produto também pode diminuir a produção de CH₄. Sauer et al. (1998) demonstrou que a adição da monensina à dieta de vacas em lactação reduziu a produção de CH₄ (Litro/dia/vaca) em 21%, em relação ao controle. O aumento da produção de propionato e diminuição na produção de CH₄ que acompanham a inclusão de monensina vem sendo associados com a redução da população de bactérias Gram-positivas e a proliferação das bactérias Gram-negativas, deslocando a fermentação ruminal de acetato para a produção de propionato (NEWBOLD et al., 1988; VAN NEVEL; DEMEYER, 1995). Diversos estudos com bovinos demonstraram que a produção de metano não foi suprimida com o uso prolongado ou repetido de ionóforos (VAN NEVEL; DEMEYER, 1995; MCCAUGHEY et al., 1999; SAUER et al., 1998).

2.7 Metodologias de Mensuração de Metano

Diversas metodologias foram desenvolvidas com o objetivo de quantificar as perdas energéticas por emissão de metano em ruminantes submetidos a diferentes dietas, os quais foram bastante úteis para a confecção de tabelas de inventários como o do órgão *Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC)*.

2.7.1 Camara Respirométrica

Miller e Koes (1988) reportaram a construção de salas providas de sistemas calorimétricos para mensuração de metano e dióxido de carbono produzidos pelo ruminante. Apesar de acurada, esta técnica tem como desvantagens alto custo de instalação e manutenção dos equipamentos, além de restringir os movimentos do animal, não correspondendo ao seu estado natural e fisiológico (JOHNSON; JOHNSON, 1995).

2.7.2 Gases Traçadores

A metodologia criada por Johnson et al. (1994) utiliza gases traçadores, em especial o hexafluoreto de enxofre (SF_6), para quantificação de emissão de metano por ruminantes. Nesta metodologia, o animal é provido de um sistema que coleta o metano erutado e o armazena em um coletor acoplado ao seu corpo. Em uma cápsula dentro do rúmen se encontra o gás traçador, cuja taxa de liberação é conhecida. Após a coleta, o coletor é pressurizado com nitrogênio e encaminhado ao laboratório, onde se fará a determinação de metano e SF_6 , ambas por cromatografia gasosa. A grande vantagem desta metodologia é que permite que os animais se movimentem e se alimentem normalmente (PRIMAVESI et al., 2004) retratando a condição fisiológica do animal e sanando a condição antinatural, a qual era imposta aos animais mantidos dentro de câmaras calorimétricas. Em contrapartida, esta técnica mensura apenas o metano erutado, não sendo possível quantificarem-se os AGCC, o que prejudica a compreensão do processo global da fermentação ruminal.

2.7.3 *In Vitro*

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).

2.7.7 *Ex-Situ*

Esta técnica vem sendo desenvolvida pelo grupo de pesquisa liderado pelo Professor Paulo Henrique Mazza Rodrigues, 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 (CH₄ 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 (RODRIGUES, 2012).

3 HIPÓTESES

As hipóteses a serem testadas são:

1) A taxa de produção de metano é maior em bovinos alimentados com dietas com alta participação de pectina (polpa cítrica) do que em dietas com alta participação de ácidos graxos insaturados (soja grão);

2) A produção de metano em relação à produção de AGCC se varia em bovinos submetidos a dietas com diferentes fontes energéticas.

4 OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito de dietas com diferentes fontes energéticas sobre a fermentação ruminal. Para tal, foi proposta uma variável que relacionasse os produtos da fermentação (AGCC e metano) a partir de uma nova técnica (metodologia *ex-situ* de estudo de fermentação ruminal).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 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 de consumo de matéria seca, nitrogênio amoniacal, mensuração de pH ruminal, produção 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 $767,3 \text{ Kg} \pm 62,3$ 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 1). Também possuíam camas de areia, que proporcionam maior conforto e bem-estar aos animais.

Figura 1 - Fotos ilustrativas das baias das instalações do Estábulo Experimental da FMVZ/USP



Fonte: Arquivo pessoal.

5.2 Tratamentos e Delineamento Experimental

As seis vacas foram distribuídas a uma das três dietas experimentais, isoenergéticas e isoprotéicas, de acordo com a fonte energética utilizada, sendo:

- 1) **Controle:** Dieta de baixo extrato etéreo (3,5% de EE);
- 2) **Soja:** Dieta de alto extrato etéreo (5,3 % de EE), com inclusão de 15% de soja grão com base na MS;
- 3) **Polpa:** Dieta de baixo extrato etéreo (3,0 % de EE) e alta participação de pectina, com inclusão de 15% de polpa cítrica com base na MS;

Para garantir que as dietas fossem isoenergéticas e isoprotéicas, optou-se por permitir uma variação na relação volumoso:concentrado, aproximando o máximo possível de 50% de concentrados e 50% de volumoso.

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. O esquema do delineamento encontra-se abaixo (Tabela 1).

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

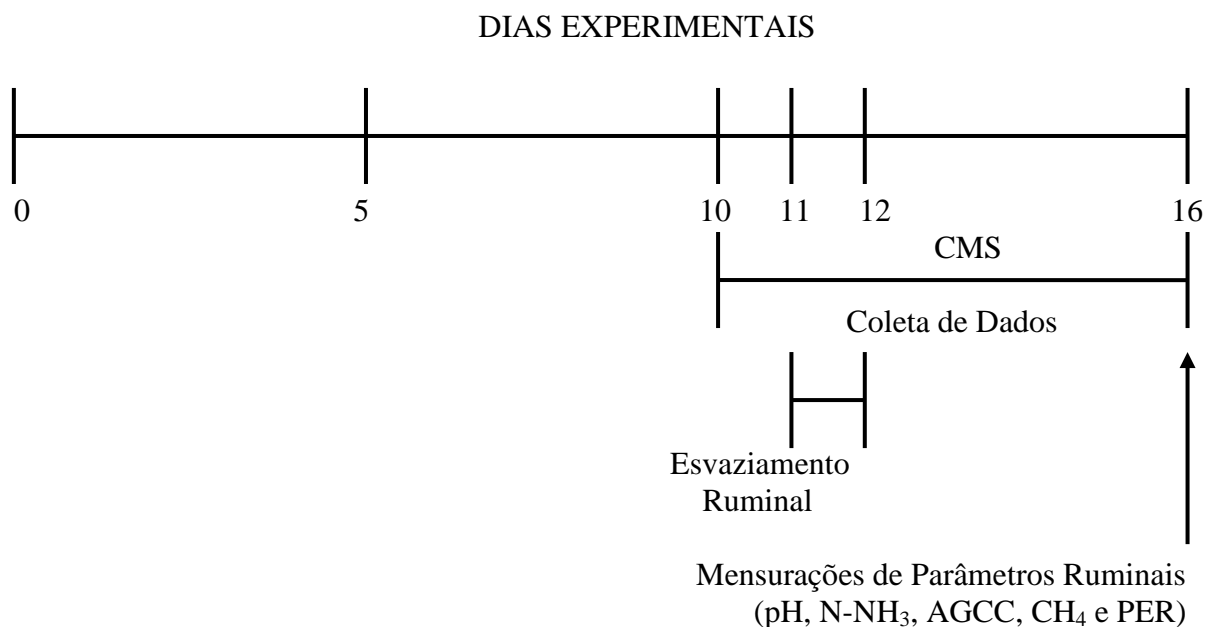
Animal	Quadrado 1			Quadrado 2		
	615	698	020	656	684	631
Período I	Controle	Soja	Polpa	Controle	Polpa	Soja
Período II	Soja	Polpa	Controle	Polpa	Soja	Controle
Período III	Polpa	Controle	Soja	Soja	Controle	Polpa

5.3 Manejo Nutricional e Período Experimental

As dietas foram oferecidas *ad libitum*, duas vezes ao dia, às 8h e 16h. No período da manhã eram pesadas a silagem de milho, concentrados, os grãos de soja e a polpa cítrica, sendo estes misturados diretamente no cocho. A mistura de concentrados foi batida sem os grãos de soja ou a polpa cítrica. 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.

Cada um dos três períodos era composto por 16 dias, sendo 15 dias de adaptação às respectivas dietas e o 16º dia destinado à coleta de conteúdo ruminal, nitrogênio amoniacal e pH (Figura 2). 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. Também foi realizado o esvaziamento ruminal no 11º e 12º dia experimental.

Figura 2 - Esquema dos dias de coleta para cada variável avaliada dentro de cada período experimental



Fonte: Arquivo pessoal

Tabela 2 - Proporções de ingredientes e composição bromatológica estimada das dietas experimentais, expressas em porcentagem da matéria seca (% MS)

Ingredientes (% MS)	Dietas		
	Controle	Soja	Polpa

Silagem de milho	50,00	54,40	48,00
Milho grão moído	34,70	27,50	20,70
Farelo de soja	12,20	-	13,50
Soja grão	-	15,00	-
Polpa cítrica	-	-	15,00
Sal comum	0,50	0,50	0,50
Fosfato bicálcico	0,10	0,10	0,10
Calcário	0,50	0,50	0,50
Suplemento mineral ¹	2,00	2,00	2,00
Composição bromatológicas			
Matéria seca ² (%)	53,10	51,00	54,00
PB ² (% MS)	11,60	11,30	12,10
PDR ³ (% PB)	65,10	67,10	68,40
PNDR ³ (% PB)	34,90	32,90	31,60
FDN ² (% MS)	27,10	31,00	27,90
FDNe ³ (% MS)	22,60	25,00	22,20
FDA ² (% MS)	14,40	19,30	16,60
CNE ² (% MS)	46,10	37,50	36,70
AMIDO ³ (% MS)	39,30	34,40	29,30
MM ² (% MS)	7,60	7,10	8,10
Ca ² (% MS)	0,85	0,72	1,01
P ² (% MS)	0,51	0,59	0,62
EE ₂ (%MS)	3,50	5,30	3,00
NDT ³ (% MS)	67,30	67,00	67,00
EL ₁ ³ (Mcal/dia)	1,55	1,55	1,55

¹ 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 D₃, 1.500 UI de vitamina E. ²Estimado segundo 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; ³Estimado segundo o programa Spartan Dairy Ration Evaluator/Balancer, versão 3.0.3.

5.4 Consumo de Matéria Seca (CMS)

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, proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), cálcio e fósforo, segundo AOAC (1985), e fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina, segundo Van Soest (1994). Estas amostragens tiveram como objetivo a avaliação da composição bromatológica da dieta fornecida.

