

LAURA ALEXANDRA ROMERO SOLÓRZANO

Efeito de fontes energéticas sobre a fermentação ruminal, produção de metano determinada pela técnica do gás traçador SF₆, digestibilidade aparente total e excreção de nutrientes em bovinos

Pirassununga

2012

LAURA ALEXANDRA ROMERO SOLÓRZANO

Efeito de fontes energéticas sobre a fermentação ruminal, produção de metano determinada pela técnica do gás traçador SF₆, digestibilidade aparente total e excreção de nutrientes em bovinos

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

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza
Rodrigues

Pirassununga

2012

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2643
FMVZ

Solórzano, Laura Alexandra Romero

Efeito de fontes energéticas sobre a fermentação ruminal, produção de metano determinada pela técnica do gás traçador SF₆, digestibilidade aparente total e excreção de nutrientes em bovinos / Laura Alexandra Romero Solórzano. -- 2012.

121 f. : il.

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

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues.

1. Gases de efeito estufa. 2. Digestão. 3. Grão de soja. 4. Polpa cítrica. 5. Ruminantes.
I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito de três fontes energéticas sobre a fermentação ruminal e produção de metano em bovinos, determinada pela técnica do gás traçador SF₆", protocolado sob o nº 2262/2011, utilizando 6 (seis) bovinos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/6/2011.

We certify that the Research "Effect of three energy sources on rumen fermentation and methane production in cattle determined by SF₆ gas tracer technique", protocol number 2262/2011, utilizing 6 (six) cattle, under the responsibility Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 06/22/2011.

São Paulo, 27 de junho de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SOLÓRZANO, Laura Alexandra Romero

Título: Efeito de fontes energéticas sobre a fermentação ruminal, produção de metano determinada pela técnica do gás traçador SF₆, digestibilidade aparente total e excreção de nutrientes em bovinos

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

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

A Deus por todas as maravilhas que me dá no meu dia a dia.

Aos meus pais, Aura Solórzano e Roberto Romero, pelo seu apoio incondicional, amor, força gestora deste triunfo, por lutarem sempre junto comigo pelos meus sonhos, por nunca me deixarem desistir e me dar aquela voz de força para não me deixar derrubar por barreira nenhuma e por ser a base de toda minha vida. Graças a vocês sou a pessoa que sou hoje em dia. Obrigada por tudo meus anjos, amo muito vocês!!!

Ao meu irmão, Sebastian, por ser meu grande amigo, companheiro e por ser uma das minhas grandes alegrias. Te amo meu pequeno.

À minha melhor amiga, irmã, companheira de vivências “Martha”. Obrigada por ser a pessoa que me motiva a alcançar grandes metas. Obrigada por me dar tanta tranquilidade em minha vida. Te amo demais.

Ao meu lindo Namorado! Amor, muito obrigada por tudo. Dou graças a Deus e à vida por ter me dado a oportunidade de te ter na minha vida. Dou graças à vida por ter me dado à pessoa mais maravilhosa do mundo. Meu amor, muito obrigada por ser meu apoio incondicional, por me ter tanta paciência e me esperar (nós dois sabemos o quanto foi difícil a distância). Muito obrigada por me fazer a mulher mais feliz do mundo, muito obrigada por não me deixar desistir para fazer realidade as minhas metas, muito obrigada por ser o meu melhor amigo, a minha maior alegria e a pessoa com quem quero sempre compartilhar minha vida inteira. AMO MUITO VOCÊ MEU AMOR!!!

À toda minha linda família, Tias, Tios, Primos e minha linda Avó (Ofélia), dedico este meu trabalho a todos vocês, pois todos vocês sempre estiveram presentes nas minhas lutas e acreditaram sempre em minhas capacidades. Obrigada por todos os conselhos que recebi de todos, obrigada por sempre se preocuparem comigo e pela linda companhia que sempre tive por parte de vocês durante minha estadia no Brasil.

A meu avô Jorge Solórzano (*in memoriam*) pela sua linda amizade, amor incondicional e por ter muita confiança em mim. Avô querido, eu sei o quanto você desejava me ver realizada como uma grande profissional. Assim, este trabalho é para você, meu lindo!!! Que saudade de você, meu grande amigo.

A todas as lindas pessoas que mencionei anteriormente, dedico meu trabalho, pois só vocês sabem todas minhas alegrias e tristezas, vocês sabem todo o esforço que realmente fiz para a realização do meu mestrado e, além disso, todos vocês têm sido o maior apoio na minha vida. Senti muita saudade de todos vocês, mas no meu coração sempre os tinha presentes!! Amo muito a todos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço de coração:

A Deus, por todas as maravilhas que me dá na vida, por me guiar e me permitir sempre alcançar grandes metas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues, por me dar a honra de ser sua orientada, por ser um excelente orientador e amigo, por me escutar nos momentos em que precisei, por me guiar e me ensinar muitas coisas tanto profissionais como coisas que serviram para minha vida, para crescer como pessoa. Muito obrigada, por me dedicar tempinhos para me explicar e esclarecer dúvidas sempre que eu precisava. Agradeço por me brindar sempre seu apoio, por me aconselhar quando possível. Professor, admiro muito o senhor e me sinto feliz de tê-lo escolhido como o meu orientador, realmente não tenho palavras para agradecer ao senhor tudo o aprendido.

À Dra. Carolina Tobias Marino, por ser meu maior apoio aqui no Brasil. Carol, não sei, nem encontro palavras, nem a maneira para te agradecer por tudo o que você tem feito por mim. Muito obrigada por ser minha coluna durante minha estadia no Brasil, muito obrigada por ser além de uma companheira do meu grupo de pesquisa, uma grande amiga, uma mãe e como sempre te digo muito obrigada por ser o meu anjo. Você realmente foi a pessoa que me ajudou em todas as minhas coisas de maneira incondicional. Muito obrigada pela sua ajuda e força durante o meu experimento e por tudo o que me ensinou. Carol, sinto muito respeito e admiração por você. Da minha parte, você também tem uma amiga incondicional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Programa PEC-PG, pela concessão da bolsa de estudos.

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

A todos os professores do Departamento de Nutrição e Produção Animal, pelo ensinamento durante as aulas e no meu dia a dia.

Ao Prof. Dr. Francisco Palma Rennó, pelas excelentes aulas durante o meu mestrado e por todos os conhecimentos dados. Professor, gostei muito de suas aulas, foram muito boas. Muito obrigada pelos conselhos como profissional, admiro muito o senhor.

À EMBRAPA Pecuária Sudeste e EMBRAPA Meio Ambiente pelo apoio durante a execução do meu experimento, pelo fornecimento das Cangas para a realização deste estudo e pelo financiamento das análises relacionadas a uma das fases do meu experimento.

Ao Dr. Alexandre Berndt, pelo seu incondicional apoio, pelos ensinamentos durante a execução do meu experimento e pela boa disposição sempre que tive dúvidas.

À Dra. Rosa Toyoko Shiraishi Frighetto e a Dagmar Oliveira Nunes, pelo imprescindível auxílio na realização das análises de Metano.

Ao senhor Gilmar E. Botteon, responsável pelo setor de fistulados do VNP (FMVZ-USP), pelo auxílio durante o meu experimento. Senhor Gilmar, sinto muito respeito pelo senhor e agradeço de coração por todas as conversas, conselhos recebidos, por me escutar sempre que precisei e por se tornar como um pai e grande amigo.

Ao senhor Gilson Luiz Alves de Godoy, funcionário do Laboratório de Bromatologia do VNP (FMVZ-USP), pelo auxílio incondicional na realização das análises laboratoriais. Senhor Gilson, muito obrigada por tudo o que me ensinou e pela sua constante dedicação durante as minhas análises laboratoriais. Muito obrigada por toda a paciência e pelas boas conversas e risadas. Agradeço de antemão por se tornar um grande amigo.

Ao senhor Ari Luiz de Castro, funcionário do Laboratório de Bromatologia do VNP (FMVZ-USP), pelo auxílio na realização das análises laboratoriais. Senhor Ari, muito

obrigada pelas explicações e tudo o que me ensinou. Muito obrigada por me transmitir parte dos seus conhecimentos e esclarecer minhas dúvidas sempre que precisei.

Ao secretário do Programa de Pós-graduação de Nutrição e Produção Animal VNP (FMVZ-USP), João Paulo Barros, por ser muito atencioso e me auxiliar sempre que precisei. João, muito obrigada por tudo, por se tornar um grande amigo, por sempre se preocupar pelas minhas coisas do mestrado, pelas boas conversas e boas risadas e por ser uma mão amiga.

À minha equipe do grupo de pesquisa e grandes amigos Flavio Perna Junior, Mauricio Furlan Martins (Xibungo), Eduardo Cuelar Orlandi, Carolina Tobias e Lerner Arévalo Pinedo. Gente muito obrigada pela força durante a realização do meu experimento. Muito obrigada por todos os momentos compartilhados, por todas as risadas, pelas boas comidinhas que sempre fazíamos durante o experimento, pelo gostoso bolinho do Xibungo. De coração, agradeço a todos por se tornarem minha segunda família aqui no Brasil.

À Juliane Diniz Magalhães, porque sempre que precisei de alguma coisa contei com você, com sua ajuda e seu apoio. Obrigada por me escutar quando precisei e por ser uma pessoa com grandes valores.

A todos os estagiários que me auxiliaram na realização deste trabalho, em especial a Angélica Munaretto.

E, finalmente, às vacas fistuladas Darlyn, Caroço, Lolita, Vermelhinha, Jacira e Pipoca, que colaboraram muito durante o experimento.

RESUMO

SOLÓRZANO, L. A. R. **Efeito de fontes energéticas sobre a fermentação ruminal, produção de metano determinada pela técnica do gás traçador SF₆, digestibilidade aparente total e excreção de nutrientes em bovinos.** [Effect of energy sources on rumen fermentation, methane production determined by the SF₆ tracer technique, total apparent digestibility and excretion of nutrients in cattle]. 2012. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de três fontes energéticas sobre a produção de metano em bovinos utilizando-se a técnica do gás traçador hexafluoreto de enxofre (SF₆), sobre os parâmetros da fermentação ruminal, a digestibilidade aparente total e a excreção de nutrientes da dieta. Seis vacas (730 ± 70 kg) canuladas no rúmen foram utilizadas e distribuídas a três dietas, que diferiram quanto à fonte energética, seguindo-se delineamento experimental em quadrado latino 3x3 replicado (n= 18 unidades experimentais): Controle (CON): Dieta de baixo extrato etéreo (3,50% de EE); Soja (SOJ): Dieta de alto extrato etéreo (5,30% de EE) com inclusão de 15% de soja grão; e Polpa Cítrica (POL): Dieta de baixo extrato etéreo (3,00% de EE) e alta participação de pectina com inclusão de 15% de polpa cítrica. Cada período experimental foi constituído de 21 dias, sendo que, entre o dia 5 e o dia 15, 2 g do marcador óxido crômico por kg de MS de alimento consumido foi administrado via cânula ruminal, para determinação da digestibilidade aparente total da MS e suas frações, bem como da excreção dos nutrientes da dieta. O ensaio de digestibilidade foi constituído por duas fases, sendo os cinco primeiros dias para adaptação ao marcador e os cinco últimos para coleta de fezes. A excreção da MS e dos nutrientes, bem como a excreção de Nitrogênio, foi calculada a partir dos dados de coeficiente de digestibilidade da MS e suas frações. Para cada período experimental, os últimos 6 dias foram destinados para coleta de dados da produção de metano (CH₄) e do consumo de matéria seca (CMS). No dia 21 coletou-se líquido ruminal para determinação da concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), contagem total e diferencial de protozoários e pH ruminal, avaliados antes, 3, 6, 9 e 12 h após a alimentação matinal. As concentrações de CH₄, SF₆ e AGCC foram determinadas por cromatografia gasosa. O pH de cada amostra foi determinado com potenciômetro digital portátil e as contagens diferenciais dos protozoários foram avaliadas através de microscopia direta. Não houve diferenças significativas (P>0,05) entre os

tratamentos para o CMS expresso em quilograma por dia (kg/dia), porcentagem do peso vivo (% PV) ou por unidade de peso metabólico (g/kg de PV^{0,75}). Não houve efeito de fonte energética sobre o consumo de energia bruta (CEB), nem de fibra em detergente neutro (CFDN). O tratamento com grãos de soja reduziu (P<0,05) o consumo de proteína bruta (CPB), de extrativo não nitrogenado (CENN) e de matéria orgânica (CMO). O consumo de extrato etéreo (CEE) foi maior (P<0,05) para os animais que consumiram o tratamento com grãos de soja. Não foi observado efeito (P<0,05) de fonte energética para os coeficientes de digestibilidade da MS, PB, EB, FDN, EE, ENN ou MO. A digestibilidade da FDA foi mais elevada (P<0,05) para o tratamento com polpa cítrica, enquanto que o valor de NDT foi maior (P<0,05) para o tratamento com grãos de soja. Não houve diferenças significativas (P<0,05) entre os tratamentos para a excreção de energia bruta (ExEB), nem de fibra em detergente neutro (ExFDN). A excreção de MS, ENN e de MO foram menores (P<0,05) para o tratamento com grãos de soja. Todas as fontes energéticas testadas influenciaram (P<0,05) a excreção de proteína bruta (ExPB), diferindo todos os tratamentos entre si. As excreções de FDA e de EE foram mais elevadas (P<0,05) para o tratamento com grãos de soja. Houve efeito (P<0,05) de fonte energética para a excreção de nitrogênio, sendo mais elevada para o tratamento com polpa cítrica em relação ao tratamento com grãos de soja. A emissão de CH₄ pelos bovinos foi de 286,22 a 344,22 g/d; 103,71 a 125,64 kg/ano; 17,41 a 22,03 g/kg de matéria seca ingerida; 5,17 a 6,58% da EB perdida na forma de metano e 3,77 a 4,53 Mcal/Ani/d. Não houve diferença significativa para as emissões de metano entre os tratamentos quando avaliadas a 5% de probabilidade. As fontes energéticas testadas não influenciaram (P<0,05) os valores de pH ruminal, a concentração média do ácido propiônico, nem a relação acético/propiônico. A concentração total de AGCC, a concentração de ácido acético, de ácido butírico, bem como a contagem total de protozoários, foram maiores (P<0,05) para o tratamento com polpa cítrica. Fonte alta em pectina, como a polpa cítrica, ou em ácidos graxos insaturados, como a soja grão, não prejudicaram a digestibilidade das dietas. Neste sentido, são indicadas como fontes de elevado potencial de utilização em dietas para bovinos. Entretanto, sua inclusão resultou em mudanças no ambiente ruminal pela alteração do perfil fermentativo, porém, não foi possível demonstrar alterações na produção de metano.

Palavras-chave: Gases de efeito estufa. Digestão. Grão de soja. Polpa cítrica. Ruminantes.

ABSTRACT

SOLÓRZANO, L. A. R. **Effect of energy sources on rumen fermentation, methane production determined by the SF₆ tracer technique, total apparent digestibility and excretion of nutrients in cattle.** [Efeito de fontes energéticas sobre a fermentação ruminal, produção de metano determinada pela técnica do gás traçador SF₆, digestibilidade aparente total e excreção de nutrientes em bovinos]. 2012. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

The objective of this study was to evaluate the effect of three energy sources on methane production in cattle using the tracer sulfur hexafluoride technique (SF₆) on rumen fermentation parameters, total apparent digestibility and excretion of nutrients of diet. Six cows (730 ± 70 kg) ruminally cannulated were used and allocated to three diets that differed in energy source, followed by the replicated 3x3 Latin square design (n = 18 experimental units): Control (CON): Low ether extract diet (3.50% EE); Soybean (SOJ): High ether extract diet (5.30% EE) with inclusion of 15% of soybean seeds; Citrus pulp (POL): Low ether extract (3.00% EE) and high pectin diet with inclusion of 15% of citrus pulp. Each experimental period consisted of 21 days. From day 5 to day 15, 2 g of the marker chromic oxide per kg DM of feed consumed were administered, through rumen cannula, to determine the apparent digestibility of total MS and its fractions as well as excretion of nutrients. Digestibility trial consisted of two phases: the first five days for marker adaptation and the last five for feces collection. The excretion of DM and nutrients, as well as, nitrogen excretion was calculated from digestibility data of DM and its fractions. For each experimental period, the last 6 days were used to collect data from methane (CH₄) production and dry matter intake (DMI). At day 21, rumen fluid was collected for short chain fatty acids concentration determination (SCFA), total and differential counts of protozoa and ruminal pH measured before, 3, 6, 9 and 12 h after morning feeding. The concentrations of CH₄, SF₆ and SCFA were determined by gas chromatography. The pH of each sample was determined with a digital portable pH meter and differential counts of protozoa were evaluated by direct microscopy. There were no significant differences (P>0.05) among treatments for DMI expressed as kilograms per day (kg/day), percentage of body weight (% BW) or per unit of metabolic weight (g/kg PV^{0,75}). There was no effect of energy source on gross energy (GEI) or neutral detergent fiber (NDFI) intake. Soybeans

treatment decreased ($P < 0.05$) crude protein (CPI), nitrogen free extract (NFEI) and organic matter (OMI) intake. Ether extract (EEI) intake as higher lower ($P < 0.05$) for cows fed the soy beans treatment. There was no effect ($P < 0.05$) of energy source on digestibility coefficients of DM, CP, GE, NDF, EE, NFE or OM. The digestibility of ADF was higher ($P < 0.05$) for citrus pulp treatment, while TDN value was higher ($P < 0.05$) for soybeans treatment. There were no significant differences ($P < 0.05$) among treatments for gross energy (GEE_{ex}) or neutral detergent fiber (NDF_{ex}) excretion. The excretion of DM, NFE and OM were lower ($P < 0.05$) for treatment with soybeans. All energy sources influenced ($P < 0.05$) crude protein excretion (CPE_{ex}) and all treatments differed from each other. The excretions of ADF and EE were higher ($P < 0.05$) for treatment with soybeans. A significant effect ($P < 0.05$) of energy source was observed for nitrogen excretion, where the highest values were observed for citrus pulp compared to soybeans treatment. The emission of CH₄ by cattle was 286.22 to 344.22 g/d, 103.71 to 125.64 kg/year; 17.41 to 22.03 g/kg of dry matter ingested, 5.17 to 6.58% GE lost in the form of methane and 3.77 to 4.53 Mcal/Ani/d. There was no significant difference in methane emissions between treatments when evaluated at 5% probability. Energy sources tested did not influence ($P < 0.05$) pH values, propionic acid concentration or acetate:propionate ratio. Total concentration of SCFA, acetic acid and butyric acid concentration, as well as total count of protozoa, were higher ($P < 0.05$) in citrus pulp treatment. Pectin high source, such as citrus pulp, or unsaturated fatty acids, such as soy beans, did not affect diets digestibility. In this sense, they are indicated as sources of high potential for use in cattle diets. However, their inclusion in diets resulted in changes in rumen environment by changes in fermentation pattern, but it was not possible to demonstrate changes in methane production.

Keywords: Greenhouse gas. Digestion. Soy bean. Citrus pulp. Ruminants.

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1 - Esquema do delineamento experimental em dois quadrados latinos 3 x 3 contemporâneos..... | 54 |
| Tabela 2 - Esquema da análise de variância para delineamento em quadrado latino replicado | 54 |
| Tabela 3 - Proporções de ingredientes e composição bromatológica estimada das dietas experimentais, expressas em porcentagem da matéria seca (% MS) | 55 |
| Tabela 4 - Efeito de três fontes energéticas sobre o consumo de matéria seca, expresso em quilograma por dia, porcentagem do peso vivo ou unidade de peso metabólico | 65 |
| Tabela 5 - Efeito de três fontes energéticas sobre a produção de metano por bovinos determinada pela técnica do gás traçador SF ₆ | 68 |
| Tabela 6 - Efeito de três fontes energéticas sobre os parâmetros da fermentação ruminal.. | 71 |
| Tabela 7 - Efeito de três fontes energéticas sobre a contagem total e diferencial de protozoários | 77 |
| Tabela 8 - Esquema do delineamento experimental em dois quadrados latinos 3 x 3 contemporâneos..... | 91 |
| Tabela 9 - Esquema da análise de variância para delineamento em quadrado latino replicado | 91 |
| Tabela 10 - Proporções de ingredientes e composição bromatológica estimada das dietas experimentais, expressas em porcentagem da matéria seca (% MS) | 92 |
| Tabela 11 - Efeito de três fontes energéticas sobre o consumo da MS e dos nutrientes | 97 |
| Tabela 12 - Efeito de três fontes energéticas sobre a digestibilidade aparente total da MS e suas frações..... | 100 |
| Tabela 13 - Efeito de três fontes energéticas sobre a excreção da MS e dos nutrientes..... | 102 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Esquema dos dias de coleta para cada variável avaliada dentro de cada período experimental 56
- Figura 2 - Cápsula de permeação de hexafluoreto de enxofre (SF₆) identificada e previamente preenchida com SF₆ e calibrada: a) cápsula montada e deitada; b) cápsula de permeação em pé 58
- Figura 3 - Técnica do gás traçador SF₆ para a mensuração de metano: a) canga coletora-armazenadora em tubo de PVC de 60 mm de classe 20, com válvula de coleta e engate rápido montado na canga; b) manômetro digital portátil; c) Canga submetida a vácuo com bomba 60
- Figura 4 - Valores médios do pH ruminal e da concentração dos ácidos graxos de cadeia curta, nos diferentes tempos de coleta do líquido ruminal antes, 3, 6, 9 e 12 horas após alimentação matinal: a) médias do pH ruminal; b) concentração mM do ácido acético; c) concentração mM do ácido propiônico.; d) concentração mM do ácido butírico; e) concentração mM do total de ácidos graxos de cadeia curta; f) relação acetato:propionato 74
- Figura 5 - Esquema dos dias de coleta para análise de digestibilidade aparente total da MS e suas frações e a excreção dos nutrientes, avaliadas dentro de cada período experimental .. 93

SUMARIO

| | |
|---|-----------|
| CAPÍTULO I..... | 18 |
| CONSIDERAÇÕES INICIAIS..... | 18 |
| 1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS..... | 19 |
| CAPÍTULO II..... | 21 |
| REVISÃO DE LITERATURA..... | 21 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA..... | 22 |
| 2.1 FERMENTAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO AMBIENTE RUMINAL..... | 22 |
| 2.2 MICRORGANISMOS RESPONSÁVEIS PELA DIGESTÃO FERMENTATIVA..... | 25 |
| 2.3 SUBSTRATOS DA FERMENTAÇÃO..... | 28 |
| 2.4 PRODUTOS DA FERMENTAÇÃO..... | 29 |
| 2.5 FATORES QUE INFLUENCIAM A FERMENTAÇÃO RUMINAL..... | 31 |
| 2.6 METANOGENESE EM RUMINANTES..... | 37 |
| 2.7 ESTRATÉGIAS NUTRICIONAIS PARA DIMINUIÇÃO DE PERDA ENERGÉTICA POR PRODUÇÃO DE METANO..... | 38 |
| 2.8 EMISSÃO DE METANO: PERSPECTIVA AMBIENTAL E NUTRICIONAL..... | 41 |
| 2.9 MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE METANO..... | 42 |
| 2.10 MÉTODO DO GÁS TRAÇADOR SF ₆ | 43 |
| CAPÍTULO III..... | 45 |
| EFEITO DE TRÊS FONTES ENERGÉTICAS SOBRE A FERMENTAÇÃO RUMINAL E PRODUÇÃO DE METANO DETERMINADA PELA TÉCNICA DO GÁS TRAÇADOR SF ₆ EM BOVINOS..... | 45 |
| 3 INTRODUÇÃO..... | 50 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS..... | 53 |
| 4.1 ANIMAIS E INSTALAÇÕES..... | 53 |
| 4.2 TRATAMENTOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL..... | 53 |
| 4.3 MANEJO NUTRICIONAL..... | 54 |
| 4.4 PERÍODO EXPERIMENTAL..... | 56 |
| 4.5 PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO..... | 57 |
| 4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS..... | 64 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 65 |
| 5.1 CONSUMO DE MATÉRIA SECA..... | 65 |
| 5.2 PRODUÇÃO DE METANO DETERMINADA PELA TÉCNICA DO GÁS TRAÇADOR SF ₆ | 67 |
| 5.3 PARÂMETROS DA FERMENTAÇÃO RUMINAL..... | 71 |
| 5.4 CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE PROTOZOÁRIOS RUMINAIS..... | 77 |
| 6 CONCLUSÕES..... | 81 |
| CAPÍTULO IV..... | 82 |
| EFEITO DE TRÊS FONTES ENERGÉTICAS SOBRE A DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL E A EXCREÇÃO DE NUTRIENTES DA DIETA EM BOVINOS..... | 82 |
| 7 INTRODUÇÃO..... | 87 |
| 8 MATERIAL E MÉTODOS..... | 90 |
| 8.1 ANIMAIS E INSTALAÇÕES..... | 90 |
| 8.2 TRATAMENTOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL..... | 90 |
| 8.3 MANEJO NUTRICIONAL E PERÍODO EXPERIMENTAL..... | 91 |

| | |
|--|-----|
| 8.4 PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO | 93 |
| 8.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS | 96 |
| 9 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 97 |
| 9.1 CONSUMO DA MATÉRIA SECA E DOS NUTRIENTES | 97 |
| 9.2 DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL | 100 |
| 9.3 EXCREÇÃO DA MS E DOS NUTRIENTES | 102 |
| 10 CONCLUSÕES | 105 |
| REFERÊNCIAS | 105 |

CAPÍTULO I.
CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Mudanças climáticas no mundo, resultantes do aumento das concentrações de gases na atmosfera, tem levado à alteração no balanço de entrada e saída da radiação solar do planeta, provocando aquecimento da superfície terrestre. Os principais gases responsáveis pelo efeito estufa são: dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4), óxido nitroso (N_2O) e ozônio (O_3) (COTTON; PIELKE, 1995).

