UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

WILSON APARECIDO MARCHESIN

**Estudo da produção de gases pela
digestibilidade *in vitro* do CAPIM-MARANDU
[*Brachiaria brizantha* (Hochst ex A. RICH)
STAPF], submetido a intensidades de pastejo**

Pirassununga
2010

WILSON APARECIDO MARCHESIN

**Estudo da produção de gases pela
digestibilidade *in vitro* do CAPIM-MARANDU
[*Brachiaria brizantha* (Hochst ex A. RICH)
STAPF], submetido a intensidades de pastejo**

**Tese apresentada à
Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo,
como parte dos requisitos
para a obtenção do Título de
Doutor em Zootecnia.**

**Área de Concentração:
Qualidade e Produtividade
Animal**

**Orientador: Prof. Dr. Valdo
Rodrigues Herling**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo

M316e Marchesin, Wilson Aparecido
Estudo da produção de gases pela digestibilidade *in vitro* do CAPIM MARANDU [*Brachiaria brizantha* (Hochst ex A. RICH) STAPF], submetido a intensidades de pastejo / Wilson Aparecido Marchesin. -- Pirassununga, 2010.
57 f.
Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo. Departamento de Zootecnia.
Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.
Orientador: Prof. Dr. Valdo Rodrigues Herling.

1. Ácidos graxos voláteis 2. Capim-Brachiarão
3. Lotação rotacionada 4. Metano 5. Oferta de forragem.
I. Título.

DEDICO E OFEREÇO

*MEU AMOR RENATA E AOS MEUS PAIS, PELO
AMOR, PELA DEDICAÇÃO, PELO INCENTIVO,
INCONDICIONAL EM TODOS OS MOMENTOS.*

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora de Aparecida, pela saúde e a oportunidade de estudar em uma das melhores Universidades do Brasil.

Ao Prof. Dr. Valdo Rodrigues Herling, pela contribuição para minha formação profissional e pela orientação na condução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Pedro Henrique de Cerqueira Luz, pela inestimável colaboração durante toda a fase do Doutorado.

Ao GRUPO GEFEP – Grupo de Estudos em Forragicultura e Pastagem

Aos amigos de Pós-Graduação envolvidos no trabalho, pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos estagiários, que sem a colaboração seria impossível a execução deste trabalho.

Aos funcionários do laboratório de Solos Marcos, Anderson e Paulo, secretárias Glasiela pelo apoio sempre que necessário.

Nos nomes de Fernando, Ismael, Paulinho, José Godoy, Carlinhos, roberley e a todos os funcionários da Coordenadoria do Campus de Pirassununga pela colaboração.

À REPÚBLICA PANTANEIRA e seus moradores e sempre amigos, Tuchaps, Boi, João, Preto.

À empresas que sempre colaborou Alltech do Brasil.

À Cnpq pela concessão da bolsa.

À todas as pessoas que por ventura tenha esquecido o nome, mas de maneira direta ou indireta tenham contribuído para o desenvolvimento do trabalho.

“A cada dia que vivo, mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca, e que, esquivando-se do sofrimento, perdemos também a felicidade”

Emilio Moura

RESUMO

MARCHESIN, W. A **Estudo da produção de gases pela digestibilidade *in vitro* do CAPIM-MARANDU [*Brachiaria brizantha* (Hochst ex A. RICH) STAPF], submetido a intensidades de pastejo**, 2010, 57 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

A presente pesquisa teve como objetivo analisar a produção de gases pela digestão *in vitro* do capim-Marandu [(*Brachiaria brizantha* (Hochst ex A. RICH) STAPF)], quando submetido a quatro intensidades de pastejo, representadas pelas ofertas de forragem (OF) 5, 10 15 e 20% (kg de MSV/100 kg de peso animal/dia). O experimento foi realizado na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA/USP, no município de Pirassununga/SP, Numa pastagem formada com *Brachiaria brizantha*. O delineamento experimental foi em blocos completos casualizados com 4 repetições. A área de 25,2 ha foi dividida em 16 unidades experimentais de 1,575 ha, subdivididas em 5 piquetes de 3150 m², a fim de permitir um ciclo de pastejo de 35 dias, (sendo sete dias de ocupação e 28 dias de descanso). Os animais utilizados foram bovinos da raça Nelore (*Bos taurus indicus* L.) com peso médio inicial de 250 kg e aproximadamente 15 meses de idade. Para a técnica de produção de gases, os ensaios foram realizados de acordo com a técnica semi-automática. Os dados acumulativos da produção de gases foram gerados usando um transdutor de pressão e um “data logger” (PDL800, LANA/CENA/USP, Piracicaba/SP, Brazil). O substrato foi utilizado em triplicata com líquido ruminal de bovinos como inoculo. Três fêmeas bovinas fistuladas adultas da raça holandesa foram utilizadas como doadoras de inoculo. No preparo do inoculo utilizou-se 50% da fase líquida e 50% da fase sólida do conteúdo ruminal. As medições de gases foram realizadas às 6, 12, 18 e 24 horas após a inoculação. Foram realizadas as determinações de Ácidos Graxos Voláteis (acético, propiônico e butírico), por cromatografia gasosa. A degradabilidade da material seca *in vitro* foi determinada após 24 horas, juntamente com o fator de partição (FP). As amostras que foram utilizadas como substrato durante os ensaios laboratoriais foram colhidas durante seis ciclos de pastejo durante o ano de 2004, mais especificamente janeiro, fevereiro, março, maio, julho e agosto.

Para as estações do ano (EA), os ciclos dos meses de janeiro e fevereiro foram designados como verão, os ciclos dos meses de março e maio como outono e os ciclos dos meses de julho e agosto como inverno. Um comportamento linear foi observado para os valores de Produção total de gases, Matéria Orgânica Digestível (MOD) e Matéria Seca Digestível (MSD) e os coeficientes de determinação obtidos foram 0,96, 0,94, 0,81 respectivamente. O volume de metano em mL/g de MSD e MOD produzido durante a fermentação foi semelhante, considerando as OF, no entanto, para as EA percebe-se aumento na produção de metano do verão (MSD – 46,5 e MOD - 51,9) para o inverno (MSD - 75,94 e MOD – 76,28, $P = 0,0001$). As médias do FP foram diferentes entre as estações do ano, sendo crescentes do verão (2,92) para o inverno (3,52). Não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) para as OF em e para as EA para as percentagens molares dos ácidos acético, propiônico e butírico e também para a relação acético:propiônico e pH. O manejo do pastejo, considerando a OF e as EA, pode ser uma ferramenta importante de manipulação da MSD e MOD. A produção de metano é estimulada quando se intensifica a utilização da forragem produzida durante o verão. No inverno há maior eliminação do metano produzido considerando a MSD e MOD. No inverno verifica-se avaliando o FP que há maior atividade microbiana.

Palavras-chave: Ácidos graxos voláteis, capim-brachiarão, metano, oferta de forragem, lotação rotacionada.

ABSTRACT

MARCHESIN, W. A. **Study of gas production by in vitro digestibility Marandu palisadegrass [*Brachiaria brizantha* (Hochst ex A. Rich) Stapf], submitted to grazing intensities**, 2010, 57 f. Thesis (Ph.D.) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

This study aimed to analyze the gas production by in vitro digestion Marandu palisadegrass [(*Brachiaria brizantha* (Hochst ex A. Rich) Stapf], when subjected to four grazing intensities, represented by herbage allowance (HA) 5 , 10 15 and 20% (kg DM/100 kg live weight / day). The experiment was conducted at the Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - FZEA / USP in Pirassununga / SP, in a pasture with *Brachiaria brizantha*. A randomized complete block design with 4 replications. The area of 25.2 ha was divided into 16 experimental units of 1.575 ha, divided into 5 paddocks of 3150 m², in rotationally stocked pasture under a 35 day of grazing cycle (seven days of occupation and 28 days of rest). The animals used were Nellore cattle, with initial body weight of 250 kg and approximately 15 months of age. For the gas production, testing were according to the semi-automatic technique. The data from cumulative gas production were generated using a pressure transducer and a data logger (PDL800, LANA / CENA / USP, Piracicaba-SP, Brazil). The substrate used in triplicate with bovine rumen fluid as inoculum. Three fistulated Holstein cows were donors of inoculum. To prepare the inoculum was used 50% of the liquid phase and 50% of the solid phase of rumen contents. Measurements gases were at 6, 12, 18 and 24 hours after inoculation. The analysis of volatile fatty acids (acetic, propionic and butyric acids) by gas chromatography. Degradability of dry mater *in vitro* was determined after 24 hours, together with the partition factor (PF). Samples were used as substrate during laboratory tests were collected for six grazing cycles during 2004, specifically January, February, March, May, July and August. The seasons (SE), the cycles of months of January and February were designated as summer, the cycles of months of March and May and autumn and the cycles of

months of July and August and winter. A linear behavior was observed for values Total production of gas, organic matter digestible (OMD) and dry matter digestible (DMD) and the determination coefficients obtained were 0.96, 0.94, 0.81 respectively. The volume of methane in mL / g and DMD OMD produced during fermentation was similar, whereas the OF, however, for EA sees an increase in methane production of summer (DMD - OMD and 46.5 - 51.9) for winter (DMD - 75.94 and OMD - 76.28, $P = 0.0001$). The averages of PF were different between the seasons, and growing summer (2.92) for the winter (3.52). There were no significant differences ($P > 0.05$) for the HA and in the SE to the molar percentages of acetic, propionic and butyric acids as well as for the Acetic:Propionic and pH . Grazing management, considering the HA and the SE may be an important tool of manipulation of DMD and OMD. Methane production is stimulated when it enhances the use of forage produced during the summer. In winter there is a greater elimination of methane produced considering the DMD and OMD. In the winter occurs evaluating the PF that there is greater microbial activity.