5.5 Dinâmica Ruminal

Nos 11º e 12º dias experimentais foi realizado o esvaziamento ruminal, antes e 3 horas após a alimentação matutina, respectivamente. O conteúdo líquido foi retirado com auxílio de bomba a vácuo e o conteúdo sólido foi retirado manualmente, realizados seguindo as recomendações de Chilibroste et al. (2000). O material sólido e líquido foram pesados separadamente, uma alíquota de 10% da amostra sólida foi retirada para mensuração do teor de MS do conteúdo e o restante foi recolocado no rúmen. O volume sólido total foi corrigido pelo teor de MS do conteúdo. A partir do volume sólido, volume do líquido e o CMS foi possível calcular os seguintes itens:

O turnover sólido (%/dia):

$$\text{Turnover sólido (\%/dia)} = 100 \times \frac{\text{Consumo de MS diário (Kg)}}{\text{Volume sólido total (Kg)}}$$

A taxa de passagem (%/hora):

$$\text{Taxa de passagem (\%/hora)} = \frac{\text{Turnover s\u00f3lido (\%/dia)}}{24 \text{ (h)}}$$

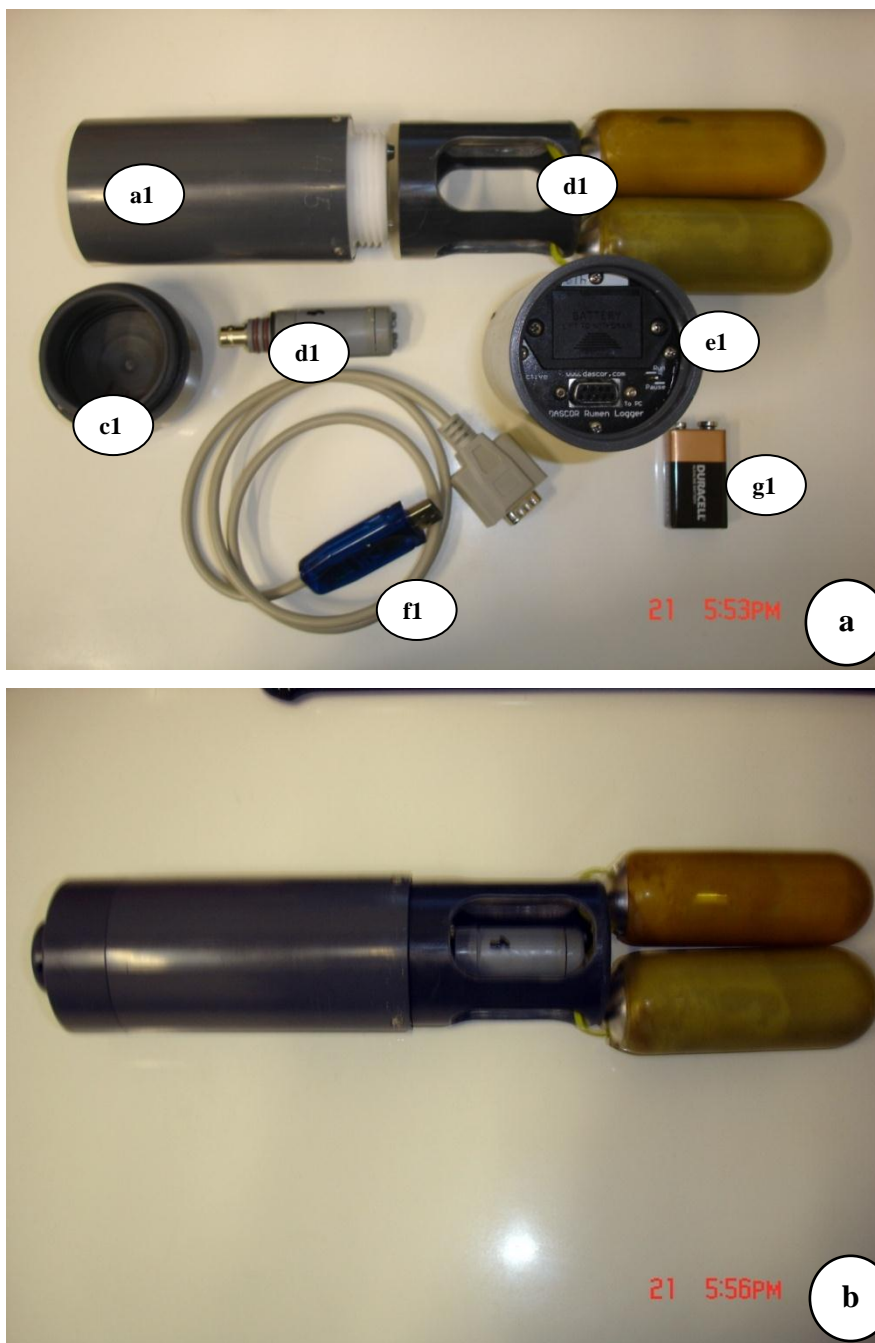
Tamb\u00e9m se calculou a passagem de s\u00f3lidos:

$$\text{Passagem de s\u00f3lido (Kg/h)} = \text{Volume de s\u00f3lido} \times \frac{\text{Taxa de passagem}}{100}$$

5.6 Mensura\u00e7\u00e3o Cont\u00ednua de pH

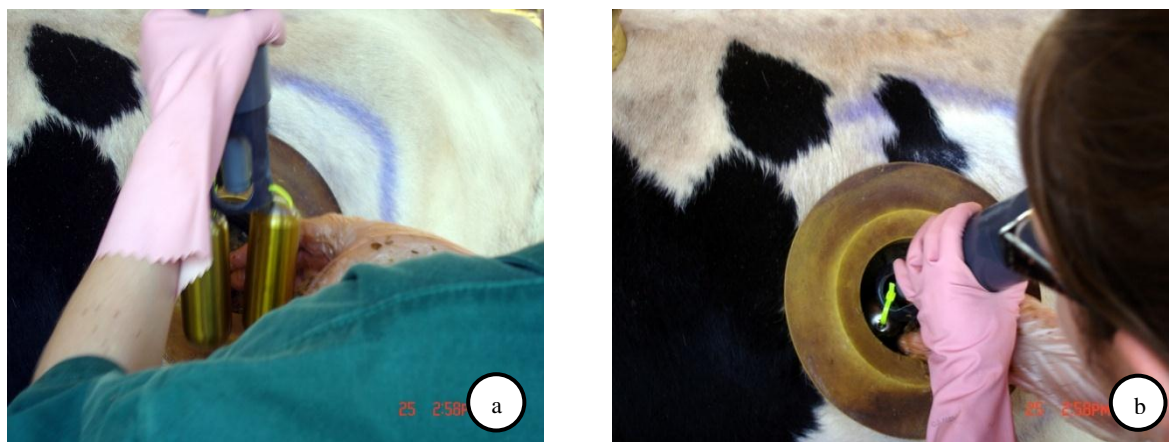
O pH foi obtido pelo m\u00e9todo de mensura\u00e7\u00e3o cont\u00ednua atrav\u00e9s do data logger. Este equipamento registra o pH, a temperatura e o potencial oxi-redox no r\u00famen de bovinos canulados por diversos dias. O sistema foi desenvolvido utilizando um data logger (modelo T7-1 LRCpH, Dascor, Escondido, CA), uma bateria alcalina de 9-V e um cabo para conex\u00e3o ao computador. Este material \u00e9 abrigado em uma c\u00e1psula de PVC resistente \u00e0 \u00e1gua. O eletrodo de pH (modelo S655CDHT, Dascor, Escondido, CA) \u00e9 coberto por uma prote\u00e7\u00e3o de 38-mm de di\u00e2metro com quatro furos de 25-mm, que foram desenvolvidos para permitir a passagem de part\u00edculas e l\u00edquido enquanto protege o eletrodo de entrar em contato com o epit\u00e9lio ruminal. Dois pesos de 900 g foram acoplados ao fundo do eletrodo para manter a “probe” no saco ventral do r\u00famen (Figura 3). A conex\u00e3o da “probe” ao computador permite a programa\u00e7\u00e3o da mesma para diferentes intervalos de mensura\u00e7\u00e3o, bem como o descarregamento dos dados mensurados diretamente em uma planilha do Excel (Microsoft Office, 2007).

Figura 3 - Ilustração da montagem das probes de mensuração contínua de pH ruminal



Legenda: (a) com suas peças: (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-V e a probe pronta para ser colocada no rúmen (b).

Figura 4 - Ilustração da colocação das probes de mensuração contínua de pH ruminal nos animais (a e b)



A partir desse sistema de monitoração, o pH ruminal foi mensurado por 24 h durante o 16º 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 formula apresentada em 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.

5.7 Metodologia de Determinação da Concentração de Nitrogênio Amoniacal

No 16º dia de experimento foi coletado líquido ruminal antes, 3, 6, 9 e 12 horas após a alimentação matutina para determinação da concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH_3). Dois mililitros foram 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).

5.8 Metodologia (*Ex-Situ*) de Determinação da Produção de AGCC, Metano e Perda de Energia Relativa (PER)

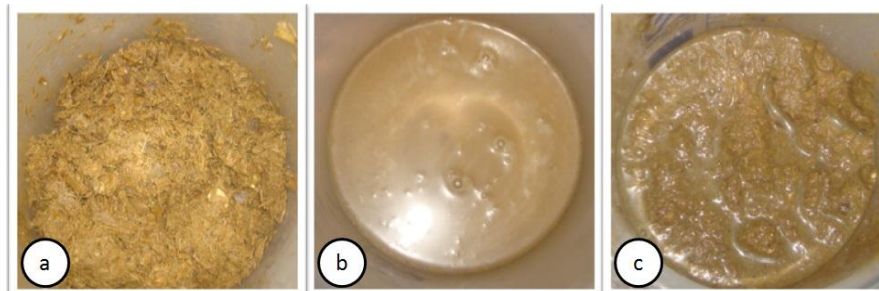
5.8.1 Preparo dos Frascos

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 45°C. Após a secagem, os frascos foram identificados e pesados em balança analítica.

5.8.2 Coleta e Preparo das Amostras

No 16º dia de oferecimento das dietas, a coleta de conteúdo ruminal foi realizada antes, 3, 6, 9 e 12 horas após o arraçoamento matutino. O conteúdo ruminal administrados nos frascos consistiu de 300 ml de conteúdo sólido ruminal, que foi coletado manualmente através da fistula, e 300 ml de líquido ruminal, coletadas com auxílio de 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 e sólido, foram homogeneizados em um liquidificador por aproximadamente 20 segundos (Figura 5). Após cada coleta, foram injetados 50 ml de conteúdo ruminal em frascos de vidros tipo de penicilina, previamente preparados.

Figura 5 - Ilustração dos conteúdos ruminais



Legenda: conteúdo sólido (a), líquido ruminal (b) e conteúdo homogeneizado (c) em liquidificador por 20s.

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, ajudado com o auxílio de um bastão fino de vidro. Após a alocação do conteúdo dentro do frasco, eles foram lacrados com rolha 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 (CO_2), sendo logo após realizada a estabilização da pressão no interior do frasco (Figura 6). O processo de “lavagem” com 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.

Foram utilizados 4 frascos por vaca, sendo dois denominados brancos e dois incubados. Os frascos incubados, após a administração do CO_2 , eram levados banho termostático, onde permaneciam a 39°C , por 30min. Depois eram levados à panela de pressão. A panela era fechada e, quando iniciava a pressão, cronometrava-se 15min, a fim de bloquear a atividade microbiana na amostra.

Decorrido os 15min sobre pressão na panela, esperava-se o esfriamento dos frascos, a fim de se evitar a despressurização dos mesmos. Em seguida eram levados ao Laboratório de Cromatografia, para a mensuração da pressão e volume dos frascos, após atingirem temperatura de aproximadamente 25°C , e subsequente quantificação das concentrações de metano.

Os frascos brancos após a substituição do ar atmosférico por CO_2 eram levados para a panela de pressão, para bloquear a atividade microbiana do mesmo modo que os frascos incubados.

Figura 6 – Ilustração do preparo dos frascos



Legenda: Injeção do conteúdo ruminal nos frascos (a), frasco arrolhado sendo lacrado com lacre de alumínio e com auxílio do alicate de recrave (b), substituição do ar atmosférico por dióxido de carbono (CO_2) (c) e frasco vedado e identificado. Idem ao anterior

Fonte: Arquivo pessoal

5.8.3 Quantificação do Gás Metano

Para a realização da quantificação de metano o Laboratório de Cromatografia foi climatizado em temperatura de 25°C e esperou 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*). 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[®] (Supelco[®]) 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[®]), com base na proporção mol/mol. O gás de arraste foi o N₂ 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%.

5.8.4 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 o peso do frasco contendo a amostra antes da estufa, sendo este volume corrigido pelo volume líquido usado na amostragem para a determinação dos AGCC.

Para a quantificação 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 3500 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 para, posteriormente, serem realizadas a quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta (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[®], modelo Focus GC) com injetor automático de amostras (Thermo Electron Corporation[®], 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 Carbopack[®] B-DA/4% Carbowax[®] 20M (Supelco[®]) 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 era o H₂ 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%.