Especialistas do IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) têm debatido questões relacionadas às mudanças climáticas globais. A quantificação das emissões de gases de efeito estufa por ecossistemas agrícolas e as estimativas preliminares dessas emissões para o Brasil mostram que a pecuária constitui uma das principais fontes de metano entre as atividades agropecuárias (IPCC, 1995). Nas últimas décadas, discutiu-se muito a respeito da produção de metano por ruminantes, pois este gás está ligado diretamente ao fenômeno de efeito estufa do globo terrestre (COTTON; PIELKE, 1995). O gás metano possui poder de absorção de radiação infravermelha cerca de 23 vezes maior que o dióxido de carbono (WUEBBLES; HAYHOE, 2002) e, apresentando 10 anos de vida na atmosfera, contribui com aproximadamente 18% de todo o potencial de aquecimento que ocorre atualmente no globo (CLARK et al., 2001). Sendo assim, é natural que as atenções de comitês, como a Agência Americana de Proteção Ambiental (USEPA) e a World Meteorological Organization, esta ligada à Organização das Nações Unidas, voltem-se à questão da emissão de gás metano e busquem medidas que possam ser adotadas para prevenção do superaquecimento do globo terrestre.

A interação entre os fatores de produção animal e o impacto ambiental causado pelas diversas atividades tem sido, cada vez mais, o objetivo de pesquisas relacionadas com as mudanças climáticas mundiais. Os ruminantes, devido ao processo digestivo de fermentação entérica, são reconhecidos como importante fonte de emissão de metano (CH_4) para a atmosfera. Além disso, a produção desse gás, que pode variar em função do sistema de alimentação, é considerada uma parte perdida da energia do alimento, refletindo em ineficiência na produção animal (PEDREIRA et al., 2005). Nos ruminantes, as perdas energéticas por eructação de gases, como o metano e dióxido de carbono, representam

valores de aproximadamente 2 a 12% da energia bruta contida na dieta (JOHNSON et al., 1993), o que tem grandes implicações no aquecimento global.

O conhecimento dos fatores que determinam a eficiência do processo fermentativo ruminal e a emissão de produtos poluidores é fundamental ao processo de redução do impacto ambiental causado pelos sistemas de produção animal, além da busca por aumento da produtividade e eficiência econômica dos sistemas de produção animal (NASCIMENTO, 2007). Posto isto, objetivou-se com o presente trabalho avaliar o efeito de três fontes energéticas sobre a fermentação ruminal e produção de metano determinada pela técnica do gás traçador SF₆, assim como sobre a digestibilidade aparente total e a excreção da MS e dos nutrientes em bovinos, obtendo desta maneira, uma compreensão mais abrangente do processo fermentativo no rúmen e de processos digestivos que podem estar envolvidos na ineficiência da produção animal.

CAPÍTULO II.
REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

Durante a evolução, os animais ruminantes desenvolveram características anatômicas e simbióticas que lhes permitiram utilizar eficientemente carboidratos estruturais como fonte de energia e compostos nitrogenados não-proteicos como fonte de proteína.

A fermentação em ruminantes é o resultado da atividade física e microbiológica, que converte os componentes dietéticos a ácidos graxos voláteis, proteína microbiana e vitaminas do complexo B e vitamina K, metano e dióxido de carbono, amônia, nitrato e etc. (OWENS; GOETSCH, 1993).

A manutenção de uma população microbiana ruminal ativa depende de algumas características ruminais que são mantidas pelo animal hospedeiro, como o suprimento de alimento mastigado ou ruminado, a remoção dos produtos da fermentação, a adição de tamponantes e nutrientes via saliva, a remoção de resíduos indigestíveis dos alimentos e a manutenção do pH, temperatura, anaerobiose e umidade ideais ao crescimento microbiano.

2.1 FERMENTAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO AMBIENTE RUMINAL

O processo digestivo das espécies ruminantes compreende uma das relações simbióticas entre seres vivos mais bem sucedidas na natureza. O principal órgão digestório dos ruminantes, o rúmen, é considerado uma câmara de fermentação que apresenta condições ambientais adequadas, tais como temperatura entre 38-41°C, pH entre 5,5-7,2, umidade entre 85-90%, osmolaridade entre 260-340 mOsm e ambiente anaeróbio. Além disso, há presença constante de substratos para fermentação oriundos da alimentação, um padrão de motilidade ruminal que permite a mistura do conteúdo e remoção periódica dos subprodutos de fermentação não utilizados pela microbiota através de absorção pelo epitélio ruminal (CARVALHO et al., 2003).

O potencial redox no rúmen está usualmente ente 250-450 mV, refletindo ausência de oxigênio e o excesso de potencial redutor (VAN SOEST, 1994). Em consequência dessa característica do ambiente ruminal, as opções metabólicas dos microrganismos tornam-se limitadas, sendo obrigados a trabalhar com este excesso de equivalentes redutores (NADH), utilizando-os em uma variedade de reações. Para dispor desses compostos, eles reduzem todos os compostos disponíveis, sendo o CO₂ reduzido a metano, sulfatos e nitratos a sulfetos e amônia, e ácidos graxos insaturados a saturados. Apesar desse excesso de compostos redutores, o crescimento microbiano permanece limitado pela disponibilidade de ATP (OWENS; GOETSCH, 1993).

Os microrganismos, por sua vez, degradam e fermentam os alimentos ingeridos pelo hospedeiro obtendo, como produtos, nutrientes necessários para sua sobrevivência e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) que não são utilizados pelos microrganismos, mas sim pelos ruminantes, como fonte de energia para os diversos processos metabólicos.

O objetivo do ruminante é manter as condições ruminais descritas acima para assegurar que o metabolismo dos microrganismos mantenha-se ativo para fermentar os nutrientes da dieta. A não manutenção destas condições poderá acarretar distúrbios metabólicos, como acidose ruminal. O principal diferencial entre ruminantes e outras espécies de mamíferos é que, através da relação simbiótica com os microrganismos, é possível o aproveitamento dos nutrientes contidos nos carboidratos estruturais e nos compostos nitrogenados não-proteicos. Isto se deve à presença de enzimas no metabolismo dos microrganismos que permitem degradar estes compostos (VALADARES FILHO; PINA, 2006).

Os ruminantes possuem a capacidade para converter alimentos de baixa qualidade em proteína de alta qualidade (VARGA; KOLVER, 1997). O rúmen é considerado um ecossistema microbiano diverso e único, composto por quatro tipos de microrganismos ativos no seu interior: bactérias, protozoários, fungos e arqueias metanogênicas, sendo as bactérias constituintes de 60 a 90% da biomassa microbiana com cerca de 200 espécies (KOZLOSKI, 2002). As arqueias metanogênicas, responsáveis pela produção de CH₄, formam um grupo distinto de microrganismos, possuindo co-fatores (coenzima M, F₄₂₀, F₄₃₀) e lipídeos (éteres de isopranyl glicerol) únicos (McALLISTER et al., 1996). A parede celular destes microrganismos é composta por pseudomureína, proteína, glicoproteína ou

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

A maior parte dos nutrientes do alimento, principalmente as fontes energéticas e protéicas, é transformada em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), em massa microbiana e em gases como metano (CH_4), dióxido de carbono (CO_2) e hidrogênio (H_2) (BAKER, 1999). Os AGCC podem ser considerados um resíduo da fermentação para os microrganismos. Entretanto, para o ruminante, representam a principal fonte de energia. A energia presente nos AGCC representa em torno de 75 a 80% da energia originalmente presente nos carboidratos fermentados e, normalmente, contribuem em 50 a 70% da energia digestível do alimento (KOZLOSKI, 2002).

A produção de metano no rúmen está diretamente relacionada com a concentração de H_2 (CHAUCHEYRAS et al., 1995). Na medida em que ocorre a fermentação dos carboidratos no rúmen, aumentam-se os teores de H_2 que, se não forem removidos, inibem os sistemas enzimáticos que envolvem o NADH, importante cofator na fermentação dos carboidratos (PEDREIRA, 2004).

De outra parte, sabe-se que do balanço entre o aporte de energia e proteína vai depender a eficiência no processo de fermentação ruminal. Assim, o aporte de nitrogênio amoniacal pode servir como a principal fonte de N para a síntese de proteína microbiana em bactérias fermentadoras de carboidratos estruturais. Entretanto, algumas espécies, como as bactérias fermentadoras de carboidratos não-estruturais, requerem aminoácidos e peptídeos (NRC, 1996). As bactérias ruminais podem incorporar aminoácidos em proteína microbiana ou fermentá-los como fonte de energia. A fermentação de aminoácidos também origina amônia ruminal. Como o crescimento microbiano é dependente do suprimento de carboidratos fermentáveis, os produtos finais do metabolismo de proteínas são influenciados pela disponibilidade de carboidratos (RUSSEL; STROBEL, 1989).

2.2 MICRORGANISMOS RESPONSÁVEIS PELA DIGESTÃO FERMENTATIVA

Os agentes responsáveis pela fermentação ruminal são microrganismos unicelulares representados por bactérias, protozoários e fungos. Em termos quantitativos, 60-90% da massa microbiana ruminal é composta por bactérias, 10-40% por protozoários ciliados e o restante 5-10% por fungos (VAN SOEST, 1994).

As bactérias representam a fração da população ruminal mais importante para a vida do ruminante. O neonato adquire esta microbiota pelo contato direto com outros bovinos ou pelo contato indireto através de elementos contaminados, como forragens ou água de bebida (RELLING; MATTIOLI, 2003).

Dependendo do tipo de dieta fornecida, tipo de substrato empregado e os diferentes produtos finais da fermentação obtidos, as bactérias podem ser classificadas em fermentadoras de carboidratos estruturais, não-estruturais, proteolíticas, arqueias metanogênicas, lácticas e lipolíticas (RELLING; MATTIOLI, 2003). Sendo assim, na dependência da dieta fornecida, ou seja, do tipo de substrato que chega ao rúmen, haverá determinada colonização, resultando em diferentes produtos de fermentação. No rúmen, os microrganismos estão distribuídos espacialmente no líquido ruminal, aderidos à fração sólida da digesta ou ligados à parede ruminal (ARCURI; LOPES; CARNEIRO, 2006).

Os protozoários se desenvolvem preferencialmente em pH ruminal superior a 6,0. Do ponto de vista metabólico, os protozoários diferem das bactérias por possuir menor capacidade celulolítica (5-20% do total). Além disso, são incapazes de sintetizar proteínas a partir de nitrogênio não proteico (NNP). São benéficos ao moderar a fermentação amilolítica, devido a que consomem preferentemente bactérias amilolíticas e ingerem partículas insolúveis e solúveis (grânulos de amido) no fluido ruminal. Essa habilidade em digerir a maioria dos componentes dos alimentos lhes confere um importante papel aos ciliados no processo de fermentação ruminal, sendo responsáveis por 34% da digestibilidade da fibra. A ausência dos ciliados está associada à diminuição da digestibilidade da forragem (PUNIA et al., 1987; ANKRAH et al., 1990; HEGARTY et al., 1994), assim como a diminuição das concentrações de $N-NH_3$, cuja escassez limita a ação das bactérias celulolíticas do rúmen.

As concentrações de protozoários variam conforme o tipo da dieta e qualidade da mesma, assim como, com a frequência com que o animal é alimentado, estado fisiológico e a genética dos animais (HUNGATE, 1966). Para tal, Veira (1986) relata que o número de protozoários pode ser relativamente baixo em animais recebendo dietas exclusivas de forragens, e maior nas misturas de forragens e grãos. Desta forma e dependendo das características mencionadas, os protozoários podem se classificar em *Entodinium*, *Isotricha*, *Dasytricha*, *Epidinium* e a subfamília *Diplodinae* (que inclui os gêneros *Diplodinium*, *Eudiplodinium*, *Ostracodinium* e *Polyplastron*). Vários autores descrevem o gênero *Entodinium* spp. como o protozoário predominante na contagem total, chegando a 90%, especialmente quando a alimentação é a base de concentrado (HUNGATE, 1966; NOGUEIRA FILHO et al., 1992) ou quando se tem uma dieta rica em energia (DENNIS et al., 1983).

Os protozoários dos gêneros *Diplodinium* spp. e *Epidinium* spp. são degradadores de fibra, devido a que apresentam concentrações consideráveis de celulase. Portanto suas populações aumentam em dietas fibrosas (HUNGATE, 1966; PURSE; MOIR, 1966; WILLIAMS; COLEMAN, 1991; JOUANY, 1996). Geralmente quando as forragens são de qualidade inferior, as proporções de *Diplodinium* spp são mais elevadas do que com forragens melhoradas, pois a população diminui (VANDERWATH; MYBURGH, 1941).

Já os *Holotricha* (*Isotricha* spp. e *Dasytricha* spp.) aparecem em maior número nos ruminantes alimentados com dietas ricas em polissacarídeos não estruturais e carboidratos solúveis das plantas (HUNGATE, 1966; WILLIAMS; COLEMAN, 1991; OLIVEIRA et al., 1992; JOUANY, 1996).

Finalmente, os fungos não predominam no rúmen, pela sua baixa taxa de multiplicação em comparação com as bactérias, algumas das quais reprimem seu crescimento, como o *Ruminococcus* spp (RELLING; MATTIOLI, 2003). Os fungos possuem uma importante atividade celulolítica, especialmente quando o ruminante consome forragens maduras.

2.2.1 Arqueias metanogênicas

As arqueias metanogênicas, são os microrganismos responsáveis pela produção de metano (CH₄) e não são mais consideradas como bactérias. Desta forma, torna-se de grande importância aprofundar mais sobre o seu metabolismo e modo de agir em geral.

As arqueias metanogênicas ocupam um nicho metabólico exclusivo, são estritamente anaeróbias e produzem metano. Estes organismos são encontrados em diversos habitats anaeróbios, desde sedimentos marinhos e aquáticos a digestores, rúmen e intestino grosso de herbívoros e outros mamíferos.

As metanogênicas representam um grupo de microrganismos polifilético, compreendendo três ordens, com oito famílias e 21 gêneros. Apresentam morfologia comum às células procarióticas, com forma de bacilos de diferentes tamanhos, cocos, e filamentos. Algumas representantes apresentam propriedade de coloração Gram-positiva e outras Gram-negativa, sendo a taxonomia baseada essencialmente em métodos moleculares, por comparação de sequências do 16SrRNA. As Análises morfofisiológicas facilitam a classificação primária relacionada a gênero (SOWERS, 1995).

Segundo Kamra (2005), oito diferentes espécies representam os cinco gêneros de metanogênicas que têm sido encontradas no rúmen: *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobacterium bryanti*, *Methanobacterium vibacter smithii*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanoculleus olentangyi*, *Methanobacterium formicicum*, *Methanosarcina barkeri* e *Methanomicrobium mobile*. As espécies metanogênicas mais comumente isoladas do rúmen são linhagens de *Methanobrevibacter*, *Methanomicrobium*, *Methanobacterium* e *Methanosarcina* (JARVIS et al., 2000).

De acordo com Mcallister et al. (1996), as arqueias metanogênicas, responsáveis pela produção de CH₄, formam um grupo distinto de microrganismos, possuindo co-fatores (coenzima M, F 420, F 430) e lipídeos (ésteres de isopropanil glicerol) únicos. A parede celular destes microrganismos é composta principalmente por pseudomureína, proteína, glicoproteína ou heteropolissacarídeos (ISHINO et al., 1998). As arqueias se diferenciam das bactérias: 1) quanto à parede celular, que pode ser composta por pseudopeptidoglicano ou apenas por proteína, sendo a parede das bactérias composta por peptidoglicano; 2)

quanto à membrana celular, que nas arqueias é formada por lipídeos de cadeias hidrocarbonadas ramificadas que se ligam ao glicerol por ligações do tipo éter e nas bactérias os lipídeos das cadeias hidrocarbonadas ramificadas se ligam ao glicerol por ligações do tipo éster; 3) quanto ao genoma, que nas arqueias é determinado pela presença de plasmídeos (DNA único, circular) e nas bactérias é constituído por DNA fragmentado em cromossomos múltiplos (RAISMAN; GONZALEZ, 2006).

No rúmen, as arqueias são encontradas intimamente associadas com protozoários ciliados (FINLAY et al., 1994). As metanogênicas podem ser encontradas tanto aderidas na superfície celular dos protozoários, como na fase intracelular dos mesmos (USHIDA; JOUANY, 1996). Considerando que os protozoários ciliados têm um grande potencial de produção de hidrogênio no rúmen, a associação somática das metanogênicas com estes ciliados indica uma relação simbiótica, em que as metanogênicas, por utilizarem o hidrogênio produzido pelos ciliados, favorecem a manutenção de um ambiente ruminal adequado ao desenvolvimento destes microrganismos (VAN SOEST, 1994).

As arqueias metanogênicas são sensíveis às mudanças nas condições da ração do animal. Por exemplo, aumento na taxa de passagem da digesta, aumento na taxa de fermentação, decréscimo da ruminação ou pH são fatores que conduzem à redução da quantidade de H₂ disponível para a formação de metano. Dessa maneira, há menor produção de metano e, em consequência disso, aumenta o nível de energia metabolizável disponível para o animal (NUSSIO et al., 2006).

2.3 SUBSTRATOS DA FERMENTAÇÃO

Os principais substratos para fermentação são os carboidratos complexos originados das células vegetais, sendo a maior parte constituída por celulose, hemicelulose, pectina, amido, dextrinas e carboidratos solúveis (BERGMAN, 1990).

Os carboidratos podem ser classificados de acordo com as características nutricionais em fibrosos ou não-fibrosos. Os carboidratos fibrosos são representados pela hemicelulose e celulose. São frações que compõem a parede celular das plantas, de

degradação ruminal lenta realizada por bactérias hemicelulolíticas e celulolíticas. Os carboidratos não-fibrosos são representados por açúcares, amido e pectina. Os açúcares e o amido são constituintes do conteúdo celular, já a pectina faz parte da parede celular. São frações de degradação rápida realizada por bactérias sacarolíticas, amilolíticas, dextrinolíticas e pectinolíticas (MERTENS, 1994).

2.4 PRODUTOS DA FERMENTAÇÃO

A fermentação, que ocorre durante o metabolismo dos carboidratos ingeridos pelos ruminantes, é um processo anaeróbio, efetuado pela população microbiana ruminal (OWENS; GOETSCH, 1988). Esses microrganismos, através de suas vias metabólicas de extração de energia e mediante a fermentação anaeróbia que ocorre durante o metabolismo dos carboidratos no rúmen, convertem os carboidratos em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), formando principalmente os ácidos acético, propiônico e butírico (OWENS; GOETSCH, 1988; LUCCI, 1997; EUN et al., 2004).

Os ácidos graxos de cadeia curta produzidos contêm de 1 a 7 átomos de carbono e estão dispostos para formar compostos de cadeias lineares ou ramificadas, os quais, além dos ácidos acético, propiônico e butírico, incluem também os ácidos fórmico, isobutírico, valérico, isovalérico, 2-metilbutírico, hexanóico e heptanóico. Todos são produzidos junto com pequenas quantidades de outros compostos orgânicos, tais como metano, dióxido de carbono, lactato e álcool, durante o processo de fermentação ruminal. Os ácidos acético, propiônico e butírico são os mais predominantes e são produzidos principalmente na fermentação de carboidratos provenientes das plantas, tais como celulose, hemicelulose, pectina, amido e açúcares (BERGMAN, 1990). Desta forma, a proporção dos ácidos graxos de cadeia curta no rúmen depende da dieta, sendo que dietas ricas em grãos favorecem a maior formação do ácido propiônico, enquanto que dietas com alta proporção de alimentos volumosos favorecem a produção de ácido acético (OWENS; GOETSCH, 1988). É importante salientar que os ácidos graxos de cadeia curta suprem 80 a 90% das exigências energéticas do animal (MEDEIROS, 2002).

As determinações quantitativas dos processos de fermentação ruminal requerem medidas das taxas de produção de ácidos graxos voláteis (BERCHIELLI et al., 1996). A proporção molar típica dos AGCC, produzidos quando o animal alimenta-se basicamente de forragens, representa uma relação de 73:20:7 (acetato, propionato e butirato, respectivamente), comparado com 60:30:10 em misturas de concentrado e forragens e somente com concentrado apresenta uma relação 50:40:10 (BLACK, 1990). A proporção relativa dos diferentes AGCC produzidos varia amplamente, dependendo dos componentes químicos degradados e do pH ruminal (MOTA, 2006). O manejo alimentar e a frequência diária de alimentação concentrada também podem afetar a variação na concentração de AGCC.

Como outros produtos da fermentação, em adição à fermentação de carboidratos, a proteólise é um processo de fermentação que produz peptídeos e aminoácidos, os quais podem ser usados como fontes de energia ou para processos biossintéticos. A proteólise é grandemente realizada pelos microrganismos ruminais e muitos aminoácidos são desaminados para formarem amônia, dióxido de carbono e AGCC. A proteólise produz não somente acetato, propionato e butirato, mas também dá origem aos ácidos graxos voláteis de cadeia ramificada ou isoácidos (AGVCR): isobutírico, isovalérico e 2-metilbutírico os quais são formados a partir da fermentação dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina, respectivamente (BERGMAN, 1990).

Dentro do processo fermentativo, também são produzidos gases tais como dióxido de carbono (CO_2), em 60% aproximadamente, e metano (CH_4), em 30 a 40% dependendo da concentração e das proporções relativas dos ácidos produzidos (OWENS; GOETSCH, 1988; LUCCI, 1997; EUN et al., 2004). Por outro lado, quantidades variáveis de H_2 originam-se das reações de descarboxilação, durante a fermentação, e das reações de neutralização do H^+ pelo HCO_3^- oriundo da saliva ou secretado pelo epitélio ruminal, durante a absorção de AGV. O Metano é oriundo da redução do CO_2 e formado pelas *archaeas* metanogênicas (COELHO Da SILVA; LEÃO, 1979).

2.5 FATORES QUE INFLUENCIAM A FERMENTAÇÃO RUMINAL

Dentre os fatores que influenciam a fermentação ruminal encontram-se:

2.5.1 Dieta

Segundo Bergman (1990), os produtos finais da fermentação são parcialmente determinados pela natureza da dieta, que pode mudar a atividade metabólica dos microrganismos, provendo novos ou diferentes substratos que influenciam a quantidade e a natureza desses produtos. A dieta é, provavelmente, o fator mais importante que influencia o número e a proporção relativa das diferentes espécies de microrganismos ruminais. A mudança da dieta de um animal resulta num período de transição na população ruminal, em que a proporção das diferentes espécies ruminais varia para um novo balanço que melhor se ajuste às mudanças dietéticas. Esse fato refere-se à adaptação da população que pode demorar dias ou semanas, dependendo de quão drástica é a mudança na dieta (OWENS; GOETSCH, 1993).

A quantidade e a composição da dieta são variáveis externas que afetam a taxa de digestão, a taxa de passagem e, dessa maneira, o *turnover* do conteúdo ruminal. A ingestão é regulada pela exigência do animal, composição da dieta e disponibilidade de alimento. A composição da dieta, geralmente, determina a distribuição da população microbiana que utiliza os nutrientes dos alimentos no rúmen. Assim, dietas com altos teores de proteína favorecem microrganismos proteolíticos, enquanto as altas em amido, que são baixas em fibra, estão associadas a uma grande população de utilizadores de amido (VAN SOEST, 1994). A ocorrência de microrganismos celulolíticos em um número reduzido em animais alimentados com dietas ricas em concentrado dependerá do tamanho das partículas da fibra e da taxa de passagem. Com uma pequena quantidade de forragem grosseira, a taxa de passagem da fibra pode ser lenta e os microrganismos celulolíticos, comparativamente, mais numerosos (BRYANT; BURKEY, 1953).

Dietas baixas em fibra e que tendem a ter altas taxas de digestão e produção de ácidos graxos de cadeia curta requerem um maior grau de tamponamento no sistema ruminal; tais condições favorecem espécies capazes de tolerar algum abaixamento do pH ruminal. Geralmente, microrganismos celulolíticos e metanogênicos são menos tolerantes a tais mudanças (SLYTER, 1976).

2.5.1.1 Fontes energéticas na fermentação ruminal

Os carboidratos não-estruturais (açúcares solúveis, amido e pectina) são fermentados rapidamente e quase de maneira completa no rúmen (VAN SOEST et al., 1991). Estes carboidratos incrementam a densidade energética da ração, aportando energia tanto para o ruminante, bem como para o crescimento microbiano no rúmen. Porém, os carboidratos não-estruturais não estimulam nem o processo da ruminação, nem a produção de saliva, mas favorecem a produção de ácido e a redução de pH e podem inibir a fermentação da fibra se em excesso na ração. O amido e os açúcares solúveis são fermentados a propionato sem a perda de carbono, reduzindo as perdas energéticas na forma de CH_4 . Pelo contrário, a fermentação da pectina resulta em acetato, reduzindo o risco de acidose e estimulando a produção de gordura no leite (VAN SOEST et al., 1991).

2.5.1.2 Fontes energéticas no consumo de MS e na digestibilidade aparente total

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

com menos energia limitam o consumo por enchimento do rúmen e diminuem a taxa de passagem, enquanto o consumo de dietas ricas em energia e de alta digestibilidade regulam a ingestão por atendimento das exigências energéticas do animal e por fatores metabólicos.

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

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

Em relação aos efeitos da administração de fontes energéticas, mais especificamente a polpa cítrica e o grão de soja, sobre a digestibilidade aparente em ruminantes, os resultados são bem variados. Experimentos de digestibilidade com polpa cítrica apresentaram valores de 78 a 92% para a digestibilidade da matéria seca (MS), 83 a 96% para a digestibilidade da matéria orgânica (MO) e 40 a 65% para a digestibilidade da proteína bruta (PB), sendo um alimento de alta digestibilidade, exceto para proteína bruta. Considerando a alta digestibilidade da polpa cítrica, sugere-se que essa pode substituir fontes de concentrados energéticos tradicionais como o milho, a cevada e o sorgo e também o volumoso quando se deseja melhoria no consumo e digestibilidade da fibra. Vários autores relatam que o uso da polpa cítrica na dieta favorece as condições ruminais quando comparada com o uso de concentrados ricos em amido, cujo padrão de fermentação diminui o pH ruminal tornando o animal propenso a distúrbios metabólicos e alterações na

composição do leite (ASSIS et al., 2004b). Van Soest (1987) afirma que a pectina, apesar de rapidamente fermentável no rúmen, gera acetato como produto final, como ocorre com a fermentação da celulose. Assim, a substituição do milho por polpa pode promover efeitos benéficos, principalmente em relação ao ambiente ruminal, em razão da alteração da fermentação láctica pela acética e do efeito tamponante da pectina, resultando em melhores condições para digestão da fibra da forragem em dietas ricas em concentrado.