Key words: herbage allowance, methane, palisadegrass, rotationally stocked, volatile fatty acids,.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de produção de Ácidos graxos voláteis no rúmen. Adaptado de HUNGATE (1966).	25
Figura 2. Extrato do balanço hídrico climatológico de Pirassununga, SP no ano de 2004.	28
Figura 3. Extrato do balanço hídrico climatológico de Pirassununga, SP Média histórica de 30 anos.	28
Figura 4. Área experimental, animais em pastagem de Capim-Marandu.	30
Figura 5. Área experimental, animais em pastagem de Capim-Marandu.	30
Figura 6. Croqui da área experimental.	32
Figura 7. Transdutor de pressão e um data logger (PDL800, LANA/CENA/USP, Piracicaba/SP, Brazil).	35
Figura 8. Garrafas utilizadas nos ensaios laboratoriais. I) Garrafa com substrato. II) Garrafa com substrato + solução Tampão III) Garrafa com substrato + solução + inoculo. IV) Garrafa com substrato + solução + inoculo com rola de borracha.	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Precipitação pluviométrica (mm) e temperatura média mensal (°C) de Pirassununga, SP.	27
Tabela 2. Análise química do solo	29
Tabela 3. Resultados das alturas de Pré-pastejo (APEP - cm), alturas Pós-pastejo (APOP - cm), produção de massa de forragem (PMF – kg/ha), Proteína Bruta (PB%), Fibra em Detergente Ácido (FDA%) e Fibra em Detergente Neutro (FDN%) para as ofertas de forragem e estações do ano durante o período experimental.	41
Tabela 4. Resultados de Produção Total de Gases (PTG), Matéria Orgânica digestível (MOD), Matéria Seca Digestível (MSD), mililitros de metano por gramas de Matéria Seca (mL CH ₄ /gMS), mililitros de metano por gramas de Matéria Orgânica Digestível (mL CH ₄ /gMOD), mililitros de metano por gramas de Matéria Seca Digestível (mL CH ₄ /gMSD) e Fator de Partição (FP) para as ofertas de forragem (OF) e estações do ano (EA).	42
Tabela 5. Resultados da interação entre as ofertas de forragem (OF) e as estações do ano (EA) para a Produção Total de Gases (PTG) e Matéria Seca Digestível (MSD).	45
Tabela 6. Resultados das médias de porcentagem molar dos Ácidos acético (acetato), propiônico (propionato) e butírico (butirato), relação acético: propiônico (Ace:Prop) e pH para as ofertas de forragem e estações do ano.	47

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. DESENVOLVIMENTO	17
2.1 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	27
2.2.1 Local	27
2.2.2 Gramínea	29
2.2.3 Delineamento experimental e manejo dos animais	31
2.2.4 Coleta das amostras de pastagem	34
2.2.5 Análises laboratoriais	35
2.2.6 Técnica de produção de gás	35
2.2.7 Análise estatística	37
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
3. CONCLUSÕES	49
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem grande parte de seu território localizado entre os trópicos de câncer e capricórnio, sendo, portanto, um país tropical e com grande número de espécies forrageiras com potencial de massa para serem usadas na alimentação de ruminantes.

A maioria do rebanho bovino no Brasil é criada, recriada e terminada em pastagens, que constituem numa importante fonte de nutrientes, porém, as plantas tropicais, de acordo com Assis et al. (1998) e Codagnome et al. (1998), apresentam fração solúvel de baixa degradabilidade e a degradabilidade potencial depende da planta forrageira avaliada.

O pior valor nutritivo dessas plantas forrageiras tropicais é a principal causa de menor produtividade do rebanho bovino, principalmente quando se trata de animais com elevada demanda por nutrientes (MINSON, 1990). Associado a esse comportamento, sabe-se que na estação seca a produção das pastagens é reduzida, a senescência de folhas e de perfilhos é acelerada, e com isso apresentam baixa disponibilidade e pior valor nutritivo da forragem.

O conhecimento do valor nutritivo da dieta alimentar dos animais torna-se imperativo, pois pode proporcionar a sua adequação para otimizar o desempenho produtivo e reduzido custo de produção, bem como diminuir as perdas de energia e de compostos nitrogenados associados à digestão e ao metabolismo dos nutrientes (CABRAL, 2002). Dos fatores relacionados ao ambiente de criação, a alimentação merece destaque, pois representa a forma pela qual os animais adquirem os nutrientes necessários às diversas funções vitais e produtivas. Adicionalmente, 60% a 70% dos custos de produção dos

animais e grande impacto na economia do sistema de produção são representados pela alimentação.

Como fator de complicação, os alimentos volumosos, principalmente aqueles de origem tropical, têm grande variação em sua composição e na taxa de degradação de seus componentes, conforme a espécie forrageira, idade da planta, época do ano, adubação do solo e manejo empregado (VAN SOEST et al., 1991; VAN SOEST, 1994).

As gramíneas tropicais, embora apresentem alta produção de massa seca, quando comparadas àquelas de clima temperado, acumulam ao longo do ciclo de crescimento elevada proporção de parede celular que, em nutrição, denomina-se de fibra em detergente neutro (FDN). Essa fração apresenta, de modo geral, lenta e incompleta digestão, ocupa espaço no trato gastrintestinal (MERTENS, 1996), e é a principal responsável pela variação na digestão dos alimentos tropicais, além de exercer efeito marcante no consumo de alimentos (VAN SOEST, 1994; MERTENS, 1996).

O rúmen é o principal local onde ocorre a digestão dos constituintes dietéticos nos ruminantes, realizada pela numerosa população microbiana desse compartimento (VAN SOEST, 1994). Esse evento permite aos ruminantes o consumo e utilização de alimentos fibrosos com maior eficiência comparados aos outros animais.

Nos atuais sistemas de adequação de dietas para ruminantes (NRC, 2001) são necessárias informações relativas às proporções das frações dos alimentos, bem como de suas taxas de digestão, no sentido de sincronizar a disponibilidade de energia e nitrogênio no rúmen, maximizar a eficiência

microbiana, a digestão dos alimentos, e reduzir as perdas decorrentes da fermentação ruminal.

Experimentos *in vivo*, que envolvem a produção animal e a digestibilidade, são os métodos mais precisos para essa determinação. Isso traz dificuldades aos experimentos, pois requer o uso de animais, alimentos, mão-de-obra, tempo e elevado custo financeiro, limitando sua aplicabilidade.

A produção de gases, durante a fermentação microbiana na digestão dos ruminantes, pode ser importante ferramenta para estimar a taxa e a extensão da digestibilidade dos alimentos. A cinética da produção de gases durante a fermentação ruminal pode fornecer valiosas informações sobre o alimento que possa estar sendo utilizado, quando da formulação da dieta e de modelos de resposta animal. Pela técnica de produção de gases *in vitro*, esses podem ser mensurados e coletados, e com esses valores o modo de fermentação dos alimentos pode ser descrito, com o uso de equações (McDONALD, 1981). Além disso, essa técnica pode ser proposta como uma ferramenta para prever o desempenho dos ruminantes, o que tem grande implicação econômica (BLÜMMEL; ØRSKOV, 1993), podendo ser utilizada para uma gama de espécies e ou cultivares de plantas forrageiras, de grãos e de suplementos.

A fermentação, que ocorre durante o metabolismo dos carboidratos ingeridos pelos ruminantes, é um processo anaeróbio, efetuado pela população microbiana ruminal, que converte os carboidratos em ácidos graxos, principalmente acético, propiônico e butírico. Nesse processo fermentativo, também são produzidos dióxido de carbono e metano, em quantidades variáveis, dependendo da concentração e das proporções relativas dos ácidos

produzidos (OWENS, GOETSCH, 1988; EUN et al. 2004). Segundo Moss, (1993) o metano não pode ser metabolizado pelo animal nem pelos microrganismos, a maior parte é removida do rúmen por expiração ou eructação, refletindo em perdas da energia bruta da dieta, além de ser caracterizado como um importante gás de efeito estufa, contribuindo com aproximadamente 15% para o aquecimento global (COTTON, PIELKE, 1995).

Deste modo, a presente pesquisa teve como objetivo analisar e quantificar a produção de gases pela digestão *in vitro* do capim-Marandu [(*Brachiaria brizantha* (Hochst ex A. RICH) STAPF)], quando submetido a quatro intensidades de pastejo, representadas pelas ofertas de forragem 5, 10 15 e 20% (kg de MSV/100 kg de peso corporal/dia) e as possíveis interações entre as ofertas de forragem, estações do ano com os gases produzidos.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 REVISÃO DA LITERATURA

Os métodos biológicos capazes de simular o processo digestivo, pelos microrganismos ruminais *in vitro* (TILLEY; TERRY, 1963) ou *in situ* (ØRSKOV et al., 1980), têm sido utilizados como alternativa ao método *in vivo* para a avaliação de plantas forrageiras.

Segundo Nocek (1988), a técnica *in situ* tem se destacado, por ser precisa e apresentar menor custo e trabalho do que as técnicas *in vivo*. Entretanto, a não descrição da cinética da digestão e a superestimação da fermentação ruminal têm sido apontadas como desvantagens dos métodos *in vitro* e *in situ*, respectivamente, resultando no emprego de outras técnicas, por exemplo, a produção de gases (MENKE et al., 1979; THEODOROU et al., 1994). Outro problema inerente aos métodos *in situ* e *in vitro* que se propôs solucionar por meio da técnica de produção de gases é o estudo das primeiras fases da fermentação, já que os procedimentos gravimétricos não são suficientemente sensíveis para medir as pequenas mudanças que ocorrem no peso do substrato durante as primeiras horas de fermentação (ROSETO, 2002).

As técnicas *in vitro* de produção de gases são capazes de simular o ambiente ruminal (THEODOROU et al., 1994), além de descrever a cinética de fermentação ruminal e estimar o consumo (BLÜMMEL; ØRSKOV, 1993). Dessa forma, elas têm se tornado uma opção para os estudos de plantas forrageiras (GETACHEW et al., 1998). Campos (2000b) observou em seus trabalhos que a produção de gases é uma técnica não invasiva, que visa diminuir, em experimentos, a utilização de animais canulados. Além disso, é

uma técnica capaz de medir eficientemente a qualidade dos volumosos analisados, principalmente quando há necessidade de se obter informações sobre a contribuição dos carboidratos solúveis e os prontamente disponíveis, como o amido.

