DIANA CAROLINA ZAPATA VÁSQUEZ

Inclusão de monensina ou tanino na dieta de bovinos sobre a emissão de metano determinada pela técnica do gás traçador SF_6

Pirassununga

2015

DIANA CAROLINA ZAPATA VÁSQUEZ

Inclusão de monensina ou tanino na dieta de bovinos sobre a emissão de metano determinada pela técnica do gás traçador SF_6

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
2015

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.3212
FMVZ

Vásquez, Diana Carolina Zapata
Inclusão de monensina ou tanino na dieta de bovinos sobre a emissão de metano determinada pela técnica do gás traçador SF_6 / Diana Carolina Zapata Vásquez. -- 2015.
63 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues.

.

1. Aditivo. 2. Gás de efeito estufa. 3. Ruminante. I. Título.

São Paulo, 24 de setembro de 2014

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito de aditivos alimentares sobre a produção de metano entérico determinada pela técnica do gás traçador SF6 e sobre a produção de metano nos dejetos em bovinos", protocolado sob o CEUA nº 8580120514, utilizando 6 Bovinos (6 femeas), sob a responsabilidade de Paulo Henrique Mazza Rodrigues, foi aprovado na reunião de 17/09/2014, e 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.

We certify that the Research "Effect of feed additives on enteric methane emission determined by sulfur hexafluoride (SF6) tracer technique and on methane production in bovine manure ", protocol number CEUA 8580120514, utilizing 6 Bovines (6 females), under the responsibility Paulo Henrique Mazza Rodrigues, was approved in the meeting of day 09/17/2014, and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: VÁSQUEZ, Diana Carolina Zapata

Título: **Inclusão de monensina ou tanino na dieta de bovinos sobre a emissão de metano determinada pela técnica do gás traçador SF_6**

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

A DIOS por todo su gran amor, por todas las bendiciones y por haberme dado la oportunidad de realizar este sueño acompañándome día a día.

A mi mamá Enelia del Socorro de Zapata, a mi papá José Ignacio Zapata Zapata y mi hermano John Jairo Zapata Vásquez (*in-memorian*), son mis tres angelitos en el cielo los cuales me han guiado y cuidado siempre. Gracias papás porque por ustedes soy la persona que soy, esta nueva meta en mi vida es por ustedes, gracias por toda la dedicación, educación, amor, apoyo y confianza que me brindaron. Siempre han sido mi fuerza para seguir luchando, doy gracias a Dios por haberlos tenido conmigo aquí y por seguir aún conmigo desde el cielo. Los amos mis angelitos.

A mis hermanos, mi hermanita la Profesora Tulia Inés Zapata Vásquez, mi hermanita la Psicóloga Ana María Zapata Vásquez y mi hermanito Ignacio Zapata, por todo el apoyo, amor, confianza, tiempo, fuerza y cariño ofrecido durante todo este tiempo, gracias por creer en mi, sin ustedes este sueño no sería igual, son mi motor, parte de mi fuerza para seguir adelante, los amo y doy gracias por haberme dado la oportunidad de tenerlos siempre conmigo, este trabajo es dedicado a ustedes gracias.

A mis sobrinitos John Jairo Laguado Zapata, Cielo Hernández Zapata, Stefania Hernández Zapata, Juan David Zapata, Anthony Agudelo Zapata y Juan Carlos Hernández Zapata que son como mis hijos, por ser el motor de mi vida, porque en cada uno de sus nacimientos cambiaron mis días, haciéndome cada vez más feliz y orgullosa de ser tía. Gracias por todas las alegrías que le han traído a mi corazón, los amo con todas mis fuerzas.

A mi novio y mi gran compañero en todo en este camino John Alexander López Caro, gracias por el inmenso apoyo, fuerza, amor y dedicación brindada en todos los momentos difíciles que se me presentaron. Gracias amor por aguantar la distancia entre los dos, para un mejor futuro juntos. Te amo mi amor.

Este trabajo es dedicado a cada una de las personas mencionadas anteriormente por ser ellas las que conocen cada parte de mi vida, mis alegrías, mis tristezas, mis llantos, mis caídas, mis risas y sobre todo lo duro que fue estar lejos de casa durante estos años, los extrañé enormemente, por tanto todos mis triunfos son para ustedes.

AGRADECIMENTOS

A DIOS por ser la luz de mi camino, por todo su amor y sabiduría dada, por darme toda la fuerza necesaria para afrontar cada obstáculo en el día a día. Gracias DIOS mío por las todas bendiciones recibidas.

A mi orientador Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues, por darme la oportunidad de ser su orientada, por su dedicación, paciencia, apoyo, ayuda en la realización de este trabajo, gracias por el tiempo dedicado para aclararme dudas y resolverme preguntas, gracias por siempre estar dispuesto a darme un espacio de su valioso tiempo. Por ser ese gran profesional y por compartirme parte de su experiencia. Muchas gracias por haber confiado en mí y darme la gran oportunidad para realizar este proyecto.

A Paula Meyer (Paulita) que realmente no tengo palabras como agradecer todo lo que me ayudo e hizo por mí, durante todo este tiempo, su ayuda fue demasiada, realmente usted fue como una mamá en Brasil, la cual me aconsejo y me enseño muchas cosas de este país (comida, cultura y hasta el portugués).

A mi gran amiga Laura Alexandra Romero Solórzano (Pilla), por ser esa persona incondicional, por haberme compartido parte de su experiencia y guiado durante mi estadía en Brasil, por ser esa fuerza y apoyo con la cual podía contar siempre, por ofrecerme una amistad sincera, por todos sus consejos dados y escucharme cuando más lo necesitaba. Gracias amiga la quiero mucho y la admiro.

A la Dra. Carolina Tobías Marino, por ser una persona incondicional, por todo el apoyo dado, la ayuda y la fuerza recibida en la realización de este trabajo. Por ser ese gran ser humano con la cual podía contar, por todos los momentos de alegrías y risas que pasamos (Magina), gracias por todas la palabras de ánimo.

A EMBRAPA Pecuária Sudeste y EMBRAPA Meio Ambiente por la gran ayuda en la realización de este proyecto, por el suministro de las Cangas y apoyo en los análisis de laboratorio.

Al Dr. Alexandre Berndt, por el apoyo brindado, gracias Dr. por todo su tiempo invertido durante este experimento, su ayuda y su experiencia dada en la realización de este proyecto fue muy grande.

A mi gran amiga y compañera de gran parte de esta experiencia en Brasil, Angélica Patricia Ordoñez Díaz (Kita), por ser un gran ser humano y brindarme una amistad sincera e incondicional, gracias por todas las risas y momentos vividos. La quiero mucho.

Al Prof. Luis Arturo Cárdenas, por toda la confianza dada y el inmenso apoyo brindando durante la realización de este sueño, gracias por todos los consejos segundo papá.

A Roberta Ferreira Carvalho (Miga) por ser ese gran ser humano, me llevo recuerdos muy gratos, muchas historias de Minas Gerais y enseñanzas que nunca se me olvidaran, gracias miga por todo el apoyo y cariño.

A Flavinho Perna Junior, por la paciencia, la ayuda, gracias por todas las experiencias compartidas y consejos dados.

A Lizbeth Collazos (Liz) por todos los consejos y la amistad brindada durante todo este tempo.

A mi equipo de trabajo y de investigación, Laura Alexandra Romero S. (Pilla), Roberta Carvalho (Miga), Carolina Tobias Marino (Carol), Lizbeth Collazos (Liz), Ricardo Nogueira (Chefe), Flavio Perna Junior (Perna), Mauricio Furlan Martins (Xibungo), Eduardo Cuelar Orlandi (Frodo), Lerner Arévalo Pinedo, Renata Gardenalli, Beatriz Rodrigues Diberto y Carolina Pinto (Carol). Gracias por brindarme su apoyo incondicional, gracias por la fuerza durante la realización de este trabajo. Muchas gracias por todas las risas, momentos vividos y por hacer de mi estadía en Brasil más amena a pesar de lo difícil que fue estar lejos de casa, no tengo como agradecer por todo.

A mi gran amigo africano Atanasio Vidane, por todas las experiencias vividas y por todos los momentos felices y tristes que pasamos lejos de casa, gracias por su gran apoyo y amistad.

A la Universidad de São Paulo, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y al Departamento de Nutrición y Producción Animal por darme la oportunidad de realizar mi maestría.

A la Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por el auxilio financiero del proyecto.

A la empresa Veronese®, por el suministro del producto evaluado.

A CAPES por la bolsa de estudio durante la realización de mi maestría.

Al señor Gilmar Botteon (meu Pai), por toda la ayuda recibida en la realización del proyecto, por los consejos de papá que me dio y por cuidar siempre de los animales del experimento.

A Ana Flavia Vitorino y a los señores Ari Luiz de Castro y Gilson Luiz Alves de Godoy, funcionarios del Laboratorio de bromatología y cromatografía del VNP (FMVZ-USP), por toda la ayuda en realización de los análisis laboratoriales. Gracias por todo lo que me enseñaron durante este tiempo.

A mis hermanos Tulia Inés Zapata (Tula), Ana María Zapata (Mary), Ignacio Zapata (Nachito), y mis sobrinos Jonh Laguado, Cielo Hernández, Stefania Hernández, Juan David Zapata, Anthony Agudelo y Juan Carlos Hernández, gracias por ser parte de mi fuerza, por ser mi motor para seguir adelante, porque a pesar de los kilómetros que nos separaban siempre estuvieron conmigo de corazón los amo, ustedes son mi vida entera.

A mi novio John Alexander por toda su compresión, palabras de ánimo y amor durante todo este proceso desde el inicio hasta el final, te amo.

A mis dos cuñados, Juan Carlos Hernández Porras, Sergio Agudelo, gracias por la fuerza y el apoyo.

Al Prof. Leonardo Avendaño, por ser una de las personas que me motivó a dar este paso en mi vida.

A Nara Regina Cônsolo y a toda su familia (la señora Fatima Brandão Cônsolo, el señor Tarcisio Cônsolo y Lara Cônsolo) muchas gracias por todo el cariño brindado y ayuda recibida durante este tiempo en Brasil, gracias por escucharmen en todo momento.

A mi familia Colombiana en Brasil, Jorge Toloza, Laura Romero, Ismael Morales, Glorita Urrea, Mariana Vasquez, Nubia Garzon, Elizabeth Certuche, Angélica Ordoñez, muchas gracias muchachos por todos los abrazos, el apoyo, las comidas y las risas que pasamos juntos, los quiero mucho.

A mis queridos amigos, Daniel Felipe Vanegas (Dany), Fabio Rios (Chino), Marlyn Tatiana Veloza (Amiguis de mi niñez), Tatiana Rivera (La Tatiana), Laura Rojas (Mamita), Margareth Mateus (Margarita), a doña Bárbara Cala, por siempre estar ahí sin importar la distancia con una voz de aliento, muchas gracias por todos los consejos y las risas que me brindaron.

RESUMO

VÁSQUEZ, D. C. Z. **Inclusão de monensina ou tanino na dieta de bovinos sobre a emissão de metano determinada pela técnica do gás traçador SF_6**. [Monensin or tannin inclusion in cattle diet on methane emission determined by the sulfur hexafluoride (SF_6) tracer technique]. 2015. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

A emissão de gases de efeito estufa (GEE) é uma das principais causas do aquecimento global, sendo uma problemática mundial das últimas décadas. O dióxido de carbono (CO_2), o metano (CH_4) e oxido nitroso (N_2O) são os principais GEE e os ruminantes são uns dos maiores contribuintes com a produção desses gases no mundo, devido ao processo digestivo de fermentação entérica. Na busca de estratégias para diminuir as emissões de metano e melhorar a produtividade animal, aditivos alimentares têm sido utilizados nas dietas dos animais. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a inclusão de aditivos alimentares sobre a produção de metano determinada pela técnica do gás traçador SF_6, assim como, o consumo de matéria seca, a dinâmica ruminal e a contagem total e diferencial de protozoários do rúmen. Seis vacas não-gestantes e não-lactantes, com peso vivo médio de 784 ± 87 kg e canuladas no rúmen, foram distribuídas a uma das três dietas experimentais, seguindo-se delineamento experimental em quadrado latino 3x3 replicado (n= 18 unidades experimentais), sendo os tratamentos: 1) Controle (CON): Dieta basal sem inclusão de aditivo; 2) Monensina (MON): Dieta com adição de 300 mg de monensina sódica por animal por dia; 3) Tanino (TAN): Dieta com adição de 68 g de extrato de tanino condensado de Acácia-negra (*Acacia mearnsii*) por animal por dia. Os alimentos foram fornecidos duas vezes ao dia, na forma de ração completa. Cada período experimental foi constituído por 21 dias, sendo 10 dias de adaptação às respectivas dietas. A partir do dia 16 até o dia 21 foram coletados os dados de consumo de matéria seca e de produção de metano, sendo este último determinado a cada 24 horas, pela técnica do gás traçador de SF_6. No dia 21, coletou-se conteúdo ruminal para determinação de protozoários. Quanto à dinâmica ruminal, foi realizado o esvaziamento ruminal nos dias 10 (3 horas após alimentação matinal) e 11 (imediatamente antes da alimentação matinal) de cada período experimental. Os resultados foram analisados através do procedimento MIXED onde o modelo incluiu o efeito de tratamento como fator fixo e os efeitos de animal dentro de quadrado, quadrado e período como fatores aleatórios. Não houve diferenças significativas ($P>0,05$) entre os tratamentos para as variáveis do consumo de matéria seca, como também, para os parâmetros de dinâmica ruminal ($P>0,05$) (matéria seca do conteúdo ruminal, massa líquida, massa sólida, massa total, assim como taxa de desaparecimento). A emissão de

metano (expressa em g/d, g/kg PV, g/kg $PV^{0,75}$ ou Mcal/Ani/d) com o tratamento com monensina foi menor em relação ao tratamento controle. Para a contagem total e diferencial de protozoários foi verificado efeito de aditivo para a subfamília *Diplodiniinae*, sendo que, o tratamento com monensina diminuiu em 27,5% a contagem desta subfamília em relação ao tratamento com tanino. Referente ao gênero *Isotricha*, foi observado que os tratamentos com monensina ou com tanino diminuíram em 31 e 30% respectivamente, este gênero em relação ao tratamento controle. A adição de monensina (17 mg/kg de MSI) revela-se uma alternativa para reduzir as perdas energéticas geradas na produção de metano, assim como também na redução de protozoários, que albergam microrganismos metanogênicos. Em relação ao tanino (0,4% na dieta) acredita-se que com doses mais elevadas na dieta possa resultar numa redução da emissão de metano.

Palavras-chave: Aditivo. Gás de efeito estufa. Ruminante.