Em contrapartida, a adição de lipídeos, como o grão de soja, se torna uma alternativa para a nutrição de animais confinados, pois promove aumento da densidade energética dessas dietas. Além disso, os lipídeos são utilizados em rações por aumentarem a capacidade de absorção de vitaminas lipossolúveis, fornecerem ácidos graxos essenciais e atuarem como precursores de diferentes metabólitos. Segundo Jenkins et al. (2008), a utilização de ácidos graxos pelas bactérias ruminais é restrita. O excesso de ácidos graxos insaturados e triglicerídeos pode causar alteração na fermentação ruminal, devido à supressão das atividades de bactérias celulolíticas e metanogênicas, geralmente gram-positivas. Além disso, o uso de elevadas quantidades de lipídeos na dieta de ruminantes pode prejudicar o consumo, podendo causar queda na digestibilidade e aproveitamento dos nutrientes (JENKINS, 1993). A redução na ingestão de matéria seca está relacionada ao controle quimiostático do consumo e à queda na digestibilidade da fibra está relacionada à formação de uma barreira física nas partículas que dificulta o ataque microbiano e à ação tóxica do ácido graxo insaturado sobre certas espécies de microrganismos (PALMQUIST, 1991). Quando administrados ácidos graxos insaturados para ruminantes, os microrganismos os hidrolisam e promovem a saturação com hidrogênio, processo chamado biohidrogenação. Estas reações são realizadas para a auto-proteção dos microrganismos, uma vez que os efeitos maléficos dos ácidos graxos saturados é menor que o dos insaturados. Allen (2000) sugere que fatores metabólicos estejam relacionados à redução no consumo, visto que a digestibilidade ruminal da fração fibrosa é pouco afetada pelo uso de lipídios insaturados em dietas com até 50% de forragem (BATEMAN; JENKINS, 1998).

2.5.2 pH ruminal

O pH ruminal está diretamente relacionado com os produtos finais da fermentação (CHURCH, 1979). A acidificação do ambiente ruminal, demonstrada pelo abaixamento do pH, ocorre, principalmente, após a ingestão de alimentos e a rápida taxa de fermentação. A redução do pH ruminal ocorre, principalmente, em virtude de elevadas taxas de degradação, atingindo seu menor valor entre 0,5 e 4 horas após a alimentação (ØRSKOV, 1986).

O pH ruminal é um importante parâmetro a ser avaliado, pois reflete diretamente as características da dieta, além disso, qualquer alteração deste reflete na taxa de crescimento das bactérias e dos protozoários, podendo, dessa forma, ocorrer variações nos microrganismos predominantes no rúmen (LAVEZZO, 1998), o que indica um forte impacto nas comunidades microbianas e conseqüentemente nos produtos de fermentação, além de ter influência nas funções fisiológicas, como motilidade e absorção ruminal (NAGARAJA; TITGEMEYER, 2007). Por sua vez, o nível de consumo alimentar, os ingredientes da dieta, o tempo após a alimentação e a salivação têm efeito direto sobre o pH ruminal (QUEIROZ et al., 1998).

Uma generalização comum é que o pH abaixo de 6,0 inibe a degradação da celulose. Sob condições normais, os microrganismos celulolíticos crescem bem em pH 6,7 e desvios substanciais para elevar ou diminuir esse valor são inibitórios. Uma variação de pH em que a atividade mantém-se próxima do normal seria de 0,5 unidades. Valores de pH inferiores a 6,2 inibem a taxa de digestão e aumentam o tempo de colonização para a degradação da parede celular (VAN SOEST, 1994).

O rúmen é bem tamponado pela saliva, mas se a quantidade de fibra dietética for restrita e a taxa de fermentação de carboidratos rápida, o pH pode declinar (STROBEL; RUSSELL, 1986).

Durante a adaptação a dietas com altos teores de concentrado, o pH exerce uma pressão seletiva sobre os microrganismos sensíveis a ele. Quando o pH cai, bactérias amilolíticas e resistentes a acidez aumentam, enquanto microrganismos celulolíticos diminuem; assim, a atividade relativa da amilase, em relação à celulase, aumenta (KAUFMANN et al., 1980). O baixo pH pode retardar a adesão dos microrganismos à

celulose, em decorrência da deficiência de compostos que aumentam a adesão, semelhantes ao bicarbonato, ou ao aumento dos que inibem a adesão, como o amido solúvel (OWENS; GOETSCH, 1993).

2.5.3 Taxa de Passagem

Junto com o pH, a taxa de passagem é um dos principais fatores que determina as alterações na fermentação ruminal. Esta, por sua vez, é influenciada pelo nível de consumo, tamanho das partículas, qualidade nutricional dos ingredientes e relação volumoso:concentrado da dieta (HOOVER; STOKES, 1991). Sendo assim, taxas de passagem rápidas do líquido ruminal geralmente estão associadas com altas concentrações de propionato. A duração e intensidade da ruminação são grandemente determinadas pelo nível e forma da fibra ingerida. Quando ruminantes aumentam a produção de saliva, aumentam ambos, tamponamento e diluição do conteúdo ruminal. A diluição faz com que a concentração de ácidos ruminais seja menor em dietas à base de forragens em relação ao concentrado (OWENS; GOETSCH, 1993).

2.5.4 Tampões

Os tampões tem a capacidade de neutralizar o excesso de ácidos produzidos no rúmen, em situações onde os sistemas tamponantes, principalmente o fluxo salivar, são insuficientes (HUTJENS, 1991), mantendo o pH ruminal dentro dos limites para que os processos fermentativos permaneçam ativos (5,5 – 7,2) (TEIXEIRA, 1998).

Segundo Russell e Chow (1993), a ação dos tampões no rúmen seria explicada pelo aumento na ingestão de água, aumento na taxa de passagem de líquidos e no escape ruminal dos carboidratos solúveis, diminuindo a produção ruminal de propionato e, conseqüentemente, aumentando a produção de gordura do leite.

2.6 METANOLOGÊNESE EM RUMINANTES

Nos estudos realizados por Miller (1995); Johnson e Johnson (1995) e McAllister et al. (1996) relatou-se que a emissão de metano proveniente da fermentação ruminal depende principalmente do tipo de animal, nível de consumo de alimentos, tipo de carboidratos presentes na dieta, processamento da forragem, adição de lipídeos no rúmen, suprimento de minerais, manipulação da microbiota ruminal e da digestibilidade dos alimentos. Por essas razões, as indicações para a redução das emissões de metano pela pecuária estão ligadas a medidas que refletem na melhor eficiência produtiva.

A eructação de metano por bovinos começa aproximadamente quatro semanas após o nascimento, quando alimentos sólidos são retidos no sistema retículo-rúmen (ANDERSON et al., 1987). O ato da eructação previne condições fatais como o timpanismo, patologia em que o animal não consegue expulsar os gases que se acumulam em seu rúmen, em virtude da fermentação dos substratos (VAN KRUIJNINGEN, 1995). Dentre estes gases, o metano é o produzido em maior quantidade, por microorganismos denominados Archaea, principalmente *Methanobrevibacter ruminantium* (GRANT et al., 1985), por um processo conhecido como metanogênese. A metanogênese ocorre, principalmente, devido à condição anaeróbia do meio (BALDERSTON; PAYNE, 1976), ao principal receptor de H_2 , o dióxido de carbono, estar presente em quantidade suficiente neste meio (BRYANT, 1979) e devido à capacidade enzimática da microbiota, envolvida desde a fermentação dos carboidratos complexos (e.g., celulose) até a produção de acetato, H_2 e dióxido de carbono, substratos para a metanogênese (BRYANT, 1979). Além do mais, a remoção de H_2 do meio é fator primordial para o crescimento bacteriano e degradabilidade da matéria orgânica (BRYANT, 1979).

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

A redução de CO_2 a CH_4 , realizada pelas Archaeas metanogênicas no rúmen, desempenha importante função, agindo na remoção contínua de H_2 , como já mencionado, resultante da fermentação da matéria orgânica. Dessa forma, a redução ou eliminação da metanogênese pode exigir o estabelecimento de outra rota para evitar o acúmulo de H_2 e o adequado funcionamento do rúmen (WEIMER, 1998), caso contrário determinados sistemas enzimáticos podem ser inibidos, comprometendo o desenvolvimento dos microrganismos ruminais. Normalmente, compostos que causam redução na produção de metano resultam em redução da produção de acetato e amônia e aumento na produção de propionato e, algumas vezes, butirato (GARCIA-LOPEZ et al., 1996).

2.7 ESTRATÉGIAS NUTRICIONAIS PARA DIMINUIÇÃO DE PERDA ENERGÉTICA POR PRODUÇÃO DE METANO

A qualidade de alimento fornecido constitui-se em importante fator que afeta a taxa de emissão de metano (AAFC, 2003; JOHNSON; JOHNSON, 1995). Em geral, dietas que proporcionam alta taxa de digestão reduzem a emissão de CH_4 , já que o alimento não permanece por tempo prolongado no rúmen (AAFC, 2003). A quantidade de forragem na dieta, método de preservação, estágio de crescimento da planta forrageira, tamanho de partícula e grau de moagem, a quantidade de grãos na dieta, a adição de lipídeos e aditivos, como os ionóforos, são importantes componentes que afetam e estão envolvidos na produção de CH_4 no rúmen (JOHNSON; JOHNSON, 1995).

Os ruminantes são dependentes de produtos da fermentação como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e, de forma a minimizarem-se as perdas energéticas da dieta por metanogênese, diversas estratégias foram estudadas. Russell (2002) arrolou dentre as principais características de uma fermentação ideal a baixa produção de metano, visando-se ótima eficiência alimentar, ou seja, alta produção (ganho de peso, leite, gestação) e consumo baixo de matéria seca. De fato, Johnson et al. (1993) reportaram associação negativa entre emissão de metano e energia digestível, quando expressadas em porcentagem da energia bruta ingerida. Anos mais tarde, Nkrumah et al. (2006) relataram

que novilhos com baixa conversão alimentar (baixa relação entre consumo de matéria seca e ganho de peso), e portanto mais eficientes, produziram menos metano do que novilhos menos eficientes. Isto posto, torna-se claro o objetivo de vários pesquisadores de possuir maior entendimento e controle sobre o metabolismo ruminal (SCHELLING, 1984), assim como estudarem-se estratégias para diminuição da produção de metano.

O metabolismo no rúmen pode ser alterado de maneira direta ou indireta para melhorar a digestibilidade do alimento fornecido. A manipulação indireta está relacionada com as características do alimento. Sendo assim, o uso de suplementos, como minerais, fontes de energia ou nitrogênio, aumentam a atividade metabólica dos microrganismos (MCSWEENEY et al., 1999). Adicionalmente, o tipo de carboidrato suplementado influi no pH do rúmen e na população microbiana, incidindo na produção dos AGCC, principalmente na relação acetato:propionato e, por sua vez, na produção de H₂ (HEGARTY et al., 2007). Além disso, a fermentação do carboidrato solúvel e do amido produz menos CH₄ do que a fermentação da parede celular, devido à baixa tolerância das bactérias metanogênicas ao decréscimo do pH (BLAXTER; CLAPPERTON, 1965).

A manipulação direta do rúmen relaciona-se com o uso de aditivos biológicos ou químicos, que modificam a fermentação ao terem efeito sobre a microbiota ruminal (DOMINGUEZ; ESCOBAR, 1997). A adição de soluções tampão, de ionóforos ou de leveduras, entre outros, têm sido usados para favorecer a digestibilidade de alimentos fibrosos (VARGA; KOLVER, 1997).

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

Um dos modificadores de fermentação ruminal mais utilizados atualmente por nutricionistas do mundo inteiro é a monensina sódica. Aprovada em 1976 pelo órgão americano Food and Drug Administration (FDA) para utilização em dietas para ruminantes, a monensina é uma substância classificada como ionóforo. Neste grupo também se

encontram outros aditivos como a salinomocina e lasalocida. O mecanismo básico de ação do ionóforo é a modificação do fluxo de íons através de membranas biológicas. Dentre outras ações, a monensina é capaz de inibir o crescimento das bactérias produtoras de H₂ (*Selenomonas ruminantium*), substrato básico para a produção de metano (VAN NEVEL; DEMEYER, 1977). Reflexos da ação da monensina são aumento da produção de propionato (VAN MAANAN et al., 1978), redução da produção de metano *in vivo* e *in vitro* (BARTLEY et al., 1979), aumento da digestibilidade da matéria seca e do amido, assim como aumento da retenção de nitrogênio (SCHELLING, 1984) e aumento do fluxo de aminoácidos e digestão dos mesmos no duodeno (HAÏMOUD et al., 1995).

Fontes energéticas vegetais, como o grão de soja e a polpa cítrica, resultam em mudanças do perfil fermentativo. A fermentação tanto da soja grão como da polpa cítrica difere entre as duas, já que a fermentação do grão de soja, por ser alta em ácidos graxos insaturados, gera principalmente ácido propiônico, enquanto a que a fermentação da polpa cítrica resulta em maior produção de ácido acético (VAN SOEST, 1994). Por outro lado, o grão de soja tem sido empregado a fim de diminuir as perdas energéticas na forma de metano e outros gases produzidos no processo de fermentação ruminal. Além de diminuir a produção de metano, reduz a concentração de NH₃ ruminal e aumentam a eficiência da síntese microbiana (LIN et al., 1995). Em contrapartida a inclusão de uma fonte alta em pectina, como a polpa cítrica, altera o perfil fermentativo, aumentando a concentração ruminal de ácido acético, a concentração total de ácidos graxos de cadeia curta bem como a contagem total diferencial de protozoários.

A polpa cítrica é rica em carboidratos solúveis, como a sacarose e fibra solúvel como a pectina, ambas de alta digestibilidade (MIRON et al., 2001). A pectina é um carboidrato que possui fermentação mais extensa no rúmen que o amido (GILLARD, 1962); e mais rápida que os demais carboidratos estruturais (STROBEL; RUSSEL, 1986; HATFIELD, 1987; BEN-GHEDALIA et al., 1989). Entretanto, o crescimento dos microrganismos ruminais, à base de pectina, parece ser distinto do crescimento à base de amido (MAROUNEK; DUSKOVÁ, 1999; HALL; HEREJK, 2001). A fermentação da pectina é peculiar, gerando grande quantidade de energia por unidade de tempo, como ocorre com o amido e açúcares, porém com fermentação acética, que caracteriza a fermentação da celulose e a hemicelulose, reduzindo os riscos de acidose (SANTOS;

MARTINEZ, 2006). Portanto, a substituição do amido de cereais por polpa cítrica na dieta além de aumentar a produção de ácido acético resulta em um aumento da relação entre acetato e propionato no ambiente ruminal (VIJCHULATA et al., 1980; BEN-GHEDALIA et al., 1989; ROCHA FILHO et al., 1999; LEIVA et al., 2000; ARIZA et al., 2001; BRODERICK et al., 2002; SALVADOR et al., 2008a), isto, por ter uma fermentação similar aos das forragens.

Entretanto, o fornecimento de lipídeos insaturados, como a soja grão, está associado à redução na produção de metano no rúmen por exercer ação deletéria sobre as metanogênicas e protozoários e consumir H₂ pelo processo de biohidrogenação (MACHMÜLLER et al., 1998), sendo que a intensidade com que ocorre a inibição da produção de metano é determinada pelo grau de saturação da gordura utilizada e a quantidade suplementada (FIEVEZ et al., 2003).

2.8 EMISSÃO DE METANO: PERSPECTIVA AMBIENTAL E NUTRICIONAL

A quantificação da perda de energia da dieta via eructação em animais ruminantes não é relato recente na literatura. Os primeiros estudos datam da década de 50 (JOHNSON; JOHNSON, 1995), sempre com o objetivo de investigar-se a ineficiência de determinadas dietas e descobrir-se meios para diminuí-la. A preocupação natural do nutricionista de ruminantes é obter a melhor eficiência alimentar possível, ou seja, a melhor relação entre ganho de peso e consumo de matéria seca, resultando em alta produtividade. Nesta busca, a diminuição de perda energética por eructação de gases, como o metano e dióxido de carbono, é importante à medida que o animal pode perder de 2 a 12% da energia bruta contida na dieta apenas eructando esses gases (JOHNSON et al., 1993).

Contudo, com a descoberta de que o metano é potente gás de efeito estufa com altíssima capacidade de absorção de radiação infravermelha (WUEBBLES; HAYHOE, 2002), outra frente de pesquisa foi sendo explorada, devido à contribuição potencial deste gás nas mudanças climáticas e aquecimento global (JOHNSON; JOHNSON, 1995). Desta forma, inventários têm sido publicados por órgãos competentes em diversos países,

principalmente após a assinatura do Protocolo de Kioto, no qual 59 países se comprometeram a diminuir e controlar a emissão de poluentes. Em face deste, a confecção das tabelas com dados de emissão de metano e dióxido de carbono se tornou essencial para monitoramento deste compromisso, assumido por diversos países em 1997.

É sabido que há três principais fontes de todo metano emitido no globo terrestre: naturais (pântanos, oceanos e populações de cupins), ligadas à geração de energia e dejetos (queima de gás, carvão, lagoas de dejetos e aterros sanitários) e ligadas à atividade agropecuária (arrozais e rebanhos). Aproximadamente, dos 480 teragramas de metano emitidos no globo terrestre por ano, 16% são devidos à atividade pecuária (IPCC, 1997). Deste montante, 73% são originários dos rebanhos de animais ruminantes (JOHNSON; JOHNSON, 1995), pois o processo digestivo dos carboidratos por estes animais gera, fisiologicamente, o metano como subproduto (CUNNINGHAM; KLEIN, 2008).

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

2.9 MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE METANO

Uma vez que é possível a manipulação da fermentação ruminal, cabe aos nutricionistas desenvolverem métodos para avaliação da mesma. Como principal produto da fermentação não utilizado pelo ruminante, o metano representa uma variável importante para avaliação da eficiência da fermentação ruminal. Sistemas confiáveis de predição de produção de metano em uma série de diferentes situações (e.g., raça, estado fisiológico, tipo de dieta) podem ser utilizados para a formulação de dietas que propiciem perda mínima de energia por metano (MILLS et al., 2001).

Sendo assim, a quantificação da produção de metano é importante ferramenta ao nutricionista de ruminantes. Métodos para tal estão sendo estudados desde a década de 50,

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

Outro método que pode ser utilizado para quantificação da emissão de metano em ruminantes vale-se de traçadores ou indicadores. Estes podem ser radioisótopos do metano (MURRAY et al., 1976) ou gases inertes, como o hexafluoreto de enxofre, cuja utilização foi descrita pela primeira vez por Johnson et al. (1994). A grande vantagem da utilização dos métodos traçadores é que dispensam a contenção do animal, uma vez que são utilizados dispositivos denominados cangas (PRIMAVESI et al., 2004a) ao redor do pescoço do animal, permitindo que o mesmo se alimente e se movimente normalmente.

2.10 MÉTODO DO GÁS TRAÇADOR SF₆

A técnica do gás traçador hexafluoreto de enxofre, desenvolvida nos Estados Unidos e adaptada para as condições tropicais brasileiras por Primavesi et al. (2004a), emprega câmaras fechadas em tubos de PVC e realiza coletas diárias de amostras de metano dos animais (WESTBERG et al., 1998).

Em animais criados em regime de pastagem, Johnson e Johnson (1995) desenvolveram a técnica empregando o hexafluoreto de enxofre (SF_6) como gás traçador interno. Essa técnica consiste no uso de 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 pressão negativa que é produzida por 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 122 kPa (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 absorvida pela corrente sanguínea e expirada, sendo, portanto, também medida pela técnica do SF_6 (WESTBERG et al., 1998).

CAPÍTULO III.
EFEITO DE TRÊS FONTES ENERGÉTICAS SOBRE A
FERMENTAÇÃO RUMINAL E PRODUÇÃO DE METANO
DETERMINADA PELA TÉCNICA DO GÁS TRAÇADOR SF₆ EM
BOVINOS.

Efeito de três fontes energéticas sobre a fermentação ruminal e produção de metano determinada pela técnica do gás traçador SF₆ em bovinos

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de três fontes energéticas sobre a produção de metano em bovinos utilizando-se a técnica do gás traçador hexafluoreto de enxofre (SF₆) e sobre os parâmetros da fermentação ruminal. Seis vacas (730 ± 70 kg) canuladas no rúmen foram utilizadas e distribuídas a três dietas, que diferiram quanto à fonte energética, seguindo-se delineamento experimental em quadrado latino 3x3 replicado (n= 18 unidades experimentais): Controle (CON): Dieta de baixo extrato etéreo (3,50% de EE); Soja (SOJ): Dieta de alto extrato etéreo (5,30% de EE) com inclusão de 15% de soja grão e, Polpa Cítrica (POL): Dieta de baixo extrato etéreo (3,00% de EE) e alta participação de pectina com inclusão de 15% de polpa cítrica. Cada período experimental foi constituído de 21 dias, onde 15 dias foram utilizados para adaptação à dieta e os últimos 6 dias para coleta de dados da produção de metano (CH₄) e do consumo de matéria seca (CMS). No dia 21 coletou-se líquido ruminal para determinação da concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), contagem total e diferencial de protozoários e pH ruminal, avaliados antes, 3, 6, 9 e 12 h após a alimentação matinal. As concentrações de CH₄, SF₆ e AGCC foram determinadas por cromatografia gasosa. O pH de cada amostra foi determinado com potenciômetro digital portátil e as contagens diferenciais dos protozoários foram avaliadas através de microscopia direta. Não houve diferenças significativas (P>0,05) entre os tratamentos para o CMS expresso em quilograma por dia (kg/dia), porcentagem do peso vivo (% PV) ou por unidade de peso metabólico (g/kg de PV^{0,75}). A emissão de CH₄ pelos bovinos foi de 286,22 a 344,22 g/d; 103,71 a 125,64 kg/ano; 17,41 a 22,03 g/kg de matéria seca ingerida; 5,17 a 6,58% de EB perdida na forma de metano e 3,77 a 4,53 Mcal/Ani/d. Não houve diferença significativa para as emissões de metano entre os tratamentos quando avaliadas a 5% de probabilidade. As fontes energéticas testadas não influenciaram (P>0,05) as médias do pH ruminal, a concentração média do ácido propiônico, nem a relação acético/propiônico. A concentração total de AGCC, a concentração de ácido acético, de ácido butírico, bem como a contagem total de protozoários, foram maiores (P<0,05) para o

tratamento com polpa cítrica. Fonte alta em pectina, como a polpa cítrica, ou em ácidos graxos insaturados, como a soja grão, resulta em mudanças no ambiente ruminal pela alteração do perfil fermentativo, porém, não foi possível demonstrar alterações na produção de metano.

Palavras-chave: Gases de efeito estufa. Grão soja. Lipídios. Polpa cítrica. Ruminantes.

**Effect of three energy sources on rumen fermentation and methane production
determined by the SF₆ tracer technique in cattle**

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of three energy sources on methane production in cattle using the tracer sulfur hexafluoride technique (SF₆) and rumen fermentation parameters. Six cows (730 ± 70 kg) ruminally cannulated were used and allocated to three diets that differed in energy source, followed by the replicated 3x3 Latin square design (n = 18 experimental units): Control (CON): Low ether extract diet (3.50% EE); Soybean (SOJ): High ether extract diet (5.30% EE) with inclusion of 15% of soybean grain; Citrus pulp (POL): Low ether extract (3.00% EE) and high pectin diet with inclusion of 15% of citrus pulp. Each experimental period consisted of 21 days where 15 days were used for diet adaptation and the last six days for methane (CH₄) production and dry matter intake (DMI) determination. At day 21, rumen fluid was collected for short chain fatty acids concentration determination (SCFA), total and differential counts of protozoa and ruminal pH measured before, 3, 6, 9 and 12 h after morning feeding. The concentrations of CH₄, SF₆ and SCFA were determined by gas chromatography. The pH of each sample was determined with a digital portable pH meter and differential counts of protozoa were evaluated by direct microscopy. There were no significant differences (P>0.05) among treatments for DMI expressed as kilograms per day (kg/day), percentage of body weight (% BW) or per unit of metabolic weight (g/kg PV^{0.75}). The emission of CH₄ by cattle was 286.22 to 344.22 g/d, 103.71 to 125.64 kg/year; 17.41 to 22.03 g/kg of dry matter ingested, 5.17 to 6.58% GE lost in the form of methane and 3.77 to 4.53 Mcal/Ani/d. There was no significant difference in methane emissions between treatments when evaluated at 5% probability. Energy sources tested did not influence (P>0.05) pH values, propionic acid concentration or acetate:propionate ratio. Total concentration of SCFA, acetic acid and butyric acid concentration, as well as, total count of protozoa were higher (P<0.05) in citrus pulp treatment. Pectin high source, such as citrus pulp, or unsaturated fatty acids, such as soy beans, resulted in changes in rumen environment by changes in fermentation pattern, but it was not possible to demonstrate changes in methane production.

Keywords: Greenhouse gases. Soy bean. Lipids. Citrus Pulp. Ruminants.

3 INTRODUÇÃO

O animal ruminante possui uma grande vantagem em relação ao monogástrico. Afinal seu processo digestivo é capaz de liberar a energia contida no material celulósico dos volumosos por fermentação dos carboidratos, por meio das enzimas da microbiota do sistema retículo-rúmen. Porém, a fermentação dos carboidratos resulta em não somente ácidos graxos de cadeias curtas (AGCC), acético, propiônico e butírico, mas também em produtos menos desejáveis, como calor e os gases metano e dióxido de carbono, que representam perda de energia ao animal, estimada em 2 a 12% da energia bruta do alimento (JOHNSON; JOHNSON, 1995). À medida que um ruminante adulto pode produzir até 17 litros de metano por hora (RUSSELL, 2002) e que este gás não pode ser metabolizado pelo animal nem pela microbiota ruminal, a maior parte é removida do rúmen por expiração ou eructação (MOSS, 1993), sendo então liberada no meio ambiente.