As técnicas *in vitro* cujo princípio é a produção de gases (MENKE; STEINGASS, 1988; THEODOROU et al., 1994; MALAFAIA et al., 1998; CABRAL et al., 2000) baseiam-se na estimativa do volume de gases produzidos por meio da leitura direta com seringa graduada ou mesmo por conversão do volume a partir de dados de pressão.

A técnica de produção de gases tem sido usada para mensurar a degradação ruminal dos alimentos (MENKE; STEINGASS, 1988; GETACHEW et al., 1998) e ainda como indicador da digestibilidade da matéria seca (BLÜMMEL; ØRSKOV, 1993; WILLIAMS et al., 1996). Essa técnica tem potencial para investigar associação entre alimentos (PRASAD et al., 1994; WOOD; MANYUCHI, 1997; LIU et al., 2002).

Muitas equações têm sido propostas para descrever os dados de produção de gases. France et al. (2005) descrevem um modelo matemático para a produção de gases que pode (descrever) prever o desempenho animal. A descrição matemática das curvas de produção de gases permite a análise dos dados, a comparação dos substratos e a avaliação de ambientes de fermentação, proporcionando valiosa informação sobre a composição do substrato e das taxas de fermentação dos constituintes solúveis e estruturais do substrato. O desenvolvimento de novos equipamentos para avaliar a cinética de fermentação por esta técnica (CONE et al., 1994; THEODOROU et al., 1994; MAURICIO et al., 1999a) permite traçar curvas de produção de gases

com maior precisão, podendo aí os diferentes processos serem identificados, situação em que há a necessidade da utilização de modelos mais completos, que permitam melhor ajuste estatístico dos dados.

Têm sido propostos modelos matemáticos para estimar os parâmetros de degradação por meio de curvas de produção de gases (MERTENS; LOFTEN 1980; FRANCE et al., 1993; BEUVINK; KOGUT 1993; SCHOFIELD et al., 1994; GROOT et al., 1996), e todos apresentam vantagens e desvantagens de ajuste quando comparados, dependendo das condições experimentais e do tipo de substrato em estudo. Isto se dá com a necessidade da avaliação de modelos em diferentes condições experimentais e com uma variedade ampla de substratos, que permitirá escolher o melhor modelo para cada situação.

Os métodos *in vitro* e *in situ* são utilizados para estimar a degradabilidade da matéria orgânica dos alimentos para ruminantes. Alternativamente, a cinética de degradação dos alimentos pode ser determinada a partir do volume de gases produzido durante o processo fermentativo *in vitro* mediante a incubação do alimento com fluido ruminal e uma solução tampão à temperatura constante (39° C) (MENKE et al., 1979). Este método pode ser utilizado para determinar as taxas de degradação dos alimentos por monitoramento das taxas de produção de gases durante determinados intervalos de tempo (BEUVINK; KOGUT 1993).

A energia para o crescimento microbiano é derivada da fermentação dos carboidratos, principalmente amido e celulose, cuja digestão anaeróbica produz ácidos graxos voláteis (AGV) como succinato, formato e lactato, além de etanol, dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄), e traços de hidrogeno (H₂); (OPATPATANAKIT et al., 1994; SCHOFIELD et al., 1994). A produção de

gases da fermentação da proteína é relativamente pequena e a de gordura é insignificante (MAKKAR, 2001).

A técnica de produção de gases mede a quantidade de gás liberado diretamente como um produto da fermentação e indiretamente como um fluido ruminal neutralizado (SCHOFIELD et al., 1994). Os gases são produzidos principalmente quando o substrato é fermentado em acetato e butirato. A fermentação do substrato em propionato produz gases somente desde a neutralização do ácido; por consequência, menor produção de gases é associada com a essa fermentação (GETACHEW et al., 1998).

Nsahlai et al. (1995) demonstraram que a produção de gases está relacionada ao desaparecimento da FDN e, posteriormente, Pell et al. (1997) encontraram que a relação entre ambos é linear, com tendência marcadamente constante. Igualmente, encontrou-se alta correlação entre a produção de gases *in vitro* e a disponibilidade de amido nos grão de cereais (OPATPATANAKIT et al. 1994). Menke et al. (1979) encontraram que a produção de gás acumulada em 24 horas está bem correlacionada com a digestibilidade da matéria orgânica determinada *in vivo*. Sileshi et al. (1996) e López et al. (1998) reportaram significativas correlações entre a taxa de desaparecimento da matéria seca *in situ* e a taxa de produção de gases.

A técnica de produção de gases pode, também, ser usada para determinar a quantidade das frações alimentares (monossacarídeos, pectinas, amido, celulose e hemicelulose), prover energia aos microorganismos e determinar os componentes que inibem a atividade microbiana (NSAHLAI et al. 1995). A técnica, ainda, permite detectar diferenças entre os substratos e também tem sido usada para determinar diferença na fermentabilidade dos

restos culturais submetidos a diversos tratamentos físico-químicos (WILLIAMS, 2000). A produção de gases pode, também, ser potencialmente usada para comparar a cinética de fermentação, desde o rúmen até o intestino grosso das espécies, e o resultado de dietas (WILLIAMS et al., 1995).

Liu et al. (2002) mostraram que a técnica de produção de gases pode ser usada como medida da degradação ruminal dos alimentos e como indicador do consumo de matéria seca digestível. Khazaal et al. (1995), estudando a degradação da matéria seca *in situ* e produção de gases *in vitro*, constataram que o desempenho dos animais pode ser predito com eficiência. Khazaal et al. (1993), em estudos de comparação do método de digestão *in vitro* pela produção de gases com o método *in situ*, avaliando a ingestão e a digestibilidade de nove fenos de leguminosas, concluíram que a predição da ingestão e digestibilidade foi mais precisa no método *in situ*, quando comparado com o método de produção de gases. Entretanto, consideraram que o método de produção de gases apresenta a vantagem de predizer com eficiência o desempenho do animal em comparação com outras técnicas laboratoriais de digestão *in vitro*.

Uma limitação da técnica é a falta de uniformidade dos métodos, o que torna difícil comparar resultados entre grupos de pesquisa (WILLIAMS, 2000). Alguns pontos críticos do método de produção de gases podem ser citados: 1) pequena quantidade de amostra, tornando maiores os erros experimentais, 2) dificuldades na conservação e padronização de alimentos, para correção dos desvios causados pela mudança na atividade microbiana do líquido ruminal, 3) o alimento pode ter baixa produção de gases, mas na digestão *in vivo* pode ter alta digestibilidade e 4) pH dos alimentos e do líquido ruminal, no processo de

digestão, pode influenciar negativamente o crescimento microbiano, acarretando menor taxa de degradação do alimento ao final da incubação (MENKE et al., 1979).

Experimentos realizados por Mauricio et al. (1998; 2001), com a finalidade de comparar líquido ruminal e fezes como fonte de inóculo, constataram com fezes maiores tempos de colonização e menor capacidade de fermentação, o que possivelmente se deva a menor atividade microbiana, porque os microorganismos são originados principalmente no ceco e no cólon. A diferença na taxa de produção de gases entre o líquido ruminal e as fezes também pode ser explicada pela diversidade de microorganismos presentes (MAURICIO et al., 1998; 2001).

Um sistema automático, em que a produção de gases é registrada graficamente num mapa, foi descrito por Wilkins (1974). Trabalhando nesta linha, Pell; Schofield (1993) descreveram uma técnica para facilitar os estudos de digestão *in vitro*, por intermédio da medição contínua da produção de gases. Assim, constataram o desaparecimento da fibra pela medida da pressão dos gases produzidos em um frasco de volume fixo. Menke; Steingass, (1988) constataram alta relação linear entre o desaparecimento da FDN e a produção de gases. Um fator complicante no sistema de digestão *in vitro* pela produção de gases está no fato de que, inicialmente, o modelo matemático baseia-se na digestão da fibra de substrato puro, enquanto o alimento apresenta uma mistura de componentes (SCHOFIELD et al. 1994). Por exemplo, FDN (GOERING; VAN SOEST 1970) inclui hemicelulose, celulose e lignina, e esses componentes possuem diferentes taxas de digestão, bem como variam de alimento para alimento (VAN SOEST, 1994). Entretanto, o modelo matemático

descrito para digestão de substrato puro pode ser também simplificado para digestão de alimentos (SCHOFIELD et al., 1994).

Com as técnicas recentes de medidas computadorizadas de pequenos volumes de gases, Schofield et al. (1994) adequaram o modelo em função da quantidade dos gases produzidos e qualidade das curvas obtidas com os dados de produção dos gases. Para o modelo de produção de gases, em relação à digestão da fibra e ao crescimento microbiano, assume-se a proporcionalidade entre a produção de massa celular bacteriana e dos gases e as quantidades de substrato digerido (SCHOFIELD et al., 1994). Essa produção dos gases é gerada diretamente do metabolismo de carboidrato por oxidação (CO_2) ou redução (CH_4) dos produtos finais e, também, pela reação dos AGV com o tampão bicarbonato. Blummel; Ørskov (1993) descrevem que o sistema é basicamente semelhante ao descrito por Tilley; Terry (1963), em que o substrato é incubado com líquido ruminal. A diferença está no fato de que os gases são o produto da fermentação total do substrato e, conseqüentemente, do desaparecimento da matéria seca. Esse sistema de produção de gases oferece a vantagem de fornecer dados de duas digestibilidades dos alimentos com apenas uma incubação, na qual o volume de gases produzidos pode ser indicador da digestibilidade aparente do alimento pela perda de MS, e o resíduo que sobra pode ser quantificado para se calcular a digestibilidade “verdadeira” do alimento, medida após tratamento do resíduo com detergente neutro para remoção dos microrganismos, que podem estar presente em quantidade relativamente grande, após 24 ou 48 horas de incubação.