ABSTRACT

VÁSQUEZ, D. C. Z. **Monensin or tannin inclusion in cattle diet on methane emission determined by the sulfur hexafluoride (SF_6) tracer technique**. [Inclusão de monensina ou tanino na dieta de bovinos sobre a emissão de metano determinada pela técnica do gás traçador SF_6]. 2015. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

The emission of greenhouse gases (GHG) is a major cause of global warming, being a worldwide concern in recent decades. Carbon dioxide (CO_2), methane (CH_4) and nitrous oxide (N_2O) are the main greenhouse gases and ruminants are one of the major contributors to the production of these gases around the world, due to the enteric fermentation process. In the search for strategies to reduce methane emissions and to improve animal productivity, food additives have been used in animal diets lately. Thus, the aim of this trial was to assess the inclusion of food additives on methane emissions in cattle, using the sulfur hexafluoride (SF_6) tracer technique, as well as on dry matter intake, rumen dynamics and total and differential counts of ruminal protozoa. Six non-pregnant and non-lactating rumen-cannulated cows (784 ± 87 kg) were assigned to a replicated 3x3 Latin square (18 experimental units). Treatments were: 1) Control (CON) – basal diet with no additive inclusion; 2) Monensin (MON)– addition of 300 mg of sodium monensin per animal per day, 3) Tannin (TAN) – addition of 68 g of concentrated extract of condensed tannin (*Acacia mearnsii*) per animal per day. The animals were fed total mixed ration twice daily. Each experimental period consisted of 21 days – the first 10 days were used for diet adaptation. From day 16 up to 21, data about dry matter intake and methane production were collected, the latter done every 24 hours using the sulfur hexafluoride (SF_6) tracer technique. On the day 21, ruminal content was sampled for protozoa determination. Regarding the rumen dynamics, the rumen was emptied on days 10 (3 hours post-morning feeding) and 11 (right before morning feeding) of each experimental period. The results were analyzed by MIXED procedure; the model included the effect of treatment as fixed factor and the effects of period, square and animal within square as random factors. There were no significant differences ($P>0.05$) among treatments for dry mater intake variables, nor for ruminal dynamics parameters (ruminal content dry matter, liquid mass, solid mass, total mass or disappearance rate). Methane emission (expressed in g/day, g/kg LW, g/kg $LW^{0.75}$ or Mcal/Ani/day) was lower for the group receiving monensin compared to the control group. For total and differential counts of protozoa, the additives affected the *Diplodiniinae* subfamily, i.e. monensin decreased the count of this subfamily by 27.5%, compared to tannin.

Regarding the *Isotricha* genus, treatments with monensin or tannin decreased it by 31 and 30% respectively, compared to the control treatment. The addition of monensin (17 mg/kg DMI) revealed to be an alternative to reduce the energy lost by methane production, as well as to decrease the protozoa, which host methanogen microorganisms. Regarding tannin (0.4% in the diet), it is believed that higher doses in the diet can lead to a reduction in methane emission.

Keywords: Additive. Greenhouse gases. Ruminant.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Proporções de ingredientes e composição bromatológica estimada das dietas experimentais 35

Tabela 2 - Efeito da inclusão de monensina ou tanino na dieta de fêmeas bovinas canuladas no rúmen sobre o consumo de matéria seca, expresso em quilograma por dia, porcentagem do peso vivo ou unidade de peso metabólico 46

Tabela 3 - Efeito da inclusão de monensina ou tanino na dieta de fêmeas bovinas canuladas no rúmen sobre a dinâmica ruminal 48

Tabela 4 - Efeito da inclusão de monensina ou tanino na dieta de fêmeas bovinas canuladas no rúmen sobre a produção de metano por bovinos determinada pela técnica do gás traçador SF_6 50

Tabela 5 - Efeito da inclusão de monensina ou tanino na dieta de fêmeas bovinas canuladas no rúmen sobre a contagem total e diferencial de protozoários 54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do efeito da monensina (M) no fluxo de íons na bactéria *Streptococcus bovis* 24

Figura 2 - Resumo dos efeitos dos ionóforos no rúmen 25

Figura 3 - Representação esquemática dos taninos ligados à proteína na dieta e o fluxo do N 28

Figura 4 - Possíveis locais de intervenção microbiana para redução metano em ruminantes 30

Figura 5 - Esquema das coletas para cada uma das variáveis que foram avaliadas dentro de cada período experimental 37

Figura 6 - Metodologia do esvaziamento ruminal 40

Figura 7 - Técnica do gás traçador SF_6 para a mensuração de metano 42

Figura 8 - Metodologia de contagem de protozoários 44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C	Carbono
CH_4	Metano
CMS	Consumo de matéria seca
Co_2-eq	Dióxido de carbono equivalente
EPA	Agencia de Protección Ambiental
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
IPCC	Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas
GEE	Gases de efeito estufa
MCTI	Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
MCT	Ministério da Ciência, Tecnologia
Kt	Taxa de desaparecimento
Kd	Taxa de digestão
Kp	Taxa de passagem
SF_6	Hexafluoreto de enxofre
AOAC	Official Methods of Analysis
ppm	Partes por milhão
mOsm	Miliosmolar
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
CO_2	Dióxido de carbono
µM	Micromolar
SF_6	Hexafluoreto de enxofre
NO_3	Nitrato
NH_3	Amônia
TC	Tanino condensado
TH	Tanino hidrossolúvel
MSI	Matéria seca ingerida
N_2O	Oxido nitroso
Da	Dalton

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO** 17
2 **REVISÃO DE LITERATURA** 19
2.1 FERMENTAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO AMBIENTE RUMINAL 19
2.2 MICRORGANISMOS RESPONSÁVEIS PELA FERMENTAÇÃO RUMINAL 19
2.3 FATORES QUE INFLUENCIAM A FERMENTAÇÃO RUMINAL 21
2.3.1 **Dieta** 21
2.3.2 **pH** 22
2.3.3 **Tampões** 22
2.3.4 **Ionóforos** 23
2.3.5 **Extratos de plantas** 26
2.3.5.1 Taninos 26
2.4 METANOGÊNESE EM RUMINANTES 29
2.5 EMISSÃO DE METANO E PERSPECTIVA AMBIENTAL 30
2.6 MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE METANO - TÉCNICA DO GÁS TRAÇADOR SF_6 31
2.7 CINÉTICA RUMINAL 32
2.7.1 **Taxa de desaparecimento** 33
3 **MATERIAL E METODOS** 34
3.1 ANIMAIS E INSTALAÇÕES 34
3.2 TRATAMENTOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 34
3.3 MANEJO NUTRICIONAL 35
3.4 PERÍODO EXPERIMENTAL 36
3.5 PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO 37
3.5.1 **Consumo de matéria seca** 37
3.5.2 **Digestibilidade aparente total** 38
3.5.3 **Dinâmica ruminal** 38
3.5.4 **Técnica do gás traçador SF_6 para a mensuração de metano** 40
3.5.5 **Metodologia da contagem total e diferencial de protozoários** 43
3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS 44
4 **RESULTADOS E DISCUSSÃO** 46
4.1 CONSUMO DE MATÉRIA SECA 46
4.2 DINÂMICA RUMINAL 47
4.3 EMISSÃO DE METANO DETERMINADA PELA TÉCNICA DO GÁS TRAÇADOR SF_6 49
4.4 CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE PROTOZOÁRIOS RUMINAIS 52
5 **CONCLUSÕES** 56
REFERÊNCIAS 57

1 INTRODUÇÃO

O aquecimento global é uma problemática mundial das últimas décadas, sendo a emissão de gases uma das principais causas. Dentre os principais gases de efeito estufa (GEE) causadores desse aquecimento, encontram-se o dióxido de carbono (CO_2), o metano (CH_4) e o óxido nitroso (N_2O). Apesar de, as concentrações de CH_4 e N_2O na atmosfera serem menores que a do CO_2, a mensuração de seus fluxos de emissão é importante devido a esses gases apresentarem potencial de aquecimento global de 23 e 296 vezes maior em relação ao CO_2, respectivamente (SNYDER et al., 2008).

A pecuária bovina contribui significativamente com a emissão de GEE no mundo, principalmente com a emissão de CH_4 de origem entérica (MCT, 2010), através do processo de fermentação ruminal. Este é o resultado da intensa atividade da microbiota presente no rúmen, que degradam os componentes da dieta (celulose, hemicelulose, pectina, amido, açúcares, entre outros) e os convertem em produtos, tais como, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e gases (CO_2 e CH_4). Os AGCC (principalmente acético, propiónico e butírico) representam cerca de 60 a 85% da energia metabolizável usada pelos ruminantes. Em relação à emissão de metano, esta é determinada pela dieta fornecida ao animal, sendo que, maior proporção de forragens favorece a síntese do ácido acético, disponibilizando um maior número de moléculas de hidrogênio no meio ruminal e favorecendo, desta forma, o aumento da produção de CH_4 (OWENS; GOETSCH, 1993), o que pode representar entre 2 a 12% de perda da energia bruta ingerida, de acordo com o indicado por Johnson e Johnson (1995).

A produção de metano pode ser reduzida através da manipulação da fermentação ruminal pela inclusão de aditivos na alimentação com o objetivo de minimizar os processos ineficientes para o animal. Pesquisas evidenciam uma grande variedade de aditivos que podem ser utilizados para este fim, incluindo inibidores da produção de metano, inibidores da proteólise, ionóforos, enzimas microbianas, entre outros (REIS et al., 2006; GERBER et al., 2013). A monensina tem sido um dos ionóforos mais estudados para aumentar a eficiência da utilização da energia no metabolismo dos microrganismos ruminais e do animal, porém, sua utilização tem gerado controvérsia quanto à possibilidade de resistência que este pode causar nos microrganismos ruminais do animal ou, inclusive para o homem (RUSSELL; HOULIHAN, 2003). Entretanto, os taninos condensados (TC), que são metabólitos secundários de plantas, formados por compostos fenólicos, podem formar complexos com proteínas e carboidratos, além disso, não são considerados tóxicos, devido a que não são

absorvidos no rúmen como acontece com os taninos hidrossolúveis (TH) que causam danos na membrana intestinal e em órgãos como: fígado, rins, entre outros (MAKKAR, 2003). Desta forma os CT mostram-se como uma possibilidade natural de mitigação do gás metano, através da modificação na fermentação ruminal, devido à proteção da proteína e celulose do alimento no rúmen. Portanto, a degradação de proteína é reduzida no rúmen enquanto que se aumenta a disponibilidade no intestino delgado.

Existem diferentes métodos utilizados para quantificar a emissão de metano em ruminantes, entre estes métodos mais conhecidos encontram-se: as câmaras respirométricas, a produção de gás *in vitro* e a técnica de hexafluoreto de enxofre (SF_6), sendo este último, um método que permite que os animais se desloquem e pastejem normalmente, eliminando a necessidade de confinar os animais em gaiolas barimétricas, permitindo, desta forma, um comportamento natural do animal (PRIMAVESI et al., 2004a). Portanto, a emissão de metano determinada por esta técnica é medida com a ajuda de um gás traçador dentro do rúmen, que possui uma taxa de emissão conhecida e constante, além disso, o traçador caracteriza-se por não ser tóxico, ser fisiologicamente inerte e mistura-se com o ar do rúmen do mesmo modo como o metano (JOHNSON; JOHNSON, 1995).

Como hipótese deste trabalho foi proposto que a taxa de emissão de metano e a contagem total e diferencial de protozoários seria menor em bovinos alimentados com dietas contendo monensina ou tanino quando comparada a uma dieta controle. Da mesma forma, a dinâmica ruminal será afetada por alguns dos tratamentos com inclusão de monensina ou tanino fornecidos na dieta de bovinos. Posto isto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a inclusão de monensina ou tanino na dieta de bovinos sobre a emissão de metano determinada pela técnica do gás traçador SF_6, assim como, sobre o consumo de matéria seca, a dinâmica ruminal, e a contagem total e diferencial de protozoários do rúmen.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FERMENTAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO AMBIENTE RUMINAL

Em ruminantes, a fermentação ruminal se dá pela atividade física e microbiológica no rúmen, que transforma os componentes dietéticos em proteína microbiana, ácidos graxos de cadeia curta, vitaminas do complexo B e vitamina K, bem como também em metano, dióxido de carbono, amônia e nitrato (OWENS; GOETSCH, 1993).

A manutenção e o bom desenvolvimento de uma população microbiana ruminal ativa depende de várias condições que os animais devem manter, como a osmolaridade, que varia entre 260 e 340 mOsm, sendo mantida razoavelmente constante e próxima a 280 mOsm (OWENS; GOETSCH, 1993); o pH ruminal que oscila entre 5,5 a 7,2, dependendo da dieta, sendo encontrados valores mais baixos de pH em intervalos curtos, após a alimentação dos animais com dietas ricas em carboidratos não estruturais; a temperatura do ambiente ruminal, que pode variar de 38°C a 41°C, sendo o ideal de 39°C para uma boa manutenção da população microbiana (STROBEL; RUSSELL, 1986) e; por último, o potencial redox que se encontra entre -250 e -450 milivolts, refletindo ausência de oxigênio e o excesso de potencial redutor (VAN SOEST, 1994).

2.2 MICRORGANISMOS RESPONSÁVEIS PELA FERMENTAÇÃO RUMINAL

O ecossistema ruminal está formado por microrganismos, representados principalmente por bactérias (10^{10} - 10^{11} células/mL), protozoários (10^{5} - 10^{6}/mL de conteúdo ruminal), fungos anaeróbios (10^{3} - 10^{5} zoósporos/mL) e *Archaeas* (metanogênicos) (ARCURI et al., 2006).

As bactérias ruminais estão agrupadas em função do substrato que fermentam e podem ser classificadas em fermentadoras de carboidratos estruturais (celulolíticas ou fibroliticas), não-estruturais (amilotíticas e pectinolíticas), proteolíticas e lipolíticas (ARCURI et al., 2006).

Os fungos ruminais podem contribuir com até 8% da massa microbiana. Existem evidencias de fungos como os *Neocallismastix frontalis*, *Sphaeromonas communis* e *Piromonas communis*, degradam carboidratos estruturais, exercendo desta forma, um papel na degradação da fibra, principalmente na estrutura ligno-celulose (YOKOYAMA; JOHNSON, 1993; CARVALHO et al., 2003).

Quanto aos protozoários ruminais, estes podem compreender cerca de 2% do peso do conteúdo do rúmen, sendo a maioria protozoários ciliados (10^3 - 10^4 por mL) (YOKOYAMA; JOHNSON, 1993). Os ciliados ruminais têm evoluído para um grupo altamente especializado. Estes são microrganismos anaeróbicos, que podem fermentar material vegetal para obtenção de energia, e crescer a temperaturas do rúmen, na presença de bilhões de bactérias. Gêneros como *Dasytricha* e *Isotricha* utilizam principalmente carboidratos solúveis e polissacarídeos não-estruturais das plantas como fontes de energia (NOGUEIRA FILHO et al., 1990; DEHORITY, 2003). Os protozoários da subfamília *Diplodiniinae* são considerados principalmente, microrganismos celulolíticos, aumentando suas populações em dietas fibrosas (WILLIAMS; COLEMAN, 1992).

Os protozoários do gênero *Entodinium* engolfam e utilizam grãos de amido, para o crescimento, sendo este gênero o mais predominante na população de bovinos (DEHORITY, 1991). Estes microrganismos podem ser sensíveis a determinados aditivos. Autores como Carulla et al. (2005) usando extrato de tanino obtido da *Acacia mearnsii*, reportaram uma redução no numero de protozoários holotricha em ovelhas. Da mesma forma, Animut et al. (2008) verificaram uma diminuição do total de protozoários de cabras, utilizando diferentes níveis (100, 67, 33 e 0 com base MS) de duas forragens (*Sorghum bicolor* e *Lespedeza striata*) com concentrações de tanino condensado de 0,3 e 151 g/kg de MS nas forragens respectivamente, sendo mais efetivo em reduzir o total de protozoários o tratamento com 100% de *Lepedeza striata*, pela maior concentração de tanino na dieta.

Alguns protozoários são celulolíticos, porém, cabe salientar que, os principais substratos utilizados pelos protozoários como fonte de energia são açúcares e amidos que são assimilados rapidamente e estocados na forma de amilopectina ou amido. Portanto, os protozoários têm um efeito estabilizador da fermentação, uma vez que as bactérias não têm acesso a uma quantidade excessiva de substratos prontamente fermentáveis (ARCURI et al., 2006).