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

A emissão de metano por ruminantes representa perda de parte da energia ingerida, resultando em redução na produtividade animal. Quando houver redução nas perdas de energia ingerida na forma de metano, a energia correspondente poderá ser utilizada em ganho de peso ou em produção de leite, trazendo vantagens econômicas ao produtor, em razão do melhor aproveitamento do alimento e, ao mesmo tempo, reduzirá as emissões de metano para a atmosfera e o agravamento do aquecimento global. Estudos com ruminantes

demonstram que a emissão de metano depende da quantidade do alimento ingerido e da qualidade da dieta (TAMMINGA, 1992; HOLTER; YOUNG, 1992). Geralmente, alimentos de elevada digestibilidade produzem menor emissão de metano por unidade de produto do que dietas de baixa qualidade, mais fibrosas e com baixos teores de proteína bruta. Assim, como a emissão de metano varia de acordo com a quantidade e qualidade do alimento digerido (USEPA, 1990 a,b), as várias modalidades de sistemas de criação de animais resultam em diferentes níveis de emissão de metano. Dessa forma, as indicações para a redução das emissões de metano para a pecuária estão ligadas ao manejo alimentar e às estratégias nutricionais (TAMMINGA, 1992; HOLTER; YOUNG, 1992).

Compreende-se que, ao apontar métodos adequados de manejo alimentar para redução do volume de gás liberado pelos animais, possa representar ganho de produtividade para quem produz carne ou leite. Além disso, o conhecimento dos processos nutricionais pelos ruminantes e da composição dos gases emitidos à atmosfera é fundamental para se buscar sistemas produtivos mais eficientes, em que se perca menos da energia ingerida.

Para possibilitar o desenvolvimento de estratégias que reduzam a emissão de metano pelo rebanho bovino, é necessário quantificar a emissão das várias categorias animais sob as mais diferentes condições de manejo alimentar. Existem muitas técnicas para quantificar a emissão individual ou em grupo referentes ao metano ruminal. A técnica de mensuração em câmaras fechadas (por exemplo, de calorimetria respiratória) é precisa (WESTBERG et al., 1998), porém requer animais treinados, reduz o movimento dos animais, exige muito trabalho e dispêndios altos, o que limita o número de animais avaliados e, também, não representa as condições normais de pastagens. Os modelos de previsão de emissão com base no balanço de fermentação de componentes dos alimentos têm sido utilizados para estimar a produção de metano. Essas equações são úteis, porém, as suposições e as condições que necessitam ser atingidas para cada equação limitam sua capacidade de predição de emissão de metano, em especial sob condições de produção comercial.

Existe uma técnica para a medição da emissão de metano por ruminantes em condições de produção, utilizando um gás traçador inerte, o hexafluoreto de enxofre (SF_6), sem as limitações encontradas em outras técnicas, o que possibilita realizar as aferições com animais em situação normal de pastejo. Essa técnica consiste na colocação de um tubo

de permeação, que libera o SF₆ a uma taxa previamente conhecida no rúmen do animal, e as amostras de CH₄ e SF₆ são coletadas nas proximidades da sua boca e narina. Assume-se nesse método que o padrão de emissão de SF₆ simula o padrão de emissão de CH₄. O fluxo de CH₄ liberado pelo animal é calculado em relação ao fluxo de SF₆ (WESTBERG et al., 1998). Além disso, essa técnica elimina a necessidade de confinar os animais em gaiolas ou câmaras barométricas 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 metano, a coleta de ar em torno do focinho e das narinas deve resultar em estimativa precisa da produção de metano pelo animal. Grande parte do metano presente no intestino posterior é absorvida pela corrente sanguínea e expirada, sendo, portanto, também medida pela técnica do SF₆ (WESTBERG et al., 1998).

Contudo, seria mais natural que a produção de metano fosse relacionada com os parâmetros da fermentação ruminal, uma vez que estes processos ocorrem concomitantemente no rúmen. Assim, entende-se que este tipo de dado possa trazer informações mais acuradas sobre o processo da fermentação ruminal.

Como hipóteses científicas deste trabalho foi proposto que a taxa de produção de metano seria maior em bovinos alimentados com dietas com alta participação de pectina (polpa cítrica) do que com dietas com alta participação de lipídios (alto teor de extrato etéreo), principalmente quando estes eram ácidos graxos insaturados presentes nos grãos de soja.

O presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito de três fontes energéticas sobre a produção de metano determinada pela técnica do gás traçador hexafluoreto de enxofre (SF₆) em bovinos, assim como, sobre os parâmetros da fermentação ruminal, obtendo, assim, uma compreensão mais abrangente do processo fermentativo no rúmen.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS E INSTALAÇÕES

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

Para avaliação da produção de metano, dos parâmetros fermentativos, bem como do consumo de MS, foram utilizadas seis vacas não gestantes e não lactantes, com peso vivo médio de 730 ± 70 kg e portadoras de cânula ruminal com 10 cm de diâmetro e 7,5 cm de espessura. Os animais foram mantidos em instalação coberta, provida de baias individuais com cochos de cimento e bebedouros automáticos comuns a cada dois animais, e também de camas de areia, a fim de proporcionar maior conforto e bem-estar aos mesmos.

4.2 TRATAMENTOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Seis vacas foram distribuídas a uma das três dietas experimentais, isoenergéticas (1,55 Mcal de EL_1 /kg de MS) e isoproteicas (12,0% de PB), formuladas com o programa *Spartan Dairy Ration Evaluator/Balancer*, versão 3.0.3., diferindo de acordo com a fonte energética utilizada, sendo: 1) Controle (CON): Dieta de baixo extrato etéreo (3,50% de EE); 2) Soja (SOJ): Dieta de alto extrato etéreo (5,30% de EE) com inclusão de 15% de soja grão e, 3) Polpa Cítrica (POL): Dieta de baixo extrato etéreo (3,00% de EE) e alta participação de pectina com inclusão de 15% de polpa cítrica.

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

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

Tabela 1 - Esquema do delineamento experimental em dois quadrados latinos 3 x 3 contemporâneos

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

Tabela 2 - Esquema da análise de variância para delineamento em quadrado latino replicado

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

4.3 MANEJO NUTRICIONAL

Os alimentos foram oferecidos duas vezes ao dia, às 08:00 e 16:00 h, na forma de ração completa. Cada um dos períodos contou com 21 dias, nos quais 15 dias foram para adaptação às respectivas dietas e os últimos 6 dias foram destinados para coleta de dados dos parâmetros fermentativos e de consumo de matéria seca.

Em todas as dietas, 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. As proporções dos diversos ingredientes das dietas experimentais e a composição bromatológica das mesmas estão descritas na tabela 3.

Tabela 3 - Proporções de ingredientes e composição bromatológica estimada das dietas experimentais, expressas em porcentagem da matéria seca (% MS)

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

1: Suplemento mineral e vitamínico, quantidade por kg de produto: 200 g de cálcio, 60 g de fósforo, 20 g de enxofre, 20 g de magnésio, 70 g de sódio, 15 mg de cobalto, 700 mg de cobre, 700 mg de ferro, 40 mg de iodo, 1.600 mg de manganês, 19 mg de selênio, 2.500 mg de zinco, 200.000 UI de vitamina A, 50.000 UI de vitamina D3, 1.500 UI de vitamina E; 2: Estimado segundo análises bromatológicas, determinadas no Laboratório de Nutrição Animal e Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga; 3: Estimado segundo o programa *Spartan Dairy Ration Evaluator/Balancer*, versão 3.0.3.

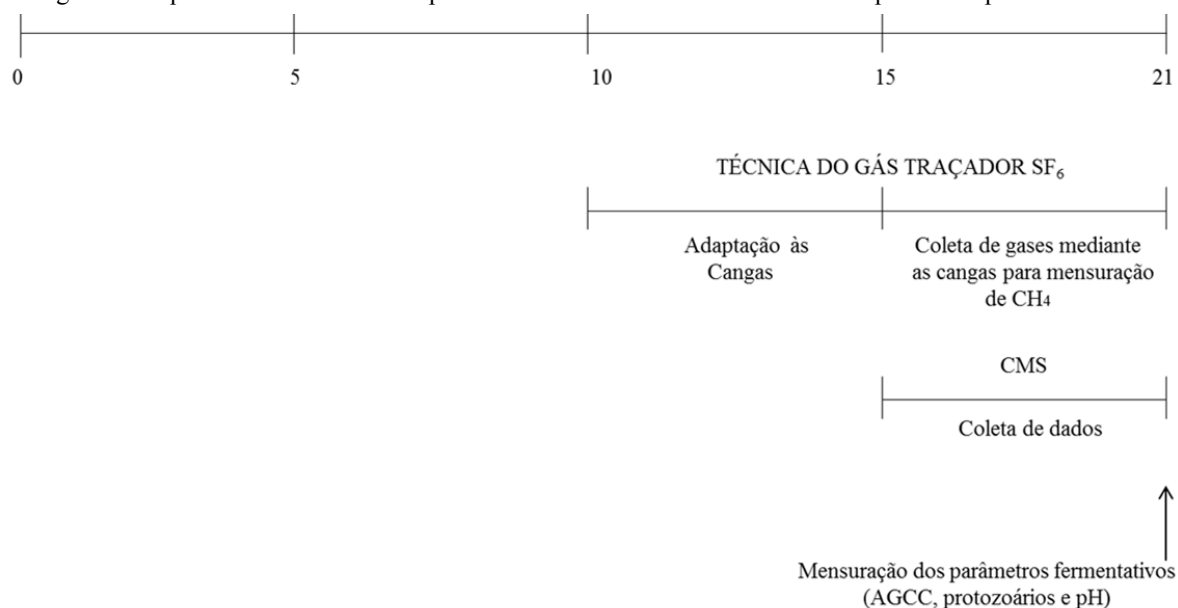
4.4 PERÍODO EXPERIMENTAL

Cada período experimental foi constituído de 21 dias, sendo que 15 dias foram considerados para adaptação às respectivas dietas e os últimos 6 dias foram destinados para coleta de dados dos parâmetros fermentativos e de consumo de matéria seca. Posto isto, entre os dias 10 e 21 foram colocadas as cangas para a mensuração da produção de metano pela técnica do gás traçador SF₆, no qual os primeiros cinco dias foram destinados para adaptação às cangas e os seis últimos dias para coleta de metano a cada 24 horas.

Por outro lado, o dia 21 foi destinado à coleta de líquido ruminal para determinação dos parâmetros da fermentação (pH, contagem total e diferencial de protozoários e concentração de AGCC que incluíram os ácidos acético, propiônico e butírico). A coleta de líquido ruminal foi realizada antes e 3, 6, 9, e 12 h após a alimentação matinal.

Em todos os períodos do presente experimento, os animais foram pesados no primeiro e último dia. Diariamente foram feitas pesagens das quantidades dos volumosos e concentrados fornecidos e das sobras de cada ração experimental para estimar o consumo por animal. Na figura 1 estão representados os dias em que foram mensuradas cada uma das variáveis avaliadas dentro de cada período experimental.

Figura 1- Esquema dos dias de coleta para cada variável avaliada dentro de cada período experimental



4.5 PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO

4.5.1 Consumo de matéria seca

O Consumo de matéria seca (CMS) foi avaliado diariamente nos últimos 5 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 (MS) do alimento.

4.5.2 Análises bromatológicas

As amostras dos alimentos utilizados nas dietas foram analisadas para determinação dos teores de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), cálcio (Ca), fósforo (P) e energia bruta (EB), segundo AOAC (1985), e fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina (LIG) conforme Van Soest (1994).

As análises bromatológicas foram feitas 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.

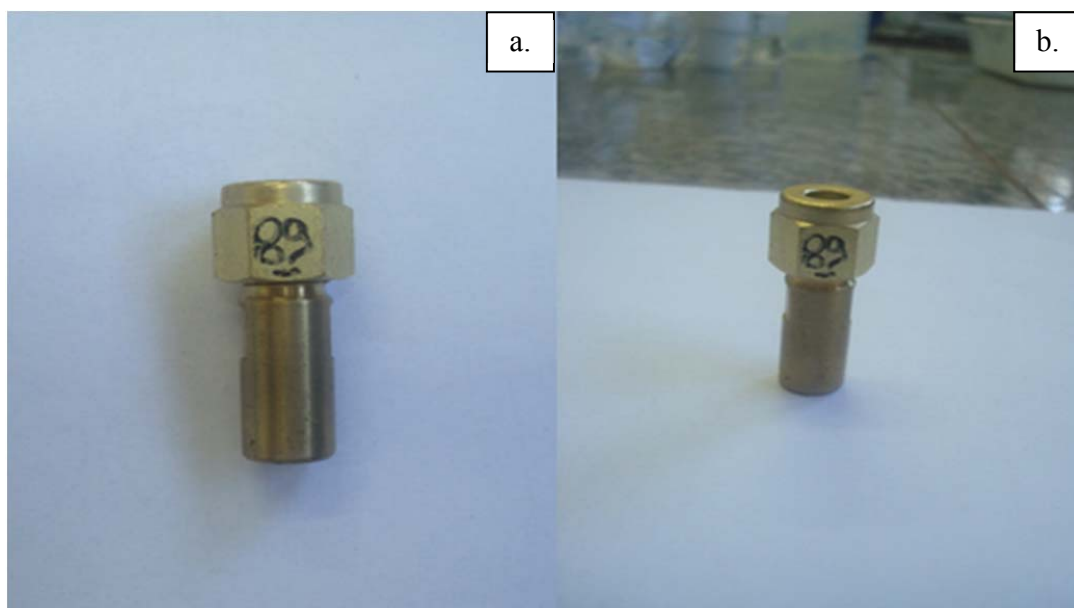
4.5.3 Técnica do gás traçador SF₆ para a mensuração de metano

A técnica empregada para a mensuração de metano foi aquela denominada técnica do traçador interno SF₆ descrita por Johnson e Johnson (1995) e adaptada no Brasil por Primavesi et al. (2004a).

Prévio 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 isso, 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 , a fim de verificar se as cápsulas estavam prontas para serem introduzidas no rúmen dos animais.

A seguir, na figura 2, observa-se uma cápsula de permeação de hexafluoreto de enxofre identificada e previamente preenchida com SF_6 e calibrada para sua utilização.

Figura 2 - Cápsula de permeação de hexafluoreto de enxofre (SF_6) identificada e previamente preenchida com SF_6 e calibrada: a) cápsula montada e deitada; b) cápsula de permeação em pé



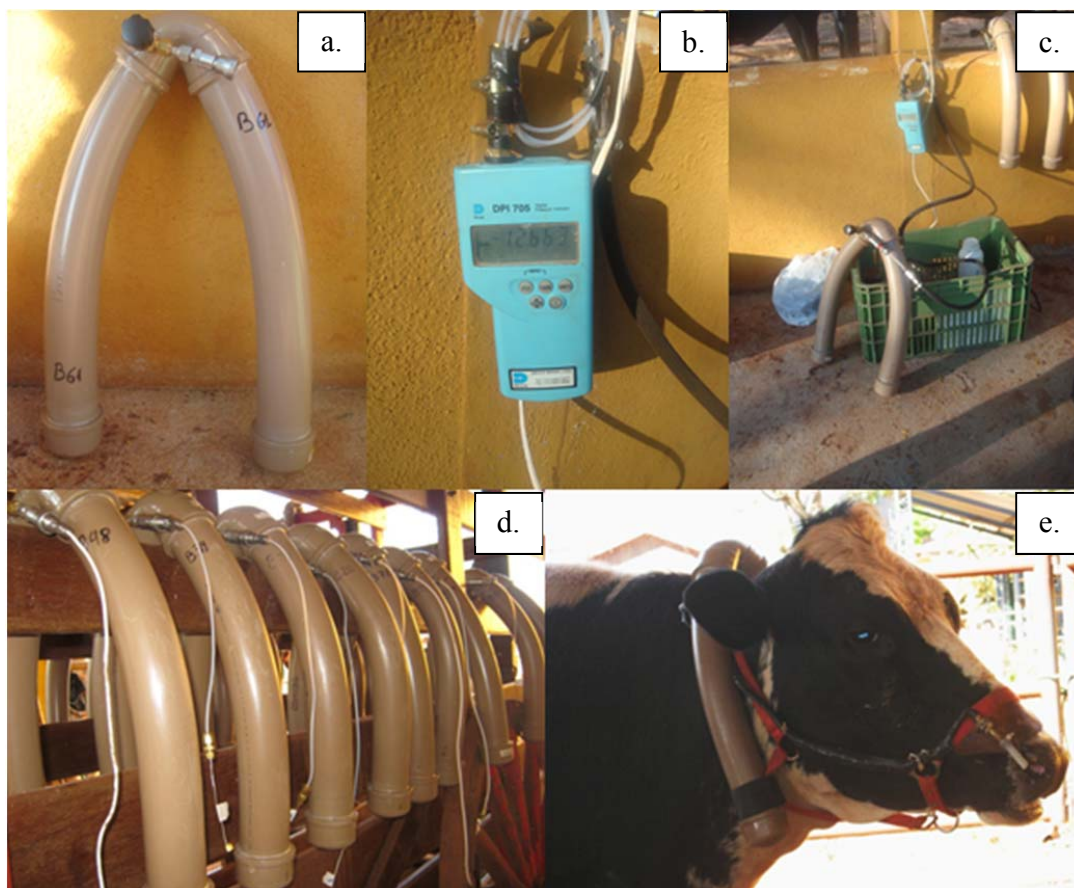
As cápsulas de permeação de hexafluoreto de enxofre, previamente identificadas, foram colocadas no rúmen dos animais cinco dias antes do início da primeira coleta de gases mediante as cangas, permanecendo dentro deste até o último período experimental.

Para a mensuração de metano utilizou-se uma canga coletora-armazenadora confeccionada em tubo de PVC de 60 mm de classe 20 (Figura 3a), tendo pressão interna próxima de zero atmosfera. Para esta técnica empregou-se uma bomba de alto vácuo com dois estágios; um manômetro digital (Figura 3b) 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 N₂.

Antes de dar início às coletas, as cangas foram testadas submetendo-as ao vácuo (Figura 3c) 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 3d) por meio 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 3e), compreendida entre os dias 11 e 15 de cada período experimental, a mensuração da produção de metano pela técnica do gás traçador SF₆ foi realizada ao longo de seis dias a partir do 16º dia de oferecimento das dietas em intervalos de 24 horas, após a alimentação matutina.

Figura 3 - Técnica do gás traçador SF₆ para a mensuração de metano: a) canga coletora-armazenadora em tubo de PVC de 60 mm de classe 20, com válvula de coleta e engate rápido montado na canga; b) manômetro digital portátil; c) Canga submetida a vácuo com bomba



As concentrações de metano (CH₄) e hexafluoreto de enxofre (SF₆) 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 °C, coluna megabore (0,53 μm, 30 m) Plot HP-Al/M (para CH₄), detector de captura de elétrons (ECD) a 300°C e coluna megabore (0,53 mm x 30 m x 25,0 mm) HP-MolSiv (para SF₆), com dois loops de 0,5 cm³ acoplados a duas válvulas de seis vias. O forno do cromatógrafo a gás foi mantido a 50°C durante as análises e aquecido a 150°C 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 CH₄ e de SF₆, a pressurização das cangas até atingir pressão aproximada de 1,2 atm foi realizada com nitrogênio especial 5.0, com as leituras de pressão feitas com manômetro digital ($\pm 0,01$). 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 CH₄ e em ppt (34 \pm 9, 91 \pm 9 e 978 \pm 98 ppt) para SF₆, conforme Westberg et al. (1998).

A quantificação de metano liberado pelo animal na amostra foi calculado em função das concentrações de SF₆, associando os resultados à taxa conhecida de liberação do traçador no rúmen (WESTBERG et al., 1998). Sendo assim, as concentrações de CH₄ e de SF₆, 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 por dia - CH₄ (g/d); quilograma de metano por ano - CH₄ (kg/ano) não considerando variações na oferta e na qualidade da forragem; gramas de metano por quilograma de matéria seca ingerida - CH₄ (g/kgMSI); porcentagem de energia bruta perdida na forma de metano - CH₄ (%EB) considerando a porcentagem de energia bruta da dieta; Megacalorias de metano por animal por dia - CH₄ (Mcal/Ani/d) considerando 13,16 Mcal/g de CH₄ e energia bruta ingerida por animal por dia - EBI(Mcal/Ani/d).

4.5.4 Metodologia de determinação da concentração de AGCC

No 21º dia de oferecimento das dietas, a coleta de líquido ruminal foi realizada antes, 3, 6, 9 e 12 horas após a alimentação matutina dos animais, com bomba de vácuo motorizada.

Imediatamente após a coleta, uma fração de aproximadamente 50 mL de líquido ruminal foi centrifugada por 15 minutos a 5000 rpm. Com pipeta, aspirou-se 2 mL do sobrenadante e foram colocados em tubos de ensaio arrolhado, previamente preparados,

com 0,4 mL de ácido fórmico. Após isso, os frascos foram levados para congelador (-20°C) para armazenamento.

Para a quantificação dos AGCC, foram aspirados 2 mL de amostra, colocando novamente em tubos de ensaio e centrifugando-os mais uma vez por 15 minutos a 5000 rpm. Posteriormente, foi aspirado 1 mL do sobrenadante de cada frasco com ajuda de uma pipeta e colocado em um frasco próprio para AGCC de 1mL. Após os frascos estarem em sala com temperatura controlada de 25°C, a determinação da concentração dos AGCC, na amostra acondicionada no frasco, foi realizada pela técnica de cromatografia gasosa, segundo Erwin et al. (1961).

Antes de começar as leituras para determinação da concentração de AGCC no cromatógrafo, o aparelho foi calibrado com um dia de antecedência, fazendo-se uma curva de calibração. Da mesma forma, antes da análise, o cromatógrafo foi pré-estabilizado nas seguintes condições: gás de arraste, nitrogênio, na vazão de 25 mL/min; oxigênio, como gás comburente, na vazão de 175 mL/min; hidrogênio, como gás combustível, na vazão de 15 mL/min; temperaturas de operação do injetor a 220°C, da coluna a 150°C inicialmente, mantida por dois minutos e seguida de uma rampa aumentando 10°C por minuto até atingir 210°C, e do detector de ionização de chama a 250°C. O cromatógrafo estava equipado com uma coluna de vidro de dois metros de comprimento e 1/8" de diâmetro interno, empacotada com fase estacionária 80/120 Carbopack® B-DA/4% Carbowax® 20M (Supelco®). Para a determinação dos AGCC, foi calibrado com injeções de 1 µl da solução padrão mista em uma curva já estabelecida no software do microcomputador (BORWIN versão 1.21.60).

Foi utilizada uma microseringa, retirando 10 µl do tubo de amostra e eliminando por 3 vezes; após isso, retirou-se novamente, 4 µl da amostra até acertar o volume para 1 µl, retornando até 3 µl, aspirando ar e injetando no cromatógrafo. A técnica de injeção foi rápida e sem danos à agulha. Para tal, foi utilizado amostrador automático acoplado ao cromatógrafo.

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

4.5.5 Metodologia de determinação do pH do líquido ruminal

Imediatamente após a colheita, 100 mL de fluido ruminal foram utilizados para a determinação do pH de cada amostra com potenciômetro digital portátil (HANNA instruments HI8424), calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e pH 7,0.

A determinação de pH foi realizada no dia da coleta de líquido ruminal de cada período experimental, antes, 3, 6, 9 e 12 horas após a alimentação matutina dos animais, colocando o eletrodo do potenciômetro dentro de cada amostra para fazer a leitura do pH.

4.5.6 Contagem total e diferencial de protozoários ruminais

As coletas para contagem total e diferencial de protozoários foram realizadas no dia da coleta de líquido ruminal de cada período experimental, antes, 3, 6, 9 e 12 horas após a alimentação matinal. O conteúdo ruminal foi coletado manualmente por varredura do assoalho ruminal e 10 mL deste material foram armazenados em frasco contendo 20 mL de formaldeído 50% (v/v). Para posterior realização da contagem 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.

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. Esta câmara foi acoplada à ocular de um microscópio da marca Olympus modelo CH2, conforme técnica descrita por Dehority (1993).

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 diferenciados cinco gêneros: *Isotricha*, *Dasytricha*, *Entodinium*, *Epidinium* e *Diplodinium* (incluem *Eudiplodinium*, *Ostracodinium* e *Polysplatron*).

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados de consumo de MS bem como a taxa de emissão de CH₄ foram analisados pelo programa Statistical Analysis System (Versão 9.2, 2010), verificando a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk. Estes dados foram submetidos à análise de variância e seus efeitos avaliados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os dados de AGCC, protozoários e pH foram analisados com as mesmas causas de variação, porém adicionado o fator medidas repetidas no tempo, referentes aos diferentes momentos de coleta. Tal análise foi realizada utilizando-se o procedimento MIXED do SAS (Versão 9.2, 2010). O modelo incluiu o efeito de tratamento como fator fixo e os efeitos de animal dentro de quadrado, quadrado e período como fatores aleatórios. A análise por tempo foi realizada quando as interações entre efeito de tempo e efeito de tratamento foram significativas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CONSUMO DE MATÉRIA SECA

Quanto aos valores referentes ao consumo de MS, expresso em quilograma por dia (kg/dia), em porcentagem do peso vivo (% PV) ou por unidade de peso metabólico (g/kg de PV^{0,75}), apresentados na tabela 4, não houve diferenças significativas (P<0,05) entre os tratamentos, provavelmente pelo fato de os animais terem recebido dietas isoenergéticas e isoproteicas na forma de ração completa, o que poderia ter proporcionado, ao longo do dia, melhor aporte de nutrientes, favorecendo a fermentação ruminal, principalmente na concentração de ácidos graxos de cadeia curta. Da mesma forma, esse resultado deve-se também ao fato de os animais estarem adaptados à dieta experimental e terem recebido um bom manejo, por se encontrarem em um local sombreado, com boas condições de água, proporcionando-lhes maior conforto, o que significa que encontravam-se em condições similares.

Tabela 4 - Efeito de três fontes energéticas sobre o consumo de matéria seca, expresso em quilograma por dia, porcentagem do peso vivo ou unidade de peso metabólico

| Variáveis | Tratamentos | | | EPM | Probabilidade |
|-----------------------------------|-------------|-----------|---------------|--------|---------------|
| | Controle | Soja Grão | Polpa Cítrica | | |
| CMS (kg/animal/dia) | 16,17 | 14,91 | 15,78 | 0,3591 | 0,2559 |
| CPV (% PV) | 2,12 | 1,94 | 2,08 | 0,0639 | 0,1309 |
| CPM (g/kg de PV ^{0,75}) | 111,45 | 102,23 | 109,28 | 3,0038 | 0,1571 |

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.