Na fermentação, que ocorre durante o metabolismo dos carboidratos ingeridos pelos ruminantes, são produzidos ácidos graxos voláteis,

principalmente os ácidos acético, propiônico e butírico. Nesse processo fermentativo, também são produzidos dióxido de carbono e metano, em quantidades variáveis, dependendo da concentração e das proporções relativas dos ácidos produzidos (OWENS, GOETSCH, 1988; EUN et al. 2004). Segundo Moss (1993), o metano não pode ser metabolizado pelo animal nem pelos microrganismos, a maior parte é removida do rúmen por expiração ou eructação, refletindo em perdas da energia bruta da dieta.

As maiores fontes de emissão de metano considerando as atividades agrícolas são representadas pela fermentação entérica em ruminantes, produção de arroz em terrenos alagados e fermentação de dejetos da pecuária (OLSEN et al., 2006). De acordo com Harper et al. (1999), a produção de arroz em terrenos alagados contribui com 11% do total do metano liberado para a atmosfera, a fermentação entérica em animais com 16% e a fermentação de dejetos com 17%.

A relação ácido acético:propiônico é um relevante ponto de destaque no estudo da metanogênese ruminal. Se esta relação chegar a 0,5, a perda de energia pode ser nula, porém, se todos os carboidratos forem fermentados a ácido acético e não produzirem nenhum ácido propiônico, as perdas energéticas podem chegar a 33%. A relação acético:propiônico pode variar entre 0,9 a 4,0, e, portanto, as perdas por metano podem variar amplamente (JOHNSON, JOHNSON, 1995).

Dentre as principais variáveis que influenciam a produção de metano em ruminantes, podem ser citados os fatores nutricionais (quantidade e tipo de carboidrato na dieta, nível de ingestão de alimento, presença de ionóforos ou lipídios), fatores metabólicos (taxa de passagem da digesta) e fatores

ambientais (temperatura e manejo dos animais) (MOSS, 1994; MILLER, 1995; McALLISTER, OKINE, MATHISON, 1996).

Segundo Walker (1997), novilhos alimentados com grande quantidade de alimento apresentaram maior ingestão de matéria seca, alcançando peso ao abate 90 dias mais cedo e produziram, em média, 11,9 kg a menos de metano em relação ao grupo controle (15,7 e 27,6 kg, respectivamente).

Kirchgebner, Windisch e Muller (1994) verificaram que, bovinos de corte recriados em pasto tiveram a emissão total de metano durante a engorda aproximadamente duas vezes maior que bovinos confinados, especialmente qualidade e a produção da forragem foram baixos quando recriados a pasto.

As concentrações e as proporções entre os ácidos acético, propiônico, butírico dependem muito da natureza da dieta e de seu valor nutritivo. Pesquisas conduzidas com diferentes condições de dietas comprovaram aumento na concentração dos ácidos acético, propiônico e butírico (GIGER-REVERDIN et al., 1996; ROA et al., 1997; GARCIA et al., 2000, LILA et al., 2004). Entretanto, outros autores não detectaram diferenças na produção dos AGV do rúmen (OLSON et al., 1994; MCGINN et al., 2004; KNORR et al., 2004).

As equações apresentadas na Figura 1 caracterizam a perda de hidrogênio e carbono para cada tipo de ácido graxo formado.

Figura 1. Esquema de produção de Ácidos graxos voláteis no rúmen.
Adaptado de HUNGATE (1966).

Supondo uma proporção AGV de uma amostra de líquido ruminal de 62, 22 e 16% para o ácido acético, propiônico e butírico, respectivamente, a maior

produção de H_2 ocorre durante a produção do ácido acético (HUNGATE, 1966), acarretando em maior produção de CH_4 , já que o H_2 , para ser eliminado, liga-se à moléculas de CO_2 , em um processo realizado pelas bactérias metanogênicas (KRUMHOLZ *et al.*, 1983). Este fato leva a um sistema de equilíbrio, pois à medida que ocorre a fermentação dos carboidratos no rúmen, aumentam os teores de hidrogênio que, se não forem removidos, inibem os sistemas enzimáticos, principalmente os processos que envolvem a nicotinamida adenosina difosfato (MILLER, 1995).

Segundo Menke *et al.* (1979), os resultados dos experimentos realizados até o momento mostram que os parâmetros empregados em modelos de cinética de produção gases e resultados de fator de partição são capazes de prever o consumo de matéria seca de volumosos e nível de emissão de metano pelos ruminantes. O mesmo autor cita que o fator de partição mede a eficiência da produção da massa microbiana ou a eficiência de produção de proteína microbiana, quanto maior o fator maior é a eficiência.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Local

O experimento foi realizado na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA/USP, em área sob responsabilidade da Coordenadoria do Campus de Pirassununga/SP, USP - CCPS, localizada em latitude 21°59' S, longitude 47°26' W e altitude de 634 m. O clima é subtropical do tipo Cwa, com inverno seco e verão quente e chuvoso, segundo a classificação climática de Köppen (OLIVEIRA; PRADO, 1984). Na Tabela 1 estão apresentadas as precipitações pluviométricas (mm) e as temperaturas médias mensais (°C) e nas Figuras 2 e 3 os extrato do balanço hídrico climatológico, para o ano de 2004 e média histórica de 30 anos para a cidade de Pirassununga. A pesquisa foi realizada numa pastagem formada em 1997 com *Brachiaria brizantha* [(Hochst ex A. Rich.) Stapf cv. Marandu].

Tabela 1 - Precipitação pluviométrica (mm) e temperatura média mensal (°C) de Pirassununga, SP.

Mês	Precipitação pluviométrica		Temperatura média diária	
	2004	Média †	2004	Média ‡
	mm		°C	
Janeiro	187	251	22,6	24,2
Fevereiro	419	217	22,2	24,3
Março	74	155	21,4	23,8
Abril	86	46	20,7	21,8
Maio	110	41	17,7	19,5
Junho	16	37	16,8	18,3
Julho	10	19	16,0	18,1
Agosto	0	25	17,4	20,0
Setembro	-	52	-	21,6
Outubro	-	126	-	22,6
Novembro	-	157	-	23,1
Dezembro	-	217	-	23,6

† Média histórica: 30 anos, Pirassununga, SP.

‡ Média histórica: 30 anos, Pirassununga, SP.

Figura 2. Extrato do balanço hídrico climatológico de Pirassununga, SP no ano de 2004.

Figura 3. Extrato do balanço hídrico climatológico de Pirassununga, SP Média histórica de 30 anos.

O solo da área experimental é classificado como LATOSSOLO VERMELHO Distrófico típico (EMBRAPA, 1999) e os resultados da análise de solo antes do início do experimento estão representados na Tabela 2.

Tabela 2. Análise química do solo.

P	MO	pH	K	Ca	Mg	H+Al	SB	CTC	V
mg.dm ⁻³	g/kg	CaCl ₂				mmol _c .dm ⁻³			%
8,7	20,2	5,3	1,3	23,0	10,0	2,1	34,0	56,1	59,0

A correção do solo foi realizada em novembro de 2001 utilizando-se o calcário magnesiano (PRNT = 90%), aplicado em superfície, para elevar o índice de saturação por bases para 70%. Em outubro de 2002 e dezembro de 2003, antes do início do experimento, foi realizada a uniformização dos piquetes à altura média de 20 cm do solo, utilizando-se de uma roçadeira e de animais em pastejo, respectivamente. Após a uniformização, a área foi adubada com o equivalente a 90 kg de P₂O₅ ha⁻¹ na forma de superfosfato simples.

Para as avaliações do ano de 2004, a área experimental foi uniformizada por pastejo (em dezembro de 2003) de acordo com os respectivos tratamentos experimentais. Após a correção do solo, as parcelas experimentais, em lotação rotacionada, de cada unidade experimental, receberam adubação nitrogenada e potássica de manutenção, em cobertura, durante o período das chuvas, utilizando-se como fontes uréia (45% N) e cloreto de potássio (58% de K₂O) nas doses de 50 e 25 Kg/ha/pastejo, respectivamente de N e K₂O.

2.2.2 Gramínea

A espécie de gramínea utilizada pertence ao gênero *Brachiaria*, o Capim-Marandu [*Brachiaria brizantha* (Hochst ex A. RICH.) STAPF. cv. Marandu] (**Figuras 4 e 5**), caracterizado pela sua tolerância à cigarrinha das pastagens, bom valor nutritivo, alta, robusta e com colmos iniciais prostrados,

mas com perfilhos predominantemente eretos, podendo chegar a altura de 50 cm.

Figura 4. Área experimental, animais em pastagem de Capim-Marandu.

Figura 5. Área experimental, animais em pastagem de Capim-Marandu.

As inflorescências atingem até 40 cm de comprimento, geralmente com 4 a 6 ráculos, equidistantes ao longo do eixo e medindo de 7 a 10 cm de comprimento (NUNES et al., 1984). O capim-Marandu é considerado de média exigência em fertilidade do solo, produz até 20 t de MS ha⁻¹ano⁻¹ e apresenta teores médios de proteína e digestibilidade de 10% e 60%, respectivamente (NUNES et al., 1984; WERNER et al., 1996; VALLE et al., 2000). Pastagens formadas por este capim possuem elevado potencial para a produção de carne bovina, proporcionando ganhos de 480 a 700 kg peso corporal ha⁻¹ ano⁻¹ em média (VALLE et al., 2000).

2.2.3 Delineamento experimental e manejo dos animais

Os tratamentos foram quatro níveis de oferta de forragem (OF): 5, 10, 15 e 20% (por exemplo: 5 kg de massa seca de forragem determinada no pré-pastejo para cada 100 kg de peso corporal por dia⁻¹), com ciclo de pastejo de 35 dias, sendo sete dias de ocupação e 28 dias de descanso. O delineamento experimental foi em blocos completos casualizados com 4 repetições. A área de 25,2 ha foi dividida em 16 unidades experimentais de 1,575 ha, subdivididas em 5 piquetes de 3150 m² (35 x 95 m), a fim de permitir a duração do ciclo de pastejo (**Figura 6**). As amostras utilizadas como substrato durante os ensaios laboratoriais foram colhidas durante seis ciclos de pastejo durante o ano de 2004, mais especificamente janeiro, fevereiro, março, maio, julho e agosto.