5.8.5 Cálculos da Produção de AGCC, CH₄ e 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 que:

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

Onde:

Prod. CH₄ = Produção de metano no momento compreendido entre a injeção do líquido ruminal no frasco de penicilina até a inativação por pressão;

Conc.CH₄ = Concentração de CH₄ (mMol);

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

T₃₀ = Tempo de 30 min de incubação

T₀ = 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 pressão 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_{30} = Tempo de 30 min de incubação

T_0 = Tempo de 0 min de incubação (frasco branco)

Posteriormente, as produções de CH_4 e AGCC foram expresso 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 3 dias) 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:

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

Onde:

CH_4 = metano;

C_2 = ácido acético;

C₃ = ácido propiônico;

C₄ = ácido butírico.

5.9 Análises Estatísticas

Os dados de CMS obtidos nos últimos seis dias de cada período experimental, o pH e o esvaziamento ruminal foram analisados pelo programa Statistical Analysis System (Versão 9.2, 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 Hartley. 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, CH₄, nitrogênio amoniacal e PER foram analisados com as m o mesmo modelo, porém para estas variáveis 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 (Versão 9.2, 2010). A análise por tempo somente foi realizada quando as interações entre efeito de tempo e efeito de tratamentos foram significativas.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Consumo e Dinâmica Ruminal

As dietas experimentais avaliadas diferiram ($P < 0,05$) quanto ao CMS, Turnover de sólidos (TurSol) e Taxa de Passagem de sólidos (TaxPa). A dieta Soja apresentou os menores valores para estas variáveis quando comparada à dieta Polpa e Controle. Quanto a Passagem de sólidos (PaSol), o tratamento Polpa não diferiu dos demais. O Volume de Sólidos Totais (VolSolTot) não diferiu estatisticamente entre os tratamentos ($P > 0,05$). O tratamento com Soja apresentou maior ($P < 0,05$) Volume Líquido Total (VolLiqTot) comparado aos tratamentos Polpa e Controle. Os dados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Efeito das diferentes fontes de energia da dieta sobre o consumo de matéria seca e a dinâmica ruminal em bovinos

Variáveis*	Tratamentos			EPM ¹	Probabilidade
	Controle	Soja	Polpa		
CMS (Kg/dia)	16,33 ^a	14,52 ^b	16,19 ^a	0,3173	0,0166
MSSol (%)	16,54	16,74	16,59	0,2786	0,6971
VolLiqTot (Kg)	59,76 ^b	66,73 ^a	57,00 ^b	2,7644	0,0363
VolSolTot (Kg)	8,16	8,91	8,16	0,3701	0,5110
TurSol (%/dia)	212,19 ^a	170,75 ^b	213,20 ^a	10,6850	0,0351
TaxPa (%/hora)	8,84 ^a	7,11 ^b	8,88 ^a	0,4452	0,0354
PaSol (Kg/hora)	0,68 ^a	0,60 ^b	0,66 ^{ab}	0,0138	0,0288

*CMS = Consumo de Matéria Seca, MSSol = % da Matéria Seca do Sólido, VolLiqTot = Volume Líquido Total, VolSolTot = Volume de Sólidos Totais, TurSol = Turnover de sólidos, TaxPa = Taxa de Passagem de sólidos e PaSol = Passagem de Sólidos. ¹Erro padrão da média. ^{ab}Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

A dieta Soja proporcionou menor CMS dentre todas as dietas. Esse achado pode ser decorrente ao efeito negativo que as gorduras insaturadas ocasionam nas bactérias gram positivas e protozoários (TAMMINGA; DOREAU, 1991), além do recobrimento da fibra realizada por estes lipídios (HOBSON; STEWART, 1997; JENKINS; MCGUIRE, 2006),

umentando, conseqüentemente, o tempo de retenção do alimento no rúmen e inibindo o consumo. A hipótese de a satisfação energética ter gerado o menor CMS para a dieta Soja parece ser pouco provável, uma vez que as dietas foram isoenergéticas.

Vargas et al. (2002) relataram resultado semelhante, ao utilizar três dietas diferentes, controle (3% de EE) e duas fontes de lipídeos, óleo de soja e grãos de soja (ambos com 7% EE), em vacas lactantes. Estes autores observaram médias de CMS 14,3; 11,3 e 11,0 Kg/MS, respectivamente.

Apesar de outros trabalhos não demonstrarem alteração do CMS, com a utilização de grãos de soja (DUARTE et al., 2005; CÔNSOLO, 2011; FREITAS JR, 2012; SOLORZANO, 2012), no presente trabalho a redução do CMS, pode ser explicado por variações no período de adaptação e a aceitabilidade da fonte de gordura (STAPLES et al., 2001).

O CMS no tratamento Polpa não foi alterado em relação ao Controle. Quanto ao tratamento Polpa, a baixa inclusão deste ingrediente (15% da MS) não foi suficiente para promover esta alteração, corroborando com os trabalhos de Carvalho (1995) e Pammerman e Henry (1991), os quais sugerem que a inclusão de 20% a 30% de Polpa cítrica na MS da dieta total não altera o CMS. Henrique et al. (1998) observaram que a polpa cítrica pode substituir o milho em até 100% nas dietas com baixa proporção de concentrados (20% de concentrados). No entanto em dietas com altas proporções de concentrado, cuja relação volumoso:concentrado se aproxima de 20:80, os mesmos autores observaram que, a substituição total do milho pela polpa pode diminuir o CMS, resultando em redução do desempenho e prejuízo na qualidade da carcaça.

O efeito da inclusão de lipídios sobre o consumo pode ter afetado a motilidade ruminal gerando um menor Turnover e Taxa de Passagem de Sólidos, bem como da Passagem desses Sólidos ($P < 0,05$). Com isto, o Volume Líquido Total do conteúdo ruminal foi mais elevado na dieta com grãos de soja ($P < 0,05$), quando comparado com as dietas controle e polpa cítrica, sendo que estas últimas não diferiram entre si (Tabela 3). Isto, possivelmente, ocorreu devido ao maior tempo de retenção da fibra dentro do rúmen, o que pode ter gerado um aumento na salivacão, resultando em maior tempo de ruminação. As taxas de passagem observadas no presente experimento são semelhantes ao descrito no ARC (1984), que são de 8%/h em vacas lactantes, com produção de leite inferior a 15 Kg/dia e superiores aos resultados de Villela (1995) e Rabello et al. (1996).

Freitas Jr. (2012), ao avaliar diferentes fontes de lipídios em vacas lactantes, não encontrou diferença na taxa de passagem ou renovação ruminal da MS. Rabello et al. (1996), trabalhando com grãos de soja moído no concentrado em níveis de 0%, 15%, 30% ou 45%, observaram maiores taxas de passagem para a inclusão de 30% comparado à de 45%. Os demais tratamentos (0% e 15%) não diferiram, entre si.

Menezes et al. (2011), alimentando bovinos com dietas constituídas de silagens de milho, cana-de-açúcar e cana *in natura*, obtiveram maiores taxas de passagem nos animais alimentados com silagem de milho e justificaram tal efeito ao maior consumo de matéria seca. Estes autores reforçam também a ação do CMS sobre dinâmica ruminal.

6.2 Mensuração Contínua de pH Ruminal

As variáveis obtidas através da mensuração contínua do pH ruminal estão descritas na Tabela 4. O pH mínimo foi maior ($P < 0,05$) no grupo que recebeu dieta com grãos de soja quando comparado à dieta Controle, sem diferença dos dois grupos para o da polpa cítrica. Referente à área abaixo de pH 6,0, o tratamento com soja apresentou menores valores para esta variável, em relação ao tratamento controle, ambos não diferindo da polpa cítrica. O pH médio para os diferentes tratamentos está apresentado na Figura 6. Não foi observada diferenças entre os tratamentos para nenhuma outra variável de pH avaliada ($P > 0,05$). Estes resultados de pH eram esperados devido à proporção volumoso:concentrado utilizada nas dietas, pois há pouca flutuação diária do pH e houve tempo adequado de adaptação às dietas. Apesar de os tratamentos não diferirem estatisticamente entre si, o grupo alimentado com Soja obteve maiores valores de pH médio e os menores tempos de pH abaixo de 5,8; 6,0 e 6,2.

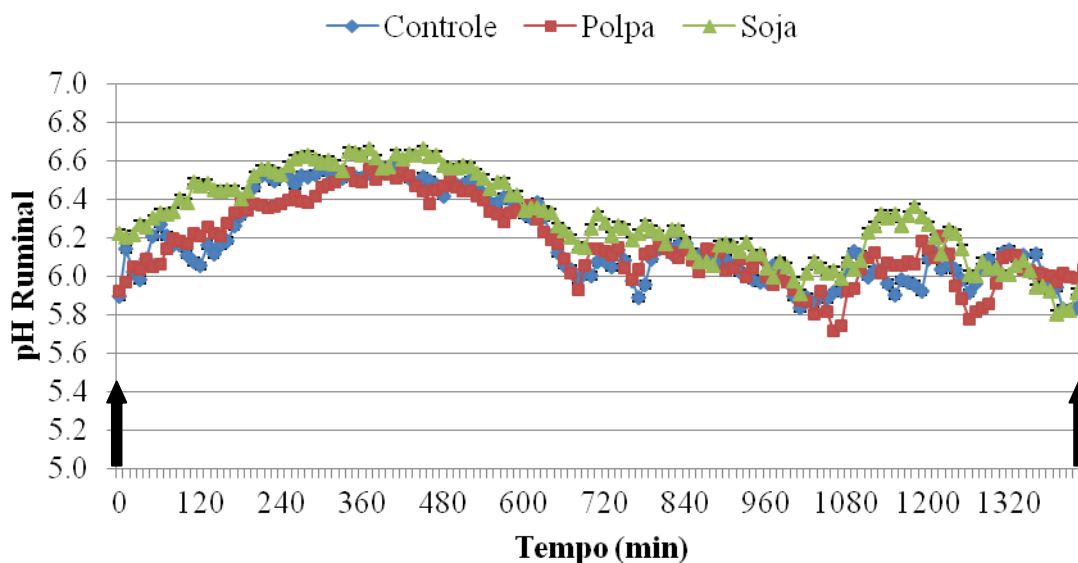
Freitas Jr. (2012), ao comparar o efeito das fontes de lipídios (óleo de soja, grãos de soja e gordura protegida com sais de cálcio) sobre o pH ruminal, observou que a dieta contendo óleo de soja apresentou o maior valor de pH, resultado este que difere do observado no presente trabalho. Por outro lado, diversos autores testando fontes de gorduras não encontraram diferenças significativas para o pH ruminal (STERN et al., 1985; VARGAS et al., 2002; SOLORZANO, 2012).

Tabela 4 - Variáveis de pH ruminal em bovinos alimentados com diferentes fontes energéticas

Variáveis	Tratamentos				Probabilidade
	Controle	Soja	Polpa	EPM ¹	
pH médio	6,18	6,29	6,17	0,02	0,0853
pH máximo	6,72	6,80	6,69	0,03	0,3490
pH mínimo	5,29 ^b	5,60 ^a	5,43 ^{ab}	0,06	0,0035
Tempo abaixo de 5,8 (min)	225,00	115,00	213,33	29,23	0,0581
Tempo abaixo de 6,0 (min)	418,30	266,67	408,33	38,61	0,0901
Tempo abaixo de 6,2 (min)	670,00	493,33	737,67	52,09	0,1423
Área pH abaixo de 5,8 (h.pH/dia)	0,71	0,35	0,58	0,10	0,0960
Área pH abaixo de 6,0 (h.pH/dia)	1,75 ^a	1,00 ^b	1,61 ^{ab}	0,21	0,0416
Área pH abaixo de 6,2 (h.pH/dia)	3,60	2,23	3,08	0,37	0,1217

¹EPM = Erro padrão da média. ^{ab}Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Figura 7 - Valores médios de pH ruminal mensurados através da metodologia de mensuração contínua em bovinos alimentados com diferentes fontes energéticas. As setas representam o momento do fornecimento da alimentação



Cônsolo (2011), ao avaliar a inclusão de grãos de soja (0%, 8%, 16% e 24%) na dieta, encontrou menor valor de pH ruminal para o grupo sem inclusão. O autor atribui este efeito ao maior teor de AGCC produzidos por este tratamento, devido a maior disponibilidade de carboidratos fermentescíveis neste grupo.