Em animais alimentados com cana-de-açúcar a população de protozoários aumenta, enquanto que, dietas ricas em concentrados levam a um pH mais baixo, tornando o ambiente

prejudicial para os protozoários. De acordo a isto, pode-se indicar que o pH ideal para estes microrganismos é por volta de 6,5 (CARVALHO et al., 2003).

No rúmen, os microrganismos têm uma distribuição espacial e dividem-se em três proporções: população do líquido ruminal, microrganismos aderidos à fração sólida da digesta e população ligada à parede ruminal (ARCURI et al., 2006). Referente aos protozoários ciliados, estes se associam às partículas sólidas como uma estratégia de sobrevivência, uma vez que o seu tempo de geração (multiplicação) é superior à taxa de passagem da fase líquida (WILLIAMS; COLEMAN, 1997).

2.3 FATORES QUE INFLUENCIAM A FERMENTAÇÃO RUMINAL

2.3.1 Dieta

A composição da dieta determina parcialmente os produtos da fermentação ruminal, bem como a distribuição da população microbiana que utiliza os nutrientes dos alimentos no rúmen (OWENS; GOETSCH, 1993; VAN SOEST, 1994). Portanto, dietas com altos teores de proteína favorecem microrganismos proteolíticos, enquanto que, dietas com alto concentrado estão associadas a uma grande população de utilizadores de amido. Por outro lado, dietas baixas em fibra e altas em concentrados que tendem a ter altas taxas de digestão e produção de ácidos graxos de cadeia curta, que demandam um maior grau de tamponamento no ambiente ruminal, sendo favorecidos os microrganismos mais tolerantes ao pH baixo. Isso é contrário o que acontece com os microrganismos celulolíticos e metanogênicos, que são mais sensíveis a pH baixos (VALADARES FILHO et al., 2006).

Comumente, em dietas com uma proporção de volumoso:concentrado de 75:25, a relação molar de acetato, propionato e butirato varia em torno de 68:18:8%, entretanto, para dietas com uma proporção de 20:80 (v:c) esta relação pode variar de 54:31:11%, respectivamente, para as proporções de ácidos graxos de cadeia curta produzidos no rúmen (FAHEY; BERGER, 1993).

2.3.2 pH

O pH do rúmen pode influenciar profundamente a população microbiana e, consequentemente, nos produtos de fermentação, além de influenciar nas funções fisiológicas, como motilidade e absorção ruminal (NAGARAJA; TITGEMEYER, 2007).

As bactérias celulolíticas e os microrganismos metanogênicos podem ser gravemente afetados, especialmente quando o pH do rúmen cai abaixo de 6,0. Os protozoários do rúmen também são afetados pelo pH baixo, que pode ser provocado por excesso de concentrados na dieta. Por outro lado, quando o pH é mantido cerca de 5,5 um grande número de protozoários do gênero *Isotricha* e *Entodinium* podem estar presentes no rúmen, mas, abaixo de 5,5 o numero é muito reduzido (YOKOYAMA; JOHNSON, 1993).

Estudos têm demostrado, que quando o pH ruminal diminui de 6,9 para 5,5, ocorre um aumento na proporção molar de propionato, levando assim, à diminuição da relação acetato:propionato, por causa do decréscimo das bactérias celulolíticas, produtoras de acetato e burirato, que são sensíveis a um pH baixo, contrário do que acontece com as bactérias amilolíticas, produtoras de propionato, consideradas como microrganismos mais resistentes (CALSAMIGLIA et al., 2002; YANG et al., 2002).

2.3.3 Tampões

A função dos tampões é de neutralizar o excesso de ácidos produzidos no rúmen, sendo a saliva o tamponante natural do rúmen produzida principalmente pela glândula parótida com o estímulo da mastigação. A saliva está composta por 99 - 99,5% de agua, assim como, de material inorgânico (cloretos, fosfatos, bicarbonato de potássio e bicarbonato de sódio) e material orgânico (proteína, uréia e mucina). Esta secreção salivar nos ruminantes tem um pH entre 8,2 a 8,4 (FURLAN et al., 2011).

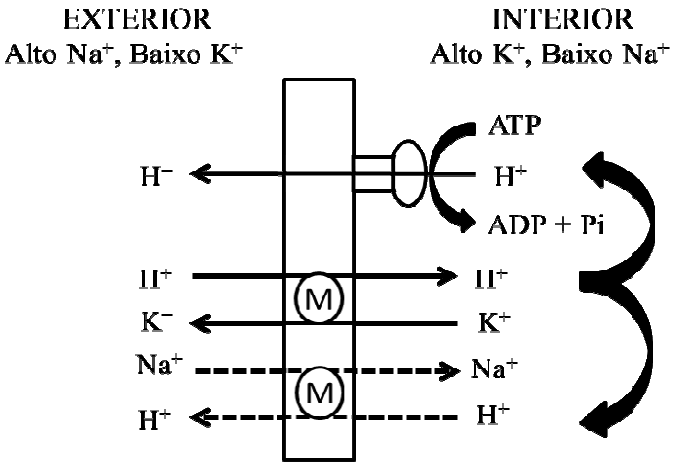
A saliva secretada pelo animal depende principalmente, do tipo de alimento ingerido, da preensão e da mastigação do alimento, os quais têm forte papel na indução da secreção deste fluido, sendo a ruminação um forte estimulo para ativar a secreção das glândulas salivares (FURLAN et al., 2011).

2.3.4 Ionóforos

Os ionóforos são substâncias altamente lipofílicas, tóxicos para muitas bactérias, protozoários e fungos, caracterizados por ter um peso molecular de 500 a 2000 daltons (RUSSELL; STROBELL, 1989). A monensina, principal ionóforo utilizado e pesquisado na nutrição de ruminantes, tem sido usada nos Estados Unidos, em dietas para gado de corte em sistemas de pastejo desde 1976 e para animais de corte confinados desde 1978. Atualmente, são conhecidos mais de 120 tipos de ionóforos resultantes da fermentação de diferentes tipos de actinomicetos, que são produzidos principalmente por bactérias do gênero *Streptomyces,* dos quais, unicamente quatro são admitidos para uso nas dietas dos ruminantes, sendo estes: monensina, lasalocida, salinomicina e laidlomicina propionato (MORAIS et al., 2011).

O mecanismo de ação está relacionado com a capacidade dos ionóforos em se ligar a cátions monovalentes, como sódio, e formar complexos lipofílicos capazes de atravessar a membrana celular de bactérias Gram-positivas e de protozoários (RUSSELL; STROBEL, 1989; CHOW et al., 1994), facilitando assim, o movimento de cátions através da membrana celular. As bactérias Gram-positivas são forçadas a utilizar sistemas de transporte celular para dissipar o H^+ e Na^+ intracelular, tentando manter o equilíbrio da célula (Figura 1). Nesse processo há gasto de ATP, provocando queda da reserva energética, alterando a divisão celular e, como consequência, diminui o funcionamento eficiente da bomba iônica, levando a um aumento da pressão osmótica e possivelmente conduzindo à morte dos microrganismos (RUSSELL; STROBEL, 1989; MORAIS et al., 2011).

Figura 1 - Representação esquemática do efeito da monensina (M) no fluxo de íons na bactéria *Streptococcus bovis*



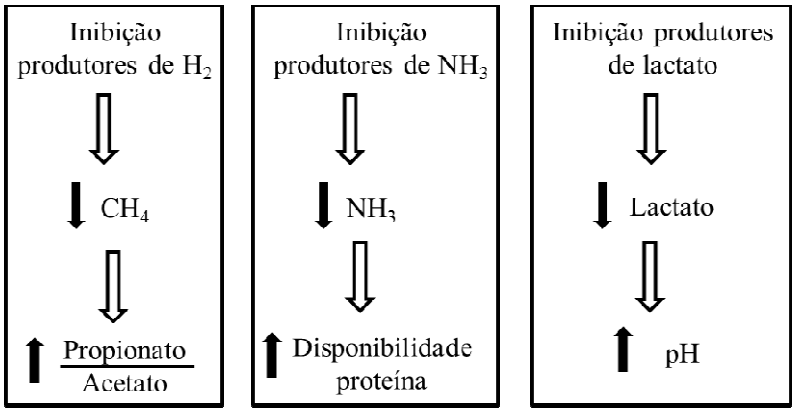
Fonte: Adaptado de Russell e Strobell (1989).

As bactérias Gram-negativas são mais resistentes aos ionóforos em virtude de sua célula ser constituída por uma membrana externa de proteção formada por proteínas, lipoproteínas e lipopolissacarideos, a qual contém porinas com tamanho limite de aproximadamente 600 daltons, que impedem a entrada dos ionóforos. Em contrapartida, as bactérias Gram-positivas possuem só uma camada espessa de peptidoglicanos que, por ser porosa, não impede a ação da monensina (MORAIS et al., 2011).

Os efeitos da monensina sobre a fermentação ruminal estão relacionados com as bactérias produtoras de ácido acético, butírico, lático, fórmico e de hidrogênio como produto final, já que estas são suscetíveis aos ionóforos, enquanto que, as bactérias produtoras de ácido succínico e propiônico são resistentes (MORAIS et al., 2011).

Por outro lado, o efeito da monensina sobre a metanogênese é indireto. Como dito anteriormente, está relacionado com a inibição de bactérias que produzem hidrogênio e formato (Figura 2). Portanto, a produção de metano diminui devido ao declínio na produção de H_2, considerado como o substrato primário da metanogênese ruminal. Simultaneamente, a redução do número de protozoários causada pela monensina leva também a uma redução da produção de metano ruminal, já que os protozoários fornecem H_2 às *Archaeas* metanogênicas (RUSSELL; STROBELL, 1989).

Figura 2 - Resumo dos efeitos dos ionóforos no rúmen



Fonte: Adaptado de Russell e Strobel (1989).

Outros dos efeitos atribuídos ao uso de monensina na dieta dos animais (Figura 2) é a diminuição da produção de amônia, já que ionóforos podem inibir o crescimento de algumas bactérias proteolíticas ruminais; além disso, um dos benefícios do uso da monensina é a diminuição de desordens metabólicos, como a acidose ruminal e o timpanismo, sendo este um efeito atribuído à redução da produção de ácido lático no rúmen por parte da monensina (RUSSELL; STROBEL, 1989).

Em um estudo realizado por Lana e Russell (2001), indicaram que a adição de doses crescentes (0 a 10 µM) de monensina causou decréscimo na produção de metano em amostras provenientes de bovinos fistulados no rúmen alimentados tanto com 100% de forragem, como com uma relação de 90% de concentrado e 10% de volumoso. Os autores indicam que a produção de metano foi diminuindo a partir da adição de um nível de monesina de 0,5 µM e que esse efeito foi ainda maior, para os animais que receberam forragem, devido a que a produção de metano para animais recebendo 90% de concentrado já era baixa. Por outro lado, Odongo et al. (2007) reportaram que a adição de 24 mg de monensina por kg de matéria seca ingerida, resultou em uma redução na produção de metano em g/dia de 7% em relação à dieta controle (sem monensina) em bovinos da raça Holstein em lactação.

Cabe salientar que, os ionóforos são proibidos pela União Europeia, embora os genes responsáveis pela resistência de bactérias ruminais aos ionóforos não tem sido identificados e há pouca evidência de que a resistência ao ionóforo pode ser transmitida a partir de uma bactéria para outra. Por conseguinte, a utilização de ionóforos na alimentação animal não é susceptível de ter um impacto significativo sobre a transferência da resistência aos antibióticos do animal para o homem (RUSSELL; HOULIHAN, 2003).

2.3.5 Extratos de plantas

As plantas produzem metabólitos secundários que servem como mecanismos de defesa contra depredadores como: bactérias, fungos, herbívoros e insetos. Estes metabólitos podem também, ser usados como corantes, aromas e fragrâncias, como é no caso dos taninos e quinonas, que são responsáveis pela pigmentação das plantas (COWAN, 1999; MARIENHAGEN; BOTT, 2013).

2.3.5.1 Taninos

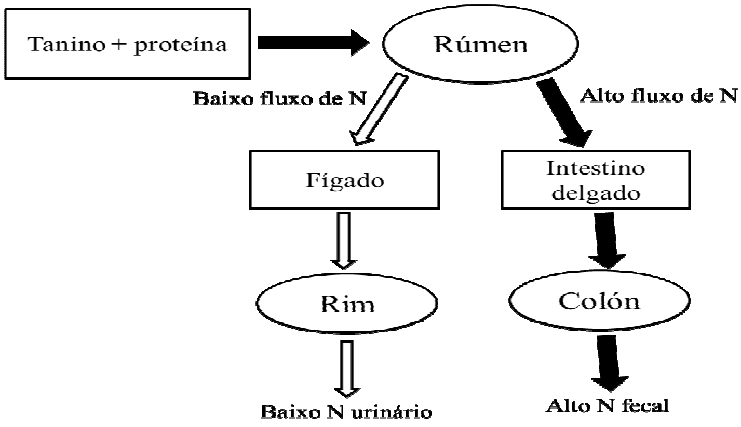
Os taninos são substâncias polifenólicas com alto peso molecular (500 a 20000 Da) e alta complexidade, sendo classificados em taninos condensados ou proantocianidinas e hidrolisáveis (MAKKAR, 2003; FRUTOS et al., 2004). Os taninos hidrolisáveis (TH) podem ser divididos em taninos gálhicos, em que a parte fenólica é o ácido gálhico; e em taninos elágicos, em que a parte fenólica é o ácido hexahidroxidifénico, que após à hidrólise origina o ácido elágico. Os taninos hidrolisáveis são considerados tóxicos para os ruminantes, por serem mais susceptíveis a hidrólise quimica ou enzimática em relação ao CT (REED, 1995). A toxicidade destes parece ser devido à absorção dos produtos degradados dos taninos hidrolisáveis pelos microrganismos do rúmen e pela maior carga de compostos fenólicos na corrente sanguínea, que supera a capacidade do fígado para eliminá-los. Quanto aos taninos condensados (TC), estes são constituídos por duas ou mais unidades de flavan-3-ol, que quando aquecidos em meio ácido estes compostos originam antocianidinas (compostos de grande importância na cor das uvas e vinhos) (KHANBABAEE; VAN REE, 2001). Os TC não são absorvidos via corrente sanguínea em condições normais, como também não são susceptíveis de danificar órgãos como: o fígado, rim, baço, entre outros. Porém, danos na membrana intestinal causados por concentrações elevadas de taninos ou outros agentes irritantes, podem desencadear a que os taninos condensados sejam absorbidos via sanguínea, causando desta forma, danos em órgãos semelhantes aos afeitados pelos TH (MAKKAR et al., 1995a; REED, 1995; MAKKAR, 2003).

Os taninos formam complexos, principalmente, com proteínas através de ligações hidrofóbicas, como também, por pontes de hidrogênio em vários locais das proteínas e carboidratos, devido ao grande numero de compostos fenólicos livres que estes compostos possuem (SILANIKOVE et al., 2001). Além disso, formam também, complexos em menor proporção com íons metálicos, polissacarídeos e aminoácidos, reduzindo a digestibilidade destes (REED, 1995; MAKKAR, 2003). Entretanto, a presença de baixas concentrações de taninos na dieta pode ser utilizada como potencial modulador da fermentação ruminal (MORAIS et al., 2011). A força de ligação dos complexos entre taninos e proteínas depende de características de ambos, como: peso molecular, estrutura terciária e compatibilidade entre os locais de ligação.