Figura 6. Croqui da área experimental.

Os animais utilizados eram bovinos da raça Nelore (*Bos taurus indicus* L.) com peso médio inicial de 250 kg e aproximadamente 15 meses de idade, suplementados exclusivamente com suplemento mineral vitamínico.

Em cada unidade experimental, animais *testers* (traçadores), em número de quatro em 2003 e três em 2004, eram mantidos para as avaliações de desempenho (GMD – kg/animal/dia), e animais reguladores foram adicionados ou retirados no decorrer das avaliações para ajustar a lotação de acordo com a OF estipulada. A pesagem dos animais foi realizada a cada ciclo de pastejo, sob jejum de água, forragem e sal por 16 horas.

Em 2003 a estimativa de massa de forragem (MF) no pré-pastejo e no pós-pastejo foi realizada de maneira direta pelo corte da forragem ao nível do solo em três pontos de área igual a 1m^2 ($1,0 \times 1,0$ m) e representativos da condição média do piquete. Em 2004, a avaliação foi realizada de maneira indireta com prato ascendente de 35,5 cm de diâmetro e 480,2 g de peso (Ashgrove, Palmerston North, Nova Zelândia), em cerca de 50 pontos por piquete. A calibração para a leitura do prato e MF foi realizada ao longo de todo o período experimental, tanto no pré como no pós-pastejo. Para cada calibração, foram escolhidos cinco pontos de 1m^2 de área ($1,0 \times 1,0$ m) com MF constante. Após a realização de quatro leituras em cada ponto, a forragem foi cortada ao nível do solo para a pesagem e determinação dos teores de matéria seca em estufa de circulação forçada de ar a 65°C por 72 horas.

As curvas de regressão linear foram geradas e os coeficientes de determinação obtidos foram superiores a 0,78 (BRAGA et al., 2004), e quando possível foram agrupadas por análise de covariância para limitar o número de equações utilizadas.

2.2.4 Coleta das amostras de pastagem

Amostragens no pré-pastejo, em todos os ciclos de pastejo do verão e inverno agrostológicos, para caracterizar a forragem aparentemente consumida, foram realizadas em cada piquete. A avaliação do consumo do pasto é bastante complexa, pois devem ser consideradas as inter-relações solo – planta - animal. Fatores como quantidade de forragem disponível e arquitetura do pasto, que têm influência no tamanho do bocado e tempo de pastejo, valor nutritivo, topografia do local, entre outros, interferem no consumo do animal. Para tanto, decidiu-se utilizar o método da diferença da massa de forragem entre o pré-pastejo do ciclo correspondente e o pós-pastejo do ciclo anterior. Deste modo, tinham-se as medidas das alturas médias do pasto no pós-pastejo, que servia de referência para a altura de corte da forragem do pré-pastejo em trinta pontos do pasto, considerando a altura média do piquete. Assim, a forragem oriunda das amostragens representava aquela aparentemente consumida pelos animais.

As amostragens foram realizadas apenas no 3º piquete de cada unidade experimental (**Figura 6**). Decidiu-se não utilizar gaiolas de extrusão, considerando a hipótese de que as plantas quando são protegidas em seu interior num determinado tempo, podem gerar um microclima responsável pelo acúmulo de forragem que não representaria o restante da forragem do piquete.

As amostras foram acondicionadas em sacos de polietileno, identificadas, enviadas ao laboratório para pesagem da matéria original. Assim, no laboratório, essas amostras foram levadas para estufa de circulação forçada à temperatura de 65 °C, até que se atingisse uma massa constante. Essas amostras foram armazenadas para análises.

2.2.5 Análises laboratoriais

As amostras secas foram moídas em moinho tipo Willey, dotado com peneira de malha de 1 mm, e acondicionadas em vidros, previamente identificados, para posteriores análises de laboratório.

As amostras acondicionadas e identificadas foram utilizadas para as seguintes determinações: matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA).

As análises de MS, MM e PB foram realizadas segundo método da A.O.A.C, (1980), FDN e FDA segundo Van Soest et al. (1991).

2.2.6 Técnica de produção de gases

Para a técnica de produção de gases, os ensaios foram realizados de acordo com a técnica semi-automática descrita por Theodorou et al. (1994) e Mauricio et al. (1999a). Os dados acumulativos da produção de gases foram gerados usando um transdutor de pressão e um "data logger" (PDL800, LANA/CENA/USP, Piracicaba/SP, Brasil), **Figura 7**.

Figura 7. Transdutor de pressão e um data logger (PDL800, LANA/CENA/USP, Piracicaba/SP, Brasil).

O substrato foi utilizado em triplicata com líquido ruminal de bovinos como inoculo, retirado de três fêmeas bovinas adultas da raça holandesa fistuladas. Para preparação do inoculo foram coletados, separadamente, o líquido e a parte sólida do conteúdo ruminal dos animais, e acondicionados em recipientes para manter a temperatura a 38-39 °C. No preparo do inóculo utilizou-se 50% da fase líquida e 50% da fase sólida do conteúdo ruminal, de acordo com Bueno et al. (2005).

Um ensaio com um substrato padrão foi realizado para posteriores correções dos ensaios com o substrato do experimento. Com o substrato do experimento foram realizadas três corridas.

Durante os ensaios, incubou-se 0,5 g de cada amostra em garrafas de 160 mL com 50 mL de solução tampão e 25 mL de inoculo (**Figura 8**). Garrafas sem substratos com inoculo e solução tampão (brancos) foram utilizadas para mensurar os gases produzidos para serem subtraídos das garrafas que foram inoculadas com substratos, inoculo e solução tampão, para se obter a produção líquida de gases.

As medições de gases foram realizadas às 6, 12, 18 e 24 horas após a inoculação. Os valores de degradabilidade da matéria seca *in vitro* foi determinada após 24 horas segundo Menke et al. (1979).

O fator de partição que é a relação entre a matéria orgânica digestível e o volume (mL) de gases produzido pelo substrato incubado foi realizado segundo Menke et al. (1979).

As determinações de Ácidos Graxos Voláteis (acético, propiônico e butírico) foram realizadas, em duplicata, por cromatografia gasosa segundo Erwin; Marco; Emery (1961).

Figura 8. Garrafas utilizadas nos ensaios laboratoriais. I) Garrafa com substrato. II) Garrafa com substrato + solução Tampão III) Garrafa com substrato + solução + inoculo. IV) Garrafa com substrato + solução + inoculo com rola de borracha.

2.2.7 Análise estatística

Para as análises estatísticas utilizou-se o procedimento MIXED do programa estatístico SAS (SAS, 1999). Para comparação das médias procedeu-se ao teste de médias (Tukey) entre as ofertas de forragens, estações do ano (verão, outono, inverno). O nível de probabilidade para a aceitação ou rejeição no teste de hipótese foi de 5%. Para as estações do ano, os ciclos dos meses de janeiro e fevereiro foram designados como verão, os ciclos dos meses de março e maio como outono e os ciclos dos meses de julho e agosto como inverno.

Os dados foram submetidos à análise da variância de acordo com o seguinte modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + P_j + e_{ij}$$

Y_{ij} = variável dependente;

μ = media geral;

T_i = efeito do tratamento (ofertas de forragem) (i = 5%, 10%, 15% e 20%);

P_j = efeito do período do ano (j = verão, outono e inverno);

e_{ij} = resíduo

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Tabela 3 estão apresentadas as alturas de pré-pastejo e pós-pastejo (cm), produção de massa de forragem por área (kg/ha), teores de proteína bruta (PB%), fibra em detergente ácido (%FDA) e fibra em detergente neutro (FDN%) da forragem de capim-Marandu.

Os dados da Tabela 3 não foram submetidos à análise da variância. Representam a variação média da altura do pasto antes e após o pastejo, bem como a produção de massa de forragem e sua composição em proteína bruta, fibra em detergente ácido e fibra em detergente neutro.

A diminuição da intensidade de pastejo, representada por valores percentuais crescentes da oferta de forragem aos animais, favoreceu as plantas, tanto no pré como no pós-pastejo, atingirem maior porte (cm), terem maior produção de massa de forragem, os animais a se comportarem num pastejo seletivo e, conseqüentemente, ao acúmulo de material senescente, tornando menores os teores de proteína bruta e crescentes os teores de fibra em detergente ácido e fibra em detergente neutro. Nas estações do ano, do verão para o inverno, as alturas, a produção de massa de forragem, a composição em proteína bruta e fibra em detergente neutro decresceram, enquanto os teores de fibra em detergente ácido permaneceram inalterados.

Os resultados de produção total de gases, matéria orgânica digestível, matéria seca digestível, mililitros de metano por gramas de matéria seca, mililitros de metano por gramas de matéria orgânica digestível, mililitros de metano por gramas de matéria seca digestível e fator de partição para as ofertas de forragem e estações do ano estão apresentadas na Tabela 4.

Herling et al. 2010 (**no prelo**), trabalhando na mesma área experimental em 2004 e com os mesmo níveis de oferta de forragem, observaram forte efeito linear de oferta de forragem no ganho por hectare ($p = 0,0164$), sendo o máximo valor obtido na oferta de forragem de 5%. Mesmo comportamento linear foi observado para a produção total de gases, matéria orgânica digestível e matéria seca digestível, com coeficientes de determinação de 0,96; 0,94 e 0,81 respectivamente.

Tabela 3. Alturas do pasto no pré-pastejo (APEP - cm) e no pós-pastejo (APOP - cm), produção de massa de forragem (PMF – kg/ha), teores de proteína bruta (PB%), Fibra em Detergente Ácido (FDA%) e Fibra em Detergente Neutro (FDN%) do capim-Marandu, considerando as intensidades de pastejo e as estações do ano durante o período experimental.