A substituição de milho por polpa cítrica altera o padrão de fermentação ruminal, sem promover a redução o pH ruminal (ROCHA FILHO, 1998; LEIVA et al., 2000; MENEZES JR, 2000). Marino et al. (2011), ao trabalharem com diferentes fontes energéticas, não observaram efeito da inclusão de polpa cítrica sobre o pH ruminal.

O tratamento Soja obteve um menor valor para área de pH abaixo de 6,0 e um pH mínimo mais elevado quando comparado ao o tratamento Controle. Esse resultado pode ser explicado pelo maior tempo de retenção alimentar no rúmen, ocasionando aumento na ruminação e salivação e, conseqüentemente, maior tamponamento ruminal. De acordo com Penner et al. (2009), a redução da ruminação diminui a produção da saliva e, conseqüentemente, a capacidade de neutralizar a rápida produção dos AGCC, provenientes da fermentação dos grãos. Outra possibilidade a ser considerada é o efeito do consumo de matéria seca do tratamento Soja que pode ter modificado a fermentação ruminal.

Os menores valores de pH mínimo dieta Controle em relação a dieta soja, se explica pela forma de fermentação do amido, proveniente da maior proporção de milho na dieta. Segundo Sniffen (1988), as taxas de degradação ruminal da pectina variam de 30 a 50%/hora, enquanto o amido, não processado a vapor, é digerido em taxas que variam entre 10 a 20%/hora. Entretanto, a fermentação da Polpa no rúmen propicia produções maiores de acetato, evitando queda brusca de pH ruminal, reduzindo, assim, os riscos de acidose por promover um ambiente ruminal mais favorável.

Maekawa et al. (2002), trabalhando com diferentes proporções de volumoso:concentrados (40:60; 50:50 e 60:40) e oferta dos mesmos separadamente, com probes de mensuração contínua de pH, encontraram valores de pH médio inferiores ao do presente trabalho, maiores área de pH abaixo de 5,8 e tempo abaixo de pH 5,8. Porém, os valores para o pH mínimo foram superiores.

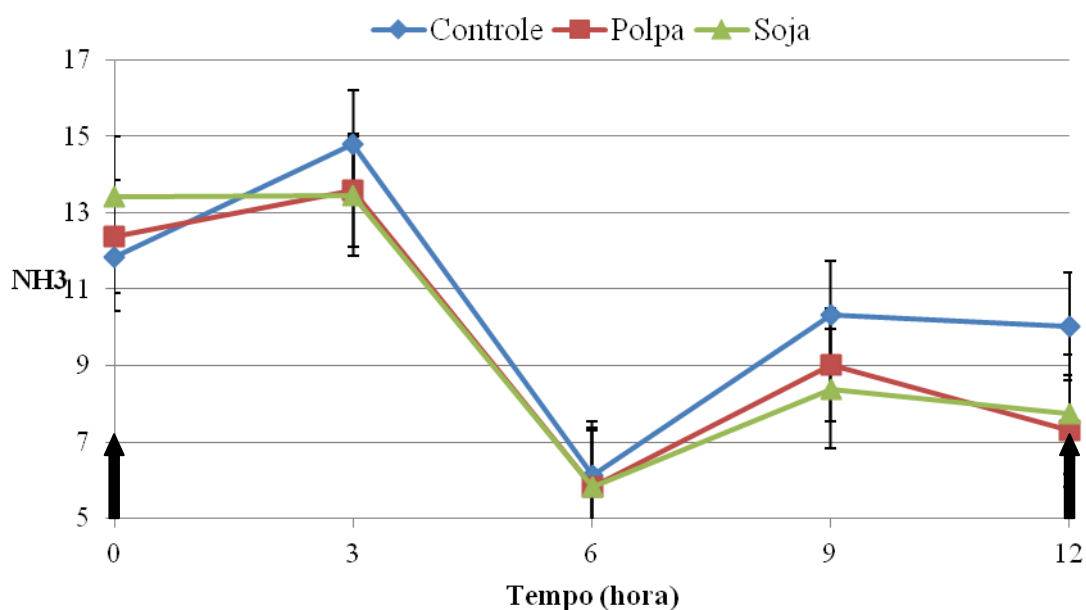
Marino (2008) encontrou valores de pH semelhantes ao presente estudo, utilizando potenciômetro digital, ao avaliar diferentes fontes energéticas (milho grão seco, silagem de grão úmido de milho ou polpa cítrica). No fator tempo de pH abaixo de 6,0 a polpa cítrica apresentou menor tempo (145 min) em relação ao milho grão seco (418 min). Já a silagem

de grão úmido não diferiu dos demais (238 min), demonstrando o melhor padrão de fermentação da polpa cítrica.

6.3 Nitrogênio Amoniacal

Para a variável concentração ruminal de nitrogênio amoniacal (Figura 8), não foi observado efeito de interação entre o efeito de tratamento e tempo ($P=0,8355$), bem como efeito da dieta ($P=0,2681$), observando-se apenas efeito de tempo de amostragem ($P<0,0001$). O valor médio encontrado para dieta Controle, da concentração ruminal de nitrogênio amoniacal, foi de 10,62 (mg/dL); para dieta Soja foi de 9,76 (mg/dL) e a dieta Polpa foi de 9,62 (mg/dL). Este resultado demonstra que a inclusão dos grãos de soja, apesar de afetar o consumo, provavelmente não afetou, substancialmente, o metabolismo de nitrogênio. A não significância para a concentração de nitrogênio amoniacal era esperado, pois as dietas eram isoproteicas, com semelhança em proteína degradável no rúmen e a não degradável (Figura 8).

Figura 8 - Valores médios da concentração de nitrogênio amoniacal em bovinos alimentados com diferentes fontes energéticas. As setas representam o momento do fornecimento da alimentação



Segundo Borges (1999), o teor de nitrogênio amoniacal é consequência do equilíbrio entre sua produção e sua utilização pelos microrganismos e esta última depende da quantidade de energia disponível.

As concentrações de nitrogênio amoniacal apresentaram pico às 3 horas após a alimentação e, em seguida, os níveis começaram a decair e depois estabilizaram. Este fato condiz com os achados de Santos e Pedroso (2011), onde relatam que fontes de proteína verdadeira apresentavam pico de concentração de N-NH₃ aproximadamente entre 3 a 5 horas após a alimentação.

Freitas Jr (2012) observou redução nas concentrações de N-NH₃ em três fontes de gordura, em vacas lactantes, sendo que a dieta Controle apresentou uma concentração de aproximadamente 17,55% maior em relação à média das três dietas, contendo fontes de gordura. Entretanto, Rabello et al. (1996), ao trabalharem com diferentes níveis de inclusão de grão de soja, observaram que estas não afetaram o comportamento das concentrações de amônia ruminal.

O tratamento Polpa apresentou resultado semelhante ao encontrado por Rocha Filho (1998), em estudo de substituição de 50% do milho grão por polpa cítrica, com concentração média de 13,9 mg/100 mL até as seis horas após a alimentação. Menezes Jr. et al. (2000) também não encontraram diferença na concentração de amônia do líquido ruminal quando inclui polpa cítrica na dieta.

No presente trabalho, foi observado em alguns tempos valores abaixo do recomendado por Leng (1990), que relata que uma faixa de 10 a 20 mg/100 mL de N-NH₃ no líquido ruminal para promover a máxima digestibilidade e consumo de forragens de baixo teor de nitrogênio e baixa digestibilidade. Entretanto, Mehrez et al. (1977) recomendaram concentrações de 23,5 mg/100 mL de N-NH₃ no líquido ruminal, para uma maior taxa de fermentação. Para Assis (2001) este nível de concentração de nitrogênio amoniacal é praticamente impossível de se manter no intervalo da alimentação.

6.4 Produção de Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC), 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 variáveis produções de AGCC e de CH₄, além de uma nova variável, a

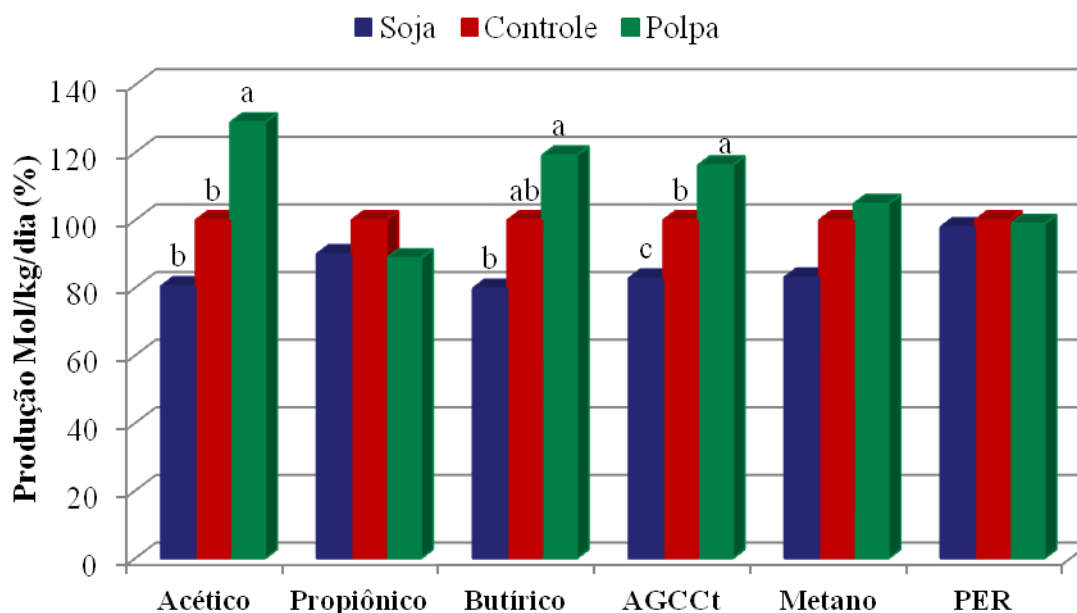
perda de energia relativa (PER) de metano em relação aos demais produtos da fermentação ruminal. Devido à originalidade da técnica, há escassez de informações sobre a produção destes parâmetros. Assim, os mesmos serão discutidos com a concentração de AGCC e emissão de metano. Os dados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Efeito da inclusão de diferentes fontes energéticas na dieta sobre a produção de AGCC, metano e PER