Outro fator de grande importância na formação destes complexos é o pH do rúmen (6,0 - 7,0), que permite a formação do complexo estável entre o tanino e a proteína. Assim, os taninos podem exercer seu efeito inibitório sobre a degradação das proteínas no rúmen. Uma vez passado o rúmen, com o pH mais baixo no abomaso (pH 2,5-3,5), dissociam-se os complexos de tanino-proteína, levando como resultando um aumento da absorção e digestão de aminoácidos no intestino delgado (AERTS et al., 1999).

Como mencionado anteriormente, os taninos em ruminantes podem produzir efeitos positivos, como: reduzir a quantidade de proteína digerida no rúmen, aumentar a quantidade de proteína disponível no intestino delgado e também eliminar parasitas e diminuir o timpanismo espumoso. A mudança do local da digestão de proteínas também é conhecido como “escape ruminal de proteínas”. Os ruminantes alimentados com dietas com taninos tendem a excretar menos N urinário e aumentar um pouco o N fecal, como mostrado na Figura 3 (MUELLER-HARVEY, 2006). Por outro lado, um dos efeitos adversos dos taninos é que podem reduzir a ingestão de alimentos nos animais, isto, como consequência da redução da aceitabilidade dada pela adstringência que os taninos possuem, causada pela formação de complexos entre os taninos e a glicoproteína salivar, o que pode aumentar a salivação e diminuir a aceitabilidade dos alimentos (REED, 1995).

Figura 3 - Representação esquemática dos taninos ligados à proteína na dieta e o fluxo do N



Fonte: Adaptado de Mueller-Harvey (2006).

No rúmen, o metano é produzido durante a fermentação anaeróbia dos componentes da dieta pelas *Archaeas* metanogênicas. São conhecidos dois mecanismos de ação dos taninos sobre a metanogênese, sendo estes, um efeito de tipo direto sobre os microrganismos do rúmen, onde os polifenois reagem com a parede celular das bactérias e as enzimas extracelulares segregadas, inibindo desta forma, o transporte de nutrientes dentro da célula retardando assim, o crescimento dos microrganismos (McSWEENEY et al., 2001). O outro efeito é de tipo indireto sobre a degradação da fibra, que surge pela possível formação de complexos tanino-celulose, reduzindo assim, a atividade fibrolítica e a produção de hidrogênio, que é o substrato para os microrganismos (BENTO et al., 2005; TAVENDALE et al., 2005).

Cieslak et al. (2012) demostraram uma redução na produção de metano, na concentração de amônia, na população de protozoários e na relação acetato:propionato, ao utilizar 2 g de tanino (extrato de *Vaccinium vitis idaea*) por kg de MS na dieta de vacas leiteiras. Entretanto, não foi afetada a proporção total de AGCC.

Por outro lado, Grainger et al. (2009) num experimento realizado com vacas em lactação usando tanino condensado obtido da *Acacia mearnsii* em 0,9 e 1,5% da MS (10,8 e 19 g/kg de MSI), foi possível demostrar uma diminuição na produção de metano em 14 e 29% respectivamente, assim como também, foi reduzido o consumo de matéria seca dos animais em 13,21 e 26% respectivamente. Da mesma forma, Carulla et al. (2005) relataram redução em media de 13% na emissão de metano, quando o tanino condensado (25 g/kg de MS) obtido da *Acacia mearnsii* foi colocado na dieta de ovelhas.

Os sistemas de produção animal têm o objetivo de atender todas as exigências de energia e proteína, com a finalidade de aprimorar o desempenho do animal para o máximo beneficio econômico, sendo que, estas necessidades de proteína têm sido claramente definidas. Portanto, quando se têm dietas com excesso de proteína em relação às necessidades do animal, os taninos condensados podem reduzir a degradação sem limitar a disponibilidade de aminoácidos para absorção. Porém, quando utilizado em dietas com teores de proteína abaixo das exigências do animal, a presença do tanino será prejudicial para o desempenho animal (WAGHORN, 2008).

2.4 METANOGÊNESE EM RUMINANTES

O metano é um subproduto da fermentação ruminal e sua importância se apoia na função que este gás tem de servir como "dreno" de hidrogênio. A via metabólica para degradação da fibra mais utilizada pelas bactérias celulolíticas gera grande parte do CH_4 ruminal, através da transferência interespecífica de hidrogênio para as *Archaeas* que produzem o CH_4 (MORAIS et al., 2011).

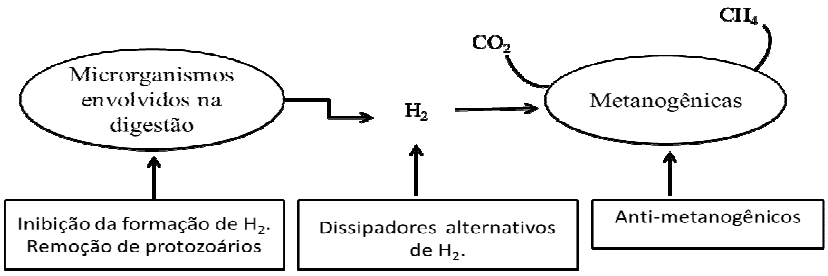
Para obter o rendimento máximo de energia a partir da fermentação anaeróbia de carboidratos, é necessário um dissipador de elétrons para a regeneração do NAD^+. A geração de metano deve ser vista como um dissipador de energia e, como dito anteriormente, cumpre a função de "dreno" do hidrogênio produzido pelos microorganismos ruminais, permitindo assim, um maior rendimento total de ATP. Outros dissipadores de hidrogênio existem no rúmen, como por exemplo: conversões de NO_3 para NH_3 e a saturação dos ácidos graxos insaturados. No entanto, estes receptores de H encontram-se em níveis relativamente baixos na dieta e, assim, não são quantitativamente importantes (FAHEY; BERGER, 1993).

A quantidade de metano gerado está relacionada com os produtos finais produzidos na fermentação de carboidratos. Por exemplo, em uma dieta rica em grãos, o resultado é uma razão molar de 1, de acetato:propionato (3 glicose $\longrightarrow$ 2 acetato + 2 propionato + butirato + 3 CO_2 + CH_4 + 2 H_2O). Em contraste, uma dieta alta em forragens resulta em uma razão molar de 3, de acetato:propionato (5 glicose $\longrightarrow$ 6 acetato + 2 propionato + butirato + 5 CO_2 + 3 CH_4 + 6 H_2O). Isto acontece, devido a que o CO_2 e H são subprodutos da conversão da

glicose em acetato e butirato. Entretanto, as vias de succinato e acrilato utilizam C e H para síntese de propionato (FAHEY; BERGER, 1993).

Do total da energia bruta ingerida pelo animal, cerca de 2 a 12% pode ser perdida na forma de metano (JOHNSON; JOHNSON, 1995). Para tal, existem estratégias alimentícias que diminuem a emissão de metano o que leva a uma redução dos gases de efeito estufa, permitindo também, uma melhora da eficiência na utilização de energia digerida pelo animal. Uma das opções é o uso de antibióticos afetando os microrganismos metanogênicos diretamente. Outra alternativa é a diminuição da produção de H_2, de modo que menos H_2 estivesse disponível para formação de metano. Isto, pode ser alcançado através da remoção de protozoários do rúmen (defaunação) ou pelo fornecimento de uma dieta menos fibrosa com aumento de fontes de carboidratos rapidamente fermentáveis, como os grãos. Por último, deve-se apontar em desenvolver dissipadores alternativos de H_2 a fim de desviar este gás longe dos microrganismos metanogênicos (Figura 4) (HEGARTY, 1999; JOBLIN, 1999).

Figura 4 - Possíveis locais de intervenção microbiana para redução metano em ruminantes



Fonte: Adaptado de Joblin (1999).

2.5 EMISSÃO DE METANO E PERSPECTIVA AMBIENTAL

A produção animal é uma importante fonte de emissão de gases de efeito estufa (GEE) em todo o mundo. Dependendo da abordagem utilizada para quantificação e do tipo de questões estudadas, diferentes instituições (IPCC, FAO, EPA e outros) têm calculado que a contribuição do gado para as emissões globais de GEE antropogênico representa entre 7 e 18% das emissões totais (GERBER et al., 2013).

A maior fonte de emissão de GEE na produção de ruminantes é o CH_4, com mais de 90% proveniente da fermentação entérica e o restante dos dejetos. Globalmente, a

fermentação entérica de bovinos, búfalos e pequenos ruminantes contribui com 2.448 milhões de toneladas de CO_2-eq, dos quais 76% são emitidos pelos bovinos e 14 e 10% pelos búfalos e pequenos ruminantes, respectivamente. A produção de CH_4 entérico de ruminantes é afetada principalmente pela ingestão e qualidade dos alimentos que, por sua vez, definem a energia total ingerida, assim como, o desempenho animal (OPIO et al., 2013).

O protocolo de Kyoto, de dezembro de 1997, teve como objetivo reduzir no mínimo 5% das emissões agregadas aos principais GEE (dióxido de carbono, metano e óxido nitroso, e dos gases industriais fluorados: hidrofluorocarbonetos, perfluorocarbonetos, hexafluoreto de enxofre) entre os anos 2008 ao 2012 em relação ao ano de 1990 (THORPE, 2009). Assim, esse tema ganhou grande importância o que gerou a necessidade de realizar mais estudos, na busca de estratégias para mitigação das emissões de GEE.

As principais fontes de emissão de metano do setor agropecuário, segundo o MCTI (2013), correspondem à fermentação entérica do gado de corte (75%), seguida da fermentação entérica de gado de leite (12%) e o restante compreende outros animais, o manejo de dejetos, a queima de resíduos agrícolas e do cultivo de arroz, estes últimos com apenas um 13% das emissões para o ano de 2010 no Brasil.

2.6 MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE METANO - TÉCNICA DO GÁS TRAÇADOR SF_6

A técnica do gás traçador hexafluoreto de enxofre, desenvolvida nos Estados Unidos e adaptada para as condições tropicais brasileiras, emprega câmeras fechadas em tubos de PVC e realiza coletas diárias de amostras de metano dos animais.

Johnson e Johnson (1995) desenvolveram a técnica empregando o hexafluoreto de enxofre (SF_6) como gás traçador interno em animais criados em regime de pastejo. Essa técnica consiste no uso de uma pequena cápsula de permeação com SF_6, com taxa de liberação conhecida, que é inserida no rúmen do animal. A seguir, um cabresto equipado com tubo capilar é ajustado na cabeça do animal e conectado a uma canga amostradora submetida previamente a uma bomba de vácuo. A válvula fixada na canga é aberta, para iniciar a coleta do ar em torno do focinho e das narinas do animal, a uma taxa constante de aspiração.

O sistema amostrador é calibrado para completar metade da capacidade de armazenamento da canga amostradora, aproximadamente 51 kPa (0,5 atm.), no período de coleta predeterminado (normalmente 24 h). A regulagem do tempo de amostragem é realizada variando-se o comprimento ou o diâmetro do tubo capilar. Após a amostragem, a pressão na canga é medida precisamente, com medidor digital, e a canga é pressurizada com nitrogênio de alta pureza para uma pressão aproximada de 1,2 atm. Essa pressurização é necessária para a diluição das amostras coletadas e sua injeção no equipamento de análise (WESTBERG et al., 1998).

As concentrações de CH_4 e de SF_6 são determinadas por cromatografia gasosa. A taxa de emissão de CH_4 é o produto da taxa de emissão da cápsula de permeação, localizada no rúmen, pela razão das concentrações de CH_4 e de SF_6 na amostra. Essa técnica elimina a necessidade de confinar os animais em gaiolas ou câmaras barimétricas e permite que eles se desloquem e pastem normalmente. Também não é necessário realizar amostragem no rúmen ou na faringe do animal, porque o traçador acompanha as mudanças na diluição associadas ao movimento da cabeça do animal ou do ar. Como os ruminantes eructam e respiram a maior parte do CH_4, a coleta de ar em torno do focinho e das narinas deve resultar em estimativa precisa da produção de CH_4 pelo animal. Grande parte do CH_4 presente no intestino posterior é absorvido pela corrente sanguínea e expirada, sendo, portanto, também medida pela técnica do SF_6 (WESTBERG et al., 1998).

2.7 CINÉTICA RUMINAL

O estudo da cinética ruminal envolve o conhecimento da dinâmica de fluxo dos componentes da digesta, sendo de grande importância para qualquer modelo nutricional, a interação entre ingestão, passagem e digestibilidade. A taxa de passagem pode influenciar o desaparecimento ruminal da digesta e a ingestão. A taxa de desaparecimento (Kt) é igual à soma das taxas de digestão (Kd) e de passagem (Kp). Portanto, sabendo o valor de Kt e Kp, pode-se estimar a taxa de digestão ruminal (Kd). Para compostos indigestíveis ou indicadores que desaparecem do rúmen somente pela passagem para o omaso, o Kt = Kp, enquanto que, para compostos digeridos, Kt = Kd + Kp (OWENS; GOETSCH, 1993).

2.7.1 Taxa de desaparecimento

A taxa total de desaparecimento (Kt) de uma substância no rúmen difere da taxa de passagem e é calculada a partir da ingestão diária e da quantidade de material no rúmen em lugar da saída de material e volume ruminal. Se um animal ingere 8 kg de matéria seca/dia, o conteúdo ruminal tem 12% de matéria seca, e a massa total do rúmen é de 50 kg, então a quantidade de matéria seca no rúmen é de 6,0 kg (50 kg x 0,12). O Kt é calculado como consumo diário (8 kg/24) dividido pelo conteúdo ruminal (6,0 kg), o que equivale a 1,33/24h, o que é igual a 0,055 ou 5,5% por hora (OWENS; GOETSCH, 1993).

3 MATERIAL E METODOS

3.1 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 no Laboratório de Nutrição Animal e Bromatologia. Para avaliação de consumo de matéria seca, a emissão de metano entérico, a dinâmica ruminal e a contagem total e diferencial de protozoários ruminais foram utilizadas seis vacas não-gestantes e não-lactantes, com peso vivo aproximado de 784 ± 87 kg e portadoras de cânula ruminal com 10 cm de diâmetro e 7,5 cm de espessura. Os animais foram mantidos em instalação coberta, provida de baias individuais com cochos de cimento e bebedouros automáticos comuns a cada dois animais, bem como camas de areia, que proporcionam maior conforto e bem-estar aos mesmos.

3.2 TRATAMENTOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Seis vacas foram distribuídas a uma das três dietas experimentais, isoenergéticas (1,55 Mcal de ELl/kg de MS ou 67,30% de NDT) e isoproteicas (12,0% de PB), formuladas com o programa *Spartan Dairy Ration Evaluator/Balancer*, versão 3.0.3., que diferiram de acordo com o aditivo alimentar utilizado, sendo os tratamentos: 1) Controle (CON): Dieta basal sem inclusão de aditivo; 2) Monensina (MON): Dieta com adição de 300 mg de monensina sódica (3,0 g de Rumensin, Elanco®) por animal por dia; 3) Tanino (TAN): Dieta com adição de 68 g de extrato concentrado de tanino condensado obtida da acácia negra (*Acacia mearnsii*) por animal por dia, comercializado pela empresa Veronese®. 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. O experimento contou com 18 unidades experimentais referentes a 3 animais, 3 períodos e 2 quadrados. Por se tratarem de quadrados impares, estes foram balanceados em função da replicação.