Composição	Oferta de Forragem (%)				Estações do Ano		
	5	10	15	20	Verão	Outono	Inverno
APEP (cm)	27,7	44,8	53,9	59,4	51,4	41,5	41,3
APOP (cm)	20,0	33,3	41,5	47,6	36,6	36,4	32,9
PMF (kg/ha)	7539	8948	11731	12260	8329	9615	6110
PB (%)	9,21	7,51	7,48	6,66	8,01	8,14	7,83
FDA (%)	33,60	35,83	35,69	37,45	35,65	35,36	35,93
FDN (%)	63,47	66,50	66,22	67,56	66,94	64,91	64,95

Tabela 4. Resultados de Produção Total de Gases (PTG), Matéria Orgânica digestível (MOD), Matéria Seca Digestível (MSD), mililitros de metano por gramas de Matéria Seca (mL CH₄/g MS), mililitros de metano por gramas de Matéria Orgânica Digestível (mL CH₄/g MOD), mililitros de metano por gramas de Matéria Seca Digestível (mL CH₄/g MSD) e Fator de Partição (FP) para as ofertas de forragem (OF) e estações do ano (EA).

Variável	Oferta de Forragem (OF) ‡				Estações do Ano (EA) †		
	5%	10%	15%	20%	Verão	Outono	Inverno
PTG (mL/g MS/24h)	202,60 A	191,16 B	187,29 B	179,35 C	221,11a	189,78 b	159,41 c
P				0,0001			
CV%				2,74			
MOD (g/kg MO)	641,47 A	602,03 B	594,03 B	557,29 B	656,03 a	580,10 b	573,49 b
P				0,0002			
CV%				3,68			
MSD (g/kg MS)	623,81 A	574,94 B	572,93 B	550,87 B	637,33 a	555,63 b	548,94 b
P				0,0001			
CV%				3,24			
mL CH₄/g MS	10,38 A	10,78 A	9,94 AB	9,09 B	12,41 a	10,83 b	6,89 c
P				0,0001			
CV%				6,41			
mL CH₄/kg MOD	61,49 A	60,72 A	62,28 A	60,81 A	51,90 c	55,80 b	76,28 a
P				0,0001			
CV%				4,40			
mL CH₄/kg MSD	56,87 A	57,84 A	56,75 A	58,44 A	46,50 c	49,99 b	75,94 a
P				0,0001			
CV%				4,11			
FP (MOD/mL gases)	3,11 A	3,12 A	3,18 A	3,12 A	2,92 c	3,17 b	3,52 a
P				0,0017			
CV%				5,64			

‡ Médias com letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente (P>0,05); † Médias com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente (P>0,05); **P** probabilidade, **CV** coeficiente de variação.

Os resultados de matéria orgânica e matéria seca digestíveis mostraram-se maiores para a oferta de forragem de 5%, semelhante ao ocorrido no verão, já para as demais ofertas de forragem e estações do ano não houve diferença estatística, resultado esse que pode ser explicado pelo fato de que na oferta de forragem de 5% há maior participação de folhas e no verão há menor quantidade de material senescente na composição morfológica. Herling et al. 2010 (**no prelo**) constataram na mesma área experimental que a quantidade do componente colmo da planta em pré-pastejo foi maior do que a lâmina foliar e material morto, especialmente para as ofertas de 15 e 20%.

Sundstol (1981) afirmou que o estágio de maturidade, método de conservação e processamento físico da forragem também influenciam em maior ou menor grau a produção de metano, ainda em geral, sua produção tende a aumentar, quanto mais avançado for o estágio fenológico da planta ingerida. Pelos resultados expressos em mililitros de metano por grama de matéria seca encontrados durante o estudo, constata-se relação contrária. Com o aumento na oferta de forragem tem-se um estágio de maturação mais avançado de alguns componentes da planta, devido ao acúmulo de forragem, e menor produção de metano, mesmo comportamento observado nas estações do ano.

O volume de metano em mL/g de matéria seca digestível - MSD e matéria orgânica digestível - MOD produzido durante a fermentação foi semelhante, considerando as ofertas de forragem, no entanto, para as estações do ano percebe-se aumento na produção de metano do verão (MSD – 46,5 e MOD - 51,9) para o inverno (MSD - 75,94 e MOD – 76,28, $P = 0,0001$).

Kurihara et al. (1999) estudaram a emissão de metano por bovinos da raça *Brahman* alimentados com três dietas distintas: feno de baixa qualidade, feno de alta qualidade e dieta rica em grãos, ao avaliarem a produção de metano em gramas de matéria orgânica digestível (g/kg MOD), observaram valores de 75,4; 64,6 e 32,1 g/kg MOD, para feno de baixa qualidade, feno de alta qualidade e dieta à base de grãos, respectivamente, os mesmos autores concluíram que em animais alimentados com gramíneas de baixa qualidade, a perda de energia na forma de metano foi 3,7% maior que animais alimentados com dieta com alto teor de grãos. Resultados apresentados por Moss (2001) evidenciam que o maior consumo de matéria orgânica digestível, deve levar a maior produção ruminal de CH₄ por animal, mas também resulta em maior eficiência produtiva e, conseqüentemente, menor emissão de metano por unidade de produto (leite ou carne) ou por ciclo produtivo.

Outra variável de importância nesse estudo é o fator de partição (FP), definido como a relação de substrato verdadeiramente degradado *in vitro* para o volume de gases produzido por ele. O fator de partição não apresentou diferença entre as ofertas de forragem, já para as médias do fator de partição foram diferentes entre as estações do ano, sendo crescentes do verão (2,92) para o inverno (3,52). Segundo Makkar (2001), o intervalo teórico para a PF é de 2,74 a 4,41, qualquer valor fora desse intervalo deve ser criteriosamente avaliado.

Na Tabela 5 estão apresentadas as médias de produção total de gases e matéria seca digestível, mostrando que houve interação entre as ofertas de forragem e as estações do ano para essas variáveis estudadas. Observa-se relação linear negativa, considerando as duas variáveis, com diminuição na

produção total de gases e no percentual de matéria seca digestível para todas as ofertas de forragem no decorrer das estações do ano.

Tabela 5. Resultados da interação entre as ofertas de forragem (OF) e as estações do ano (EA) para a Produção Total de Gases (PTG) e Matéria Seca Digestível (MSD).

Oferta de Forragem (OF)	Estações do Ano (EA)	PTG (mL/g MS/24h)	MSD (g/kg MS)
5%	Verão	229,49	654,38
	Outono	210,65	533,58
	Inverno	167,66	536,86
10%	Verão	224,90	644,07
	Outono	185,61	516,78
	Inverno	162,97	557,94
15%	Verão	219,83	577,89
	Outono	184,25	535,05
	Inverno	157,81	539,68
20%	Verão	210,23	673,00
	Outono	178,62	610,36
	Inverno	149,22	588,07
P	-	0,0287	0,0373

P probabilidade.

Na Tabela 6 estão apresentadas as médias da concentração de ácidos graxos voláteis (AGV) no líquido, após a produção de gases, as porcentagens molares dos ácidos acético, propiônico e butírico, a relação acético:propiônico e o pH em função das ofertas de forragem e estações do ano. Verifica-se que não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) para as ofertas de forragem e para as estações do ano entre as percentagens molares dos ácidos acético, propiônico e butírico, e também para a relação acético:propiônico e pH.

Segundo Pereira (1994), a produção de ácido propiônico tende a decrescer com o avanço da maturidade da planta e tem relação inversa com o

ácido acético, Analisando os resultados obtidos, constatou-se que a produção de ácido propiônico e a relação ácido acético:ácido propiônico foram semelhantes entre as ofertas de forragem e estações do ano.

Segundo Possenti et al. (2008), o ácido acético é sempre produzido em maior quantidade que os outros ácidos graxos voláteis do rúmen e suas concentrações não variaram muito com a espécie vegetal utilizada na dieta.

Tabela 6. Resultados das médias de porcentagem molar dos Ácidos acético (acetato), propiônico (propionato) e butírico (butirato), relação acético: propiônico (Ace:Prop) e pH para as ofertas de forragem e estações do ano.

Variável	Oferta de Forragem (OF) ‡				Estações do Ano (EA) †		
	5%	10%	15%	20%	Verão	Outono	Inverno
Acetato (%molar)	74,00 A	73,40 A	72,80 A	71,20 A	74,80 a	72,45 a	72,00 a
<i>P</i>				0,006			
<i>CV</i>				3,78			
Propionato (%molar)	16,33 A	16,31 A	15,55 A	15,57 A	16,43 a	15,76 a	15,89 a
<i>P</i>				0,0006			
<i>CV</i>				5,78			
Butirato (%molar)	5,77 A	6,22 A	6,98 A	6,15 A	6,35 a	6,16 a	6,27 a
<i>P</i>				0,008			
<i>CV</i>				3,67			
Relação Ace:Prop	4,56 A	4,54 A	4,70 A	4,63 A	4,49 a	4,63 a	4,48 a
<i>P</i>				0,006			
<i>CV</i>				4,78			
pH	6,72 A	6,72 A	6,70 A	6,61 A	6,68 a	6,76 a	6,62 a
<i>P</i>				0,001			
<i>CV</i>				2,05			

‡ Médias com letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente ($P>0,05$); † Médias com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente ($P>0,05$); ***P*** probabilidade, ***CV*** coeficiente de variação.

A relação ácido acético:propiónico (Ace:Prop) pode apresentar valores de 0,5, aonde a perda de energia pode ser nula, porém, se todos os carboidratos forem fermentados a ácido acético e não produzirem nenhum ácido propiónico, as perdas energéticas podem chegar a 33%. A relação Ace:Prop pode variar entre 0,9 a 4,0, e, portanto, as perdas por metano podem variar amplamente (JOHNSON, JOHNSON, 1995).

O pH é considerado fator importante quando se relaciona a produção de metano ao metabolismo ruminal. Segundo Van Kessel, Russell (1996) e Lana et al. (2000), bovinos recebendo dietas exclusivas de forragens apresentam pH ruminal relativamente com pequena variação (6,6 a 6,9), mas, quando recebem concentrado na dieta, o pH diminui para valores abaixo de 5,4. Bactérias no rúmen em animais com dietas exclusivas de forragens convertem CO_2 e H_2 em metano, enquanto, com dietas à base de concentrados ou de forrageiras de muito boa qualidade, a produção de metano diminui drasticamente quando o pH é menor que 6,0.