Variáveis	Tratamentos			Probabilidade			
	Controle	Soja	Polpa	EPM ¹	Trat.	Hora	Interação ²
Acético							
Branco (mMol/L)	70,00 ^b	67,84 ^b	78,77 ^a	0,8621	<,0001	0,0048	0,4512
Incubado (mMol/L)	76,40 ^b	73,05 ^b	86,67 ^a	0,9917	<,0001	0,0014	0,9078
Diferença (mMol/L)	6,39 ^b	5,21 ^c	7,89 ^a	0,2230	<,0001	<,0001	0,9988
Produção (mMol/g/h)	0,14 ^b	0,11 ^b	0,18 ^a	0,0062	<,0001	0,0053	0,9439
Produção (Mol/Kg/dia)	3,43 ^b	2,76 ^b	4,42 ^a	0,1492	<,0001	0,0045	0,9357
Produção (g/Kg/dia)	206,01 ^b	165,75 ^c	265,17 ^a	8,9546	<,0001	0,0045	0,9348
Propiônico							
Branco (mMol/L)	21,82	21,12	20,14	0,5509	0,0852	<,0001	0,6951
Incubado (mMol/L)	24,92	23,85	22,38	0,6370	0,7053	<,0001	0,4922
Diferença (mMol/L)	3,10	2,74	2,53	0,1445	0,5563	<,0001	0,6643
Produção (mMol/g/h)	0,067	0,060	0,058	0,0027	0,5552	<,0001	0,9012
Produção (Mol/Kg/dia)	1,60	1,44	1,42	0,6042	0,6042	<,0001	0,6579
Produção (g/Kg/dia)	118,18	106,37	104,75	4,8246	0,6019	<,0001	0,6616
Butírico							
Branco (mMol/L)	9,50 ^b	8,66 ^b	13,03 ^a	0,2793	0,0275	<,0001	0,5593
Incubado (mMol/L)	13,01	11,18	15,84	0,3214	0,0519	<,0001	0,7275
Diferença (mMol/L)	1,78 ^{ab}	1,41 ^b	2,04 ^a	0,0571	0,0123	0,0001	0,6128
Produção (mMol/g/h)	0,039 ^b	0,032 ^b	0,047 ^a	0,0016	0,0002	<,0001	0,9111
Produção (Mol/Kg/dia)	0,94 ^a	0,75 ^b	1,12 ^a	0,0378	0,0031	<,0001	0,8782
Produção (g/Kg/dia)	83,25 ^a	65,61 ^b	98,58 ^a	3,3303	0,0031	<,0001	0,8931
AGCC Total							
Branco (mMol/L)	103,05 ^b	98,72 ^b	112,75 ^a	1,3700	<,0001	<,0001	0,8436
Incubado (mMol/L)	114,33 ^{ab}	108,07 ^b	125,19 ^a	1,5670	0,0020	<,0001	0,7384
Diferença (mMol/L)	11,28 ^a	9,36 ^b	12,43 ^a	0,3402	<,0001	<,0001	0,9865
Produção (mMol/g/h)	0,25 ^{ab}	0,21 ^b	0,30 ^a	0,0090	0,0002	<,0001	0,9638
Produção (Mol/Kg/dia)	5,98 ^b	4,95 ^c	6,95 ^a	0,2164	0,0002	<,0001	0,9572
Produção (g/Kg/dia)	407,45 ^b	337,73 ^c	468,51 ^a	14,5224	0,0004	<,0001	0,9547
Metano							
Branco (mMol/Frasco)	0,023	0,019	0,022	0,0002	0,3429	0,0006	0,6775
Incubado (mMol/Frasco)	0,124	0,103	0,126	0,0029	0,1933	<,0001	0,0282
Produção (mMol/Frasco)	0,102	0,085	0,102	0,0025	0,1268	<,0001	0,0412
Produção (mMol/g/h)	0,052	0,043	0,055	0,0017	0,1616	0,0002	0,2986
Produção (Mol/Kg/dia)	1,252	1,040	1,313	0,0407	0,2334	0,0083	0,8402
Produção (g/Kg/dia)	20,025	16,625	20,997	0,6509	0,2338	0,0083	0,8443
PER*(%)	13,037	12,766	12,887	0,2326	0,9446	0,0310	0,0950

¹EPM = Erro padrão da média, ²Interação entre tratamento e hora, *PER = Perda de energia realtiva do metano em relação aos demais produtos da fermentação ruminal. ^{abc}Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Figura 9 - Produção relativizada dos produtos da fermentação ruminal (em Mol/Kg/dia) para os diferentes tratamentos.



Para as produções de AGCC Totais, não foi observado efeito de interação entre tratamento e tempo de coleta ($P>0,05$), apenas efeitos independentes de tratamento e tempo de coleta ($P<0,05$). Todos os tratamentos diferiram para produção de AGCC Totais em Mol/Kg/dia, sendo que o tratamento Polpa apresentou maior produção (16% maior em relação ao controle) e o tratamento com a inclusão dos grãos de soja resultou em menor produção (17% menor que o Controle).

O perfil de fermentação ruminal de AGCC totais dos tratamentos apresentou um pico às 3 horas, após a alimentação matutina (Figura 13). Em seguida, ocorreu um declínio dos mesmos, com exceção do tratamento Polpa, que volta a ter pico às 9 horas após alimentação matutina.

Rocha Filho et al. (1999) observaram que, em dietas onde polpa cítrica ou milho triturado substituíram a silagem de milho, em diferentes proporções, não foi observada diferença entre os tratamentos para a concentração total de AGCC. Porém, nos tratamentos onde a polpa cítrica esteve presente, associada ou não ao grão de milho triturado, a quantidade total de AGCC foi numericamente maior.

Para a variável de produção de ácido acético, não ocorreu interação entre as dietas e os tempos de coletas ($P>0,05$), apresentando efeitos independentes de tratamento e efeito

de tempo de coleta. A produção de Mol/Kg/dia de acético foi maior para a Polpa (29%) em relação ao Controle, também diferindo da Soja ($P < 0,05$). O tratamento com inclusão de grãos de soja, para a mesma variável, não diferiu da dieta Controle.

As produções de ácido butírico (Mol/Kg/dia) foram diminuídas pela inclusão de grãos de soja ($P < 0,05$), em relação aos tratamentos Controles e com a inclusão da polpa cítrica e esses não diferiram entre si ($P > 0,05$). A produção de ácido butírico (Mol/Kg/dia) foi 17% menor para o tratamento Soja e 19% maior para o tratamento Polpa, ambos em relação ao Controle. Segundo Van Soest (1994) a utilização de alto teor de pectina gera maiores valores de acético e diminuem a proporção de lactato e propionato. Este fato se deve pela fermentação da polpa cítrica (pectina) ser similar a das forragens (Rocha Filho, 1998), mantendo o pH ruminal em valores que favorecem a fermentação ruminal, incrementando a atividade microbiana e, conseqüentemente, a produção de AGCC.

Figura 10 - Valores médios da produção de ácido acético (em Mol/Kg/dia) nos diferentes tempos de coleta do conteúdo ruminal. As setas representam o momento do fornecimento da alimentação.

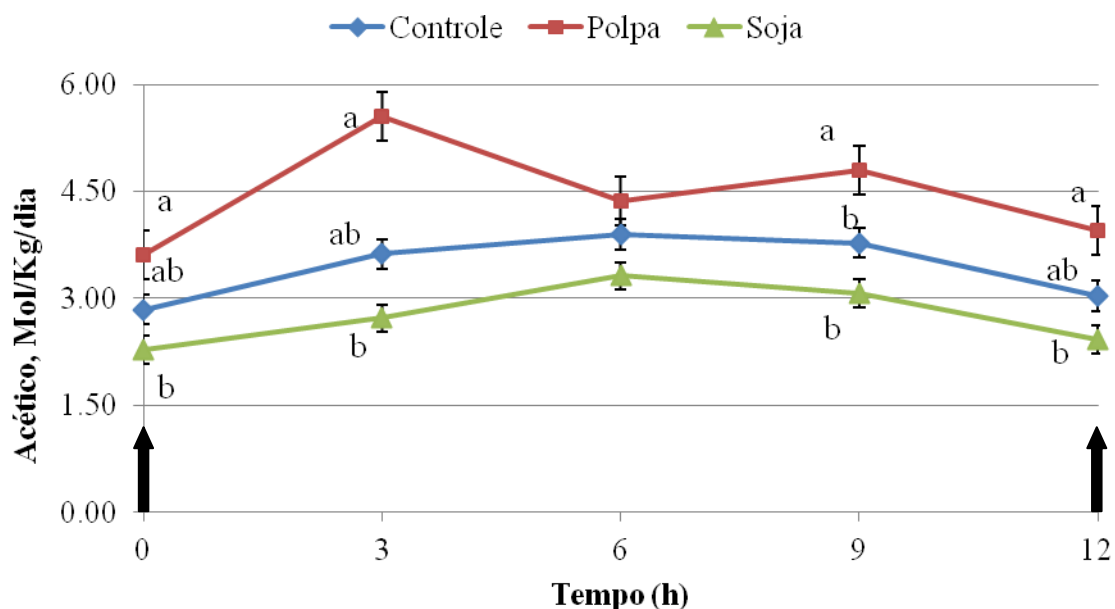


Figura 11 - Valores médios da produção de ácido propiônico (em Mol/Kg/dia) nos diferentes tempos de coleta do conteúdo ruminal. As setas representam o momento do fornecimento da alimentação.

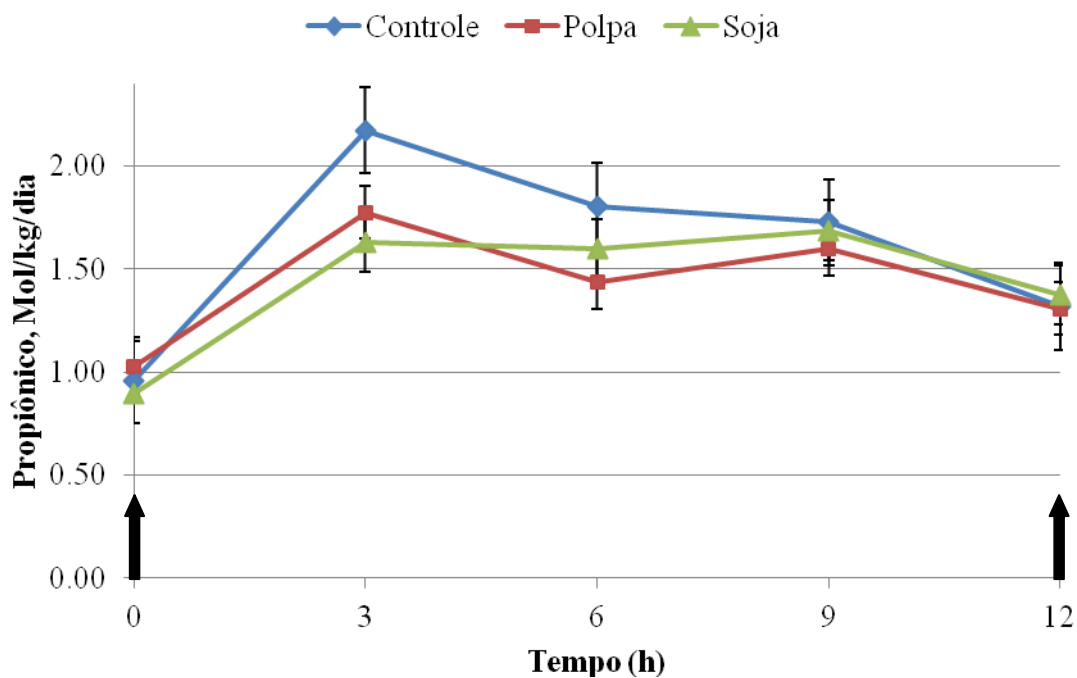


Figura 12 - Valores médios da produção de ácido butírico (em Mol/Kg/dia) nos diferentes tempos de coleta do conteúdo ruminal. As setas representam o momento do fornecimento da alimentação.