3.3 MANEJO NUTRICIONAL

Os alimentos foram oferecidos *ad libitum*, duas vezes ao dia, às 8:00 e 16:00 horas na forma de ração completa com proporção volumoso:concentrado de 50:50. A fonte de volumoso utilizada foi a silagem de milho e o concentrado consistiu de milho grão moído, farelo de soja, sal comum, fosfato bicálcico, calcário e suplemento mineral. Ao dia seguinte de oferecimento das dietas, foram retiradas e pesadas as sobras. Ofertou-se a dieta para garantir sobras de 5 a 10% do fornecido. Os aditivos (monensina sódica e tanino condensado) foram adicionados diretamente à dieta oferecida no cocho. Como fonte de tanino condensado utilizou-se o extrato da casca da Acácia-negra *(Acacia mearnsii)*, um pó amorfo com 68% de pureza, sendo o restante composto por outros fenóis e cinzas, o que garantiu uma dieta com o aditivo tanino condensado de 4 g/kg de MSI (0,4% da dieta). O aditivo monensina sódica garantiu uma dieta com 17,7 ppm deste produto com base na MS ingerida. As proporções dos diversos ingredientes na dieta e a composição bromatológica da mesma estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Proporções de ingredientes e composição bromatológica estimada das dietas experimentais

(continua)

Ingredientes (% MS)	**Dieta basal**
Silagem de milho	50,00
Milho grão moído	34,70
Farelo de soja	12,20
Sal comum	0,50
Fosfato bicálcico	0,10
Calcário	0,50
Suplemento mineral[1]	2,00
Composição bromatológica	
Matéria seca[2] (%)	61,24
Proteína bruta[2] (% MS)	12,11
Proteína degradável no rúmen[3] (% PB)	65,10
Proteína não-degradável no rúmen[3] (% PB)	34,90
Fibra em detergente neutro[2] (% MS)	31,08
Fibra em detergente neutro efetiva[3] (% MS)	22,60

(conclusão)

Composição bromatológica	Dieta basal
Fibra em detergente ácido[2] (% MS)	18,64
Carboidratos não fibrosos[2] (% MS)	46,65
Amido[3] (% MS)	39,30
Matéria mineral[2] (% MS)	7,02
Cálcio[2] (% MS)	0,85
Fósforo[2] (% MS)	0,44
Extrato etéreo[2] (%MS)	3,15
Nutrientes digestíveis totais[3] (% MS)	67,30
E_{liq} lactação[3] (Mcal/dia)	1,55

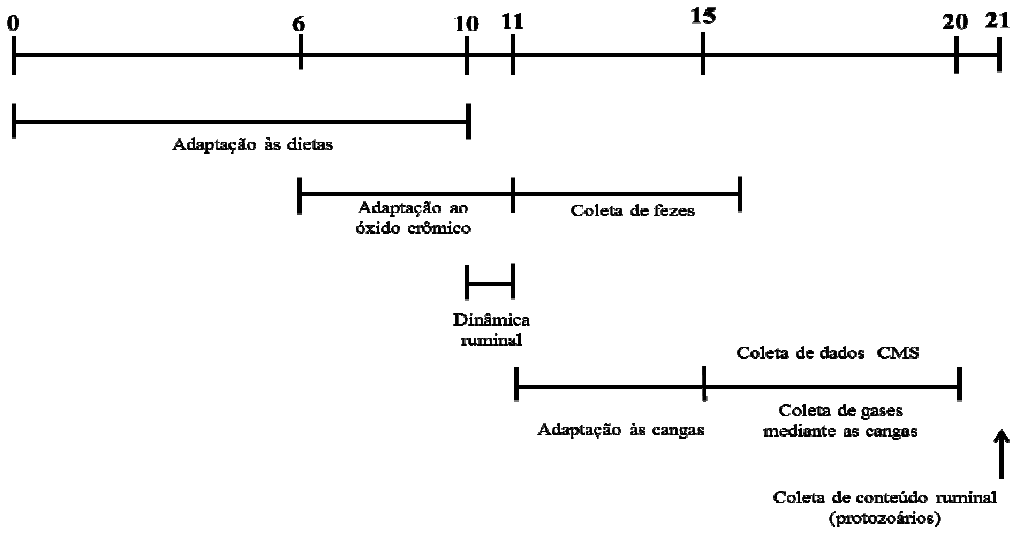
[1]Suplemento mineral e vitamínico, quantidade por kg de produto: 200 g de cálcio, 60 g de fósforo, 20 g de enxofre, 20 g de magnésio, 70 g de sódio, 15 mg de cobalto, 700 mg de cobre, 700 mg de ferro, 40 mg de iodo, 1.600 mg de manganês, 19 mg de selênio, 2.500 mg de zinco, 200.000 UI de vitamina A, 50.000 UI de vitamina D3, 1.500 UI de vitamina E.
[2]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.
[3]Estimado segundo o programa Spartan Dairy Ration Evaluator/Balancer, versão 3.0.3.

3.4 PERÍODO EXPERIMENTAL

Cada um dos períodos experimentais foi constituído por 21 dias (Figura 5), sendo 10 dias destinados para adaptação às respectivas dietas. Os animais foram pesados no primeiro e último dia de cada período experimental. A partir do dia 16 até o dia 21 foram coletados os dados de consumo de matéria seca e de produção de metano, sendo este último determinado a cada 24 horas, pela técnica do gás traçador de SF_6, considerando cinco dias prévios para adaptação às cangas (dias 11 a 15) antes do inicio da coleta. No dia 21 coletou-se conteúdo ruminal para determinação de protozoários. Quanto à dinâmica ruminal, foi realizado o esvaziamento ruminal nos dias 10 (3 horas após alimentação matinal, tempo de maior enchimento ruminal) e 11 (0 horas antes da alimentação matinal, tempo de menor enchimento ruminal) de cada período experimental.

A avaliação da digestibilidade aparente total foi realizada entre o dia 6 até o dia 16 de oferecimento das dietas, sendo os cinco primeiros dias para adaptação ao marcador e os seis últimos para coleta de fezes.

Figura 5 - Esquema das coletas para cada uma das variáveis que foram avaliadas dentro de cada período experimental



Fonte: Arquivo pessoal.

3.5 PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO

3.5.1 Consumo de matéria seca

O CMS foi avaliado durante os seis últimos dias de cada período experimental. O CMS foi calculado pela diferença entre a quantidade de alimento fornecida em um dia e a sobra de alimento coletada e pesada na manhã seguinte ao oferecimento, multiplicada pela porcentagem de matéria seca de cada alimento. Os alimentos utilizados nas dietas experimentais foram amostrados e analisados para obtenção dos valores de MS (método 934,01; AOAC, 1990), matéria mineral - MM (determinado por gravimetria; AOAC, 1990), proteína bruta - PB (determinação do nitrogênio total utilizando a técnica de micro-Kjeldahl; método 920,87; AOAC, 1990), extrato etéreo - EE (determinado por gravimetria após extração pelo éter de petróleo em um extrator Soxhlet; método 920,85; AOAC, 1990), cálcio - Ca (método 968,08; AOAC, 1995), fósforo - P (método 965,17; AOAC, 1990); Fibra em detergente neutro - FDN (com α-amilase termo estável), fibra em detergente ácido - FDA e lignina, conforme Van Soest (1991).

3.5.2 Digestibilidade aparente total

A digestibilidade aparente total da MS da dieta e das frações de EB e MO foram determinadas por meio do marcador de óxido crômico (Cr_2O_3), segundo Bateman (1970). Entre tanto, cabe salientar que os dados obtidos da digestibilidade aparente total das frações determinadas foram utilizadas para o calculo da emissão de metano, expressa em gramas de metano emitidas por quilograma de matéria orgânica digestível - CH_4 (g/kg MOD) e porcentagem de energia digestível perdida na forma de metano - CH_4 (% de ED).

Foi administrado, duas vezes ao dia, via cânula ruminal, 1 g do marcador de óxido crômico por kg de MS de alimento consumido, através de envelopes confeccionados em papel absorvente. O ensaio de digestibilidade foi constituído por duas fases, sendo os cinco primeiros dias para adaptação ao marcador e os seis últimos para coleta de fezes.

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

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

3.5.3 Dinâmica ruminal

A dinâmica ruminal foi avaliada nos dias 10° e 11° de cada período experimental utilizando a técnica do esvaziamento deste órgão. O conteúdo ruminal foi coletado em dois períodos, um considerado como o de maior enchimento ruminal (três horas após a

alimentação) e outro, de menor enchimento ruminal (antes da alimentação). O conteúdo ruminal foi retirado manualmente, via cânula ruminal, e colocada em baldes plásticos (Figura 6). A separação de sólidos e líquidos foi efetuada pela filtragem da porção líquida através de uma peneira (5 mm de poros), segundo a metodologia adaptada de Dado e Allen (1995).

O material sólido e líquido foram pesados separadamente. Uma alíquota de 5% da amostra sólida foi retirada e colocada em bandejas de alumínio previamente identificadas para mensuração do teor de MS do conteúdo e o restante de todo o conteúdo coletado foi recolocado no rúmen. A massa sólida total foi corrigida pelo teor de MS do conteúdo.

A partir da massa sólida, da massa líquida e do CMS foi possível calcular as seguintes variáveis através das equações 1 e 2, respectivamente:

- Taxa de desaparecimento da massa sólida (%/hora):

$$\text{Taxa de desaparecimento (\%/h)} = 100 \times \frac{\text{Consumo de MS (kg/d)}}{\text{Massa sólida (kg)}} / 24 \qquad (1)$$

- Taxa de desaparecimento da massa sólida (kg/h):

$$\text{Taxa de desaparecimento (kg/h)} = \text{Massa sólida total} \times \frac{\text{Taxa de desaparecimento (\%/h)}}{100} \qquad (2)$$

Figura 6 - Metodologia do esvaziamento ruminal

Fonte: Arquivo pessoal.
Legenda: a) Retirada do conteúdo ruminal manualmente; b) Separação de sólido e líquido pela filtragem através de uma peneira; c) imagem do interior do rúmen após esvaziamento; d) baldes plásticos com material sólido e líquido; e) Pesagem do material retirado; f) amostra coletada para mensuração da MS do conteúdo.

3.5.4 Técnica do gás traçador SF_6 para a mensuração de metano

A técnica empregada para a mensuração de metano foi aquela denominada técnica do gás traçador interno SF_6, descrita por Johnson e Johnson (1995) e adaptada no Brasil por Primavesi et al. (2004a).

Antes ao início do experimento foi realizada a carga e calibração das cápsulas de permeação de hexafluoreto de enxofre (SF_6) a serem utilizadas. Para tal, foi eliminado o nitrogênio residual das cápsulas e posteriormente foram carregadas com o gás SF_6 esvaziando duas seringas de plástico descartáveis de 60 mL, equipadas com agulha (16G) previamente preenchidas com SF_6 no estado gasoso, retirado diretamente do cilindro de gás, equipado com válvula de entrada marcando 1.777 kPa (250 psi ou 17 atm.) e válvula de saída marcando 35 kPa (5 psi ou 0,35 atm.), num espaço de tempo total aproximado de 20 a 25 segundos. Após

disso, a cápsula foi pesada a fim de verificar o atingimento da carga desejada, de preferência acima de 500 mg de SF_6. Posteriormente, as capsulas foram colocadas em béquer imerso em banho-maria e permaneceram à temperatura de 39°C, durante 4 a 6 semanas. Semanalmente as cápsulas foram pesadas para se determinar a taxa de emissão de SF_6 e a fim de verificar se as cápsulas estavam prontas para serem introduzidas no rúmen dos animais.

As cápsulas de permeação de hexafluoreto de enxofre, previamente identificadas, foram colocadas no rúmen dos animais cinco dias antes do início da primeira coleta de gases mediante as cangas, permanecendo dentro deste até o último período experimental. Para a mensuração de metano, utilizou-se uma canga coletora-armazenadora confeccionada em tubo de PVC de 60 mm de classe 20 (Figura 7a), tendo pressão interna próxima de zero atmosfera. Para esta técnica, empregou-se uma bomba de alto vácuo com dois estágios; um manômetro digital (Figura 7b) com escala de 0 a 203 kPa (2 atm. ou 29,4 psi ou 1.520 mm Hg; na escala 0 a 2 atm), o qual permitiu medir a pressão inicial, a pressão ao final do período de coleta e a pressão final após diluição com N_2.

Antes de dar início às coletas, as cangas foram testadas submetendo-as ao vácuo até chegar à pressão de aproximadamente -13,14 psi no manômetro digital, mantendo-as assim durante 24 horas. Após esse tempo, foi feita a leitura esperando encontrar a mesma pressão inicial, garantindo, desta forma, sua perfeita vedação. As cangas foram numeradas na região do cotovelo oposta à válvula e também ao lado desta, em suas duas extremidades, para facilitar a identificação durante as coletas. Anteriormente à sua utilização, as cangas foram calibradas para que atingissem meia atmosfera de pressão no final do período de coleta, mediante tubo capilar de aço inoxidável com 0,127 mm de diâmetro interno preso a um cabresto. A calibração foi determinada pelo comprimento e constrição do tubo capilar e realizada durante um período de 24 horas. As cangas foram esvaziadas com bomba de vácuo e submetidas a uma pressão inicial de -13,14 psi. Posteriormente, foram conectadas ao tubo capilar (Figura 7c) por meio de válvula de engate rápido. Após a amostragem, foi feita a leitura esperando-se atingir meia atmosfera (-6,0 a -7,0 psi aproximadamente) como pressão final.

Após a adaptação dos animais às cangas (Figura 7d), compreendida entre os dias 11 e 15 de cada período experimental, a mensuração da produção de metano pela técnica do gás traçador SF_6 foi realizada ao longo de seis dias a partir do 16º até o dia 21° de oferecimento das dietas. A troca das cangas foi realizada em intervalos de 24 horas, antes da alimentação matutina.

Figura 7 - Técnica do gás traçador SF_6 para a mensuração de metano

Fonte: Arquivo pessoal.
Legenda: a) canga coletora armazenadora em tubo de PVC de 60 mm de clase 20, com válvula de coleta e engate rápido montado na canga; b) manômetro digital portátil; c) canga coletora conectada ao tubo capilar; d) animal com canga coletora.

As concentrações de metano (CH_4) e hexafluoreto de enxofre (SF_6) foram determinadas por cromatografia gasosa nos laboratórios da EMBRAPA Meio Ambiente, localizada em Jaguariúna/SP, em cromatógrafo a gás HP6890, equipado com detector de ionização de chama (FID) a 280 ºC, coluna megabore (0,53 µm, 30 m) Plot HP-Al/M (para CH_4), bem como detector de captura de elétrons (ECD) a 300ºC e coluna megabore (0,53 mm x 30 m x 25,0 mm) HP-MolSiv (para SF_6), com dois loops de 0,5 Cm^3 acoplados a duas válvulas de seis vias. O forno do cromatógrafo a gás foi mantido a 50ºC durante as análises e aquecido a 150ºC por aproximadamente 15 minutos para a limpeza da coluna. Posteriormente, este retornava à temperatura inicial, garantindo, assim, que o aparelho estivesse pronto para o próximo período de análises. Logo após o período de coleta, e antes da determinação da concentração de CH_4 e de SF_6, a pressurização das cangas foi realizada com nitrogênio especial 5.0, com as leituras de pressão feitas em medidor digital (±0,01), até atingir uma pressão aproximada de 1,2 atm. As leituras da pressão inicial e final, após diluição, foram

tabuladas de forma a se calcular o fator de diluição. As curvas de calibração foram estabelecidas utilizando-se padrões de gases certificados pelo laboratório de desenvolvimento “White Martins", com concentração em ppm (4,85 e 20 ppm) para CH_4 e em ppt (34±9, 91±9 e 978±98 ppt) para SF_6, conforme Westberg et al. (1998).