Segundo Silva e Leão (1979), os valores de pH inferiores a 6,0 podem acarretar diminuição da atividade dos microorganismos fibrolíticos, sendo que para Mertens (1992) a digestão da fibra declina em pH abaixo de 6,7 e para Orskov (1982) e Mould, Orskov e Mann (1983), abaixo de 6,2. A menor média encontrada no experimento foi de 6,61, muito acima daquela que afetaria a digestibilidade da fração fibrosa.

3. CONCLUSÕES

O manejo do pastejo, considerando a oferta de forragem e as estações do ano, pode ser uma ferramenta importante de manipulação da matéria seca e matéria orgânica digestíveis.

A produção de metano é estimulada quando se intensifica a utilização da forragem produzida durante o verão, considerando a matéria seca digestível.

No inverno há maior eliminação do metano produzido, considerando a matéria seca digestível e a matéria orgânica digestível.

No inverno verifica-se avaliando o fator de partição que há maior atividade microbiana.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.O.A.C. **Official methods of analytical chemists**. Washington. DC. 1980.

ASSIS, M. A.; SANTOS, G. L.; CECATO, U.; DAMASCENO, J.C.; PETIT, H.V.; BETT. V.; GOMES, L.H.; DANIEL, M. Degradabilidade “in situ” de gramíneas do gênero *Cynodon* submetidas ou não a adubação nitrogenada. *Reunião Anual Sociedade Brasileira de Zootecnia*, Botucatu, v.2. p. 351-353, 1998.

BEUVINK, J. M. W.; KOGUT, J. Modelling gas production kinetics of grass silages incubated with buffered ruminal fluid. *Journal of Animal Science*. 71: 1041-1046. 1993.

BLÜMMEL, M.; ØRSKOV, E.R. Comparison of in vitro gas production and nylon degradability of roughage in predicting feed intake in cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v. 40, p.109-119, 1993.

BRAGA, G.J.; MARCHESIN, W.A.; MACEDO, F. B.; PEDREIRA, C.G.S.; HERLING, V.R.; LUZ, P.H.C. **Estimativa indireta de massa de forragem em pasto de capim-braquiaria [(*Braquiaria brizantha* Hochst ex. A. Rich.) Stapf. cv. Marandu]**. IN: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41, Campo Grande, 2004. **Anais**. Campo Grande: SBZ, CD-Room, 2004.

BUENO, I.C.S.; CABRAL FILHO, S.L.S.; GOBBO, S.P.; LOUVANDINI, H.; VITTI, D.M.S.S.; ABDALLA, A.L. Influence of inoculum source in a gas production method. *Anim. Feed Sci. Tech.* 123–124, 95–105. 2005.

CABRAL, L.S.; VALADARES FILHO, S.C.; MALAFAIA, P.A.M. et al. Frações de carboidratos de alimentos volumosos e suas taxas de degradação estimadas pela técnica de produção de gases. *Rev. Bras. Zootec.*, v.29, p.2087-2098, 2000.

CABRAL, L.S. Avaliação de alimentos para ruminantes por intermédio de métodos in vivo e in vitro. 2002. 137p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2004. (CD-ROM).

CAMPOS, F.P. Digestibilidade de alguns volumosos através do monitoramento computadorizado de produção de gás *in vitro*. Jaboticabal, 2000b. 111p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CODAGNOME, H.C.V.; VIEIRA, A. M.; LEME, M.C.J.; AS, J.P.G. Qualidade do Capim-elefante em sistema de pastejo rotacionado. *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, Botucatu, v.2. p. 722-724, 1998.

CONE, J. W.; BEUVINK, J. M. W.; RODRIGUES, M. Use and applications of an automated time related gas production test for In Vitro study of fermentation kinetics in the rumen. *Revista Portuguesa de Zootecnia*. 1: 25 - 37. 1994.

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

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional e Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília, 1999. 412p.

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

EUN, J.S.; FELLNER, V.; GUMPERTZ, M.L. Methane production by mixed ruminal cultures incubated in dualflow fermentors. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.87, p.112-121, 2004.

FRANCE, J.; DHANOA, M. S.; THEODOROU, M. K. et al. A model to interpret gas accumulation profiles associated with in vitro degradation of ruminant feeds. *Journal of Theoretical Biology*. 163: 99 - 111. 1993.

FRANCE, J.; L'ÓPEZ, S.; KEBREAB, E. et al. A general compartmental model for interpreting gas production profiles. *Anim. Feed Sci. Technol.*, doi:10.1016/j.anifeedsci.2005.04.038. 2005.

GARCIA, C.C.G.; MENDONZA, M.G.D; GONZÁLES, M.S. et al. Effect of a yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) and monensin on ruminal fermentation and digestion in sheep. **Animal Feed Science Technology**, v.83, p.165-170, 2000.

GETACHEW, G.; BLÜMMEL, M.; MAKKAR, H.P.S. et al. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v.72, p.261-281, 1998.

GIGER-REVERDIN, S.; BEZAULT, N.; SAUVANT, D. et al. Effects of a probiotic yeast in lactating ruminants: interaction with dietary nitrogen level. **Animal Feed Science and Technology**, v.63, p.149-162, 1996.

GOERING, K.H.; VAN SOEST, P.J. *Forage fiber analysis* (apparatus, reagents, procedures, and some application), Washington: ARS-USDA (USDA *Agricultural Handbook*, 379p). 1970.

GROOT, J. C.; CONE, J. W.; WILLIAMS, B. A.; DEBERSAQUES, F. M. A.; LANTIGA, E. A. Multiphasic analysis of gas production kinetics for in vitro fermentation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*. 64: 77 - 89. 1996.

HARPER, L.A.; DENMEAD, O.T.; FRENEY, J.R.; BYERS, F.M. Direct measurements of methane emissions from grazing and feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.77, p.1392-1401, 1999.

HERLING, V. R.; et al 2010. **Performance and productivity of Nellore steers on Palisadegrass pastures in response to herbage allowance**, Scientia Agricola. Piracicaba. **No prelo**

HUNGATE, R.E. **The rumen and its microbes**. New York: Academic, 1966. 533p.

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

KHAZAAL, M.T.; DENTINHO, M.T.; RIBEIRO, J.M. et al. A comparison of gas production during incubation with rumen contents in vitro and nylon bag degradability as predictors of apparent digestibility in vivo and the voluntary intake of hays. *Anim. Prod.*, 57:105-112. 1993.

KHAZAAL, M.T.; DENTINHO, M.T.; RIBEIRO, J.M. et al. Prediction of apparent digestibility and voluntary intake of hays fed to sheep: comparison between using fibre components, in vitro digestibility or characteristics of gas production or nylon bag degradation. *J. Anim. Sci.*, 61(3):527-538. 1995.

KIRCHGEBNER, M.; WINDISCH, W.; MULLER, H. L. Methane release from dairy cows and pigs. In: AGULERA, J. F. Enregy metabolism of farm animals. Mojarar: CSIC Servicio publicaciones, 1994. p. 300-402. (EAAP Publ. 76).

KNORR, M. PATINO, H.O; MEDEIROS, F.S. et al. Efeito de diferentes níveis de nitrogênio não protéico em sais proteinados no pH e na concentração de amônia ruminal de bovinos alimentados com feno de baixa qualidade. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004.

KRUMHOLZ, L.R.; FORSBERG, C.W.; VEIRA, D.M. Association of methanogenic bacteria with rumen protozoa. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.29, p.676-680, 1983.

KURIHARA, M.; MAGNER, T.; HUNTER, R.A.; MCCRABB, G.J. Methane production and energy partition of cattle in tropics. *British journal of Nutrition*, v. 81, n. 3, p. 227-234, 1999.

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

LILA, Z.A.; MOHAMMED, N.; YASUI, T. et al. Effects of a twin strain of *Saccharomyces cerevisiae* live cells on mixed ruminal microorganism fermentation *in vitro*. **Journal of Animal Science**, v.82, p.1847-1854, 2004.

LIU, J. X.; SUSENBETH, A.; SÜDEKUM, K. H. In vitro production measurements to evaluate interactions between untreated and chemically treated rice straws, grass hay, and mulberry leaves. *Journal of Animal Science*. 80: 517-524. 2002.

LÓPEZ, S.; CARRO, M. D.; GONZÁLEZ, J. S.; OVEJERO, F. J. Comparison of different in vitro and in situ methods to estimate the extent and rate of degradation of hays in the rumen. *Animal Feed Science and Technology*. 73: 99-113. 1998.

MAKKAR, H. Recent advances in *in vitro* gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources. 2001. http://www.fao.org/DOCREP/ARTICLE/AGRIPPA/570_EN_toc.htm

MALAFAIA, P. A . M. ; VALADARES F^o, S. C. ; VIEIRA R. A. M. Determinação das frações que constituem os carboidratos totais e da cinética ruminal da fibra em detergente neutro de alguns alimentos para ruminantes. *Revista brasileira de Zootecnia*, 27 (4): 790-796, 1998.

MAURICIO, R.M.; MOULD, F.L.; DHANOA, M.S. et al. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminants feedstuff evaluation. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v.79, p.321-330, 1999a.

MAURICIO, R. M.; MOULD, F.; OWEN, E. Comparison of rumen liquor and faeces from cows as sources of microorganisms for the in vitro gas production technique. *Arquivo Brasileiro de Medicina y Zootecnia*. 50: 569-572. 1998.

MAURICIO, R. M.; OWEN, E.; MOULD, F. L. et al. Comparison of bovine rumen liquor and bovine faeces as inoculum for an in vitro gas production technique for evaluating forages. *Animal Feed Science and Technology*. 89: 33-48. 2001.