Cant et al. (1997), sinalam que, a inclusão de lipídios insaturados em dietas para ruminantes tem sido relacionada à diminuição no consumo de matéria seca, devido à interferência dos lipídios insaturados sobre a atividade das bactérias Gram-positivas, principais responsáveis pela fermentação da fibra, reduzindo, assim, a taxa de passagem da

digesta pelo trato gastrointestinal. Esta inibição pode ser direta, conforme mencionado anteriormente, ou indireta, pela substituição do carboidrato por lipídio, mantendo-se as dietas isocalóricas. Neste caso, devido aos lipídios não serem fonte de energia para o crescimento microbiano (VARGAS et al., 2002). Entretanto, de acordo com essas informações, a fonte lipídica utilizada no presente experimento e seu teor de extrato etéreo na dieta não influenciaram em nenhum mecanismo que afetasse o consumo de matéria seca, o que pode ser explicado pelos teores de extrato etéreo das dietas, pois o maior nível foi de 5,30% para a dieta com grãos de soja, o que estaria abaixo do limite de 7%, valor limite preconizado por Palmquist e Jenkins (1980).

Em contrapartida Henrique et al. (2003), ao trabalharem com diferentes níveis de polpa cítrica (0, 25, 40 e 55% na MS) em substituição ao milho grão, ressaltaram que as ingestões de matéria seca elevaram-se linearmente com o aumento da porcentagem de polpa cítrica na dieta. Esse aumento pode ter sido decorrente de melhor padrão de fermentação ruminal (VAN SOEST, 1982), devido à presença da pectina na polpa cítrica, que determina um ambiente mais propício, principalmente para a população celulolítica, e resulta em maiores relações acetato/propionato. Nussio et al. (2002), avaliando diferentes processamentos do grão de milho e inclusão da polpa cítrica, observaram que a polpa cítrica estimulou o consumo de MS, quando combinada com milho moído fino, mas não com o milho floculado. Já Menezes Jr et al. (2000), não observaram diferença no consumo de MS quando incluíram polpa cítrica ou grão de milho processado em dietas de vacas em lactação, onde registraram consumo médio diário de MS de 19,4 kg, valores acima do encontrado no presente estudo.

Apesar de alguns trabalhos mencionarem efeito de fontes, como a soja grão ou a polpa cítrica, sobre o consumo de matéria seca, no presente trabalho não foi possível demonstrar que as fontes energéticas utilizadas influenciaram sobre esta variável.

O consumo médio da dieta total entre os animais, com base na MS, foi de 16,17; 14,91 e 15,78 kg/animal/dia, para os tratamentos controle, soja grão e polpa cítrica, respectivamente. Resultados próximos foram encontrados por Vargas et al. (2002) ao trabalharem com adição de lipídios na ração de vacas leiteiras, citando consumos de matéria seca entre 11,0 e 14,3 kg/d. Por outro lado, Ítavo e Ítavo (2005) relataram valores

menores (8,28 a 10,86 kg/d) para vacas leiteiras alimentadas com diferentes níveis de energia na dieta.

Os valores de consumo de MS, quando expressos em porcentagem do peso vivo (%PV) dos animais, foram de 2,12; 1,94 e 2,08% para os tratamentos controle, soja grão e polpa cítrica, respectivamente. Esses valores são semelhantes aos indicados pelo NRC (1996), que sugere valores próximos de 2,5% PV em bovinos de corte. Porém, independentemente do tratamento, consideram-se valores menores ao sugerido pelo NRC (1989) para bovinos leiteiros (3,2% do PV) em lactação com produção diária de 25 kg de leite/dia e PV médio de 600 kg. Os valores obtidos neste experimento podem ter sido menores aos sugeridos pelo NRC (1989) para bovinos leiteiros, provavelmente, porque os animais utilizados não são animais que se encontravam em lactação.

Referente ao consumo de MS, quando expresso em relação ao peso metabólico (g/kg de $PV^{0,75}$), Goularte et al. (2010) avaliaram a influência de diferentes níveis de concentrado (30; 40; 50 e 60%), utilizando valores crescentes de extrato etéreo (5,7; 6,6; 7,5 e 8,4%) na dieta de bovinos, e relataram valores de consumo de matéria seca em relação ao peso metabólico menores (85,76 e 95,56 g/kg de $PV^{0,75}$) para os níveis de concentrado de 30 e 40%, respectivamente, quando comparados aos encontrados no presente trabalho. Entretanto, os autores citaram valores semelhantes (109,00 e 112,11 g/kg de $PV^{0,75}$) quando os animais foram alimentados com 50 ou 60% de concentrado, respectivamente.

5.2 PRODUÇÃO DE METANO DETERMINADA PELA TÉCNICA DO GÁS TRAÇADOR SF₆

Não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($P>0,05$) entre os tratamentos para os valores médios de emissão de metano (Tabela 5) quando expressos em gramas de metano por dia - CH₄ (g/d); quilogramas de metano por ano - CH₄ (kg/ano); gramas de metano por quilograma de matéria seca ingerida - CH₄ (g/kgMSI); porcentagem de energia bruta perdida na forma de metano - CH₄ (%EB) e Megacalorias de metano por

animal por dia - CH₄ (Mcal/Ani/d). Também não foram observadas diferenças para a quantidade de energia bruta ingerida por animal por dia – EBI(Mcal/Ani/d).

Devido a que o valor de significância em algumas variáveis da emissão de metano foi próximo a 5%, quando avaliado a 10% de probabilidade foi observado efeito de fonte energética (P<0,10) para as médias da produção de metano expressas em g/d; kg/ano e Mcal/Ani/d, resultando em maior emissão de metano o tratamento com polpa cítrica, em relação ao tratamento com grãos de soja e não diferindo nenhum destes tratamentos do tratamento controle. Isto é explicado, devido ao fato da inclusão de uma fonte rica em pectina gerar um aumento da produção de metano, em decorrência da fermentação da pectina, a qual favorece a produção de acetato e não de lactato ou propionato (VAN SOEST, 1994), caracterizando o padrão fermentativo desta fonte como similar aos das forragens (ROCHA FILHO et al., 1999). Posto isto, a fermentação da pectina é peculiar, gerando grande quantidade de energia por unidade de tempo, como ocorre com o amido e açúcares, porém com fermentação acética, que caracteriza a fermentação da celulose e da hemicelulose (SANTOS; MARTINEZ, 2006).

Tabela 5 - Efeito de três fontes energéticas sobre a produção de metano por bovinos determinada pela técnica do gás traçador SF₆

| Variáveis | Tratamentos | | | EPM | Probabilidade |
|------------------------------|-------------|-----------|---------------|-------|---------------|
| | Controle | Soja Grão | Polpa Cítrica | | |
| CH ₄ (g/d) | 286,22 | 284,15 | 344,22 | 17,70 | 0,0703 |
| CH ₄ (kg/ano) | 110,36 | 103,71 | 125,64 | 6,46 | 0,0703 |
| CH ₄ (g/kgMSI) | 17,41 | 19,10 | 22,03 | 1,20 | 0,2418 |
| CH ₄ (% EB) | 5,17 | 5,52 | 6,58 | 0,36 | 0,1885 |
| CH ₄ (Mcal/Ani/d) | 3,98 | 3,74 | 4,53 | 0,23 | 0,0704 |
| EBI (Mcal/Ani/d) | 71,72 | 67,86 | 69,58 | 1,55 | 0,5106 |

EBI = Energia Bruta Ingerida

Os valores da emissão de metano em gramas por dia - CH₄ (g/d) foram de 286,22; 284,15 e 344,22 para os tratamentos controle, grãos de soja e polpa cítrica, respectivamente. Os valores das emissões obtidas foram menores aos relatados por Johnson e Johnson (1995) em estimativas para gado de corte (164 a 194 g/animal/dia), mas assemelharam-se aos valores sugeridos para gado leiteiro (298 a 345 g/animal/dia). Por

outro lado, os valores obtidos neste experimento encontraram-se acima dos valores observados por Possenti et al. (2008) ao trabalharem com bovinos machos mestiços, com cânulas no rúmen e com peso médio de 814 kg, incluindo dois níveis de leucena na dieta (20 ou 50% da MS). Esses autores observaram emissões de CH₄ de 127 a 156 g/animal/dia, valores próximos aos observados por Pedreira et al. (2004) (125, 149 e 140 g/dia), estudando a emissão do gás metano em bovinos machos mestiços consumindo dieta à base de silagem de sorgo com 100, 70 e 30% de volumoso, respectivamente. Nascimento (2007), avaliando a emissão de metano por bovinos nelore ingerindo feno de *Brachiaria brizantha* cortado em diferentes estádios de maturação, relatou valores de emissão de metano de 132,65; 138,32 e 133,93 g/animal/dia para os diferentes tratamentos. Por outro lado, Primavesi et al. (2004b), ao avaliarem a produção de metano por gado leiteiro, tanto em novilhas como em vacas lactantes e não-lactantes em pastagens de *Panicum maximum*, observaram valores da emissão de metano de 222, 403 e 278 g/dia, respectivamente. Todos os autores mencionados acima utilizaram a técnica do gás traçador (SF₆) para captura e determinação da produção de metano.

Os valores obtidos na emissão de metano, quando expressos em kg/ano, foram menores para o tratamento controle (104,47) e grão de soja (103,71) quando comparados com os resultados obtidos por Primavesi et al. (2004b) (121 e 147 kg/animal/ano), ao trabalharem com bovinos leiteiros de 600 kg de PV mantidos em pastejo. Da mesma forma, foram menores aos valores médios ocorrentes na América do Norte, que são estimados em 118 kg/animal/ano, para animais com 600 kg de PV, e maiores aos valores sugeridos no leste europeu estimados em 100 kg/animal/ano de CH₄, para vacas de 550 kg de PV (IPCC, 1995; JOHNSON; WARD, 1996). Entretanto, os valores do tratamento com polpa cítrica (125,64 kg/ano) do presente experimento foram próximos aos resultados obtidos por Primavesi et al. (2004b) e acima dos valores sugeridos na América do Norte e no leste europeu.

Enquanto às emissões de metano quando expressas em g/kgMSI, para os tratamentos controle, grãos de soja e polpa cítrica (17,41; 19,10 e 22,03 g/kgMSI, respectivamente), estas foram semelhantes aos valores relatados por Possenti et al. (2008) (20,49 e 16,90 g/kgMSI) ao trabalharem com dois níveis de leucena na dieta (20 ou 50% MS respectivamente) e às emissões descritas por Nascimento (2007), quem apresentou

valores de metano entre 17,38 e 23,41 g/kgMSI ao utilizar feno de *Brachiaria brizantha* cortado em diferentes estádios de maturação, valores estes que, por sua vez, foram menores aos mencionados por Primavesi et al. (2004b) (entre 42 a 69 g/kgMSI).

Na América do Norte e no leste Europeu (USEPA, 2000), o percentual de CH₄ produzido em relação à energia bruta ingerida por bovinos é estimado entre 5,5% e 6,5%. Entretanto, Primavesi et al. (2004b) relataram valores de até 8,3% para vacas holandesas em lactação e de 10,6% para vacas mestiças. O IPCC (1995) estima perdas de 7% da energia bruta da dieta, quando os animais são alimentados com gramíneas tropicais de baixa qualidade, e de 6%, quando alimentados com dietas contendo grãos. Estes valores são menores aos relatados por Kurihara et al., (1999), ao trabalharem com animais alimentados com gramíneas de baixa qualidade e com dieta alta em grãos (10,4% e 6,7%, da EB, respectivamente). As perdas de energia bruta na forma de metano, observadas por Nascimento (2007), foram entre 6,18 e 9,02%. No presente trabalho, os valores observados foram de 5,17% para as vacas alimentadas com o tratamento controle, 5,52% para as alimentadas com soja grão e de 6,58% para as vacas alimentadas com polpa cítrica, valores estes que se encontram dentro do estimado para a América do Norte e para o leste Europeu (USEPA, 2000).

Moss, Givens e Garnsworthy (1995), destacaram que a produção de metano ruminal está diretamente relacionada com o consumo de MS, mas essa medida deve ser feita quando a fonte de MS não varia, principalmente com relação ao conteúdo e qualidade da fibra da dieta. Entretanto, essa relação, da produção de metano com o consumo de matéria seca, é um parâmetro que só poderia explicar o quanto é fermentado no rúmen, não trazendo assim, uma medida acurada e exata do processo de fermentação ruminal. Posto isto, é importante não só mensurar o quanto do material consumido pelo animal fermenta no rúmen, senão também, o como fermenta e, conseqüentemente, que produtos são gerados através desse processo de fermentação ruminal, fato este que se obtém quando se varia a fonte de MS e que, por conseguinte, foi realizado no presente experimento.

5.3 PARÂMETROS DA FERMENTAÇÃO RUMINAL

Quanto aos valores médios do pH ruminal e à concentração dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), bem como a sua proporção molar, apresentados na tabela 6, não houve interação ($P>0,05$) entre tempo e tratamento para nenhuma das variáveis avaliadas.

Não houve efeito significativo ($P>0,05$) de fonte energética para as médias do pH ruminal. Isto pode ser explicado pelo tempo de adaptação às respectivas dietas e pelo fato de os animais terem recebido dietas isoenergéticas e isoproteicas duas vezes por dia, na forma de ração completa. Isto favoreceu a fermentação ruminal e, conseqüentemente, levou que o consumo de matéria seca (Tabela 4) não apresentasse diferenças entre os tratamentos, fato este, que coincide com o fato de obterem os animais um consumo constante e não significativo. Isto sugere uma razoável relação entre consumo de matéria seca e o pH ruminal.

Tabela 6 - Efeito de três fontes energéticas sobre os parâmetros da fermentação ruminal

| Variáveis | Tratamentos | | | EPM | Valor de P | | |
|-----------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|------|------------|---------|-------------|
| | Controle | Soja Grão | Polpa Cítrica | | Tratamento | Hora | Trat x Hora |
| pH | 6,46 | 6,53 | 6,46 | 0,02 | 0,4775 | <0,0001 | 0,4442 |
| Concentração de AGCC (mM) | | | | | | | |
| Acético | 71,48 ^b | 68,47 ^b | 78,88 ^a | 1,23 | <0,0001 | 0,0208 | 0,2627 |
| Propiônico | 22,23 | 21,30 | 20,03 | 0,57 | 0,7219 | <0,0001 | 0,3687 |
| Butírico | 11,33 ^{ab} | 9,86 ^b | 13,72 ^a | 0,27 | 0,0227 | 0,0003 | 0,7712 |
| Total | 104,5 ^b | 99,81 ^b | 112,62 ^a | 1,37 | <0,0001 | 0,0004 | 0,3397 |
| Relação A:P | 3,44 | 3,36 | 3,95 | 0,07 | 0,1284 | <0,0001 | 0,1757 |
| Proporção Molar (%) de AGCC | | | | | | | |
| Acético | 68,18 | 69,02 | 70,06 | 0,37 | 0,4568 | <0,0001 | 0,2036 |
| Propiônico | 20,94 | 21,12 | 17,79 | 0,40 | 0,1172 | <0,0001 | 0,4280 |
| Butírico | 10,87 ^{ab} | 9,85 ^b | 12,14 ^a | 0,17 | 0,0208 | 0,0086 | 0,3889 |

^{ab} Letras diferentes na mesma linha, diferem significativamente ($P<0,05$) pelo teste de Tukey.

Apesar de os valores médios do pH ruminal não terem apresentado efeito significativo ($P>0,05$) entre os diferentes tratamentos, nem interação entre tratamento e tempo, foi observado efeito significativo de tempo de coleta do líquido ruminal (Figura 4a). Como era de se esperar, houve diminuição do pH ruminal para os três tratamentos às 3 h após a alimentação. Esta queda explica-se devido a que, no tempo de 3 ou 4 horas após a alimentação matinal, atinge-se o período correspondente ao pico de fermentação da última refeição (MARINO et al., 2011). Esta observação foi constatada neste experimento, onde os menores valores de pH foram observados às 3 h após a alimentação. O valor do pH ruminal foi aumentando de forma gradativa nos tempos 6 e 9 horas até alcançar novamente o pH ruminal mais alto às 12 horas após alimentação matinal.

Nogueira et al. (2005), avaliando o efeito de níveis de substituição de milho por polpa cítrica (0, 40, 60 e 80% na MS) na fermentação ruminal em 4 novilhos Nelore, observaram que o pH diminuiu linearmente ($p<0,05$) com o tempo de amostragem (0, 2, 6 e 8 horas após alimentação matinal), possivelmente decorrente da fermentação e da degradação do alimento. Os autores citam que dietas contendo polpa cítrica apresentam queda do pH, bem como alta taxa de degradação da pectina (30 a 50%/hora). Este achado não foi observado no presente trabalho devido a que o pH ruminal manteve-se similar entre todos os tratamentos.

Evidenciou-se que o pH manteve-se na faixa considerada adequada para os microrganismos manterem a fermentação ruminal, como esperado para dietas com misturas de concentrados e forragens, sendo que o pH regula a afinidade dos microrganismos ao substrato e que, de acordo com Allen e Mertens (1988), valores próximos a pH neutro melhoram a capacidade de adesão das bactérias à fibra.

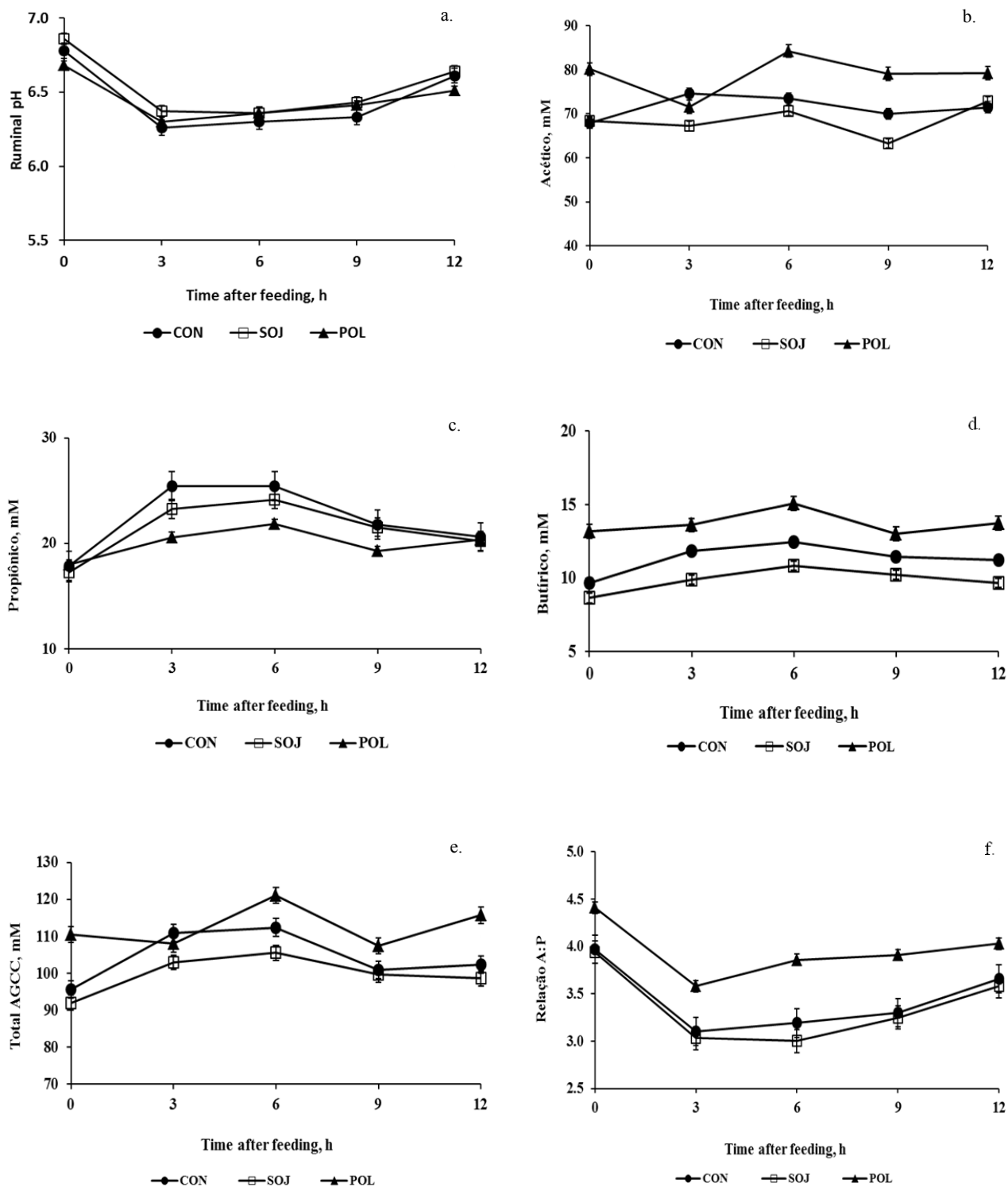
Segundo Van Soest (1994), a inclusão de fontes ricas em pectina na dieta em substituição de parte dos carboidratos não estruturais (amidos e açúcares) traz benefícios à nutrição e à produção de ruminantes, devido a que a degradação ruminal da pectina não contribui para o abaixamento do pH, uma vez que não gera ácido láctico. Em contrapartida, fontes lipídicas vegetais, como o grão de soja, tendem ao aumento do pH, devido à queda no consumo de matéria seca e à menor fermentação ruminal, o que proporciona menor acúmulo de ácidos graxos de cadeia curta, principal fator de redução do pH (VARGAS et al., 2002).

Vargas et al. (2002), trabalhando com duas fontes de lipídios (grão de soja e óleo de soja) na ração de vacas leiteiras, citaram valores médios de pH entre 6,26 a 6,50, valores semelhantes aos encontrados no presente trabalho (6,46 e 6,53).

O tratamento com polpa cítrica aumentou ($P<0,05$) as concentrações médias do ácido acético e do total de ácidos graxos de cadeia curta em relação aos tratamentos controle e grão de soja, que por sua vez, estes últimos, não diferiram entre si (Tabela 6). Foi observado efeito significativo ($P<0,05$) de fonte energética para as médias da concentração do ácido butírico, resultando em maior concentração deste ácido com o tratamento com polpa cítrica, em relação ao tratamento com grãos de soja e não diferindo estes dois do tratamento controle. O valor superior da concentração do acético, do ácido butírico e do total de AGCC para o tratamento com polpa cítrica é devido ao fato desta fonte ter uma alta disponibilidade ruminal, o que propicia um ambiente mais favorável à fermentação ruminal e ao fato desse padrão de fermentação resultar em mudanças no ambiente ruminal. O alto teor de pectina produz maior proporção de ácido acético em detrimento aos ácidos láctico e propiônico (VAN SOEST, 1994), podendo ocorrer um aumento da concentração do ácido butírico. Rocha Filho et al. (1999) trabalhando com vacas lactantes alimentadas com diferentes níveis de inclusão de polpa cítrica ou de milho em substituição da silagem de milho, concluíram que a fermentação da polpa cítrica é similar ao das forragens, dado que sua inclusão resulta em mudanças favoráveis no ambiente ruminal, como já mencionado, aumentando a atividade microbiana e, por conseguinte, a produção total de ácidos graxos de cadeia curta.

Para a concentração média do ácido acético, foi observado efeito de fonte energética em todos os tempos de amostragem, onde o grupo suplementado com polpa cítrica apresentou valores mais elevados em relação aos tratamentos controle e grãos de soja, que por sua vez não diferiram entre si. Com relação ao tempo de amostragem, o tratamento com polpa cítrica apresentou maior concentração de ácido acético, 6 horas após a alimentação matinal (Figura 4b), enquanto a que os tratamentos controle e grão de soja, além de não diferirem entre si, permaneceram constantes ao longo dos tempos de coleta.

Figura 4 - Valores médios do pH ruminal e da concentração dos ácidos graxos de cadeia curta, nos diferentes tempos de coleta do líquido ruminal antes, 3, 6, 9 e 12 horas após alimentação matinal: a) médias do pH ruminal; b) concentração mM do ácido acético; c) concentração mM do ácido propiônico; d) concentração mM do ácido butírico; e) concentração mM do total de ácidos graxos de cadeia curta; f) relação acetato:propionato



As médias da concentração total de AGCC, quando avaliadas por tempos de amostragem (Figura 4e), apresentaram-se de forma similar à concentração média do ácido acético, sendo que o tratamento com polpa cítrica aumentou os valores do total dos AGCC em relação aos tratamentos controle e grãos de soja e apresentou o seu pico máximo às 6 horas após a alimentação. Porém, no caso dos tratamentos controle e grãos de soja, estes apresentaram as maiores médias 3 e 6 horas após a alimentação, diminuindo os seus valores, após esses tempos de amostragem. O aumento da concentração total de AGCC esteve relacionado com o aumento da concentração média do ácido acético quando fornecido o tratamento com polpa cítrica, provavelmente porque a adição da polpa cítrica, possuidora de fibra de alta disponibilidade, pode ter beneficiado a atividade microbiana, aumentando a fermentação no rúmen e, conseqüentemente, os produtos da fermentação ruminal.

Para a concentração média do ácido butírico, além de ter sido observado efeito significativo ($P < 0,05$) de tratamento (Tabela 6), notando um aumento para o tratamento com polpa cítrica em relação ao tratamento com grãos de soja e não diferindo estes dois tratamentos do tratamento controle, como mencionado acima, verificou-se efeito de tempo de coleta (Figura 4d), alcançando este ácido a concentração média mais elevada 6 horas após a alimentação, para todos os tratamentos.

Não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os tratamentos para a concentração média do ácido propiônico ou a relação acético/propiônico. Isto está provavelmente relacionado ao pH ruminal obtido, o qual não foi diferente entre os tratamentos. Semelhante aos resultados deste experimento (Tabela 6), a maioria dos trabalhos realizados sobre o uso de lipídios saturados e insaturados tem demonstrado pequenos ou insignificantes efeitos sobre os parâmetros ruminais. Larson e Schultz (1970) não encontraram efeito na proporção dos ácidos propiônico e butírico ao compararem dietas contendo ou não óleo de soja para vacas em lactação. Schauff et al. (1992), testando soja integral e/ou sebo bovino em dietas para vacas em lactação, observaram que a proporção molar de acetato e a relação acético/propiônico tenderam a decrescer nas dietas contendo lipídios. Em contrapartida, Strobel e Russel (1986) indicaram que fontes ricas em pectina comparadas com fontes altas em amido ou lipídios promoviam maior relação acético/propiônico e mínima produção de ácido láctico.