A quantificação de metano liberado pelo animal na amostra foi calculado em função das concentrações de SF_6, associando os resultados à taxa conhecida de liberação do traçador no rúmen (WESTBERG et al., 1998). Sendo assim, as concentrações de CH_4 e de SF_6, bem como as informações pertinentes à amostragem, foram tabuladas em planilha eletrônica.

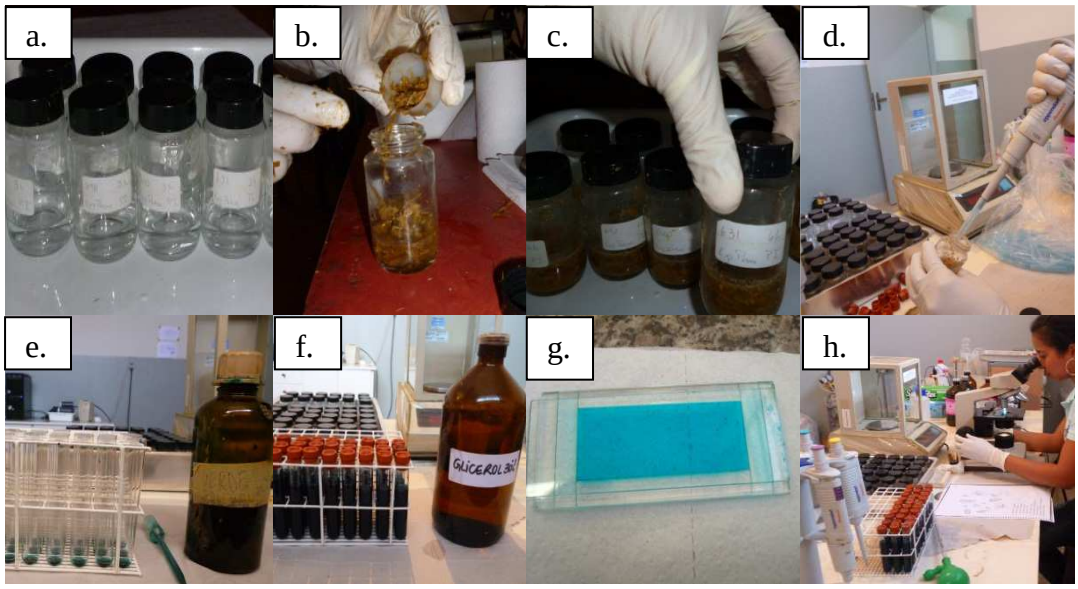
A partir dos dados primários foi calculada a emissão potencial de gramas de metano emitidas por dia - CH_4 (g/d); gramas de metano emitidas por quilograma de peso vivo por dia - CH_4 (g/kg PV); gramas de metano emitidas por quilograma de peso metabólico por dia - CH_4 (g/kg $PV^{0,75}$); gramas de metano emitidas por quilograma de matéria seca ingerida - CH_4 (g/kg MSI); gramas de metano emitidas por quilograma de matéria orgânica - CH_4 (g/kg MO); gramas de metano emitidas por quilograma de matéria orgânica digestível - CH_4 (g/kg MOD); porcentagem de energia bruta perdida na forma de metano - CH_4 (% de EB) considerando a porcentagem de energia bruta da dieta; porcentagem de energia digestível perdida na forma de metano - CH_4 (% de ED); megacalorias de metano por animal por dia - CH_4 (Mcal/Ani/d) considerando 13,16 Mcal/kg de CH_4 e energia bruta ingerida por animal por dia - EBI (Mcal/Ani/d).

3.5.5 Metodologia da contagem total e diferencial de protozoários

A coleta para contagem total e diferencial de protozoários foi realizada no dia 21 de cada período experimental nos tempos antes (0), 3, 6, 9 e 12 horas após a alimentação matinal. O conteúdo ruminal foi coletado manualmente a partir de 3 pontos diferentes, via cânula ruminal, e 10 mL deste material foram armazenados em frascos contendo 20 mL de formaldeído a 18,5% (v/v). Para posterior realização da contagem total e diferencial dos protozoários foi utilizado 1 mL da amostra diluída com formol e adicionadas 2 gotas de verde brilhante a 2%, deixando repousar por 4 horas. Em seguida, foram adicionados 9 mL de glicerol a 30% e homogeneizada a mistura, tornando a alíquota do líquido ruminal diluída 30 vezes (Figura 8). Para as contagens diferenciais dos protozoários foi utilizada uma câmara de

contagem “Sedgwick-Rafter” composta por retículo de 0,5 mm x 0,5 mm de área, com subdivisões de 25 quadrículos (capacidade de 1 mL). Esta câmara foi acoplada à ocular de um microscópio da marca Olympus, modelo CH2, conforme técnica descrita por Dehority (1993).

Figura 8 - Metodologia de contagem de protozoários



Fonte: Arquivo pessoal.
Legenda: a) frascos com 20 mL de formaldeído a 50%; b) frasco com amostra de conteúdo ruminal; c) frasco identificado com 10 mL de amostra coletada; d) coleta de 1 mL da amostra diluída com formaldeído; e) tubos de ensaio com 2 gotas de verde brilhante; f) amostra em tubos de ensaio com 9 mL de glicerol a 30%; g) lâmina com 1 mL da amostra; h) leitura da amostra através do microscópio.

Com a câmara acoplada ao microscópio, foram contados 100 campos óticos através do retículo, com aumento de 100 x, onde as identificações das espécies dos protozoários foram estabelecidas, bem como suas proporções na amostra. Do total de protozoários, foram identificados os gêneros: *Isotricha*, *Dasytricha*, *Entodinium*, e subfamília *Diplodiniinae* (*Ostracodinium*, *Diplodinium*, *Eudiplodinium*, *Metadinium*, *Polyplastron*).

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados de consumo de MS, dinâmica ruminal e a taxa de emissão de CH_4 foram analisados pelo programa Statistical Analysis System (SAS, versão 9.3, 2010). Antes das análises propriamente ditas, os dados foram analisados em relação à presença de informações

discrepantes (“outliers”) e a normalidade dos resíduos pelo teste Shapiro-Wilk, assim como, a homogeneidade das variâncias pelo teste Levene. Quando a premissa de normalidade não foi atendida, foi necessária a transformação logarítmica ou pela raiz quadrada.

Os dados foram analisados utilizando o PROC MIXED para modelos mistos. Os dados foram submetidos à análise de variância e o modelo incluiu o efeito de tratamento como fator fixo e os efeitos de animal dentro de quadrado, quadrado e período como fatores aleatórios. Os efeitos de tratamento foram avaliados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O modelo estatístico utilizado está descrito conforme a equação abaixo:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + P_j + Q_k + A_l(Q_k) + E_{ijkl}$$

Onde:

Y_{ijkl} = Observação referente ao $Tratamento_i + Periodo_j + Quadrado_k + Animal_l$ *dentro de* $quadrado_k$;

μ = Média geral;

T_i = Efeito de tratamento (efeito fixo);

P_j = Efeito de período (efeito aleatório);

Q_k = Efeito de quadrado (efeito aleatório);

$A_l(Q_k)$ = Efeito de animal dentro de quadrado (efeito aleatório);

E_{ijkl} = Erro aleatório associado a cada observação.

Os dados de protozoários também foram analisados pelo programa SAS. Entre tanto, estes dados foram analisados de acordo com o PROC MIXED para modelos mistos, levando em consideração as diferentes horas de coleta (0, 3, 6, 9, 12) como medidas repetidas no tempo. Para as análises, dentre as 15 diferentes estruturas de covariância testadas, a que melhor se ajustou ao modelo estatístico foi escolhida baseado no menor valor do critério de informação Akaike corrigido (AICC) (WANG; GOONEWARDENE, 2004).

O modelo incluiu os efeitos de tratamento, tempo e a interação tratamento e tempo como fatores fixos e o animal dentro de quadrado, quadrado e período como fatores aleatórios. Adicionalmente, as comparações de médias entre os tratamentos foram realizadas através do teste de Tukey ajustado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONSUMO DE MATÉRIA SECA

Referente aos valores de consumo de MS, expresso em quilograma por animal por dia (kg/animal/dia), em porcentagem do peso vivo (% PV) ou por unidade de peso metabólico (g/kg de $PV^{0,75}$), apresentados na Tabela 2, não houve diferenças significativas (P>0,05) entre os tratamentos.

Estes resultados se devem provavelmente à adaptação que estes animais tiveram às respetivas dietas, como também, pode ter sido devido às baixas doses de inclusão de aditivos que foram usadas neste experimento. Alguns trabalhos indicam que com doses mais altas pode-se obter uma redução no consumo da matéria seca dos animais. Neste caso, e em relação à monensina, Oliveira et al. (2005), usando uma dose mais alta de monensina (28 mg/kg de MSI) em dietas contendo dois teores de proteína (11,45 e 16,54%), em novilhos holandeses fistulados no rúmen, relataram que o consumo de matéria seca foi diminuído para as dietas com monensina independentemente do teor de proteína utilizada, em 16,7, 16,9 e 16,8%, expresso em kg/dia, em porcentagem do PV e em função do peso metabólico respectivamente. Por outro lado, Borges et al. (2008) ao avaliarem os efeitos da administração monensina sódica (21,7 mg/kg de MS) sobre o consumo de matéria seca em fêmeas bovinas não-gestantes e não-lactantes, não verificaram efeito significativo sobre o CMS.

Tabela 2 - Efeito da inclusão de monensina ou tanino na dieta de fêmeas bovinas canuladas no rúmen sobre o consumo de matéria seca, expresso em quilograma por dia, porcentagem do peso vivo ou unidade de peso metabólico

	Tratamentos				
Variáveis*	Controle	Monensina	Tanino	EPM	Probabilidade
CMS (kg/animal/dia)	18,02	16,89	17,03	0,44	0,3376
CPV (% PV)	2,088	1,941	1,961	0,06	0,1520
CPM (g/kg de $PV^{0,75}$)	113,1	105,3	106,4	2,96	0,1928

*CMS = Consumo de matéria seca; CPV = Consumo de matéria seca em relação ao peso vivo; CPM = Consumo de matéria seca por unidade de peso metabólico. [1]Erro padrão da média. [ab]Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

Em relação ao tanino, Grainger et al. (2009) usando doses mais altas de 10,8 e 19 g/kg de MSI de tanino condensado (*Acacia mearnsii*) à utilizada no presente estudo (4 g/kg de MSI), relataram uma redução do consumo de matéria seca de 13,21 e 26,43% respectivamente, quando comparada ao tratamento sem monensina, em vacas leiteiras. Em contrapartida, Beauchemin et al. (2007) utilizando uma fonte diferente e doses maiores de extrato de tanino condensado de quebracho (9,1 e 18,2 g/kg de MS) em relação à utilizada no presente experimento, não observaram efeito significativo sobre o consumo de matéria seca em bovinos.

4.2 DINÂMICA RUMINAL

Para os valores da matéria seca do conteúdo ruminal (%), da massa líquida, massa sólida e, massa total (expressas em kg e % PV), assim como, da taxa de desaparecimento do sólido (%h e kg/h), não foi observado efeito significativo (P>0,05) com a inclusão de monensina ou de tanino na dieta de fêmeas bovinas canuladas no rúmen (Tabela 3).

Os valores observados em media para massa sólida, líquida e a massa total do rúmen (10,63, 70,79, 81,42 kg respectivamente) neste experimento, foram próximos aos resultados de Park et al. (2011) em trabalho realizado avaliando a dinâmica ruminal de vacas leiteiras em diferentes estágios de produção (-72 dias pré-parto até 90 dias pós-parto) onde descreveram valores de 6,1 a 11,4 kg, 44,3 a 66 kg e de 50,3 a 77,5 kg, para massa sólida, massa líquida, e massa total do rúmen respectivamente, representando esta última variável entre 35,8 a 50,5% da capacidade total do rúmen. Sendo esta definida como o peso da água removido do rúmen, variando entre 125 a 171 kg, parâmetro que no presente estudo não foi avaliado. Da mesma forma, Reynolds et al. (2004) realizaram um estudo com vacas leiteiras em diferentes estágios de produção, onde determinaram a massa ruminal (-17 dias pre-parto até 31 dias pos-parto) e relataram valores de 7,02 a 10,27 kg para massa sólida; 48,87 a 57,67 kg para massa líquida; 57,04 a 67,81 kg para massa total do rúmen e; 12,11 a 15,03% de MS no conteúdo ruminal, resultados menos aos encontrados no presente experimento, porém eram animais em diferente estágio produtivo (gestação ou lactação).

Tabela 3 - Efeito da inclusão de monensina ou tanino na dieta de fêmeas bovinas canuladas no rúmen sobre a dinâmica ruminal

	Tratamentos				
Variáveis*	Controle	Monensina	Tanino	EPM[1]	Probabilidade
CMS (kg/dia)	18,51	17,81	17,71	0,408	0,3977
MS do conteúdo ruminal (%)	13,22	13,23	12,81	0,312	0,7702
Massa líquida (kg)	69,22	70,70	72,46	1,712	0,6442
Massa líquida (% PV)	8,005	8,093	8,335	0,190	0,4989
Massa sólida (kg)	10,49	10,75	10,64	0,325	0,9275
Massa sólida (% PV)	1,218	1,233	1,225	0,038	0,9772
Massa total (kg)	79,71	81,46	83,11	1,878	0,6717
Massa total (% PV)	9,225	9,325	9,562	0,213	0,5364
Kt sólido (%/h)	7,565	7,071	7,311	0,207	0,4245
Kt sólido (kg/h)	0,788	0,762	0,760	0,018	0,5454

*CMS = Consumo de matéria seca (kg/dia), Kt sólido (%/h) = Taxa de desaparecimento do sólido (%/hora) e Kt sólido (kg/h) = Taxa de desaparecimento do sólido (kg/hora). [1]Erro padrão da média. [ab]Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

Autores como Plaizier et al. (2000) e Salles e Lucci (2000) reportaram que a monensina aumenta a digestibilidade das frações da dieta, possivelmente por um maior tempo de retenção do alimento no rúmen, o que faria uma fermentação mais pronunciada e como consequência levaria a uma menor taxa de desaparecimento da MS no rúmen. Da mesma forma, Spears (1990) reporta que o aumento na digestibilidade em ruminantes alimentados com ionóforos pode resultar de um maior tempo de retenção de sólidos no rúmen, permitindo assim um maior tempo para a digestão microbiana da fibra. Portanto, a taxa mais lenta de digestão da fibra pode explicar o turnover no rúmen mais lento e consequentemente, a taxa de desaparecimento do sólido seria também menor nos animais. Neste estudo não foi possível mostrar diferença significativa (P>0,05) para as variáveis anteriormente mencionadas.

Em relação ao tanino, Narjisse et al. (1995) infundiram taninos diretamente no rúmen de ovinos, com o intuito de observar se efeitos independentes à palatabilidade eram responsáveis pela redução no consumo voluntário de alimento. Os autores observaram uma redução da digestão da matéria seca no rúmen e indicaram que este efeito prejudica o esvaziamento do trato digestivo, gerando sinais de enchimento e saciedade para os centros nervosos envolvidos no controle da ingestão. De acordo a isto, a massa total do rúmen seria maior, enquanto a taxa desaparecimento seria menor nestes animais. Por outro lado, Waghorn

et al. (1994) indicam que com a adição de taninos diminui-se o turnover ruminal e a taxa de digestão, e que estes, influenciam mais do que a palatabilidade para reduzir o consumo de matéria seca. No presente experimento não foi verificado efeito significativo (P>0,05) para as variáveis anteriormente mencionadas. Entretanto, a massa sólida total com o tratamento com tanino (83,11 kg) foi numericamente maior que os tratamentos com monensina (81,46 kg) e controle (79,71 kg), o que pode estar relacionado com a menor taxa de desaparecimento e menor consumo de matéria seca dos animais com o tratamento com tanino.