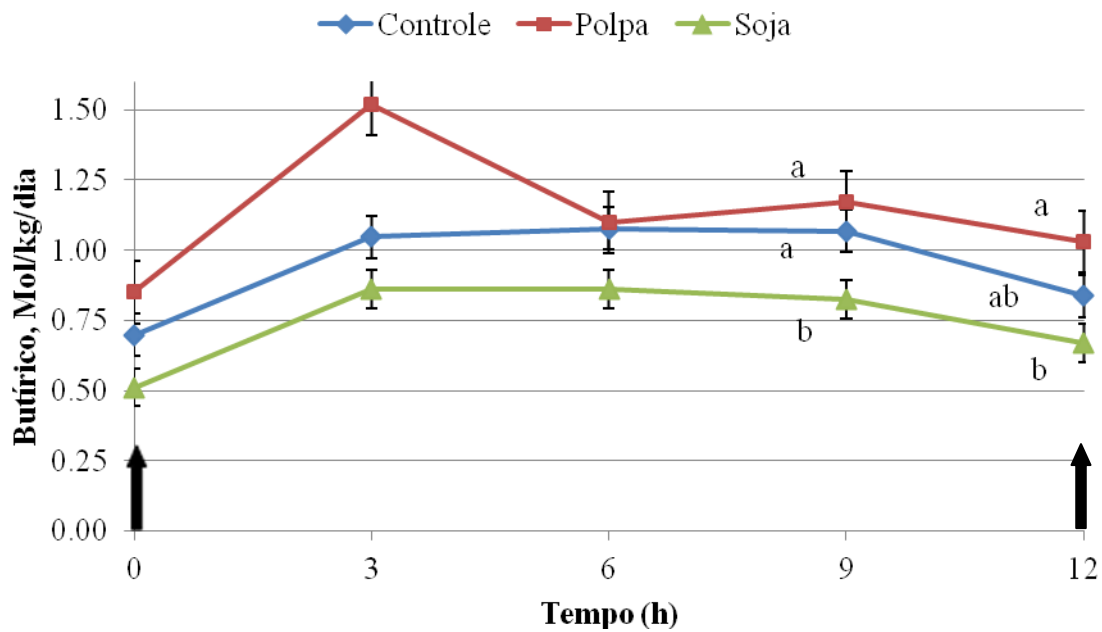


Figura 13 - Valores médios da produção de ácido AGCC Totais (em Mol/Kg/dia) nos diferentes tempos de coleta do conteúdo ruminal. As setas representam o momento do fornecimento da alimentação.

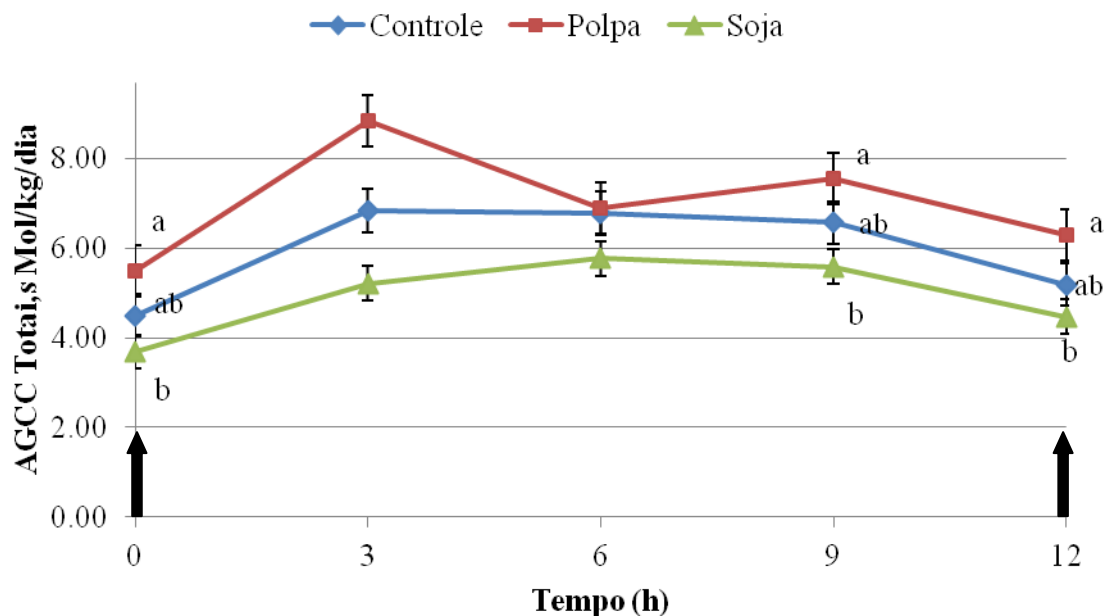


Figura 14 - Valores médios da produção de metano (em Mol/Kg/dia) nos diferentes tempos de coleta do conteúdo ruminal. As setas representam o momento do fornecimento da alimentação.

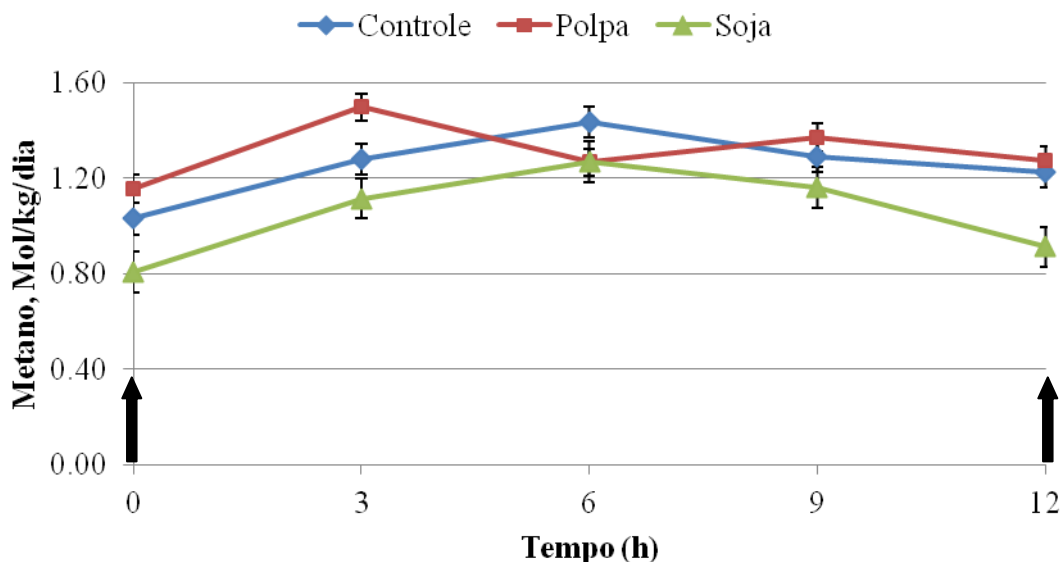
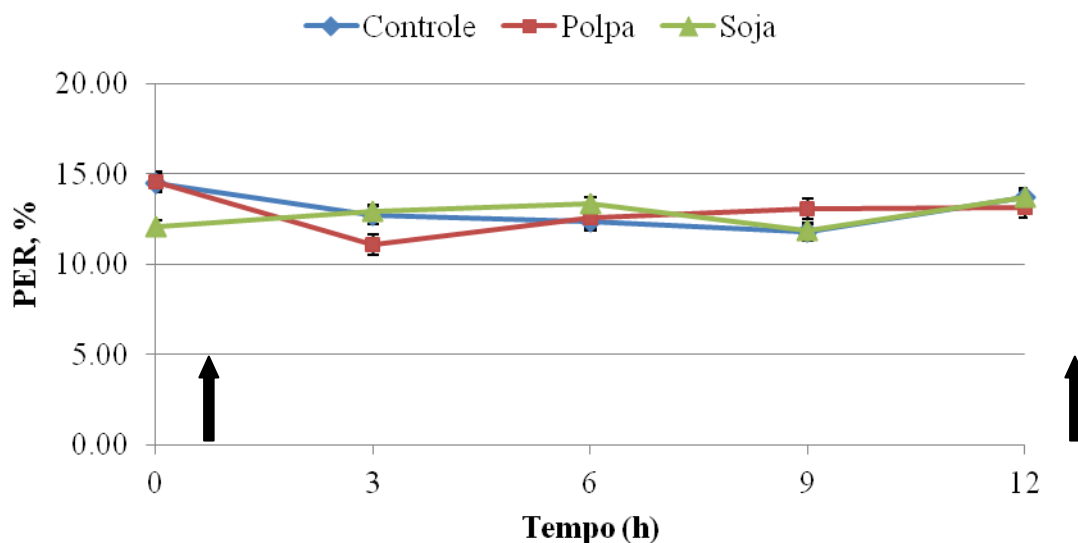


Figura 15 Valores médios da produção de PER (Perda de Energia Relativa, em Mol/Kg/dia) nos diferentes tempos de coleta do conteúdo ruminal. As setas representam o momento do fornecimento da alimentação.



Em substituição total do milho pela polpa cítrica em dietas para ovinos com alta proporção de carboidratos prontamente fermentescíveis, Gilaverte et al. (2011) observaram valores semelhantes, ao presente trabalho, para a concentração de ácidos acético e propiônico. Entretanto, o mesmo não foi observado para o ácido butírico.

Para as produções de propiônico, não se observou diferença significativa para a interação entre tratamentos e tempo de coleta, bem como efeito de tratamentos ($P > 0,05$), apresentou apenas no tempo de coleta.

A diminuição das produções dos ácidos acético e butírico, com a inclusão dos grãos de soja, pode ser causada pela redução da digestibilidade, ocasionado pela diminuição no crescimento de bactérias, especialmente as celulolíticas gram positivas, e de protozoários (TAMMINGA; DOREAU, 1991), além do recobrimento físico da fibra com estes lipídios (HOBSON; STEWART, 1997; JENKINS; McGUIRE, 2006),

As produções de acético, butírico, propiônico e metano seguiram o mesmo comportamento fermentativo dos AGCC Totais, para os tratamentos Soja e Polpa. O tratamento Controle apresentou comportamento semelhante na produção de metano, ácido acético e butírico, porém o ácido propiônico foi maior 3 horas após a alimentação matutina e diminuiu após esse tempo de coleta, devido à maior proporção de amido na dieta (Figura 11).

Para a produção de metano, não foi observada interação entre dieta e tempo de coleta ($P>0,05$), tão pouco efeito de tratamento ($P>0,05$), apenas efeito de tempo de coleta ($P<0,05$). Apesar de não significativo, deve-se ressaltar que o tratamento Soja produziu aproximadamente 17% menos de metano (Mol/Kg/dia) comparado ao tratamento Controle. Enquanto que, a produção de metano (Mol/Kg/dia) foi 5% maior para o tratamento Polpa em relação ao Controle. Segundo Van Soest (1994, a pectina gera um aumento na produção de metano, pois a sua fermentação aumenta a quantidade de acetato, ao invés de lactato e propionato.

Solorzano (2012), também não encontrou efeito de tratamento ($P>0,05$) para a emissão de metano, ao trabalhar com os mesmos tratamentos, do presente trabalho, porém utilizando a técnica de gás traçador, obtendo valores de 17,41; 19,10 e 22,03 g de CH_4/Kg de MS ingerida para os tratamentos Controle, Grãos de soja e Polpa cítrica, respectivamente. Entretanto, quando se comparado a uma probabilidade de 10%, o tratamento Polpa apresentou maior emissão de metano em g/d; Kg/ano e Mcal/ani/d que os Grãos de Soja e ambos não diferiram do controle

Jordan et al. (2006a) avaliaram três dietas para bovinos (controle, com grãos de soja ou óleo de soja) não observaram diferença na concentração de AGCC ou relação acetato:propionato. As dietas diferiram na emissão de metano, onde os animais suplementados com óleo ou grãos de soja apresentaram menor valor, quando obtidos pela técnica do gás traçador. Jordan et al. (2006b), adicionando óleo de coco em dietas para bovinos não encontraram, também, diferenças para AGCC, mas apenas para metano, o que difere dos resultados do presente trabalho.

Primavesi et al. (2004) relatam que a emissão de 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 CH_4 por bovinos. Afirmam também que animais de sangue taurino geram menos CH_4 que bovinos de sangue zebuíno.

Outras formas para a diminuição 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).

A técnica *ex-situ* apresenta uma nova variável dos parâmetros da fermentação, que permite avaliar a eficiência fermentativa dos alimentos. A perda de energia relativa do metano em relação aos demais produtos da fermentação (PER), permite associar a produção de metano com os produtos intermediários, os AGCC.