Embora não tenha sido observada diferença significativa entre tratamentos, tanto para as médias da concentração do ácido propiônico quanto para as médias da relação acético/propiônico, o tempo de coleta influenciou estas variáveis. Entretanto, no caso das concentrações médias do ácido propiônico verificou-se aumento das médias desta variável três e seis horas após a alimentação matinal (Figura 4c), observando uma diminuição gradativa para os tempos 9 e 12 horas após a alimentação independentemente dos tratamentos testados. No caso da relação de acético/propiônico, foi observado o contrário, sendo que houve diminuição desta variável, para todos os tratamentos, 3 horas após a alimentação (Figura 4f), observando um aumento gradativo para os tempos 6, 9 e 12 horas após a ingestão do alimento. Estes resultados foram condizentes com os resultados obtidos para o pH ruminal, sendo que, enquanto os valores do pH ruminal diminuíram às 3 horas após alimentação (Figura 4a), as médias da concentração do ácido propiônico aumentaram para este tempo, o que sugeriu uma diminuição da relação acético/propiônico. Estes fatos relacionam-se também com o consumo de matéria seca, devido a que após 3 horas da ingestão do alimento atinge-se o pico da fermentação do que é consumido e, conseqüentemente, ocorre abaixamento do pH, aumento da concentração do ácido propiônico e, como resultado, diminuição da relação acético/propiônico.

Em relação à proporção molar dos ácidos graxos de cadeia curta (Tabela 6), os resultados foram condizentes ao tipo de substrato para fermentação ruminal de cada dieta. Em geral, não houve efeito de fonte energética ($P < 0,05$) para a proporção molar de ácido acético, nem para a de ácido propiônico. Entretanto, diferenças significativas ($P < 0,05$) foram observadas para a proporção do ácido butírico, sendo que o tratamento com polpa cítrica aumentou a proporção molar deste ácido em relação ao tratamento com grãos de soja e não diferindo estes dois do tratamento controle.

A proporção molar típica dos ácidos graxos de cadeia curta produzidos, quando o animal é alimentado com dietas à base de forragens, representa uma relação de 73:20:7 (acético, propiônico e butírico, respectivamente), comparado com 60:30:10 em misturas de concentrado e forragens, enquanto que para dietas à base de concentrado tem-se uma relação de 50:40:10 (BLACK, 1990). Essa proporção relativa dos diferentes ácidos graxos de cadeia curta produzidos varia amplamente, dependendo dos componentes químicos degradados e do pH ruminal (MOTA, 2006). As proporções dos ácidos graxos obtidas no

presente experimento para os tratamentos controle e grãos de soja, assemelharam-se aos valores para misturas de concentrado e forragens, citados por Black (1990), enquanto que o tratamento com polpa cítrica apresentou valores semelhantes ao relatados para dietas à base de forragens, provavelmente porque a fermentação da pectina é similar ao das forragens.

5.4 CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE PROTOZOÁRIOS RUMINAIS

As médias das contagens total e diferenciais de protozoários em bovinos alimentados com três fontes energéticas podem ser vistas na tabela 7, na qual se observa que as dietas contendo polpa cítrica promoveram maiores concentrações para a contagem de protozoários por mL analisadas quando comparadas com os tratamentos controle e grão de soja.

Tabela 7 - Efeito de três fontes energéticas sobre a contagem total e diferencial de protozoários

| Variável | Tratamentos | | | EPM | Valor de P | | |
|--------------------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------|------------|--------|----------------|
| | Controle | Soja Grão | Polpa Cítrica | | Tratamento | Hora | Trat x Hora |
| Protozoários (x 10 ³ /mL) | | | | | | | |
| <i>Dasytricha</i> | 2,44 | 1,08 | 3,52 | 0,3178 | 0,2532 | 0,9474 | 0,4252 |
| <i>Diplodinium</i> | 0,24 ^b | 0,44 ^b | 3,00 ^a | 0,2634 | 0,0466 | 0,2441 | 0,7909 |
| <i>Entodinium</i> | 206,16 ^{ab} | 119,16 ^b | 277,68 ^a | 11,4241 | 0,0026 | 0,0187 | 0,5155 |
| <i>Epidinium</i> | 0,00 | 0,04 | 0,00 | 0,0133 | 0,3732 | 0,4137 | 0,4443 |
| <i>Isotricha</i> | 4,12 ^b | 1,44 ^b | 15,12 ^a | 0,9333 | 0,0040 | 0,1965 | 0,1601 |
| <i>Polyplastron</i> | 8,88 ^{ab} | 1,16 ^b | 11,56 ^a | 0,9058 | 0,0163 | 0,5431 | 0,7381 |
| Total /mL | 221,84 ^{ab} | 123,32 ^b | 310,88 ^a | 12,6656 | 0,0069 | 0,0777 | 0,3457 |
| Protozoários (%) | | | | | | | |
| <i>Dasytricha</i> | 1,12 | 1,70 | 0,89 | 0,3897 | 0,9379 | 0,7742 | 0,5205 |
| <i>Diplodinium</i> | 0,15 ^b | 0,25 ^b | 0,87 ^a | 0,0791 | 0,0177 | 0,3800 | 0,9604 |
| <i>Entodinium</i> | 92,47 ^{ab} | 95,88 ^a | 89,47 ^b | 0,5675 | 0,0071 | 0,7669 | 0,1620 |
| <i>Epidinium</i> | 0,00 | 0,02 | 0,00 | 0,0061 | 0,3732 | 0,4137 | 0,4443 |
| <i>Isotricha</i> | 2,69 ^{ab} | 1,40 ^b | 4,74 ^a | 0,3127 | 0,0313 | 0,2887 | 0,0325 |
| <i>Polyplastron</i> | 3,55 ^a | 0,92 ^b | 3,66 ^a | 0,3072 | <0,0001 | 0,6516 | 0,9256 |

^{ab}Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente (P<0,05) no teste de Tukey.

O tratamento com polpa cítrica aumentou ($P < 0,05$) a contagem total de protozoários por mL, assim como também as contagens de *Entodinium* e *Polyplastron* quando comparado com o tratamento com grãos de soja e não diferindo estes dois tratamentos do tratamento controle, para estas variáveis. As contagens dos *Isotricha* e *Diplodinium* foram maiores para o tratamento com polpa cítrica em relação aos tratamentos controle e grão de soja, que por sua vez não diferiram entre si. Referente à população de *Dasytricha* e *Epidinium*, não foram observadas diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos.

Na contagem diferencial dos protozoários, houve predominância na concentração dos *Entodinium* para todas as dietas, provavelmente pelo efeito do pH obtido (Tabela 6) no estabelecimento deste gênero de protozoários. Segundo Fonty et al. (1984), o gênero *Entodinium* é pioneiro em predominar em pH entre 6,0 e 6,5, valor semelhante ao obtido no presente experimento (6,46). Vários autores descrevem o gênero *Entodinium spp.*, como o protozoário predominante na contagem total, chegando a 90%, especialmente quando se tem uma inclusão de fontes energéticas nas dietas (DENNIS et al., 1983) ou quando esta é à base de concentrados (HUNGATE, 1966; NOGUEIRA FILHO et al., 1992). A predominância de *Entodinium* corrobora registros que mostram essa situação em bovinos (D'AGOSTO et al., 1996; FRANZOLIN; DEHORITY, 1996; D'AGOSTO et al., 1998; D'AGOSTO; GUEDES, 2000; FRANZOLIN; FRANZOLIN, 2000), bubalinos (FRANZOLIN et al., 1998; FRANZOLIN; FRANZOLIN, 2000) e ovinos (NAKAMURA; KANEGASAKI, 1969).

Em média, a população dos gêneros *Diplodinium* e *Epidinium* apresentaram menores concentrações em relação a outros gêneros, provavelmente porque estes gêneros são predominantes quando os animais recebem dietas exclusivas de volumoso. Segundo Willianms e Coleman (1991), os ciliados do gênero *Epidinium spp.*, assim como os *Diplodinium spp.*, por apresentarem a enzima celulase, são capazes de degradar a celulose. Portanto, quando se tem dietas mais fibrosas, ocorre um aumento na população destes ciliados (HUNGATE, 1966; JOUANY, 1996; PURSE; MOIR, 1966; NOGUEIRA FILHO et al., 1999).

Efeito de fonte energética foi observado para a população do gênero *Isotricha spp.*, observando diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos, sendo que os animais alimentados com polpa cítrica apresentaram maior concentração deste gênero em relação

aos do tratamento controle e grãos de soja, que por sua vez não diferiram entre si. Isto é explicado pela presença de pectina na dieta dos animais que receberam polpa cítrica, uma vez que, segundo Van Soest (1994), o gênero *Isotricha* tem características pectinolíticas. Isso também foi citado por Williams e Coleman (1988), ao relatarem que os ciliados do gênero *Isotricha* estão mais envolvidos na utilização de polissacarídeos não estruturais e açúcares solúveis, demonstrando, assim, atividade pectinolítica. Por outro lado, Williams e Coleman (1991) relatam que estes gêneros aparecem em maior número nos ruminantes em regime de pastejo, consumindo forragens novas ou recebendo feno ou cana-de-açúcar. Isto ocorre, pois têm a capacidade de degradar os polissacarídeos não estruturais e carboidratos solúveis das plantas (HUNGATE, 1966; OLIVEIRA et al., 1992; JOUANY, 1996), motivo pelo qual não foi observado um grande número deste gênero na contagem diferencial do presente experimento, devido ao fato de que os animais não se encontravam em condições de pastejo e receberam dieta com 50%:50% (V:C) com a inclusão de fontes energéticas.

Quanto ao gênero *Dasytricha*, não foi observado efeito de fonte energética ($P < 0,05$) e, por sua vez, os valores observados na contagem diferencial foram baixos em relação a outros gêneros. Isto porque o aumento da população de *Dasytricha* ocorre quando fornecidas dietas à base de cana-de-açúcar, como mencionado por Leng e Preston (1976) e Valdez et al. (1977), fato que não aconteceu no atual experimento. Segundo Valdez et al. (1977), em sistemas de alimentação que promovam maior disponibilidade de carboidratos solúveis no rúmen, como o uso de cana-de-açúcar, os protozoários do gênero *Dasytricha* podem conferir vantagem ao animal hospedeiro, pois podem rapidamente armazenar os açúcares solúveis, que passam a ser fermentados mais lentamente, permitindo fermentação mais constante.

Em relação à porcentagem dos protozoários, os resultados foram condizentes ao tipo de substrato para fermentação ruminal de cada dieta. Em resumo, a dieta à base de polpa cítrica, elevou a proporção dos ciliados *Diplodinium*, *Isotricha* e *Polyplastron*, não observando diferenças significativas ($P < 0,05$) para os ciliados do gênero *Dasytricha* e *Epidinium*. Entretanto, para os ciliados do gênero *Entodinium*, quando analisado em porcentagem, foi observado um valor mais elevado ($P < 0,05$) na dieta contendo grãos de soja em relação ao tratamento com polpa cítrica e não diferindo estes dois do tratamento controle.

Em geral, o aumento na quantidade de protozoários em animais recebendo dietas com polpa cítrica, segundo Nogueira et al. (2005), pode favorecer a degradação da dieta pelo aumento da digestão ruminal da fibra, permitindo que a eficiência energética não seja comprometida pela redução da quantidade de amido.

6 CONCLUSÕES

Fontes energéticas utilizadas, polpa cítrica e soja grão, não alteraram o consumo de matéria seca, as médias do pH ruminal, a concentração média do ácido propiônico, nem a relação acético/propiónico no conteúdo ruminal.

A inclusão de uma fonte rica em pectina, como a polpa cítrica, ou em ácidos graxos insaturados, como os grãos de soja, resulta em mudanças no ambiente ruminal. Porém, não foi possível demonstrar alterações na emissão de metano pelos bovinos.

Fonte rica em pectina, como a polpa cítrica, alterou o perfil fermentativo, aumentando a concentração ruminal de ácido acético, de ácido butírico, bem como a concentração total de ácidos graxos de cadeia curta, especialmente quando comparada à dieta contendo grãos de soja.

As diferenças observadas na contagem total e diferencial de protozoários entre os tratamentos podem ser atribuídas às diferentes fontes de energia dos ingredientes, aos ácidos graxos insaturados como fonte lipídica do grão de soja e à pectina como fibra solúvel existente na polpa cítrica, que podem ter promovido diferenças no crescimento microbiano, favorecendo determinadas espécies de ciliados.

CAPÍTULO IV.
EFEITO DE TRÊS FONTES ENERGÉTICAS SOBRE A
DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL E A EXCREÇÃO DE
NUTRIENTES DA DIETA EM BOVINOS.

Efeito de três fontes energéticas sobre a digestibilidade aparente total e a excreção de nutrientes da dieta em bovinos

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de três fontes energéticas sobre o consumo, a digestibilidade aparente total e a excreção de nutrientes da dieta em bovinos. Seis vacas (730 ± 70 kg) canuladas no rúmen foram utilizadas e distribuídas a três dietas, que diferiram quanto à fonte energética, seguindo-se delineamento experimental em quadrado latino 3×3 replicado ($n = 18$ unidades experimentais): Controle (CON): Dieta de baixo extrato etéreo (3,50% de EE); Soja (SOJ): Dieta de alto extrato etéreo (5,30% de EE) com inclusão de 15% de soja grão e Polpa Cítrica (POL): Dieta de baixo extrato etéreo (3,00% de EE) e alta participação de pectina com inclusão de 15% de polpa cítrica. Para determinação do consumo e da digestibilidade aparente total da MS e suas frações, bem como da excreção dos nutrientes da dieta, foi utilizado o marcador óxido crômico. Cada período experimental foi constituído de 15 dias, onde do dia 5 até o dia 15 de oferecimento das dietas foi administrado, via cânula ruminal, 2 g do marcador óxido crômico por kg de MS de alimento consumido. O ensaio de digestibilidade foi constituído por duas fases, sendo os cinco primeiros dias para adaptação ao marcador e os cinco últimos para coleta de fezes. A excreção da MS e dos nutrientes, bem como a excreção de Nitrogênio, foi calculada a partir dos dados de coeficiente de digestibilidade da MS e suas frações. Não houve efeito de fonte energética sobre o consumo de energia bruta (CEB), nem de fibra em detergente neutro (CFDN). O tratamento com grãos de soja reduziu ($P < 0,05$) o consumo de matéria seca (CMS), de proteína bruta (CPB), de extrativo não nitrogenado (CENN) e de matéria orgânica (CMO). O consumo de extrato etéreo (CEE) foi maior ($P < 0,05$) para os animais que consumiram o tratamento com grãos de soja. Não foi observado efeito ($P > 0,05$) de fonte energética para os coeficientes de digestibilidade da MS, PB, EB, FDN, EE, ENN ou MO. A digestibilidade da FDA foi mais elevada ($P < 0,05$) para o tratamento com polpa cítrica, enquanto que o valor de NDT foi maior ($P < 0,05$) para o tratamento com grãos de soja. Não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os tratamentos para a excreção de energia bruta (ExEB), nem de fibra em detergente neutro (ExFDN). A

excreção de MS, ENN e de MO foram menores ($P<0,05$) para o tratamento com grãos de soja. Todas as fontes energéticas testadas influenciaram ($P<0,05$) a excreção de proteína bruta (ExPB), diferindo todos os tratamentos entre si. As excreções de FDA e de EE foram mais elevadas ($P<0,05$) para o tratamento com grãos de soja. Houve efeito ($P<0,05$) de fonte energética para a excreção de nitrogênio, sendo mais elevada para o tratamento com polpa cítrica em relação ao tratamento com grãos de soja. Fonte alta em pectina, como a polpa cítrica, ou em ácidos graxos insaturados, como a soja grão, não prejudicaram a digestibilidade das dietas. Neste sentido, são indicadas como fontes de elevado potencial de utilização em dietas para bovinos.

Palavras-chave: Digestão. Nutrientes. Grão de soja. Polpa cítrica. Ruminantes.

Effect of three energy sources on the apparent total tract digestibility and excretion of nutrients in cattle

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of three energy sources on dry matter intake, total apparent digestibility and excretion of nutrients in diet. Six cows (730 ± 70 kg) ruminally cannulated were used and allocated to three diets that differed in energy source, followed by the replicated 3x3 Latin square design ($n = 18$ experimental units): Control (CON): Low ether extract diet (3.50% EE); Soybean (SOJ): High ether extract diet (5.30% EE) with inclusion of 15% of soybean grain; Citrus pulp (POL): Low ether extract (3.00% EE) and high pectin diet with inclusion of 15% of citrus pulp. In order to determine dry matter intake and total apparent digestibility of DM and its fractions, and excretion of nutrients, chromic oxide was used as a marker. Each experimental period consisted of 15 days, where from day 5 to day 15 of diets offering, 2 g of the marker chromic oxide per kg of DM of food consumed were administered through rumen cannula. Digestibility trial consisted of two phases: the first five days for marker adaptation and the last five for feces collection. The excretion of DM and nutrients, as well as, nitrogen excretion was calculated from digestibility data of DM and its fractions. There was no effect of energy source on gross energy intake (GEI), or neutral detergent fiber (NDFI). Soybeans treatment decreased ($P < 0.05$) dry matter (DMI), crude protein (CPI), nitrogen free extract (NFEI) and organic matter (OMI) intake. Ether extract (EEI) intakes were higher ($P < 0.05$) for cows fed the soy beans treatment. There was no effect ($P > 0.05$) of energy source on digestibility coefficients of DM, CP, GE, NDF, EE, NFE or OM. The digestibility of ADF was higher ($P < 0.05$) for citrus pulp treatment, while TDN value was higher ($P < 0.05$) for soybeans treatment. There were no significant differences ($P > 0.05$) among treatments for gross energy (GEE_x) or neutral detergent fiber (NDF_{Ex}) excretion. The excretion of DM, NFE and OM were lower ($P < 0.05$) for treatment with soybeans. All energy sources influenced ($P < 0.05$) crude protein excretion (CPE_x), all treatments differed from each other. The excretions of ADF and EE were higher ($P < 0.05$) for treatment with soybeans. A significant effect ($P < 0.05$) of energy source was observed for nitrogen excretion, where the highest values were observed for

citrus pulp treatment compared to soybeans treatment. Pectin high source, such as citrus pulp, or unsaturated fatty acids, such as soy beans, did not affect diets digestibility. In this sense, they are indicated as sources of high potential for use in cattle diets.

Keywords: Digestion. Nutrients. Soy bean. Citrus pulp. Ruminants.

7 INTRODUÇÃO

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

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

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

Ensaio de digestibilidade da matéria seca e suas frações tornam-se uma importante ferramenta de avaliação do aproveitamento de dietas pelo animal, além de estarem intimamente relacionados com os eventos ruminais. Em relação a fontes energéticas, como a polpa cítrica e o grão de soja, caracterizam-se por alterar o perfil fermentativo, resultando em mudanças no ambiente ruminal, podendo, de certa forma, alterar a digestibilidade de alguns nutrientes pela modulação do pH ruminal, em decorrência da proporção dos AGCC formados e da velocidade da fermentação.

A fermentação da pectina da polpa cítrica proporciona um pH mais elevado em relação a dietas contendo milho (LEIVA et al., 2000) ou gorduras e óleos. A pectina, apesar de rapidamente fermentável no rúmen, gera acetato como produto final, como ocorre com a fermentação da celulose. Assim, a substituição de fontes de amido por polpa cítrica pode promover efeitos benéficos, principalmente em relação ao ambiente ruminal, em razão da alteração da fermentação láctica pela acética e do efeito tamponante da pectina, resultando em melhores condições para digestão da fibra da forragem em dietas ricas em concentrado (VAN SOEST, 1987). Em contrapartida, gorduras e óleos têm sido adicionados a dietas para ruminantes com o objetivo de aumentar a concentração energética da dieta. Porém, um dos principais problemas com a utilização de gorduras insaturadas na dieta de ruminantes é o efeito sobre o consumo (ALLEN, 2000). Os suplementos lipídicos insaturados apresentam, em doses elevadas, efeito tóxico sobre as bactérias gram-positivas do rúmen, sobretudo a população celulolítica (NAGARAJA et al., 1997), alterando a relação acetato:propionato, em razão da produção de propionato à custa de acetato, da redução da produção de metano e da diminuição da amônia ruminal (JENKINS, 1993). De forma geral, o uso de óleo em rações para ruminantes apresenta efeitos desejáveis, como inibição da produção de metano, redução da concentração de NH_3 ruminal e aumento na eficiência da síntese microbiana (LIN et al., 1995). Por outro lado, o óleo apresenta efeitos indesejáveis, como a redução na digestibilidade da matéria seca (MS) e redução na relação acetato:propionato com conseqüente diminuição da gordura do leite (VARGAS et al., 2002). Posto isto, a avaliação nutricional desses alimentos torna-se necessária para a caracterização do seu potencial e utilização na composição de dietas de ruminantes, que envolvem estudos de digestibilidade. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de três fontes energéticas sobre o consumo, a digestibilidade aparente total

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

8 MATERIAL E MÉTODOS

8.1 ANIMAIS E INSTALAÇÕES

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

Para avaliação do consumo e da digestibilidade aparente total da MS e suas frações, bem como a excreção dos nutrientes da dieta, foram utilizadas seis vacas não gestantes e não lactantes, com peso vivo médio de 730 ± 70 kg e portadoras de cânula ruminal com 10 cm de diâmetro e 7,5 cm de espessura. Os animais foram mantidos em instalação coberta, provida de baias individuais com cochos de cimento e bebedouros automáticos comuns a cada dois animais, e também de camas de areia, a fim de proporcionar maior conforto e bem-estar aos animais.

8.2 TRATAMENTOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Seis vacas foram distribuídas a uma das três dietas experimentais, isoenergéticas (1,55 Mcal de EL_1 /kg de MS) e isoproteicas (12,0% de PB), formuladas com o programa *Spartan Dairy Ration Evaluator/Balancer*, versão 3.0.3., diferindo de acordo com a fonte energética utilizada, sendo: 1) Controle (CON): Dieta de baixo extrato etéreo (3,50% de EE); 2) Soja (SOJ): Dieta de alto extrato etéreo (5,30% de EE) com inclusão de 15% de soja grão e, 3) Polpa Cítrica (POL): Dieta de baixo extrato etéreo (3,00% de EE) e alta participação de pectina com inclusão de 15% de polpa cítrica.

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

referentes a 3 animais, 3 períodos e 2 quadrados (Tabela 8). A tabela da análise de variância encontra-se abaixo (Tabela 9).

Tabela 8 - Esquema do delineamento experimental em dois quadrados latinos 3 x 3 contemporâneos

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

Tabela 9 - Esquema da análise de variância para delineamento em quadrado latino replicado

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

8.3 MANEJO NUTRICIONAL E PERÍODO EXPERIMENTAL.

Os alimentos foram oferecidos duas vezes ao dia, às 08:00 e 16:00 h, na forma de ração completa. Cada subperíodo experimental foi constituído de 15 dias, sendo que, para a análise da digestibilidade aparente total e a excreção da MS e dos nutrientes da dieta, constituíram-se duas fases entre o dia 5 até o dia 15 de oferecimento das dietas, sendo os cinco primeiros dias para adaptação ao marcador óxido crômico e os cinco últimos para coleta de fezes.

Em todas as dietas, 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. As proporções dos diversos ingredientes das dietas experimentais e a composição bromatológica das mesmas estão descritas na tabela 10.

Tabela 10 - Proporções de ingredientes e composição bromatológica estimada das dietas experimentais, expressas em porcentagem da matéria seca (% MS)

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

1: Suplemento mineral e vitamínico, quantidade por kg de produto: 200 g de cálcio, 60 g de fósforo, 20 g de enxofre, 20 g de magnésio, 70 g de sódio, 15 mg de cobalto, 700 mg de cobre, 700 mg de ferro, 40 mg de iodo, 1.600 mg de manganês, 19 mg de selênio, 2.500 mg de zinco, 200.000 UI de vitamina A, 50.000 UI de vitamina D3, 1.500 UI de vitamina E; 2: Estimado segundo análises bromatológicas, determinadas no Laboratório de Nutrição Animal e Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga; 3: Estimado segundo o programa *Spartan Dairy Ration Evaluator/Balancer*, versão 3.0.3.

alimento fornecida em um dia e a sobra de alimento, coletada e pesada na manhã seguinte ao oferecimento, multiplicada pela porcentagem de matéria seca (MS) do alimento.

8.4.2 Análises bromatológicas

As amostras dos alimentos utilizados nas dietas foram analisadas para determinação dos teores de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), cálcio (Ca), fósforo (P) e energia bruta (EB), segundo AOAC (1985), e fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina (LIG) conforme Van Soest (1994).

As análises bromatológicas foram feitas 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.

8.4.3 Digestibilidade aparente total

A digestibilidade aparente total da MS da dieta e suas frações (PB, EE, EB, extrativo não nitrogenado, FDN, FDA, e MO) foram determinadas por meio do marcador óxido crômico (Cr_2O_3), segundo Bateman (1970). Para tal, entre o dia 5 até o dia 15 de oferecimento das dietas de cada período experimental, foram administrados duas vezes ao dia, via cânula ruminal, 2 g do marcador óxido crômico por kg de MS de alimento consumido, através de envelopes confeccionados em papel absorvente. O ensaio de digestibilidade foi constituído por duas fases, sendo os cinco primeiros dias para adaptação ao marcador e os cinco últimos para coleta de fezes.

Para análise da composição das amostras de fezes, se retirou 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 e armazenada em freezer a -20°C até o momento do processamento e análise.

Durante esse período foram coletadas duas vezes ao dia, aproximadamente 200 g 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 ventilada a 65°C por 72h. As amostras foram trituradas em moinho, utilizando-se peneira de 1mm, e acondicionadas em potes fechados para posterior determinação da concentração de óxido crômico, segundo Conceição et al. (2007), e demais análises laboratoriais.

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

8.4.4 Excreção da MS e dos nutrientes

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

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

8.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados de consumo e da digestibilidade aparente total da MS e suas frações, bem como a excreção da MS e dos nutrientes, foram analisados pelo programa Statistical Analysis System (Versão 9.2, 2010), verificando anteriormente a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk. Estes dados foram submetidos à análise de variância e seus efeitos avaliados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O modelo incluiu o efeito de tratamento como fator fixo e os efeitos de animal dentro de quadrado, quadrado e período como fatores aleatórios.