4.3 EMISSÃO DE METANO DETERMINADA PELA TÉCNICA DO GÁS TRAÇADOR SF_6

Quanto aos efeitos de aditivos sobre a emissão de metano, verificou-se que o tratamento com monensina foi mais eficiente em reduzir as emissões deste gás. Para as variáveis de CH_4 em g/d; g/kg PV; g/kg $PV^{0,75}$ e Mcal/Ani/d, o tratamento com monensina diminuiu em 24% (P<0,05) as emissões em relação ao tratamento controle, não diferenciando-se o tratamento com tanino em relação aos outros dois tratamentos (Tabela 4). Este efeito pode ser explicado pelo próprio mecanismo de ação da monensina, que facilita o movimento de cátions através da membrana das bactérias Gram-positivas, levando a baixa concentração de K^+, alta concentração de Na^+ e baixo pH intracelular. Portanto, as bactérias são forçadas a utilizar os sistemas de transporte celular para dissipar o H^+ e o Na^+ intracelular na tentativa de manter o equilíbrio da célula, desta forma, muitas bactérias acabam morrendo neste esforço (RUSSELL, 1987; MORAIS et al., 2011). Estas bactérias têm como produtos finais o hidrogênio e o formato, que são precursores na formação de metano, causando, portanto, a redução deste gás de forma indireta.

Tabela 4 - Efeito da inclusão de monensina ou tanino na dieta de fêmeas bovinas canuladas no rúmen sobre a produção de metano por bovinos determinada pela técnica do gás traçador SF_6

	Tratamentos				
Variáveis	**Controle**	**Monensina**	**Tanino**	**EPM[1]**	**Probabilidade**
CH_4 (g/d)	373,9[a]	282,9[b]	334,0[ab]	17,87	0,0451
CH_4 (g/kg PV)	0,428[a]	0,324[b]	0,383[ab]	0,017	0,0372
CH_4 (g/kg $PV^{0,75}$)	2,324[a]	1,760[b]	2,082[ab]	0,097	0,0383
CH_4 (g/kg MSI)	20,69	16,81	19,93	0,967	0,2006
CH_4 (g/kg MO)	22,07	17,74	20,54	0,981	0,1824
CH_4 (g/kg MOD)	38,92	29,17	38,69	2,032	0,0993
CH_4 (% EB)	6,433	5,222	6,189	0,303	0,2099
CH_4 (% ED)	11,76	8,820	12,004	0,627	0,0842
CH_4 (Mcal/Ani/d)	4,921[a]	3,723[b]	4,395[ab]	0,235	0,0451
EBI (Mcal/Ani/d)	76,35	71,55	72,14	1,848	0,3371

EBI = Energia Bruta Ingerida. [1]Erro padrão da média. [ab]Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

Valores de metano em g/d e g/kg de PV encontrados no presente trabalho foram próximos aos relatados por Primavesi et al. (2004b) ao avaliar a taxa de emissão de metano pela técnica do gás traçador (SF_6) em vacas secas (278 g/d e 0,46 g/kg PV) em regime de pastejo de *Pannicum máximum*. Entretanto, os valores de energia bruta (5,2 a 6,4%) e energia digestível (8,8 a 12%) perdidos na forma de metano no presente estudo foram menores aos valores relatados por Primavesi et al. (2004b) 7,6% de EB e 14,0% de ED.

Odongo et al. (2007) reportaram valores de emissão de metano de 459; 0,738 e 429 g/dia; 0,675 g/kg de PV para o tratamento sem monensina e para o tratamento com adição de monensina (24 mg/kg de MS) respectivamente, onde foi reduzida a produção de metano em 7% (g/dia) e 9% (g/kg de PV) para o tratamento com monensina em vacas da raça Holstein em lactação. No entanto, Grainger et al. (2008) relataram que o uso de monensina (240 mg/dia) em cápsulas de liberação controlada (13 mg/kg de MSI) não gerou efeito nas emissões de metano entérico com valores de 309 e 306 g/dia para o tratamento controle e o tratamento com monensina, quando avaliadas pela técnica do SF_6, em bovinos da raça Holstein. Contrario ao que aconteceu neste experimento com uma dose maior de monensina (17,7 mg/kg de MSI), onde foi possível mostrar uma redução na emissão de metano (g/dia, g/kg de PV, g/kg de $PV^{0,75}$, Mcal/Ani/dia).

Em outro estudo, McGinn et al. (2004) avaliaram a adição de aditivos na dieta de bovinos da raça Holstein, entre eles a monensina (33 mg/kg de MS) relataram valores de emissões de metano de 22,64 e 20,70 g/kg de MSI para o tratamento controle e o tratamento com monensina respectivamente, sendo verificada uma redução de 8,6% (P=0,08) entre os tratamentos.

Por outro lado, Guan et al. (2006), avaliando as emissões de metano determinada pela técnica do gás SF_6 com a inclusão de ionóforos (monensina 33 ou lasalocida 36 mg/kg de MS), em dietas de bovinos com alto (32:68; v:c) e baixo concentrado (86:14; v:c) por 16 semanas, relataram diminuição das emissões de metano expressas em L/kg de MSI ou % de EBI de 27% depois da segunda semana para os animais que receberam uma dieta com alto concentrado e, de 30% depois da quarta semana de inclusão dos ionóforos para animais consumindo uma dieta com baixo concentrado, sendo que estas emissões retornaram nos seus valores normais depois de 3 e 6 semanas da inclusão dos ionóforos na dieta respectivamente, o que demostrou que o efeito dos ionóforos sobre a metanogênese não persiste por muito tempo. A diferença nos tempos de redução de CH_4 das dietas com alto e baixo concentrado pode ser explicada, pela maior energia disponível para dieta de alto concentrado.

Em outro estudo, Waghorn et al. (2008) relataram que a adição de monensina em capsulas, com uma taxa de liberação controlada de 10,8 mg/kg de MSI, em vacas da raça Holstein em lactação, não causou efeito na produção de metano determinada pela técnica do SF_6, com valores em media de 323 g/dia e 20 g/kg de MSI com o tratamento com monensina. Valores menores de 283 g/dia e 16,81 g/kg de MSI foram encontrados no presente trabalho usando uma dose mais alta de monensina (17,7 mg/kg de MSI). Beauchemin et al. (2008) em uma revisão de literatura constatou que a monensina em doses menores de 15 ppm não afetam a produção de metano, porém com doses de 15 a 20 ppm podem reduzir a produção total de metano, sem reduzir a produção em g/kg de MSI, no entanto doses de 24 a 35 ppm reduzem a produção em g/dia e g/kg de MSI de bovinos leiteiros.

Em relação ao tanino, Beauchemin et al. (2007) utilizando extrato de tanino condensado de quebracho de 9,1 e 18,2 g/kg de MS, não observaram efeito sobre as emissões de metano (g/d; g/kg de MS, % de EB e % de ED) de bovinos, variáveis que também no presente estudo, não mostraram efeito significativo para o tratamento com tanino em relação aos demais. No entanto Grainger et al. (2009) usando duas doses de 10,8 (tanino 1) e 19 (tanino 2) g/kg de MSI de tanino condensado (*Acacia mearnsii*) em vacas leiteiras, sendo estas doses mais altas à utilizada no presente experimento (4 g/kg de MSI), os autores verificaram diminuição na produção de metano de 14 e 29% respectivamente, com valores de

435, 373, 309 g/dia para as dietas controle, tanino 1, tanino 2, respectivamente, sendo reduzido ao mesmo tempo o consumo de matéria seca, variável que neste estudo não foi afetada. Por outro lado, Woodward et al. (2004) relataram redução de 13% de CH_4 g/kg de MSI de vacas leiteiras alimentadas com *Lotus corniculatus* contendo 26 g de tanino/kg de MS, sendo estas emissões de metano determinadas pela técnica do SF_6.

Em outro estudo, Cieslak et al. (2012) demostraram uma redução na produção de metano em 8,5% em relação ao tratamento controle (sem tanino), ao utilizar 2 g de tanino/kg de MS da dieta (extrato de *Vaccinium vitis idaea*) em fêmeas bovinas da raça Holstein, segundo o autor a redução de metano está relacionada com a diminuição de protozoários num 35% para o tratamento com tanino, já que estes são precursores do hidrogênio para a formação do CH_4. Porém, cabe salientar que a fonte de tanino utilizada foi diferente em relação à utilizada no presente experimento, o qual pode ter influenciado em mostrar redução de CH_4, mesmo com uma menor dose.

4.4 CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE PROTOZOÁRIOS RUMINAIS

Para os efeitos de tratamento sobre a contagem total e diferencial de protozoários foi verificado diminuição de 27,5% sobre as contagens da subfamília de protozoários *Diplodiniinae* com o tratamento com monensina em relação ao tratamento com tanino, não diferindo estes dois tratamentos do tratamento controle. Em relação ao gênero *Isotricha*, foi observada redução ($P<0,05$) para os tratamentos com monensina ou com tanino de 31 e 30% respectivamente, quando comparada com o tratamento controle (Tabela 5). Por outro lado, não foi verificado efeito de tratamento quando os protozoários foram analisados em porcentagem.

As populações de protozoários da subfamília *Diplodiniinae* e do gênero *Isotricha* diminuíram com a inclusão de monensina. Porém, apesar dos resultados serem contraditórios em relação aos gêneros sensíveis a este ionóforo, sabe-se que a monensina se liga à membrana celular dos protozoários, facilitando o movimento de cátions através da mesma, provocando um desequilíbrio, e um aumento da pressão osmótica dentro da célula e levando, consequentemente à morte de protozoários (BERGEN; BATES, 1984; MORAIS et al., 2011).

Guan et al. (2006), avaliando os efeitos da inclusão de ionóforos (monensina 33 e lasalocida 36 mg/kg de MS), em dietas com alto e baixo concentrado por 16 semanas, relataram diminuição dos gêneros *Entodinium* e *Isotricha* e do total de protozoários ciliados de novilhos angus. Entretanto, a contagem de protozoários foi restaurada depois de seis semanas de inclusão dos ionóforos, comprovando que o efeito do aditivo foi transitório e que estes microrganismos podem criar resistência, quando utilizados por períodos mais longos. Por outro lado, Martinele et al. (2008) avaliando os efeitos da monensina (33 mg/kg de MS) e do óleo de soja (4% na MS) na dieta de vacas lactantes sobre a contagem de protozoários ciliados, demostraram uma redução das populações da subfamília *Diplodiniinae* e *Dasytricha,* da mesma forma, no número total de protozoários (43,1; 24,32 e 15,8%), para os tratamentos com monensina, oleo e, oleo + monensina, respectivamente em relação ao tratamento controle.

Referente aos efeitos dos taninos sobre os protozoários ruminais, estes são muito variáveis e dependem do tipo de tanino, da origem e dos níveis de suplementação na dieta. Alguns autores (MAKKAR et al., 1995a; MAKKAR, 2003; ANIMUT et al., 2008) reportam que o tanino causa redução do número de protozoários e que esta diminuição, pode estar associada com o decréscimo da produção de metano ruminal, entretanto, os mecanismos de inibição dos protozoários no rúmen não estão bem estabelecidos ainda (HESS et al., 2003).

Carulla et al. (2005), avaliando a suplementação de *Acacia mearnsi* (25 g/kg de MS) em ovelhas, relataram que a adição de taninos diminui a contagem de protozoários ciliados holotricha *(Isotricha spp. e Dasytricha spp.)* sem afetar a contagem de protozoários entodiniomorfos (*Entodinium spp., Diplodinium spp., Polyplastron spp., Epidinium spp.* e *Eudiplodinium spp*). Essas afirmações acompanham os resultados encontrados neste experimento, onde a contagem do gênero *Isotricha* foi menor com a presença de tanino. Como mencionando anteriormente, os efeitos dos taninos são variáveis (MAKKAR, 2003), entretanto, tem-se certa evidência de que o uso de taninos reduz o número de protozoários, principalmente os holotricha são caracterizados por serem mais sensíveis em relação aos entodiniomorfos (MAKKAR et al., 1995b; CARULLA et al., 2005). Makkar et al. (1995b) usando extrato de tanino de quebracho, demostraram que o número de protozoários entodiniomorfos e holotrichas diminuíram, porém, os holotrichas apresentaram uma maior sensibilidade que os entodiniomorfos ao tanino.

Tabela 5 - Efeito da inclusão de monensina ou tanino na dieta de fêmeas bovinas canuladas no rúmen sobre a contagem total e diferencial de protozoários

	Tratamentos				**Valor de P**		
Variáveis	Controle	Monensina	Tanino	EPM[1]	Tratamento	Hora	Trat. x Hora
Protozoários x 10^3/mL							
Dasytricha	7,76	6,80	7,12	0,745	0,4190	0,0072	0,1885
Diplodiniinae	9,92[ab]	7,88[b]	10,88[a]	0,628	0,0160	0,6022	0,4923
Entodinium	333,5	299,8	328,4	9,705	0,4996	0,0005	0,8458
Isotricha	8,84[a]	6,08[b]	6,20[b]	0,506	0,0330	0,1114	0,3354
Total	360,0	320,6	352,6	9,447	0,4193	0,0062	0,5971
Protozoários %							
Dasytricha	2,34	2,23	2,13	0,232	0,8696	0,0351	0,2523
Diplodiniinae	3,16	2,54	3,48	0,233	0,1507	0,2597	0,4443
Entodinium	91,87	93,29	92,55	0,435	0,2277	0,0003	0,4357
Isotricha	2,61	1,92	1,82	0,159	0,0705	0,1204	0,6135

[1]Erro padrão da média. [ab] Letras diferentes na mesma linha, diferem significativamente (P<0,05) pelo teste de Tukey.

Os valores dos microorganismos do gênero *Entodinium* foram predominantes na contagem de protozoários, representando em média 92,57%, chegando próximo aos valores de autores que descrevem este gênero como predominante na contagem diferencial de protozoários indicando um 90% da população de protozoários em ruminantes (DEHORITY, 1991; NOGUEIRA FILHO et al., 1992). Valores semelhantes foram indicados por Guan et al. (2006) reportando que em media 91,1 e 87,1% do total de protozoários, corresponderam ao gênero *Entodinium*, para uma dieta com alto e baixo teor de concentrado respectivamente. Da mesma forma, Martinele et al. (2008), avaliando dietas com monensina e óleo, reportam também *Entodinium* como o gênero mais representante na população de bovinos com valores de 81,5; 93,3; 94 e 98,8% para as dietas: controle, monensina, óleo e óleo + monensina, respectivamente.

Em outo estudo, Franzolin et al. (2000) determinaram que, as concentrações dos principais gêneros de protozoários no conteúdo ruminal de ovinos, ao se substituir em níveis crescentes, a silagem de milho por cana-de-açúcar na ração, foi encontrado o gênero *Entodinium* como predominante entre os protozoários para todas as dietas estudadas, variando de 87,3 a 97,8% da concentração total. Uma possível explicação de que este gênero seja o mais predominante, pode estar relacionada com a divisão de crescimento dos protozoários

onde, o gênero *Entodinium* demora 15 minutos para se dividir, enquanto que, gêneros como o *Eudiplodinium* e *Diplodinium* em cultura *in vitro* se reproduzem uma vez por dia e os *Polyplastron* demoram 48 horas (SILVA; LEÃO, 1979).