No presente estudo, a PER não apresentou efeito de interação entre tratamento e tempo de coleta, apenas foi encontrado efeito de tempo de coleta.

O tratamento Soja não alterou a PER. Isto ocorreu devido, provavelmente, à redução no crescimento de bactérias, principalmente, as celulolíticas gram positivas, e de protozoários (TAMMINGA; DOREAU, 1991). Assim, é possível deduzir que houve redução das reações geradoras de H₂ ou promovendo alternativas que façam uso de rotas de escoamento de H₂ durante a fermentação (Joblin, 1999), assim não alterando a eficiência fermentativa. Isto sugere que os lipídios não afetam o metabolismo, exclusivamente, das arqueas metanogênicas.

Apesar de o tratamento Polpa aumentar a produção de AGCC Totais por Kg de MS de conteúdo ruminal, aumentou as produções dos ácidos acético e butírico. Embora a produção de ácido acético fosse maior, o mesmo tem menos energia por Mol, fazendo com que a diferença, na PER, não fosse tão expressiva. A produção de metano/Kg de MS do conteúdo ruminal não foi alterada ($P>0,05$) pelos tratamentos, não alterando, assim, a PER.

A melhor forma de demonstrar a perda de metano é avaliar a produção de metano em relação ao produto final (leite ou carne). Jordan et al. (2006a), avaliando duas fontes de lipídios (grãos de soja e óleo de soja), com teor de EE de até 6% da MS ingerida, relataram menor emissão CH₄ por peso médio de carcaça (L/Kg) e de ganho médio diário de carcaça (L/Kg) para o tratamento com óleo de soja. O mesmo foi encontrado quando adicionado óleo de coco (JORDAN et al., 2006b). Estes autores demonstram um efeito benéfico na utilização de fontes lipídicas na emissão de metano.

7 CONCLUSÕES

As diferentes fontes de energia, na dieta de bovinos, afetaram o consumo e a dinâmica ruminal, onde a inclusão de 15% de grãos de Soja reduziu o consumo de matéria seca, ocasionando uma menor taxa de passagem de sólidos e um maior volume de líquido.

As variáveis de pH não sofreram efeito de tratamento. Exceto, o pH mínimo e área de pH abaixo de 6,0 que foram alterados no tratamento Soja.

A inclusão de lipídios na dieta de bovinos pode diminuir a produção de metano, mas esse efeito não é específicos sobre as arqueas metanogênicas e, portanto, não altera a eficiência de fermentação ruminal.

Já a pectina pode aumentar a produção de metano, por ter alta fermentabilidade ruminal, sem, contudo alterar a ineficiência deste processo.

REFERENCIAS

- .AGRICULTURAL RESEARCH COUNCIL (A. R. C.) Report of the protein group of the Agriculture Research Council working party on the nutrient requirement of ruminants. London: Commonwealth Agricultural Bureaux, 1984.p. 45.
- ANDERSON , K. L.; NAGARAJA, T. G.; MORRILL, J. I.; AVERY, T. B.; GALITZER S. J.; BOYER, J. E. Ruminal Microbial Development in Conventionally or Early-Weaned Calves. **Journal of Animal Science**, v. 64, n. 4, p. 1215-1226, 1987.
- AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analyses. 13. ed. Washington: AOAC, 1985. 1051 p.
- ARCURI, P. B.; LOPES, F. C. F.; CARNEIRO, J. C. microbiologia do rúmem. In: Berchielli, T. T., Pires, A. V., et al. **Nutrição de Ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2011.p.115-160.
- ASHES, J. R.; GULATI, S. K.; SCOTT, T. W. New approaches to changing milk composition: Potential to alter the content and composition of milk fat through nutrition. **Journal of Dairy Science**. **Título da revista por extenso**, v. 80, p. 2204–2212, 1997.
- ASSIS, A. J. **Polpa cítrica em dietas de vacas em lactação Universidade Federal de Viçosa**. 2001. 65 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia, Universidade... .Viçosa Minas Gerais, 2001.
- BALDERSTON, W. L.; PAYNE, W. J. Inhibition of methanogenesis in salt marsh sediments and whole cell suspensions of methanogenic bacteria by nitrogen oxides. **Applied Environmental Microbiology**, v. 32, p. 264, 1976.
- 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.
- BEN-GHEDALIA, D.; YOSEF, E.; MIRON, J. The effects of starch and pectin-rich diets on quantitative aspects of digestion in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v. 24, p. 289- 298, 1989.
- BORGES, A. L. C. C. Controle da ingestão de alimentos. **Caderno Técnico Escola de Veterinária - UFMG**, . único, n. v21, p. 67-69, 1999.
- BRYANT, M. P. Microbial methane production-Theoretical Aspects. **Journal of Animal Science**, v. 48, n. 1, p. 193-201, 1979.

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.

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.

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

CARVALHO, P. M. Citrus. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 6., 1995, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba, Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, p.171-214, 1995..

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

CHILIBROSTE, P.; TAMMINGA, S.; BOER, H.; GIBB, M.J.; DIKKEN, G. Duration of regrowth of ryegrass (*Lolium perenne*) effects on grazing behaviour, intake, rumen fill and fermentation of lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 5, p. 984-995, 2000.

CHRISTOPHERSEN, C. T.; WRIGHT, A. D. G.; VERCOE, P. E. In vitro methane emission and acetate:propionate ratio are decreased when artificial stimulation of the rumen wall is combined with increasing grain diets in sheep. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 2, p. 384-389, 2008.

CHURCH, D. C. **El ruminante-fisiología digestiva y nutrición**. Zaragoza: Acribia, 1993.

CLARK, H.; KLEIN, C.; NEWTON, P. **Potential management practices and technologies to reduce nitrous oxide, methane and carbon dioxide emissions from New Zealand Agriculture**. Ngaherehere: Ministry of Agriculture and Forestry, 2001. Disponível em: <<http://www.maf.govt.nz/mafnet/rural-nz/sustainable-resource-use/climate/green-house-gas-migration/ghg-mitigation.htm>>. Acesso em: 10 abr. 2010.

CÔNSOLO, N. R. B. Utilização do grão de cru integral na dieta de bovinos de corte confinado.2011. 121 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, S P, 2011.

COOMER, J. C., AMOS, H. E. The relationships between non-structural carbohydrates and milk production in lactating dairy cows. In: GEORGIA NUTRITION CONFERENCE FOR THE FEED INDUSTRY, 1992. Georgia, Atlanta. **Proceedings...** Atlanta, 1992. p. 80-86.

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

CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2001. p. 712.

CUNNINGHAM, J. G.; KLEIN B. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 4. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p.710.

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

DEPETERS, E. J.; TAYLOR, S. J.; FINLEY, C. M.; FAMULA, T. R. Dietary fat and nitrogen composition of milk from lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 70, n. 6, p. 1192-1201, 1987.

DOHME, F.; MACHMULLER, A.; WASSERFALLEN, A.; KREUZER, M. Comparative efficiency of various fats rich in medium chain fatty acids to suppress ruminal methanogenesis as measured with RUSITEC. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 80, p. 473-482, 2000.

DONG, Y.; BAE, H. D.; McALLISTER, T. A.; MATHISON, G. W.; CHENG, K. J. Lipid-induced depression of methane production and digestibility in the artificial rumen system (RUSITEC). **Canadian Journal of Animal Science**, v. 77, p. 269-278, 1997.

DOREAU, M.; FERLAY, A. Effect of dietary lipids on nitrogen metabolism in the rumen: a review. **Livestock Production Science**, v. 43, p. 97-110, 1995.

DUARTE, L. M. A.; STUMPF JÚNIOR, W.; FISCHER, V.; SALLA, L. E. Efeito de diferentes fontes de gordura na dieta de vacas Jersey sobre o consumo, a produção e a composição do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p. 2020-2028, 2005.

EIFERT, E. D. C.; LANA, R. D. P.; LEÃO, M. I.; ARCURI, P. B.; VALADARES FILHO, S. D. C.; LEOPOLDINO, W. M.; OLIVEIRA, J. D. 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, p. 297-308, 2005.

ERWIN, E. S.; MARCO, G. J.; EMERY, E. M. Volatile fatty acids analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, v. 44, n. 9, p. 1768-1771, 1961.

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

FOLDAGER, J. Protein requirement and non protein nitrogen for high producing cow in early lactation. 1997. xx p. Tese (Doutorado) - East Lansing - Michigan State University. 1977.

FORBES, J. M. **Voluntary food intake and diet selection by farm animals**. Madison: CAB Internacional, 1995. p. 532.

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.

FREITAS JR., J. E. Fontes de gordura na dieta de vacas em lactação. 2012. 141 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de ciências Agrárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, São Paulo, Brasil, 2012

FURLAN, R. L.; MACARI, M.; FARIA FILHO, D. E. Anatomia e fisiologia do trato gastrointestinal. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. (Ed.). **Nutrição de Ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2011. p. 1-27.

GALYEAN, M. L.; RIVERA, J. D. Nutritionally related disorders affecting feedlot cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 83, n. 1, p. 13-20, 2003.

GASTALDI, K. A. Produção “in vitro” de metano, dióxido de carbono e oxigênio utilizando líquido ruminal de bovinos alimentados Com Diferentes Rações. Ver modelo de tese acima. Tese (Doutorado) - Faculdade de ciências Agrárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, São Paulo, 2003

GILAVERTE, S.; SUSIN, I.; PIRES, A. V.; FERREIRA, E. M.; MENDES, C. Q.; GENTIL, R. S.; BIEHL, M. V.; RODRIGUES, G. H. Digestibilidade da dieta, parâmetros ruminais e desempenho de ovinos Santa Inês alimentados com polpa cítrica peletizada e resíduo úmido de cervejaria. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 3, p. 639-647, 2011

GOAD, D. W.; GOAD, C. L.; NAGARAJA, T. G. Ruminant microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 1, p. 234-241, 1998.

HALL, M. B. Recentes avanços em carboidratos não fibrosos na alimentação de vacas leiteiras. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL EM BOVINOCULTURA DE LEITE: NOVOS CONCEITOS EM NUTRIÇÃO, 2., 2001, Lavras. **Anais...** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2001. p.149-159.

HENRIQUE, W.; LEME, P. R.; LANNA, D. P. D. COUTINHO FILHO, J. L. V.; PERES, R. M., JUSTO C. L., SIQUEIRA P. A., ALLEONI G. F. Substituição de amido por pectina em dietas com diferentes níveis de concentrado. 1. Desempenho animal e características da carcaça. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 27, n. 6, p. 1206-1211, 1998.

HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. The rumen microbial ecosystem. London: **Blackie Academic and Professional**, 1997. 340 p.

HOOVER, W. H.; STOKES, S. R. Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3630-3644, 1991.

HUTJENS, M. F. Feed additives. In: SNIFFEN, C. J.; HERDT, T. H. (Ed.). **The veterinary clinics of north America**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1991. p. 525-540, 1991

INTERGOVERNAMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (IPCC). 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: IPCC, 1997.

IPCC. INTERGOVERNAMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. **Climate change 1992**: The supplementary report to the IPCC Scientific Assessment. Cambridge: Cambridge University, . 220., 1992.

JENKINS, T. C. Lipid metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 12, p. 3851-3863, 1993.

JENKINS, T. C.; MCGUIRE, M. A. Major advances in nutrition: impact on milk composition. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 4, p.1302-1310, 2006.

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

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.; HUYLER, M. T.; WESTBERG, H. H.; LAMB, B. K.; ZIMMERMAN, P. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a SF₆ 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.