9 RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1 CONSUMO DA MATÉRIA SECA E DOS NUTRIENTES

Na tabela 11 visualizam-se as médias do consumo de matéria seca e dos nutrientes, para os efeitos de fonte energética.

Não houve efeito de fonte energética sobre o consumo de energia bruta (CEB), nem de fibra em detergente neutro (CFDN), provavelmente pelo fato de os animais terem recebido dietas isoenergéticas com teores semelhantes de FDN (Tabela 10), o que proporcionou ao longo do dia um consumo constante destes nutrientes, sugerindo que as condições ruminais mantiveram-se também constantes para os três tratamentos.

Tabela 11 - Efeito de três fontes energéticas sobre o consumo da MS e dos nutrientes

| Variáveis | Tratamentos | | | EPM | Probabilidade |
|----------------|--------------------|--------------------|---------------------|------|---------------|
| | Controle | Soja Grão | Polpa Cítrica | | |
| CMS (kg/dia) | 16,42 ^a | 14,68 ^b | 16,37 ^a | 0,32 | 0,0196 |
| CPB (kg/dia) | 1,87 ^a | 1,67 ^b | 1,99 ^a | 0,04 | 0,0048 |
| CEB (Mcal/dia) | 70,23 | 69,25 | 64,39 | 1,25 | 0,0775 |
| CFDN (kg/dia) | 4,43 | 4,53 | 4,52 | 0,08 | 0,7848 |
| CFDA (kg/dia) | 2,34 ^b | 2,83 ^a | 2,68 ^a | 0,08 | 0,0073 |
| CEE (kg/dia) | 0,57 ^b | 0,78 ^a | 0,49 ^b | 0,03 | <0,0001 |
| CENN (kg/dia) | 8,30 ^a | 6,64 ^b | 8,01 ^a | 0,21 | 0,0005 |
| CMO (kg/dia) | 15,17 ^a | 13,63 ^b | 15,02 ^{ab} | 0,29 | 0,0273 |

CMS= Consumo de matéria seca; CPB= Consumo de proteína bruta; CEB= Consumo de energia bruta; CFDN= Consumo de fibra em detergente neutro; CFDA= Consumo de fibra em detergente ácido; CEE= Consumo de extrato etéreo; CENN= Consumo de extrativo não nitrogenado; CMO= Consumo de matéria orgânica; ^{ab} Letras diferentes na mesma linha, diferem significativamente (P<0,05) no teste de Tukey.

Foi observada diminuição (P<0,05) do consumo de matéria seca (CMS), de proteína bruta (CPB) e de extrativo não nitrogenado (CENN) para o tratamento com grãos de soja em relação aos tratamentos controle e polpa cítrica, que por sua vez não diferiram entre si. O tratamento com grãos de soja diminuiu (P<0,05) também o consumo de matéria orgânica (CMO) em relação ao tratamento controle e não diferindo destes dois tratamentos o tratamento com polpa cítrica. O efeito depressor dos lipídios sobre o consumo de matéria

seca foi devido a um efeito de saciedade, cuja diminuição da ingestão de matéria seca resultou em diminuição do consumo de proteína bruta, de extrativo não nitrogenado e da matéria orgânica.

O efeito depressor dos lipídios sobre o consumo de matéria seca e dos nutrientes mencionados anteriormente também pode estar relacionado à inibição do crescimento microbiano e, conseqüentemente, da taxa de passagem da digesta pelo trato gastrointestinal (VARGAS et al., 2002). Frequentemente, a explicação da diminuição do consumo de matéria seca está relacionada à interferência dos lipídios insaturados sobre a atividade das bactérias Gram-positivas, principais responsáveis pela fermentação da fibra (CANT et al., 1997). Além desses aspectos, a alta densidade energética da dieta pode ter levado a um aumento da concentração sanguínea de metabólitos oriundos da dieta, o que estimularia receptores químicos que ativarão o centro de saciedade e ocasionaria a diminuição da ingestão de alimentos (NRC, 1989). Allen (2000) cita que a ingestão de matéria seca diminui quando há excesso de energia, onde o controle é efetuado pela quantidade de nutrientes absorvidos, o que pode ter acontecido com os animais do presente experimento alimentados com grãos de soja. É importante levar em consideração que a composição dos carboidratos da dieta é essencial para fazer um balanço adequado das rações, principalmente de vacas leiteiras, em função da peculiaridade na fermentação de cada fração e sua interferência no consumo, além da manutenção das condições normais do rúmen (SNIFFEN et al., 1992).

O consumo de fibra em detergente ácido (CFDA) foi menor ($P < 0,05$) para os animais que consumiram o tratamento controle do que para os que consumiram grãos de soja ou polpa cítrica, não demonstrando diferenças estatísticas entre estes dois últimos tratamentos. Isto é explicado, devido a que na composição bromatológica (Tabela 10) o valor de FDA do tratamento controle (14,40% da MS) foi menor em relação à composição de FDA dos tratamentos com grãos de soja ou polpa cítrica (19,30 e 16,60% da MS, respectivamente). Além disso, o aumento do consumo de FDA para as dietas contendo grãos de soja e polpa cítrica, provavelmente, foi devido ao maior teor de fibras nessas dietas, uma vez que os grãos de soja e em especial a polpa cítrica possuem um maior teor de FDA, quando comparadas com o milho.

Efeito de fonte energética ($P < 0,05$) foi observado para o consumo de extrato etéreo (CEE), sendo este maior para o tratamento com grãos de soja em relação aos tratamentos controle e polpa cítrica, que, por sua vez, não diferiram entre si. Isso é esperado, pois o tratamento contendo grãos de soja caracterizou-se por ser uma dieta de alto extrato etéreo (5,30% de EE) em relação aos demais tratamentos, o que significa que parte dos CNF foi substituída pelo extrato etéreo, que é uma fração 2,25 vezes mais energética.

Resultados similares ao consumo de MS e dos nutrientes encontrados no presente experimento foram relatados por Oliveira et al. (2007), ao avaliarem os efeitos de diferentes fontes de lipídios sobre o consumo e a digestibilidade de novilhos bubalinos terminados em confinamento. Os autores observaram que o consumo de EE pelos animais alimentados com a dieta contendo grãos de soja integral ou óleo de soja foi maior que o daqueles do tratamento sem lipídio adicional, o que era esperado, por ser o objetivo da pesquisa destes autores. Essa maior ingestão de lipídios provocou menores consumos (em kg por dia) de MS, PB e CNF pelos animais que receberam as dietas com grãos de soja integral ou óleo de soja. Esse resultado pode ser explicado pelo atendimento energético que possivelmente ocorreu com o aporte de lipídios na alimentação dos búfalos, explicado pela teoria de regulação do consumo pela energia, descrita por Thiago e Gill (1990) e Van Soest (1994).

Por outro lado, Pereira et al. (1998a,b), trabalhando com 16 vacas leiteiras mestiças recém-paridas, durante as primeiras 14 semanas da lactação, avaliaram o uso de dois níveis (0 e 30% na base da matéria natural) de grãos de soja moídos em rações concentradas isoprotéicas (23,5% de PB na MS). Os autores observaram que a inclusão dos grãos reduziu o consumo diário de MS (16,15 e 13,38 kg), de MO (15,47 e 12,76 kg), de PB (2,68 e 2,16 kg) e de FDN (6,13 e 5,05 kg para a dieta controle e com adição de soja, respectivamente), enquanto o consumo de EE aumentou (0,35 e 0,59 kg/dia, respectivamente). Esta redução no consumo de MS, segundo os mesmos pesquisadores, possivelmente possa ser atribuída à maior densidade energética da ração proporcionada pelo elevado teor de óleo dos grãos de soja, mesmo tendo sido usada uma proporção de 3:1 de volumoso e concentrados.

9.2 DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL

Os dados dos coeficientes de digestibilidade da MS e suas frações, bem como os nutrientes digestíveis totais (Tabela 12), para os efeitos de fonte energética, independentemente do tratamento, encontram-se dentro do esperado.

Os coeficientes de digestibilidade da MS, PB, EB, FDN, EE, ENN ou MO não foram afetados por nenhum dos tratamentos testados. Entretanto, houve efeito significativo para os coeficientes de digestibilidade da FDA, assim como para o de NDT.

Tabela 12 - Efeito de três fontes energéticas sobre a digestibilidade aparente total da MS e suas frações

| Variáveis | Tratamentos | | | EPM | Probabilidade |
|-----------|--------------------|---------------------|--------------------|------|---------------|
| | Controle | Soja Grão | Polpa Cítrica | | |
| CDMS (%) | 88,87 | 88,57 | 89,41 | 0,61 | 0,2516 |
| CDPB (%) | 87,58 | 86,58 | 87,37 | 0,72 | 0,1630 |
| CDEB (%) | 89,11 | 88,50 | 89,76 | 0,56 | 0,0623 |
| CDFDN (%) | 85,89 | 85,79 | 85,94 | 0,58 | 0,9733 |
| CDFDA (%) | 81,96 ^b | 83,36 ^{ab} | 85,21 ^a | 0,78 | 0,0409 |
| CDEE (%) | 92,21 | 94,04 | 95,21 | 0,95 | 0,0980 |
| CDENN (%) | 92,20 | 92,52 | 93,28 | 0,47 | 0,1278 |
| CDMO (%) | 89,78 | 89,64 | 90,35 | 0,49 | 0,2206 |
| NDT (%) | 86,98 ^b | 89,50 ^a | 86,61 ^b | 0,50 | 0,0003 |

CDMS= Coeficiente de digestibilidade da matéria seca; CDPB= Coeficiente de digestibilidade da proteína bruta; CDEB= Coeficiente de digestibilidade da energia bruta; CDFDN= Coeficiente de digestibilidade da fibra em detergente neutro; CDFDA= Coeficiente de digestibilidade da fibra em detergente ácido; CDEE= Coeficiente de digestibilidade do extrato etéreo; CDENN= Coeficiente de digestibilidade do extrativo não nitrogenado; CDMO= Coeficiente de digestibilidade da matéria orgânica; NDT= Nutrientes digestíveis totais; ^{ab} Letras diferentes na mesma linha, diferem significativamente (P<0,05) no teste de Tukey.

De acordo com Jenkins e Jenny (1989), a adição de suplementos lipídicos diminui ou tem efeito mínimo sobre a digestibilidade da MS, apresentando raros efeitos de aumento. Por outro lado, Leite (2006) sugere que existe uma redução na digestibilidade da fibra quando fontes lipídicas são adicionadas às dietas. Porém, a magnitude de redução está relacionada não só à quantidade, mas também ao tipo de ácido graxo presente no suplemento, uma vez que lipídios ricos em ácidos graxos insaturados tendem a provocar maior redução na digestibilidade.

Em contrapartida, Bateman II e Jenkins (1998) não constataram efeitos da inclusão de até 8% de óleo de soja sobre a digestibilidade aparente de MS, MO e FDN e sugeriram que grandes quantidades de lipídios não protegidos podem ser adicionadas às dietas, pois não provocam efeitos na digestibilidade.

O tratamento com polpa cítrica apresentou maior ($P < 0,05$) digestibilidade para a fração de FDA, em relação ao tratamento controle e não diferindo estes dois do tratamento com grãos de soja. Isto é explicado, devido a que a fração fibrosa da polpa cítrica apresenta elevada digestibilidade ruminal, pois, apesar de o teor de FDA ser por volta de 24%, aproximadamente, tem baixo teor de lignina (1%), significando que quase a totalidade da fibra é digerida no rúmen do animal (ORSKOV, 1987). Por outro lado, a melhora na digestibilidade da FDA na dieta composta por polpa cítrica pode estar relacionada à manutenção do pH em valores próximos a 6,0 ao longo do dia, o que favorece a atuação das bactérias celulolíticas responsáveis pela degradação das frações fibrosas dos alimentos (RUSSELL; WILSON, 1996; MARINO, 2008).

O coeficiente de digestibilidade da fibra em detergente ácido obtido foi semelhante ao relatado por Ben-Ghedalia et al. (1989) ao trabalharem com ovinos, que apresentaram valores ao redor de 80%. A melhora na digestibilidade da FDA no presente trabalho reflete a composição da polpa cítrica, que tem sido considerada um alimento intermediário entre volumoso e concentrado (WING, 1975), pela melhora nos padrões da fermentação ruminal e por apresentar melhor efetividade da fibra em relação ao milho ou soja grão, possivelmente em função da pectina (VAN SOEST, 1982).

Além desses aspectos mencionados, a polpa cítrica é rápida e extensivamente degradada no rúmen, sendo superior em degradação quando comparada aos grãos de soja, devido ao fato de a polpa cítrica possuir alto teor de carboidratos solúveis e conter pectina, elemento componente da parede celular, de alta degradabilidade ruminal (SCOTON, 2003).

Houve efeito significativo ($P < 0,05$) de fonte energética para a concentração dos NDT, apresentando o tratamento com grãos de soja maior valor em relação ao tratamento controle e polpa cítrica, que por sua vez estes últimos não diferiram entre si. Isto provavelmente pelo aumento da densidade energética da ração. Além disso, a maior concentração dos NDT pode ter sido em decorrência de uma menor taxa de passagem da digesta, causada pelo menor consumo para a dieta com grãos de soja, pois, com a redução

da taxa de passagem, aumenta-se o tempo de retenção da digesta no trato gastrointestinal, promovendo maior tempo de exposição desta aos processos digestivos, fazendo com que a concentração dos NDT seja aumentada.

9.3 EXCREÇÃO DA MS E DOS NUTRIENTES

As fontes energéticas utilizadas no presente experimento influenciaram as médias da excreção da MS e dos nutrientes, como observado na tabela 13. Entretanto, não foram encontrados dados na literatura a respeito do efeito de fontes energéticas sobre a excreção da MS e de nutrientes na dieta de bovinos. Entende-se que este tipo de informação tenderá a crescer dada a eminência com a preocupação ambiental.

Tabela 13 - Efeito de três fontes energéticas sobre a excreção da MS e dos nutrientes

| Variáveis | Tratamentos | | | EPM | Probabilidade |
|-----------------|---------------------|--------------------|--------------------|-------|---------------|
| | Controle | Soja Grão | Polpa Cítrica | | |
| ExMS (kg/dia) | 1,82 ^a | 1,67 ^b | 1,73 ^{ab} | 0,030 | 0,0567 |
| ExPB (kg/dia) | 0,23 ^b | 0,22 ^c | 0,25 ^a | 0,005 | 0,0020 |
| ExEB (Mcal/dia) | 7,64 | 7,35 | 7,08 | 0,122 | 0,0898 |
| ExFDN (kg/dia) | 0,62 | 0,64 | 0,63 | 0,010 | 0,8262 |
| ExFDA (kg/dia) | 0,42 ^{ab} | 0,47 ^a | 0,40 ^b | 0,011 | 0,0293 |
| ExEE (kg/dia) | 0,043 ^{ab} | 0,045 ^a | 0,023 ^b | 0,004 | 0,0266 |
| ExENN (kg/dia) | 0,65 ^a | 0,49 ^b | 0,54 ^{ab} | 0,023 | 0,0048 |
| ExMO (kg/dia) | 1,55 ^a | 1,40 ^b | 1,45 ^{ab} | 0,028 | 0,0308 |
| ExN (kg/dia) | 0,038 ^{ab} | 0,035 ^b | 0,042 ^a | 0,001 | 0,0084 |

ExMS= Excreção de matéria seca; ExPB= Excreção de proteína bruta; ExEB= Excreção de energia bruta; ExFDN= Excreção de fibra em detergente neutro; ExFDA= Excreção de fibra em detergente ácido; ExEE= Excreção de extrato etéreo; ExENN= Excreção de extrativo não nitrogenado; ExMO= Excreção de matéria orgânica; ExN= Excreção de nitrogênio; ^{ab} Letras diferentes na mesma linha, diferem significativamente (P<0,05) no teste de Tukey.

Não houve diferenças significativas (P<0,05) entre os tratamentos para a excreção de energia bruta (ExEB), nem para a excreção de fibra em detergente neutro (ExFDN). Esses resultados são condizentes em relação ao encontrado no consumo e na digestibilidade desses nutrientes, sendo que também não foram observadas diferenças significativas para essas variáveis, o que confirma novamente o fato das dietas serem isoenergéticas e com

teores similares de FDN, indicando um perfil fermentativo e de aproveitamento desses nutrientes constante e similar e, conseqüentemente, não apresentando um efeito marcante na excreção dos mesmos.

A excreção de matéria seca (ExMS), de extrativo não nitrogenado (ExENN) e de matéria orgânica (ExMO) foram menores ($P < 0,05$) para o tratamento com grãos de soja em relação ao tratamento controle, sem diferença destes dois para o tratamento com polpa cítrica. Isto está relacionado com o consumo (Tabela 11) obtido para estes nutrientes, sendo que também foi menor quando os animais consumiram o tratamento com grãos de soja.

A excreção de fibra em detergente ácido (ExFDA) e de extrato etéreo (ExEE) foram mais elevadas ($P < 0,05$) para o tratamento com grãos de soja em relação ao tratamento com polpa cítrica, não diferindo estes dois tratamentos do tratamento controle. Isto, provavelmente, está relacionado com a composição de FDA e EE das dietas (Tabela 3), sendo maior para o tratamento com grãos de soja (19,30 e 5,30% da MS, respectivamente) em relação aos demais tratamentos. Por outro lado, esse aumento na excreção de FDA e de EE para o tratamento com grãos de soja pode ter sido, também, pelo maior consumo destes nutrientes (Tabela 11) e a ausência de efeito de tratamento sobre a digestibilidade (Tabela 12) destas variáveis, o que levou a uma menor retenção e aproveitamento destes nutrientes e, conseqüentemente, ao aumento da excreção dos mesmos.

Efeito de fonte energética foi observado ($P < 0,05$) para a excreção de proteína bruta (ExPB), diferindo todos os tratamentos entre si, sendo que o tratamento com polpa cítrica promoveu uma maior excreção da proteína, enquanto que o tratamento com grãos de soja resultou em menor excreção deste nutriente. Da mesma forma, houve efeito ($P < 0,05$) de fonte energética para a excreção de nitrogênio (ExN), sendo mais elevada para o tratamento com polpa cítrica em relação ao tratamento com grãos de soja e não diferindo estes dois tratamentos do tratamento controle. Posto isto, a maior excreção de proteína bruta e, conseqüentemente, de nitrogênio para o tratamento com polpa cítrica é devido a uma menor retenção dos compostos nitrogenados por parte dos animais que receberam este tratamento.

Apesar de a polpa cítrica apresentar menor teor de proteína bruta quando comparada com o milho e a soja grão, essa proteína pode ainda ser menos digestível. Bhattacharya e Harb (1973) e Schaibly e Wing (1974), ao trabalharem com ovinos, encontraram menores coeficientes de digestibilidade aparente da proteína bruta na polpa cítrica, do que no milho

em grão. A eficiência da síntese de proteína microbiana também foi menor com a utilização da polpa cítrica na dieta (HIGHFILL et al., 1987). Esses efeitos podem refletir uma menor retenção dos compostos nitrogenados e, conseqüentemente, um aumento da excreção dos mesmos.

Por outro lado, Bhattacharya e Harb (1973) e Pascual e Carmona (1980) encontraram diminuição significativa do nitrogênio retido com o aumento da participação da polpa cítrica na dieta. Estes resultados podem explicar o aumento na excreção de nitrogênio para os animais alimentados com polpa cítrica no presente experimento.

10 CONCLUSÕES

A inclusão de 15% de soja grão na dieta de bovinos reduziu os consumos de MS, PB, ENN e MO. Entretanto, nenhuma das fontes alterou o consumo de FDN, FDA, EE e EB. Isto sugere que a inclusão da polpa cítrica torna-se alternativa satisfatória para melhorar o consumo de MS e suas frações.

Fonte rica em pectina, como a polpa cítrica, ou em ácidos graxos insaturados, como a soja grão, com uma inclusão de 15% na matéria seca, não prejudicaram a digestibilidade das dietas, sendo indicadas como fontes de elevado potencial de utilização em dietas para bovinos. Entretanto, a polpa cítrica melhorou a digestibilidade da fibra em detergente ácido, enquanto a que a soja grão aumentou os nutrientes digestíveis totais.

A inclusão de até 5,30% de EE proveniente de lipídios insaturados, na dieta de bovinos, pode ser realizada, pois não provocam efeitos negativos na digestibilidade aparente total da matéria seca e suas frações.

A inclusão de polpa cítrica se mostrou eficiente em reduzir a excreção da maioria dos nutrientes, porém resultou em menor retenção dos compostos nitrogenados, aumentando a sua excreção. Entretanto, o tratamento com grãos de soja aumentou a excreção de FDA e de EE.

Recomenda-se a realização de mais ensaios para mensuração da excreção da MS e dos nutrientes das dietas de bovinos, a fim de ter uma compreensão mais abrangente dos processos digestivos em ruminantes e, conseqüentemente, do aproveitamento da dieta por parte do animal.

REFERÊNCIAS

- AAFC. AGRICULTURAL AND AGRI-FOOD CANADA. **Estimates of emissions: methane.** 2003. Disponível em: <http://www.agr.ca/research/Healthy_Air> On line. Acesso em: 10 nov. 2011.
- ALLEN, M. S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 7, p. 1598-1624, 2000.
- ALLEN, M. S.; MERTENS, D. R. Evaluating constraints on fiber digestion by rumen microbes. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 118, p. 261-270, 1988.
- ANDERSON, K. L.; NAGARAJA, T. G.; MORRILL, J. L.; AVERY, T. B.; GALITZER S. J.; BOYER, J. E. Ruminal microbial development in conventionally or early-weaned calves. **Journal of Animal Science**, v. 64, n. 4, p. 1215-1226, 1987.
- ANKRAH, P.; LOERCH, S. C.; KAMPMAN, K. A.; DEHORITY, B. A. Effects of defaunation on in situ dry matter and nitrogen disappearance in steers and growth of lambs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 68, p. 3330-3336, 1990.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analyses. 13. ed. Washington: AOAC, 1985. 1051 p.
- ARCURI, P. B.; LOPES, F. C. F. E.; CARNEIRO, J. C. Microbiologia do rúmen. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V. OLIVEIRA, S. G. (Ed.). Nutrição de ruminantes. Jaboticabal: FUNEP, 2006. p. 151-179.
- ARIZA, P.; BACH, A.; STERN, M. D.; HALL, M. B. Effects of carbohydrates from citrus pulp and hominy feed on microbial fermentation in continuous culture. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 79, n. 10, p. 2713-2718, 2001.
- ASSIS, A. J.; CAMPOS, J. M.; VALADARES FILHO, S.C.; QUEIROZ, A. C.; LANA, R.P.; EUCLYDES, R.F.; NETO, J.M.; MAGALHÃES A.L.R.; MENDONÇA, S.S. Polpa cítrica em dietas de vacas em lactação. 2. digestibilidade dos nutrientes em dois períodos de coleta de fezes, pH e nitrogênio amoniacal do líquido ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 1, p. 251-257, 2004b.
- BAKER, S. K. Rumen methanogens and inhibition of methanogenesis. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 50, n. 8, p. 1293-1298, 1999.
- BALDERSTON, W. L.; PAYNE, W. J. Inhibition of methanogenesis in salt marsh sediments and whole cell suspensions of methanogenic bacteria by nitrogen oxides. **Applied Environmental Microbiology**, v. 32, p. 264, 1976.
- BARTLEY, E. E.; HEROD, E. L.; BECHTLE, R. M.; SAPIENZE, D. A.; BRENT, B. E.; DAVIDOVICH, A. Effects of monensin or lasalocid with and without niacin or amicloral

on rumen fermentation and feed efficiency. **Journal of Animal Science**, v. 49, n. 4, p. 1066-1075, 1979.

BATEMAN II, H. G.; JENKINS, T. C. Influence of soybean oil in high fiber diets fed to non lactating cows on ruminal unsaturated fatty acids and nutrient digestibility. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2451-2458, 1998.

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

BEN-GHEDALIA, D.; YOSEF, E.; MIRON, J. The effects of starch- and pectin-rich diets on quantitative aspects of digestion in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v. 24, n. 3-4, p. 289-298, 1989.

BERCHIELLI, T. T.; RODRIGUEZ, N. M.; GONÇALVES, L. C. Polietilenoglicol e cobalto- EDTA como marcadores da fase líquida ruminal. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 48, p. 463-471, 1996.

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

BHATTACHARYA, A. N.; HARB, M. Dried citrus pulp as a grain replacement for awasi lambs. **Journal of Animal Science**, v. 36, n. 6, p. 1175-1180, 1973.

BLACK, J. L. Nutrition of the grazing ruminant. **Society of animal Production**, v. 50, n. 1, p. 7-27, 1990.

BLAXTER, K. L.; CLAPPERTON, J. L. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. **British Journal of Nutrition**, v. 19, n. 2, p. 511-522, 1965.

BRODERICK, G. A.; MERTENS, D. R.; SIMONS, R. Efficacy of carbohydrate sources for milk production by cows fed diets based on alfalfa silage. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 7, p. 1767-1776, 2002.

BRYANT, M. P. Microbial methane production-Theoretical Aspects. **Journal of Animal Science**, v. 48, n. 1, p. 193-201, 1979.

BRYANT, M. P.; BURKEY, L. A. Numbers and some predominant groups of bacteria in the rumen of cows fed different rations. **Journal of Dairy Science**, v. 36, p. 218, 1953.

CANT, J. P.; FREDEEN, A. H.; MacINTYRE, T. GUNN J.; CROWE, N. Effect of fish oil and monensin on milk composition in dairy cows. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 77, p. 125-131, 1997.

CARVALHO, P. A.; SANCHEZ, L. M. B.; VIÉGAS, J.; VELHO, J. P.; JAURIS, G. C.; RODRIGUES, M. B. Desenvolvimento de Estômago de Bezerros Holandeses Desaleitados Precocemente. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.32, n.6, p.1461-1468, 2003.

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

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

CHAUCHEYRAS, F.; FONTY, G.; BERTIN, G.; GOUET, P. In vitro H₂ utilization by a ruminal acetogenic bacterium cultivated alone or in association with an Archaea Methanogen is stimulated by a probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 9, p. 3466-3467, 1995.

CHURCH, D.C. **Digestive Physiology and Nutrition of Ruminants**. Vol. 1 - Digestive Physiology. 3. ed. Oxford Press Inc. 1979. 350p.