Desta forma, o estudo dos protozoários mostra-se de grande importância, já estes estão relacionados com os microrganismos metanogênicos, como os precursores do substrato (hidrogênio) para estes, portanto um aumento no numero de protozoários estaria relacionado com um aumento da produção de metano, entretanto uma diminuição da produção de metano poderia ser uma consequência da diminuição de protozoários ruminais.

5 CONCLUSÕES

A adição de monensina (17 mg/kg de MSI) na dieta de bovinos com relação volumoso:concentrado de 50:50 mostra-se como uma alternativa satisfatória para reduzir as perdas energéticas devido à redução das emissões de metano, além de não ter prejudicado o consumo de matéria seca dos animais.

Em relação à utilização de tanino, não foram obtidos resultados consistentes na redução de metano entérico, o que indica a necessidade de mais estudos. Acredita-se que a sua utilização em doses mais elevadas na dieta possa resultar numa redução significativa da emissão de metano.

Em relação à contagem de protozoários do gênero *Isotricha*, a adição de monensina (17,7 mg/kg de MSI) ou tanino (4 g/kg de MS) na dieta dos animais resultou em redução na sua concentração por mL, mostrando-se também uma alternativa na redução das emissões de metano, uma vez que os protozoários são percussores de hidrogênio para os microrganismos metanogênicos.

REFERÊNCIAS

AERTS, R. J.; BARRY, T. N.; MCNABB, W. C. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 75, p. 1-12, 1999.

ANIMUT, G.; PUCHALA, R.; GOETSCH, A. L.; PATRA, A. K.; SAHLU, T.; VAREL, V. H.; WELLS, J. Methane emission by goats consuming diets with different levels of condensed tannins from lespedeza. **Animal Feed Science and Technology**, v. 144, p. 212-227, 2008.

ARCURI, P. B.; LOPES, F. C. F.; CARNEIRO, J. C. Microbiologia do rúmen. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. (Ed.). **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep. 2006. p. 111-150.

BATEMAN, J. **Nutricion animal**: manual de métodos analíticos. México: Herrero Hermanos, 1970.

BEAUCHEMIN, K. A.; KREUZER, M.; O'MARA, F.; MCALLISTER, A. T. Nutritional management for enteric methane abatement: A review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 48, p. 21-27, 2008.

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, p. 1990-1996, 2007.

BENTO, M. H. L.; ACAMOVIC, T.; MAKKAR, H. P. S. The influence of tannin, pectin and polyethylene glycol on attachment of 15N-labelled rumen microorganisms to cellulose. **Animal Feed Science and Technology**, v. 122, p. 41-57, 2005.

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

BORGES, L. F.; PASSINI, R.; MEYER, P. M.; PIRES, A. V.; RODRIGUES, P. H. M. Efeitos da enramicina e da monensina sódica no consumo de matéria seca, na fermentação ruminal e no comportamento alimentar em bovinos alimentados com dietas com alto nível de concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 681-688, 2008.

CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; DEVANT, M. Effects of pH and pH fluctuations on microbial fermentation and nutrient flow from a dual-flow continuous culture system. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 574-579, 2002.

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

CARVALHO, F. A. N.; BARBOSA, F. A.; MCDOWELL, L. R**. Nutrição de bovinos a Pasto**. Belo Horizonte: Papel Form Editora Ltda, 2003. 428 p.

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

CIESLAK, A.; ZMORA, P.; PERS-KAMCZYC, E.; SZUMACHER-STRABEL, M. Effects of tannins source (*Vaccinium vitis-idaea* L.) on rumen microbial fermentation *in vivo*. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, p. 102-106, 2012.

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

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 564-582, 1999.

DADO, R. G.; ALLEN, M. S. Intake limitations, feeding behavior, and rumen function of cows challenged with rumen fill from dietary fiber on inert bulk. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 118-133, 1995.

DEHORITY, B.A. **Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliate protozoa**. Florida: CRC press Inc. 1993, 96p.

DEHORITY, B. A. **Rumen microbiology**. Wooster, USA: OARDC/OSU., 1991. 87 p.

DEHORITY, B. A. **Rumen Microbiology**. Nottingham: University Press Inc., 2003. 372 p.

FAHEY, G. C.; BERGER, L. L. Carbohydrate nutrition of ruminants. In: CHURCH, C. D. (Ed.). The ruminant animal. Englewood Cliffs: Waveland Press, 1993. p. 269-297.

FRANZOLIN, M. H. T.; LUCCI, C. S.; FRANZOLIN, R. Efeitos de rações com níveis crescentes de cana-de-açúcar em substituição à silagem de milho sobre a população de protozoários ciliados no rúmen de ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p. 1452-1457, 2000.

FRUTOS, P.; HERVÁS, G.; GIRÁLDEZ, F.J.; MANTECÓN, A.R. Review. Tannins and ruminant nutrition. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 2, p. 191-202, 2004.

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

GERBER, P.; HENDERSON, B.; MAKKAR, H. P. S. (Ed.). HRISTOV, A. N.; OH, J.; LEE, C.; MEINEN, R.; MONTES, F.; OTT, T.; FIRKINS, J.; ROTZ, A.; DELL, C.; ADESOGAN, A.; YANG, W.; TRICARICO, J.; KEBREAB, E.; WAGHORN, G.; DIJKSTRA, J.; OOSTING, S. **Producción y sanidad animal FAO 177**: Mitigación de las emisiones de gases de efecto invernadero en la producción ganadera - Una revisión de las opciones técnicas para la reducción de las emisiones de gases diferentes al CO_2. Itália, Roma: FAO, 2013.

GRAINGER, C.; AULDIST, M. J.; CLARKE, T.; BEAUCHEMIN, K. A.; MCGINN, S. M.; HANNAH, M. C.; ECKARD, R. J.; LOWE, L. B. Use of monensin controlled-release

capsules to reduce methane emissions and improve milk production of dairy cows offered pasture supplemented with grain. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 1159-1165, 2008.

GRAINGER, C.; CLARKE, T.; AULDIST, M. J.; BEAUCHEMIN, K. A.; MCGINN, S. M.; WAGHORN, G. C.; ECKARD, R. J. Potential use of *Acacia mearnsii* condensed tannins to reduce methane emissions and nitrogen excretion from grazing dairy cows. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 89, p. 241-251, 2009.

GUAN, H.; WITTENBERG, K. M.; OMINSKI, K. H.; KRAUSE, D. O. Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 1896-1906, 2006.

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

HESS, H. D.; MONSALVE, L. M.; LASCANO, C. E.; CARULLA, J. E.; DIAZ, T. E.; KREUZER, M. Supplementation of a tropical grass diet with *Sapindus Saponaria* fruits:effects on *in vitro* ruminal nitrogen turnover and methanogenesis. **Australian Journal Agricultural Research**, v. 54, p. 703-713, 2003.

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

KHANBABAEE, K.; VAN REE, T. Tannins: classification and definition. **Natural Product Reports**, v. 18, p. 641-649, 2001.

LANA, R. P.; RUSSELL, J. B. Efeitos da monensina sobre a fermentação e sensibilidade de bactérias ruminais de bovinos sob dietas ricas em volumos ou concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p. 254-260, 2001.

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

MAKKAR, H. P. S.; BLUMMEL, M.; BECKER, K. *In vitro* effects and interaction between tannins and saponins and fate of tannins in the rumen. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 69, p. 481-493, 1995a.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K.; ABEL, H.; SZEGLETTI, C. Degradation of condensed tannins by rumen microbes exposed to Quebracho tannins (QT) in rumen simulation technique (RUSITEC) and effect of QT on fermentative processes in the RUSITEC. J. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 69, p. 495-500, 1995b.

MARIENHAGEN, J.; BOTT, M. Metabolic engineering of microorganisms for the synthesis of plant natural products. **Journal of Biotechnology**, v. 163, p. 166-178, 2013.

MARTINELE, I.; EIFERT, C. E.; LANA, R.; ARCURI, P.; D'AGOSTO, M. Efeito da monensina e do óleo de soja sobre os protozoários ciliados do rúmen e correlação dos protozoários com parâmetros da fermentação ruminal e digestivos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 1129-1136, 2008.

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

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

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA (MCT). **Segunda comunicação nacional do Brasil convenção-quadro das nações unidas sobre mudança do Clima**. Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia, 2010. v. 2.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO (MCTI). **Estimativas anuais de emissões de gases de efeito estufa no Brasil**. Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia e Inovação, 2013.

MORAIS, J. A. S.; BERCHIELLI, T. T.; REIS, R. A. Aditivos. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2011. 616 p.

MUELLER-HARVEY, I. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 2010-2037, 2006.

NAGARAJA, T. G.; TITGEMEYER, E. C. Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 17-38, 2007.

NARJISSE, H.; ELHONSALI, M. A.; OLSEN, J. D. Effects of oak (*Quercus ilex*) tannins on digestion and nitrogen balance in sheep and goats. **Small Ruminant Research**, v. 18, p. 201-206, 1995.

NOGUEIRA FILHO, J. C. M.; LUCCI, C. S.; OLIVEIRA, M. E. M.; MELOTTI, L.; VALVASORI, E.; LIMA, C. G.; CUNHA, J. A. Contagens diferenciais de protozoários ciliados em rúmen de bovinos arraçoados com capim elefante Napier (*Pennisetum purpureum* Schum), em vários estádios de crescimento vegetativo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 27, p. 215-221, 1992.

NOGUEIRA FILHO, J. C. M.; LUCCI, C. S.; OLIVEIRA, M. E. M.; MELOTTI, L.; VALVASORI, E.; LIMA, C. G.; CUNHA, J. A. Influência da soja fornecida crua, tostada ou como farelo, na composição de rações para bovinos, sobre o número e gêneros de protozoários ciliados do rúmen. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 27, p. 123-127,1990.

ODONGO, N. E.; BAGG, R.; VESSIE, G.; DICK, P.; OR-RASHID, M. M.; HOOK, S. E.; GRAY, J. T.; KEBREAB, E.; FRANCE, J.; MCBRIDE, B. W. Long-term effects of feeding monensin on methane production in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 1781-1788, 2007.

OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS (AOAC). 15th ed. Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists, 1990.

OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS (AOAC). 16th ed. Gaithersburg, MD: Association of Official Analytical Chemists, 1995.

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

OPIO, C.; GERBER, P.; MOTTET, A.; FALCUCCI, A.; TEMPIO, G.; MACLEOD, M.; VELLINGA, T.; HENDERSON, B.; STEINFELD, H. **Greenhouse gas emissions from ruminant supply chains - A global life cycle assessment**. Itália, Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2013.

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.

PARK, A. F.; SHIRLEY, J. E.; TITGEMEYER, E. C.; DEFRAIN, J. M.; COCHRAN, R. C.; WICKERSHAM, E. E.; NAGARAJA, T. G.; JOHSON, D. E. Characterization of ruminal dynamics in Holstein dairy cows during the periparturient period. **Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 95, p. 571-582, 2011.

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

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

PRIMAVESI, O.; FRIGHETTO, R. T. S.; PEDREIRA, M. S.; LIMA, M. A.; BERCHIELLI, T.T.; DEMASCHI, J. J. A. A.; MANELLA, M. Q.; BARBOSA, P. F.; JOHNSON, K. A.; WESTBERG, H. H. **Técnica do gás traçador SF_6 para medição campo do metano ruminal em bovinos**: adaptações para o Brasil. São Carlos: Emprapa Pecuária Sudeste, 2004a. p. 77 (Documento, 39).

REED, J. D. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 1516-1528, 1995.

REIS, R. A.; MORAIS, J. A. S.; SIQUEIRA, G. R. Aditivos alternativos para a alimentação de ruminantes. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 2., 2006, São Paulo. [**Anais...**], 2006.

REYNOLDS, C. K.; DURST, B.; LUPOLI, B.; HUMPRIES, D. J.; BEEVER, D. E. Visceral tissue mass and rumen volume in dairy cows during the transition from lat gestation to early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 961-971, 2004.

RUSSELL, J. B. A proposed mechanism of monensin action in inhibiting ruminal bacterial growth: effects on ion flux and protonmotive force. **Journal of Animal Science**, v. 64, p. 1519-1525, 1987.

RUSSELL, J. B.; HOULIHAN, A. J. Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p. 65-74, 2003.

RUSSELL, J. B.; STROBEL, H. J. The effect of ionophores on ruminal fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 1-6, 1989.

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

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

SILVA, J. F. C.; LEÃO, M. I. **Fundamentos da nutrição de ruminantes.** Piracicaba: Livroceres, 1979. 380 p.

SNYDER, C. S.; BRUULSEMA, T. W.; JENSEN, T. L. Melhores práticas de manejo para minimizar emissões de gases de efeito estufa associadas ao uso de fertilizantes. **Informações Agronômicas**, n. 121, p.13-14, 2008.

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

STROBEL, H. J.; RUSSELL, J. B. effects of pH and energy spilling on bacteria protein synthesis by carbohydrate limited cultures of mixes rumen bacteria. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 2941-2947, 1986.

TAVENDALE, M. H.; MEAGHER, L. P.; PACHECO, D.; WALKER, N.; ATTWOOD, G. T.; SIVAKUMARAN, S.; Methane production from in vitro rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123-124, p. 403-419, 2005.

THORPE, A. Enteric fermentation and ruminant eructation: the role (and control?) of methane in the climate change debate. **Climatic Change**, v. 93, p. 407-431, 2009.

VALADARES FILHO, S. C.; PINA, D. S.; Fermentação ruminal. In: BERCHIELLI. T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal, SP.: Funep, 2006. p. 151-182.

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

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Symposium: Carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. 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.

WAGHORN, G. C. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production - progress and challenges. **Animal Feed Science and Technology**, v. 147, p. 116-139, 2008.

WAGHORN, G. C.; CLARK, H.; TAUFA, V.; CAVANAGH, A. Monensin controlled-release capsules for methane mitigation in pasture-fed dairy cows. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 48, p. 65-68, 2008.

WAGHORN G. C.; SHELTON, I. D.; McNABB, W. C. Effects of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on its nutritive value for sheep. 1. Non-nitrogenous aspects. **Journal of Agricultural Science**, v. 123, p. 99-107, 1994.

WANG, L. A.; GOONEWARDENE, Z. The use of MIXED models in the analysis of animal experiments with repeated measures data. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 84, p. 1-11, 2004.

WESTBERG, H. H.; JOHNSON, K. A.; COSSALMAN, M. W.; MICHAL, J. J. **A SF_6 tracer technique: methane measurement from ruminants**. 2. rev. Relatório. Pullman-Washington: Washington State University, 1998. 40 p.

WILLIAMS, A. G.; COLEMAN, G. S. The rumen protozoa. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (Ed.). **The rumen microbial ecosystem**. 2. ed. London: Blackie Academic, 1997. p. 73-139.

WILLIAMS, A. G.; COLEMAN, G. S. **The rumen protozoa**. New York: Springer-Verlag New York Inc, 1992. 423 p.

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

YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A.; VEDRES, D. D. Effects of pH and fibrolytic enzymes on digestibility, bacterial protein synthesis, and fermentation in continuous culture. **Animal Feed Science and Technology**, v. 102, p. 137-150, 2002.

YOKOYAMA, M. T.; JOHNSON, K. A. Microbiology of the rumen and intestine. In: CHURCH, D. C. (Ed.). **The Ruminant animal digestive physiology and nutrition**. 5. ed. New Jersey: Englewood, Cliffs, 1993. p. 125-144.