JORDAN, E.; KENNY, D.; HAWKINS, M.; MALONE, R.; LOVETT, D. R.; O'MARA, F. P. Effect of refined soy oil or whole soybeans on intake, methane output, and performance of young bulls. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 2418-2425, 2006a

JORDAN, E.; LOVETT, D. K.; MONAHAN, F. J.; CALLAN, J.; FLYNN, B.; O'MARA, F. P. Effect of refined coconut oil or copra meal on methane output and on intake and performance of beef heifers. **Journal of Animal Science**, n. 84, p. 162-170, 2006b.

KNAPP, D. M.; GRUMMER, R. R.; DENTINE, M. R. The response of lactating dairy cows to increasing levels of roasted soybeans. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 8, p. 2563-2572, 1991.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos ruminantes**. Santa Maria: UFSM, 2002. p.140.

KULASEK, G. A. A micromethod for determination of urea in plasma, whole blood and blood cells using urease and phenol reagent. **Polskie Archiwum Weterynaryjne**, v. 15, n. 4, p. 801-810, 1972.

LEIVA, E.; HALL, M. B.; VAN HORN, H. H. Performance of dairy cattle fed citrus pulp or corn products as source of neutral detergent-soluble carbohydrates. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 12, p. 2866-2875, 2000.

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

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, Piracicaba, 2007.

MACHMULLER, A.; KREUZER, M. Methane suppression by coconut oil and associated effects on nutrient and energy balance in sheep. **Canadian Journal of Animal Science** v. 79, p. 65–72, 1999.

MAEKAWA, M.; BEAUCHEMIN, K. A.; CHRISTENSEN, D. A. Effect of Concentrate Level and Feeding Management on Chewing Activities, Saliva Production, and Ruminal pH of Lactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Science** v. 85, p. 1165–1175, 2002.

MARINO, C. T.; OTERO, W. G.; RODRIGUES, P. H. M.; DICOSTANZO, MILLEN, A.; 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 Animal Science**, v. 89, p. 3228-3235, 2011.

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 “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP, 2008.

MATHISON, G. W.; OKINE, E. K.; McALLISTER, T. A.; DONG, Y.; GALBRAITH, J.; DMYTRUK, O. I. N. Reducing methane emissions from ruminant animals. **JOURNAL OF APPLIED ANIMAL RESEARCH** v. 14, p. 1–28, 1998.

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**, n. 76, p. 231–243, 1996.

MCCAUGHEY, W. P.; WITTENBERG, K.; CORRIGAN, D. Impact of pasture type on methane production by lactating beef cows. **Canadian Journal of Animal Science** v. 79, p. 221–226, 1999.

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.

MEHREZ, A. Z.; ORSKOV, E. R.; McDONALD, I. Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. **British Journal Nutrition**, v. 38, p. 437-443, 1977.

MENEZES JR., M. P.; SANTOS, F. A. P.; GUIDI, M. T. Processamento do grão de milho e sua substituição parcial por polpa de citros sobre os Itens ruminais e composição do leite de vacas holandesas. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37., Viçosa, MG, 2000. **Anais...** Viçosa, MG, 2000.

MENEZES, G. C. C.; VALADARES FILHO, S. C.; MAGALHÃES, F. A.; VALADARES, R. F. D.; MARIZ, L. D.; DETMANN, E.; PEREIRA, O. G.; LEÃO, M. I. Total and partial digestibility, rates of digestion obtained with rumen evacuation and microbial protein synthesis in bovines fed

fresh or ensiled sugar cane and corn silage. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 5, p. 1104-1113, 2011.

MERTENS, D. Nonstructural and structural carbohydrates. In: VAN HORN, H. H.; C. J. WILCOX (Ed.). **Large Dairy Herd Management. Animal of. Dairy Science Association**, único, p.219-235, 1992.

MERTENS, D. R. **Regulation of forage intake**: secondary title. Lincoln, Nebraska, USA: American Society of Agronomy, 1994. p. 450-493.

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.

MOE, P. W.; TYRRELL, H. F. Methane production in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 62, n. 10, p. 1583, 1979.

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.

MOSS, A. R. Methane-global warming and production by animals. Canterbury: **Chalcombe publications**, 1993. 105 p.

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.

MURPHY, J. J., CONNOLLY, J. F.; MCNEILL, G. P. Effects of milk fat composition and cow performance of feeding concentrates containing full fat rapeseed and maize distillers grains on grass-silage based diets. **Livestock Production Science** v. 44, p.1–11, 1995.

MURPHY, M. R.; BALDWIN, R. L.; KOONG, L. J. Estimation of stoichiometric parameters for rumen fermentation of roughage and concentrate diets. **Journal of Animal Science**, v. 55, n. 2, p. 411-421, 1982.

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.

NAGARAJA, T. G.; TITGEMEYER, E. C. Ruminal Acidosis in Beef Cattle: The Current Microbiological and Nutritional Outlook^{1,2}. **Journal of dairy science**, v. 90, p. E17-E38, 2007.

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

NEWBOLD, C. J.; WALLACE, R. J.; WATT N. D.; RICHARDSON A. J. The effect of the novel ionophore tetronasin (ICI 139603) on ruminal microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology** v. 54, p. 544–547, 1988.

NOCEK, J. E.; TAMMINGA, S. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effect on milk yield and composition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3598-3629, 1991.

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**. 7 ed. Washington, D.C.: National Academic Press, 1996.

NUSSIO, L. G.; CAMPOS, F. P.; LIMA, M. L. M. Metabolismo de carboidratos estruturais. In: Berchielli, T. T.; Pires, A.V.; Oliveira, S.G.. **Nutrição de Ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2011. p.193-238.

ORSKOV, E. R. Starch Digestion and UTILIZATION IN RUMINANTS. **Journal of Animal Science**, v. 63, n. 5, p. 1624-1633, 1986.

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.

OWENS, F. N.; SECRIST, D. S.; HILL, W. J.; GILL, D. R. Acidosis in cattle: a review. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 1, p. 275-286, 1998.

PAMMERMAN, C. B.; HENRY, P. R. Citrus and vegetable products for ruminant animals. In: ALTERNATIVE FEEDS FOR DAIRY AND BEEF CATTLE, 1991, St Louis, MO. **Proceedings... 1991**. p.103-110.

PENNER, G. B., YU, P.; CHRISTENSEN, D. A. Effect of replacing forage or concentrate with wet or dry distillers grains on the productivity and chewing activity of dairy cattle. **Animal Feed Science Technology**, v. 153, p. 1-10, 2009.

PINZON, F. J.; WING, J. M. Effects of Citrus Pulp in High Urea Rations for Steers **Journal of Dairy Science**, v. 59, n. 6, p. 1100-1103, 1976.

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.

RABELLO, T. G.; VALADARES FILHO, S. C.; SILVA, J. F. C.; LEÃO, M. I.; CECON, P. R.; CASTRO, A. C. G. Grão de soja moído na alimentação de vacas em lactação III.

Eficiência microbiana, amônia e pH. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 25, n. 2, p. 270-281, 1996.

ROCHA FILHO, R. R.; MACHADO, P. F.; D'ARCE R. D. FRANCISCO JÚNIOR, J. C. Citrus and corn pulp related to rumen volatile acid production. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, p. 471-477, 1999.

ROCHA FILHO, R. R. Efeitos da polpa de citrus e do milho sobre Itens ruminais. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1998. 71 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade de São Paulo, 1998.

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 BRASILEIRA DE ZOOTECNIA A PRODUÇÃO ANIMAL NO MUNDO EM TRANSFORMAÇÃO, 49., 2012, Brasília. **Anais...** Brasília – DF, 2012.

RUSSELL, J. B.; WILSON, D. B. Why Are Ruminant Cellulolytic Bacteria Unable to Digest Cellulose at Low pH? **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 8, p. 1503-1509, 1996.

RUSSELL, J. B. Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition. Ithaca: RUSSELL, J.B (Ed.). 2002. 119 p.

SANTOS, F. A. P., PEDROSO, A. M. Metabolismo de proteínas. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. (Ed.). **Nutrição de ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2011. p. 151-179.

SAUER, F. D.; FELLNER, V.; KINSMAN, R.; KRAMER, J. K. G.; JACKSON, H. A.; LEE, A. J.; CHEN, S. Methane output and lactation response in Holstein cattle with monensin or unsaturated fat added to the diet. **Journal of Animal Science**. v. 76, p. 906–914, 1998.

SCHWARTZKOPF-GENSWEIN, K. S.; BEAUCHEMIN, K. A.; GIBB, D. J.; CREWS, D. H., JR.; HICKMAN, D. D.; STREETER, M.; MCALLISTER, T. A. Effect of bunk management on feeding behavior, ruminal acidosis and performance of feedlot cattle: A review. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 14_ p. E149-158, 2003. Supplement, 2.

SILVA, J. F. C.. Mecanismos reguladores do consumo. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. (Ed.) **Nutrição de Ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2011. p. 61-181.

SILVA, J. F. C.; LEÃO, M. I. **Fundamentos de nutrição dos ruminantes**. Piracicaba-SP: Livrocere, 1979. p. 380.

SNIFFEN, C. J. Balancing rations for carbohydrates for dairy cattle. In: FEED DEALER SEMINARS, 112., 1988, New York. **Proceedings...** Cornell: Cornell Cooperative Extension, 1998. p. 9-19.

SOLÓRZANO, L. R. A. R. Efeito de fontes energéticas sobre a fermentação ruminal, produção de metano determinada pela técnica do gás traçador SF₆, digestibilidade aparente total e excreção de nutriente em bovinos. 2012. 121f. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, São Paulo, 2012.

STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W.; MATTOS, R. Fat supplementation strategies for lactating dairy cow diets. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE BOVINOCULTURA DE LEITE, 2., 2001, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2001. p. 161-178.

STERN, M. D.; ZIERMER, C. J. Consider value, cost when selecting nonforage fibre. **Feedstuffs**, v. 65, n. 2, p. 14-17, 1993.

STERN, M. D.; SANTOS, K. A.; SATTER, L. D. Protein degradation in rumen and amino acid absorption in small intestine of lactating dairy cattle fed heat-treated whole soybeans. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 1, p. 45-56, 1985.

TAMMINGA, S.; DOREAU, M. Lipids and rumen digestion. In: JOUANY, J. P. (Ed.). **Rumen microbial metabolism and ruminant digestion**. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique, 1991. p.151-164.

TEIXEIRA, J. C. Metabolismo dos compostos nitrogenados nos ruminantes. **Nutrição de Ruminantes**. 1998. Curso de Pós-Graduação “Lato Sensu” (Especialização) Universidade Federal de Lavras. 1998.

US PEA. UNITED STATES ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY. Evaluating ruminant livestock efficiency projects and programs. In: Peer Review Draft. Washington, D. C., 2000. p. 48.

USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Nutrient database for standard reference**. 1998. Disponível em < <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>>. Acesso em: 20 Abr. 2010.

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.

VALADARES FILHO, P. Fermentação ruminal. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Ed.). **Nutrição de ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2011. p.161-191.

VAN KESSEL, J. A. S.; RUSSELL, J. B. The effect of pH on ruminal methanogenesis. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 20, n. 4, p. 205-210, 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 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 SOEST, P. J. Nutritional ecology of the ruminant. 2. ed. New York: Cornell University Press, 1994. 476 p.

VARGAS, L. H.; LANA, R. P.; JHAM G. N.; SANTOS, F. L.; QUEIROZ, A. C.; MANCIO, A. B. Adição de lipídios na ração de vacas leiteiras: parâmetros fermentativos ruminais, produção e composição do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 1, p. 522-529, 2002. Suplemento.

VILLELA, S. D. J. Utilização do caroço de algodão na alimentação de vacas em lactação. 1995. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 1995.

WING, J. M. **Citrus feedstuffs for dairy cattle**. Gainesville: University of Florida, 25 p. 1982.

WOLIN, M. J. Metabolic interactions among intestinal microorganisms. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 27, n. 11, p. 1320-1328, 1974.

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