CLARK, H.; KLEIN, C.; NEWTON, P. **Potential management practices and technologies to reduce nitrous oxide, methane and carbon dioxide emissions from New Zealand Agriculture**. Ngaherehere: Ministry of Agriculture and Forestry, 2001. Disponível em: <<http://www.maf.govt.nz/mafnet/rural-nz/sustainable-resource-use/climate/green-house-gas-migration/ghg-mitigation.htm>>. Acesso em: 10 abr. 2011.

COELHO DA SILVA, J. F.; LEÃO, M. I. **Fundamentos de nutrição dos ruminantes**. Piracicaba: Ed. Livrocere, 1979. 384 p.

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

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

CUNNINGHAM, J. G.; KLEIN, B. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: GuanabaraKoogan, 2008. 720 p.

D'AGOSTO, M.; CARNEIRO, M. E.; NETTO, C. M. M.; ARCURI, P. B. Avaliação de ciliados do rúmen de bovinos mantidos com duas dietas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 48, p. 353-361, 1996.

D'AGOSTO, M.; GUEDES, P. M. M. Caracterização das populações de ciliados (Protista, Ciliophora) do rúmen de bovinos de corte no estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 2, n. 1, p. 81-90, 2000.

D'AGOSTO, M.; SANTA-ROSA, M. R.; AROEIRA, L. J. M.; LOPES, F. C. F. Influência da dieta no comportamento da população de ciliados do rúmen. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, n. 2, p. 153-159, 1998.

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

DENNIS, S. M.; ARAMBEL, J. M.; BARTLEY, E. E.; DAYTON, A. D. Effect of energy concentration and source of nitrogen on numbers and types of rumen protozoa. **Journal of Dairy Science, Champaign**, v. 66, p. 1248-1254, 1983.

DOMINGUEZ, M. G.; ESCOBAR, A. Rumen manipulation for the improved utilization of tropical forages. **Animal Feed Science and Technology**, v. 69, n. 2, p. 97-102, 1997.

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

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

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

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

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

FIEVEZ, V.; DOHME, F.; DANNEELS, M.; RAES, K.; DEMEYER, D. Fish oils as potent rumen methane inhibitors and associated effects on rumen fermentation in vitro and in vivo. **Animal Feed Science and Technology**, v. 104, p. 41-58, 2003.

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

FONTY, G.; JOUANY, J. P.; SENAUD, J. The evolution of microflora, microfauna and digestion in the rumen of lambs from birth to 4 months. **Canadian Journal of Animal of Sciences**, v. 64, p. 165, 1984.

FRANZOLIN, R.; DEHORITY, B. A. Effect of prolonged high-concentrate feeding on ruminal protozoa concentrations. **Journal Animal Science**, v. 74, p. 2803-2809, 1996.

FRANZOLIN, R.; FRANZOLIN, M. H. T. População de protozoários ciliados e degradabilidade em búfalos e bovinos zebuínos sob dieta à base de cana-de-açúcar. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 6, p. 1853-1861, 2000.

FRANZOLIN, R.; FRANZOLIN, M. H. T.; SILVA, J. R. Avaliação da população de protozoários ciliados no rúmen, retículo e omaso e do trato digestivo em búfalos alimentados em três níveis de energia. **Revista de La Facultad de Agronomía Luz**, v. 15, n. 1, p. 58-63, 1998.

GARCIA-LOPEZ, P. M.; KUNG JR., L.; ODOM, J. M. In vitro inhibition of microbial methane production by 9,10- anthraquinone. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 2276-2284, 1996.

GILLARD, B. D. E. The relationship between the cellwall constituents of roughages and their digestibility of the organic matter. **Journal of Animal Science**, v. 59, p. 369-373, 1962.

GOULARTE, S. R.; ÍTAVO, L. C. V.; MORAIS, M. G.; ÍTAVO, C. C. B. F.; SANTOS, G. T.; DIAS, A. M.; BEZERRA, F. S.; AZEVEDO JÚNIOR, N. P.; CALVIS, D. S. Consumo de nutrientes e parâmetros ruminiais de vacas alimentadas com diferentes níveis de energia na dieta. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 2, p. 357-364, 2010.

GRANT, W. D.; PINCH, G.; HARRIS, J. E.; DEROSA, M.; GAMBACORTA, A. Polar lipids in methanogen taxonomy. **Journal of General Microbiology**, v. 131, p. 3277-3286, 1985.

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

HALL, M. B.; HEREJK, C. Differences in yields of microbial crude protein from in vitro fermentation of carbohydrates. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 11, p. 2486-2493, 2001.

HATFIELD, R. D. Pectin polysaccharides of forages and their degradability. **Agronomy Journal**, v. 81, p. 39-46, 1987.

HEGARTY, R. S.; GOOPY, J. P.; HERD, R. M.; MCCORKELL, B. Cattle selected for lower residual feed intake have reduced daily methane production. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 6, p. 1479-1486, 2007.

HEGARTY, R. S.; NOLAN, J. V.; LENG, R. A. The effects of protozoa and supplementation with nitrogen and sulfur on digestion and microbial metabolism in the rumen of sheep. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 45, p. 1215-1227, 1994.

HIGHFILL, B. D.; BOGS, D.; AMOS, H. E.; CRICKMAN, J.G. Effects of high fiber energy supplements on fermentation characteristics and in vivo and in situ digestibilities of low quality fescue hay. **Journal of Animal Science**, v. 65, p. 224-234, 1987.

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

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

HOOVER, W. H.; STOKES, S. R. Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 12, p. 3630-3644, 1991.

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

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

HUTJENS, M. F. Feed additives. **Veterinary Clinics of North America. Large Animal Practice**, v. 7, n. 2, p. 525-540, 1991.

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

IPCC. INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (Genebra, Suíça). **Climate change 1994: radiative forcing of climate change and an evaluation of the IPCC IS92 emission scenarios**. Cambridge: University Press, 1995. 339 p.

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

ÍTAVO, L. C.V.; ÍTAVO, C. C. B. F. Parâmetros ruminais e suas correlações com desempenho, consumo e digestibilidade em ruminantes. In: ÍTAVO, L. C. V.; ÍTAVO, C. C. B. F. (Ed.). **Nutrição de ruminantes: aspectos relacionados à digestibilidade e ao aproveitamento de nutrientes**. Campo Grande: UCDB, 2005. p. 49-72.

JARVIS, G. N.; STROMPL, C.; BURGESS, D. M.; SKILLMAN, L. C.; MOORE, E. R.; JOBLIN, K. N. Isolation and identification of ruminal methanogens from grazing cattle. **Current Microbiology**, v. 40, p. 327-332, 2000.

JENKINS, T. C. Lipid metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 12, p. 3851-63, 1993.

JENKINS, T. C. Symposium: Advances in ruminant lipid metabolism - Lipid metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 3851-3863, 1993.

JENKINS, T. C.; JENNY, B. F. Effect of hydrogenate fat on feed intake, nutrient digestion and lactation performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p. 2316-2324, 1989.

JENKINS, T. C.; WALLACE, R. J.; MOATE, P. J.; MOSLEY, E.E. Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 397-412, 2008.

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, D. E.; WARD, G. M. Estimates of animal methane emissions. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 42, p. 133-141, 1996.

JOHNSON, K. A.; HUYLEYER, M. T.; WESTBERG, H. H.; LAMB, B. K.; ZIMMERMAN, P. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a SF₆ tracer technique. **Environmental Science & Technology**, v. 28, p. 359-362, 1994.

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

JOUANY, J. P. Effect of rumen protozoa on nitrogen utilization by ruminants. **Journal of Nutrition**, v. 126, p. 1335-1346, 1996. Supplement.

KAMRA, D. N. Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, v. 89, p. 124-134, 2005.

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

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

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

LARSON, S. A.; SCHULTZ, L. H. Effects of soybeans compared to soybeans oil and meal in the ration of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 53, p. 9, p. 1233-1240, 1970.

LAVEZZO, O. E. N. M.; LAVEZZO, W.; WECHSLER, F. S. Estádio de desenvolvimento do milho. 3. Avaliação de silagens por intermédio de parâmetros de fermentação ruminal. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 27, n. 1, p. 171-178, 1998.

LEITE, L. C. **Perfil dos ácidos graxos do leite e metabolismo de lipídios no rúmen de vacas recebendo dietas com alto ou baixo teor de concentrado e óleo de soja ou de peixe**. 2006. 97 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2006.

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

LENG, A. R.; PRESTON, T. R. Sugar cane for cattle production: presents constraints perspectives and research priorities. **Tropical Animal Health and Production**, v. 1, n. 1, p. 1-22, 1976.

LIN, H.; BOYSLON, T. D.; CHANG, M. J.; LUEDECKE, L. O.; SHULTZ, T. D. Survey of the conjugated linoleic acid contents of dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 11, p. 2358-2365, 1995.

LUCCI, C. S. **Nutrição e manejo de bovinos leiteiros**. São Paulo: Manole, 1997. 169 p.

MACHMÜLLER, A.; OSSOWSKI, D. A.; WANNER, M.; KREUZER, M. Potential of various fatty feeds to reduce methane release from rumen fermentation in vitro (Rusitec). **Animal Feed Science and Technology**, v. 71, p. 117-130, 1998.

MARINO, C. T. Efeito do preparado de anticorpos policlonais sobre o consumo alimentar, fermentação ruminal e Digestibilidade in vivo de bovinos suplementados com Três fontes energéticas. 2008. 121 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Falta local, 2008.

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

MAROUNEK, M.; DUSKOVÁ, D. Metabolismo of pectin in rumen bacteria *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Prevotella ruminicola*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, n. 2, p.159-163, 1999.

MARTINS, A. S.; PRADO, I. N.; ZEOULA, L. M.; BRANCO, A. F.; NASCIMENTO, W. G. Digestibilidade Aparente de Dietas Contendo Milho ou Casca de Mandioca Como Fonte Energética e Farelo de Algodão ou Levedura como Fonte Protéica em Novilhas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 1, p. 269-277, 2000.

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

MCSWEENEY, C. S.; PALMER, B.; BUNCH, R.; KRAUSE, D. O. Isolation and characterization of proteolytic ruminal bacteria from sheep and goats fed the tannin-containing shrub legume *Calliandra calothyrsus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3075-3083, 1999.

MEDEIROS, S. R. **Ácido linoléico conjugado: teores nos alimentos e seu uso no aumento da produção de leite com maior teor de proteína e perfil de ácidos graxos modificados**. 2002. 97 p. Tese (Doutorado em Agronomia - Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

- MENEZES JR., M. P.; SANTOS, F. A. P.; GUIDI, M. T.; SIMAS, J.M.C., IMAIZUMI, H. Efeito do processamento do grão de milho e sua substituição parcial por polpa cítrica peletizada sobre a digestibilidade de nutrientes de vacas em lactação. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37., 2000, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2000. p. 429.
- MERTENS, D. R. Rate and extent of digestion. In: FORBES, J. M.; FRANCE, J. (Ed.). **Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism**. 2. ed. Wallingford: CAB International, 1993. p. 13-51.
- MERTENS, D. R. Regulation of forage intake. In: FAHEY JR., G.C. (Ed.). **Forage quality, evaluation, and utilization**. Lincoln: University of Nebraska, 1994. p. 450-493.
- MILLER, T. L. Ecology of methane production and hydrogen sink in the rumen. In: ENGELHARDT, W. V.; LEONHARD-MAREK, S.; BREVES, G.; GIESSECKE, D. (Ed.). **Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction**. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag. 1995. p. 317-332.
- MILLS, J. A.; DIJKSTRA, J.; BANNIK, A.; CAMMELL, S. B.; KEBREAB, E.; FRANCE, J. A mechanistic model of whole-tract digestion and methanogenesis in the lactating dairy caow: model development, evaluation and application. **Journal of Animal Science**, v. 79, n. 6, p. 1584-1597, 2001.
- MIRON, J.; YOSEF, E.; BEM-GHEDALIA, D. Composition and in vitro digestibility of monosaccharide constituents of selected byproducts feeds. **Journal of Agricultural of Food Chemistry**, v. 49, n. 5, p. 2322-2326, 2001.
- MOSS, A. R. **Methane-global warming and production by animals**. Canterbury: Chalcombe publications, 1993. 105 p.
- MOSS, A.R.; GIVENS, D.I.; GARNSWORTHY, P.C. The effect of supplementing grass silage with barley on digestibility, in sacco degradability, rumen fermentation and methane production in sheep at two levels of intake. **Animal Feed Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 9-33, 1995.
- MOTA M. F. **Desempenho, parâmetros ruminais e taxa de passagem em vacas da raça holandesa em pastagem de coastcross**. 2006. 148 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá. 2006.
- MURRAY, R. M.; BRYANT, A. M.; LENG, R. A. Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. **British Journal of Nutrition**, v. 36, p. 1-14, 1976.
- NAGARAJA, T. G.; NEWBOLD, C. J.; VAN NEVEL, C. J.; DEMEYER, D. L. Manipulation of ruminal fermentation. In: HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. (Eds.). **The rumen microbial ecosystem**. 2. ed. Great Britain: Blackie Academic & Professional, 1997. p. 524-632.

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.

NAKAMURA, K.; KANEGASAKI, S. Densities of ruminal protozoa of sheep established under different dietary conditions. **Journal Dairy Science**, v. 52, n. 2, p. 250-255, 1969.

NASCIMENTO, C. F. Emissão de metano por bovinos Nelore ingerindo *Brachiaria brizantha* em diferentes estádios de maturação. Carolina Fernanda Moysés do Nascimento – Pirassununga: C.F.M. Nascimento, 2007. 65 f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007.

NKRUMAH, J. D.; OKINE, E. K.; MATHISON, G. W.; SCHMID, K.; LI, C.; BASARAB, J. A.; PRICE, M. A.; WANG, Z.; MOORE, S. S. Relationships of feedlot feed efficiency, performance, and feeding behaviour with metabolic rate, methane production, and energy partitioning in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 1, p. 145-153, 2006.

NOGUEIRA FILHO, J.C.M.; LEME, P. R.; RIBEIRO, F. G.; TITTO, E. A. L.; TOLEDO, L. R. A., OLIVEIRA, M. E. M.; PÁDUA, M. B. Bagaço de cana de açúcar em dieta com alto concentrado para bovinos jovens. 2. Protozoários ciliados no rúmen. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 1999, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1999. (CD-ROM).

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**. São Paulo, v. 27, n. 2, p. 215-221, 1992.

NOGUEIRA, K. A.; NOGUEIRA FILHO, J. C.; LEME, P. R.; VALINOTE, A. C.; SILVA, S.; CUNHA J. A. Substituição do milho pela polpa de citros sobre a fermentação ruminal e protozoários ciliados. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 27, n. 1, p. 123-127, Jan./March, 2005.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of beef cattle**. 7th ed. Washington, D.C.: National Academic Press, 1996.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7th ed. Washington: National Academies Press, 2001. 381 p.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of beef cattle**. 6. ed. Washington, D.C.: National Academic Press, 1989.

NUSSIO, C. M. B.; SANTOS, F. A. P.; PIRES, A. V.; SIMAS, J. M. C.; ZOPOLLATTO, M. Starch sources with different degradabilities and their partial replacement by citrus pulp for lactating dairy cows. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 24, n. 4, p. 1079-1086, 2002.

NUSSIO, L. G.; CAMPOS, F. P.; LIMA, M. L. M. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 2006. v. 1, 583 p.

OLIVEIRA, M. E. M.; WATANABE, I.; NOGUEIRA FILHO, J. C. M. Ultra estrutura de membrana celular de *Dasytricha ruminatum* encontrada no líquido ruminal de bubalinos *Bubalus bubalis* da raça Mediterrânea. In: SIMPÓSIO TÉCNICO ESP. ULTRAESTRUTURA DE MEMBRANAS, 1992. p. 63-64.

OLIVEIRA, R. L.; ASSUNÇÃO, D. M. P.; BARBOSA, M. A. A. F.; LADEIRA, M.M.; SILVA, M.M.P.; MASCARENHAS, A.G.; SNELOLIVEIRA, M.V.; OLIVEIRA, R.L. Efeito do fornecimento de diferentes fontes de lipídeos na dieta sobre o consumo, a digestibilidade e o N-urético plasmático de novilhos bubalinos em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 733-738, 2007.

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

ØRSKOV, E. R. Starch digestion and utilization in ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 63, n. 5, p. 1624-1633. 1986.

ØRSKOV, E. R. **The feeding of ruminants: principles and practice**. Rowett Research Institute, Chalcombe, UK. Publications, 1987.

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.

PALMQUIST, D. L. Influence of source and amount of dietary fat on digestibility in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 1354-1360, 1991.

PALMQUIST, D. L.; JENKINS, T. C. Fat in lactation rations: review. **Journal of Dairy Science**, v. 63, p. 1-14, 1980.

PASCUAL, J. M.; CARMONA, J. F. Composition of citrus pulp. **Animal Feed Science and Technology**, v. 5, p. 1-10, 1980.

PEREIRA, C. M. A.; SILVA, J. F. C.; VALADARES FILHO, S. C. CAMPOS, J. M. S.; CECON, P. R. Grão de soja moído na ração de vacas em lactação. 1. Consumo e digestibilidade dos nutrientes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 27, n. 6, p. 1218-1224, 1998a.

PEREIRA, C. M. A.; SILVA, J. F. C.; VALADARES FILHO, S. C. CAMPOS, J. M. S.; CECON, P. R. Grão de Soja Moído na Ração de Vacas em Lactação. 2. Produção e composição do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 27, n. 6, p. 1225-1233, 1998b.

PEDREIRA, M. S. Estimativa da produção de metano de origem animal por bovinos tendo como base a utilização de alimentos volumosos: utilização da metodologia do gás traçador hexafluoreto de enxofre (SF₆). 2004. 136 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

PEDREIRA, M. S.; BERCHIELLI, T. T.; OLIVEIRA, S. G.; PRIMAVESI, O.; LIMA, M. A.; FRIGHETTO, R. Produção de metano e concentração de ácidos graxos voláteis ruminal em bovinos alimentados com diferentes relações de volumoso:concentrado. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande, MS. **Anais...** Campo Grande: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2004. (CD-ROM).

PEDREIRA, M. S.; OLIVEIRA, S. G.; BERCHIELLI, T.T.; PRIMAVESI, O. Aspectos relacionados com a emissão de metano de origem ruminal em sistemas de produção de bovinos. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 3, p. 24-32, 2005.

POSSENTI, R. A.; FRANZOLIN, R.; SCHAMMAS, E. A.; DEMARCHI, J. J.; FRIGHETTO, R. T. S.; LIMA, M. A. Efeitos de dietas contendo *Leucaena leucocephala* e *Saccharomyces cerevisiae* sobre a fermentação ruminal e a emissão de gás metano em bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 8, p. 1509-1516, 2008.

PRIMAVESI, O.; FRIGHETTO, R. T. S.; PEDREIRA, M.S.; LIMA, M. A.; BERCHIELLI, T.T.; BARBOSA, P. F. Metano entérico de bovinos leiteiros em condições tropicais brasileiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 3, 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 SF₆ para medição do campo do metano ruminal em bovinos: adaptações para o Brasil**. São Carlos: Emprapa Pecuária Sudeste, 2004a. 77 p. (Documento, 39)

PUNIA, B. S.; LEIBHOLTZ, S.; FAICHNEY, G. J. The role of rumen protozoa in the utilization of paspalum (*Paspalum dilatatum*) hay by cattle. **British Journal of Nutrition**. London, v. 57, p. 395-406, 1987.

PURSER, D. B.; MOIR, R. J. Variations in rumen volume and associated effects as factors influencing metabolism and protozoa concentrations in the rumen of sheep. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 25, p. 516-520, 1966.

QUEIROZ, A. C.; BARBOSA, M. A.; RESENDE, F. D. Suplementação da palhadas de milho na alimentação de bovinos. 2. Concentração de amônia ruminal e pH ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 27, n. 2, p. 390-396, 1998.

RAISMAN, J. S.; GONZALEZ, A. M. **Hipertextos del área de la biología**. 2006. Disponível em: <<http://www.biologia.edu.ar/bacterias/arqueobacterias.htm>>. Acesso em: 29 set. 2011.

RELLING, A. E.; MATTIOLI, G. A. Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. Falta local: Ed. EDULP. Fac. Cs. Veterinarias – UNLP, 2003. 72 p.

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

RUSSELL, J. B.; WILSON, D. B. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 1503-1509, 1996.

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

RUSSELL, J. B.; CHOW, J. M. Another theory for the action of ruminal buffer salts, decreased starch fermentation and propionate production. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 826, 1993.

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

SALVADOR, S. C.; PEREIRA, M. N.; SANTOS, J. F.; MELO, L. Q.; CHAVES, M. L. Resposta de vacas leiteiras à substituição total de milho por polpa cítrica e à suplementação com microminerais orgânicos I: Consumo e digestão. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 5, p. 682-690, 2008.

SANTOS, F. A.; MARTINEZ, J. C. Fontes alternativas de energia para bovinos leiteiros - parte I. Leite Integral. **Revista técnica de Bovinocultura de Leite**, Belo Horizonte, v. 5, p. 56-64, 2006.

SAS. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **Users guide**: statistics. Versão 9.2, 2010. Cary: SAS Inst, Inc, 2010. CD-ROM.

SCHAIBLY, G. E.; WING, J. M. Effect of roughage concentrate ratio on digestibility and rumen fermentation of corn silage/citrus pulp rations. **Journal of Dairy Science**, v. 38, n. 3, p. 697-701, 1974.

SCHAUFF, D. J.; ELLIOTT, J. P.; CLARK, J. H.; DRACKLEY, J. K. Effects of feeding lactating dairy cows diets containing soybeans and tallow. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 1923-1935, 1992.

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

SCOTON, R. A. Substituição do milho moído por polpa cítrica peletizada e/ou raspa de mandioca na dieta de vacas leiteiras em final de lactação. 2003. 68 p. Tese (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

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

SLYTER, L. L. Influence of acidosis on rumen function. **Journal of Animal Science**, v. 43, p. 910, 1976.

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

SOWERS, K. R. Methanogenic Archaea: an overview. In: SOWERS, K. R.; SCHREIER, H. J. (Ed.). **Archaea – a laboratory manual**. Methanogens. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995. p. 3-13.

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

TAMMINGA, S. Nutritional management of dairy cows as a contribution to pollution control. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 1, p. 345-357, 1992.

TEIXEIRA, J.C. Metabolismo dos compostos nitrogenados nos ruminantes. Nutrição de Ruminantes – Lavras:UFLA/FAEPE. Curso de Pós-Graduação “Lato Sensu”(Especialização) a Distância: Produção de Ruminantes. 1998.

THIAGO, L. R. L.; GILL, S. **Consumo voluntário**: fatores relacionados com a degradação e passagem da forragem pelo rúmen. Campo Grande: EMBRAPA - CNPGC, 1990. 32 p.

USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Greenhouse gas emissions from agricultural systems. Proceedings of the In: WORKSHOP ON GREENHOUSE GAS EMISSIONS FROM AGRICULTURE, 1990, Washington. **Proceedings...** Washington D.C.: USEPA, 1990a. v. 1.

USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 1990b. Methane emissions and opportunities for control. In: WORKSHOP ON GREENHOUSE GAS EMISSIONS FROM AGRICULTURE, 1990, Washington. **Proceedings...** Washington, DC.: Japan Environmental Protection Agency, 1990b.

USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Evaluating ruminant livestock efficiency projects and programs**. Washington D.C.: USEPA, 2000. 48 p.

USHIDA, K.; JOUANY, J. P. Methane production associated with rumen-ciliated protozoa and its effect on protozoan activity. **Letters Applied Microbiology**, v. 23, p. 129-132, 1996.

VALADARES FILHO, S. C.; PINA D. S. Fermentação ruminal. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S.G.. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP., 2006. p. 151-179.

VALDEZ, R. E.; ALVAREZ, F. J.; FERREIRO, H. M.; GUERRA, F.; LOPEZ, J., PRIEGO, A., BLACKBURN, T.H., LENG, R.A.; PRESTON, T. R. Rumen function in cattle given sugar cane. **Tropical Animal Production**, v. 2, p. 260-272, 1977.

VAN KRUININGEN, H.J. Gastrointestinal system. In: CARLTON, W.W.; MCGAVIN, M. D. **Thomson's special veterinary pathology**. 2. ed. Philadelphia: Mosby, 1995. p. 1-80.

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

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

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

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminants**. Corvallis: OB Books Inc., 1982. 374 p.

VAN SOEST, P. J. Soluble carbohydrates and the non-fiber components of feeds. **Large Animal Veterinary**, v. 40, p. 44-46, 1987.

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

VANDERWATH, J. G.; MYBURGH, S. J. Studies on the alimentary tract of merino sheep in South Africa. VI. The role of infusoria in ruminal digestion with some remarks on ruminal. **Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry**, Transvaal, v. 17, p. 61-88, 1941.

VARGA, G. A.; KOLVER, E. S. Microbial and animal limitations to fiber digestion and utilization. **Journal of Nutrition**, v. 127, n. 5, p. 819-823, 1997.

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

VEIRA, D. M. The role of ciliate protozoa in nutrition of the ruminant. **Journal of Animal Science**, Cambridge, v. 63, p. 1547-1560, 1986.

VIJCHULATA, P.; HENRY, P. R.; AMMERMAN, C. B.; POTTER, S. G.; PALMER, A. Z.; BECKER, H. N. Effect of dried citrus pulp and cage layer manure in combination with monensin on performance and tissue mineral composition in finishing steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 50, n. 6, p. 1022-1030, 1980.

WALDO, D. R. Effect of forage quality on intake and forage-concentrate interactions. **Journal of Dairy Science**, v. 69, n. 4, p. 617-631, 1986.

WEIMER, P. J. Manipulating ruminal fermentation: a microbial ecological perspective. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 3114-3122, 1998.

WESTBERG, H. H.; JOHNSON, K. A.; COSSALMAN, M. W.; MICHAL, J. J. **A SF₆ 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: P.N. Hobson (Ed). **The Rumen Microbial Ecosystem**. London: Elsevier Applied Science, 1988. p. 77-128.

WILLIAMS, A. G.; COLEMAN, G. S. **The rumen protozoa**. London: Springer-Verlag, 1991. 441 p.

WING, J. M. Effects of physical form and amount of citrus pulp on utilization of complete feeds for dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 58, n. 1, p. 63-66, 1975.

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

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