McALLISTER, A. T.; Okine, E. K.; MATHISON, G. W. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Canadian Journal of Animal Science*, V 76, n. 2, p. 231-234, 1996.

McDONALD I. A revised model for the estimation of protein degradability in the rumen. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 96: 251-252, 1981.

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

MENKE, K.H.; RAAB, L.; SALEWZKI, A. et al. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *J. Agric. Sci.*, 93(1):217-222. 1979.

MENKE, K.H.; STEINGASS, H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Develop.*, v.28, p.7-12, 1988.

MERTENS, D.R. Analysis of fiber in feeds and its use in feed evaluation and ration formulation. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE RUMINANTES, 1992, Lavras, MG. Anis... Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1992. p. 1-32.

MERTENS, D. R.; LOFTEN, J. R. The effect of starch on forage fiber digestion kinetics in vitro. *Journal of Dairy Science*. 63: 1437 - 1446. 1980.

MERTENS, D.R. Using fiber and carbohydrate analyses to formulate dairy rations. In: INFORMATIONAL CONFERENCE WITH DAIRY AND FORAGE INDUSTRIES, 1996, Wisconsin, USA. Wisconsin, [s.ed.], 1996. Proceedings. p.81-92.

MILLER, T.L. Ecology of methane production and hydrogen sink in the rumen. In: ENGELHARDT, W. V., LEONHARD-MAREK, S., BREVES, G., GIESSECKE, D. (Ed). **Ruminant Physiology**: Digestion, metabolism, growth and reproduction. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag. 1995. p. 317-332.

MILLER, T.L. Ecology of methane production and hydrogen sink in the rumen. In: ENGELHARDT, W.V.; LEONHARD-MAREK, S.; BREVES, G.; GIESSECKE, D. (Ed.) *Ruminant Physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction*. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag. 1995. p. 317-332.

MINSON, D. J. Forage in Ruminant Nutrition. Ed. Minson D. J. Academic Press, Toronto, p. 1-8, 1990.

MOSS, A.R.; Environmental control of methane production by ruminants. In: International conference on greenhouse gases and animal agriculture – GGAA, 1. 2001. Hokkaido. Proceedings... Hokkaido: Greenhouse Gases and Animal Agriculture. 2001. p. 35-43.

MOSS, A.R. Methane: Global warming and production by animals. Chalcombe Publications, Kingston, United Kingdom, 1993. 105 p.

MOSS, A.R. Methane production by ruminants – Literature review of I. Dietary manipulation to reduce methane production and II. Laboratory procedures for estimating methane potential of diets. *Nutrition Abstract and Reviews (Series B)*, v. 64, n. 12. p. 785-806, 1994.

MOULD, F.L.; ORKOV, E R.; MANN, S. O. Associative effects of mixed feed, 2. The effect of dietary additions of bicarbonate salts on the voluntary intake and digestibility of diets containing various proportions of hay and barley. *Animal Feed Science and Technology*, v. 10, n.1, p. 31-47, 1983.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrients requirements of dairy cattle. 7th ed. Washington, D.C: National Academy Press, 2001. 381p.

NOCEK, J. In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: a review. **Journal of Dairy Science**, v.71, p.2051-2069, 1988.

NSAHLAI, I. V.; UMUNNA, N. N.; NEGASSA, D. The effect of multi-purpose tree digesta on in vitro gas production from napier grass or neutral-detergent fibre. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1995; 69: 519-528. 1995.

NUNES, S.G.; BOOK, A.; PENTEADO, M.I.O.; GOMES, D.T. ***Brachiaria brizantha* cv. Marandu**. Campo Grande; EMBRAPA, CNPQC, 1984. 31p. (Embrapa, CNPQC, Documentos, 21).

OLESEN, J.E.; SCHELDE, K.; WEISKE, A.; WEISBJERG, M.R.; ASMAN, W.A.H.; DJURHUUS, J. Modelling greenhouse gas emissions from European conventional and organic dairy farms. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v.112, p.207-220, 2006.

OLIVEIRA, J.B.; PRADO, H. **Levantamento pedológico do Estado de São Paulo: quadrícula de São Carlos. II Memorial descritivo**. Campinas; IAC, 1984. 188p. (Boletim Técnico, 98).

OLSON, K.C.; CATON, J.S.; KIRBY, D.R. et al. Influence of yeast culture supplementation and advancing season on steers grazing mixed-grass prairie in the Northern Great Plain: II ruminal fermentation, site of digestion, and microbial efficiency. **Journal of Animal Science**, v.72, p.2158-2170, 1994.

OPATPATANAKIT, Y.; KELLAWAY, R. C.; LEAN, I. J. et al. Microbial fermentation of cereal grains in vitro. *Australian Journal of Agricultural Research*. 45: 1247-1263. 1994.

ORSKOV, E.R. Protein nutrition in ruminants. London: Academic Press, 1982. 160 p.

ØRSKOV, E.R.; HOVELL, F.D.B.; MOULD, F. The use of the nylon bag technique for evaluation of feedstuffs. *Trop. Anim. Produc.*, v.5, p.195-213, 1980.

OWENS, F.N.; GOETSCH, A.L. Ruminal fermentation. In: CHURCH, D.C. (Ed) **The ruminant animal: digestive physiology and nutrition**. Waveland Press, 1988. p.145-171.

PELL, A. N.; DOANE, P. H.; SCHOFIELD, P. In vitro digestibility and gas production. In: Simpósio sobre Tópicos Especiais em Zootecnia, Lavras, MG, p.109 - 132. 1997.

PEREIRA, A.M.F. **Avaliação da toxicidade por dihidroxipiridina através do consumo de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. em três raças de bovídeos**. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa, 1994. 117p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária e Zootecnia Tropicais) - Universidade Técnica de Lisboa, 1994.

POSSENTI, R. A. et al. Efeitos de dietas contendo *Leucaena leucocephala* e *Saccharomyces cerevisiae* sobre a fermentação ruminal e a emissão de gás metano em bovinos. **R. Bras. Zootec.**, Viçosa, v. 37, n. 8, ago. 2008.

PRASAD, C. S.; WOOD, C. D.; SAMPATH, K. T. Use of in vitro gas production to evaluate rumen fermentation of untreated and urea-treated finger millet straw (*Eleusine coracana*) supplemented with different levels of concentrate. *J. Sci. Food Agric.* 65:457-464. 1994.

ROA, M.L.; BARCENA-GAMA, J.R.; GONZÁLES, S.M. et al. Effect of fiber source and a yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* 1026) on digestion and the environment in the rumen of cattle. **Animal Feed Science and Technology**, v.64, p.327-336, 1997.

ROSERO, J. R. Estudo químico, "*in situ*", "*in vitro*" e microscópico da parede celular de cinco genótipos de sorgo colhidos em três épocas de corte. *Ph. D. Thesis*. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. 148p. 2002.

SAS INSTITUTE. **System for Microsoft Windows**, Release 8.0, Cary: 1999, ICD ROOM.

SCHOFIELD, P.; PITT, R.E.; PELL, A.N. Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. *J. Anim. Sci.*, 72(11):2980-2991. 1994.

SILESHI, Z.; OWEN, E.; DHANOA, M. S. et al. Prediction of in situ rumen dry matter disappearance of Ethiopian forages from an in vitro gas production technique using a pressure transducer, chemical analyses or in vitro digestibility. *Animal Feed Science and Technology*. 61: 73-87. 1996.

SILVA, C. J.F.; LEÃO, M.I. Fundamentos de nutrição dos ruminantes. Piracicaba: Livroceres, 1979. 330p.

SUNDSTOL, F. Methods for treatment of low quality roughages. In KATEGILE, J.A.; SAND, A.N.; SUNDSTOL, F. Utilization of low quality roughages in Africa. Agricultural University of Norway. Norway; As-NLH, 1981. p. 61-80.

THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S. et al. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v.48, p.185-197, 1994.

TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two technique for the in vitro digestion of forage crops. *J. Br. Grassl. Soc.*, 18:104-111. 1963.

VALLE, C.B.; EUCLIDES, V.P.B.; MACEDO, M.C.M. **Características das plantas forrageiras do gênero *Brachiaria***. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 17., Piracicaba, 2000. **Anais**. Piracicaba: FEALQ, 2000. p. 65-108.

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

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. **Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and non Starch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition**. *J. Dairy Sci.* 74, 3583-3597. 1991.

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

VAN SOEST, P.J. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2.ed. Ithaca: Cornell Press/Constock Publish. 476p. 1994.

WALKER, J. A. animal performance and methane emitted by steers under alternative production strategies. *Journal of Animal Science*, v. 75, n. 1, p. 271. 1997.

WERNER, J.C.; PAULINO, V. T.; CANTARELLA, H.; ANDRADE, N.O.; QUAGGIO, J.A. Forrageiras. In: Rajj, B. Van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. (Ed.). **Recomendação de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2. ed. Campinas: Instituto Agrônomo/Fundação IAC, 1996. p.261-273.

WILKINS, J.R. 1974. Pressure transducer method for measuring gas production by microorganisms. *Appl. Microbiol.*, 27:135-141.

WILLIAMS, B. A. Cumulative gas-production techniques for forage evaluation. In: Givens D I, Owen E, Omed H M and Axford R F E (editors). Forage Evaluation in Ruminant Nutrition. Wallingford (UK). CAB International. 475 p. 2000.

WILLIAMS, B. A.; BHATIA, S. K.; BOER, H. et al. A preliminary study using the cumulative gas production technique to compare the kinetics of different fermentations by use of standard substrates. *Annales de Zootechnie* 44: 35 - 46. 1995.

WILLIAMS, B. A.; CHUZAEMI, S.; SOEBARINOTO, J. et al. A comparison of ten rice straw varieties grown at two different altitudes during a wet and dry season, using the in vitro cumulative gas production technique. *Anim. Feed Sci. Technol.* 57:183–194. 1996.

WOOD, C.D.; MANYUCHI, B. Use of an in vitro gas production method to investigate interactions between veld hay and napier hay or groundnut hay supplements. *Anim. Feed Sci. Technol.* 67:265–278. 1997.