

LIÉBER DE FREITAS GARCIA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE DIFERENTES ADITIVOS SOBRE A EMISSÃO DE METANO, A DEGRADABILIDADE DA MATÉRIA SECA, A PRODUÇÃO DE GASES, E AS CONCENTRAÇÕES DE AMÔNIA E ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação do Mestrado Profissional em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

G216a  
2013

Garcia, Liéber de Freitas, 1982-

Avaliação *in vitro* de diferentes aditivos sobre a emissão de metano, a degradabilidade da matéria seca, a produção de gases, e as concentrações de amônia e ácidos graxos voláteis / Liéber de Freitas Garcia. – Viçosa, MG, 2013.  
ix, 34f. : il. (algumas color.) ; 29cm.

Orientador: Sebastião de Campos Valadares Filho  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 28-34

1. Ruminantes - Nutrição. 2. Metano. 3. Rações - Aditivos.  
4. Ruminantes - Alimentação e rações. 5. Efeito estufa (Atmosfera). 6. Amônia. 7. Ácidos graxos. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. II. Título.

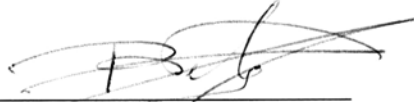
CDD 22. ed. 636.2085

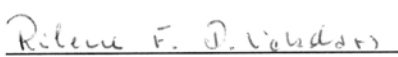
LIÉBER DE FREITAS GARCIA


**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE DIFERENTES ADITIVOS SOBRE A  
EMISSÃO DE METANO, A DEGRADABILIDADE DA MATÉRIA  
SECA, A PRODUÇÃO DE GASES, E AS CONCENTRAÇÕES DE  
AMÔNIA E ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação do Mestrado Profissional em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 31 de janeiro de 2013.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Raul Franzolin Neto  
(Coorientador)

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Rileu Ferreira Diniz Valadares

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Sebastião de Campos Valadares Filho  
(Orientador)

## DEDICO

À minha grande amiga, companheira e Esposa Patrícia Avelar Garcia, com quem vivo dias de glória, que me ampara, me apoia e, sobretudo está sempre ao meu lado nas mais diversas situações da vida.

Obrigado por existir em minha vida!

Te amo!

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida e por tudo o que Ele me proporciona e me proporcionará.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de realizar este curso.

À Manufaturação de Produtos para Alimentação Animal Premix Ltda., pela bolsa parcial para que fosse possível a execução deste curso.

Ao sr. Lauriston Bertelli Fernandes, pelo incentivo, pela confiança e pela amizade, para que o mestrado fosse uma realidade em minha vida profissional.

Ao Prof. Dr. Sebastião de Campos Valadares Filho, pela orientação, pela paciência e pelas sugestões no trabalho.

Ao Prof. Dr. Raul Franzolin Neto, pela concessão de seu laboratório e orientação nas análises pela Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/USP – Pirassununga-SP.

À profa. Dra. Rilene Ferreira Diniz Valadares, pela participação da banca e pelas valiosas sugestões ao trabalho.

Ao Prof. Dr. Ives Cláudio da Silva Bueno, pela amizade, paciência e humildade com que me conduziu no bioensaio de gases e metano.

À técnica de laboratório Priscila, pela paciência e boa vontade nas madrugadas de mensuração de pressão *in vitro* no laboratório.

Aos amigos de mestrado Danilo Arelaro, Wolney e Joca, pela amizade e pelos momentos engraçados.

A todos os professores que colaboraram para enriquecer o meu conhecimento.

## OFEREÇO

Ao dom mais precioso que Deus poderia me dar, minha filha Lara, com quem realmente descobri o sentido da palavra AMOR.

Te amo, filha!

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1. Formas de mitigação do metano entérico .....	6
2.1.1. Ionóforos .....	7
2.1.2. Leveduras .....	8
2.1.3. Ácidos graxos essenciais .....	10
2.1.4. Fator P® .....	10
2.1.5. Farinha de algas .....	11
2.2. Técnica <i>in vitro</i> da produção de gases .....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	18
5. CONCLUSÃO .....	27
REFERÊNCIAS .....	28

## RESUMO

GARCIA, Liéber de Freitas, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2013. **Avaliação *in vitro* de diferentes aditivos sobre a emissão de metano, a degradabilidade da matéria seca, a produção de gases, e as concentrações de amônia e ácidos graxos voláteis.** Orientador: Sebastião de Campos Valadares Filho. Coorientador: Raul Franzolin Neto.

O metano é um dos principais gases do efeito estufa. Sua emissão tem se intensificado nos últimos anos, tornando-se um dos objetos de estudos dos nutricionistas, uma vez que sua produção também se dá pela fermentação ruminal. Foi objetivo desta pesquisa avaliar *in vitro* o efeito de aditivos orgânicos e inorgânicos (monensina, monensina + Fator P, Fator P, Fator P em dose duplicada, Fator P em dose triplicada, AGE, levedura e farinha de algas) para mitigar CH<sub>4</sub>, bem como o efeito desses aditivos sobre as concentrações ruminais de nitrogênio amoniacal e de ácidos graxos voláteis e sobre a degradabilidade da matéria seca e matéria orgânica do feno de capim Tifton 85. As dosagens dos aditivos estudadas foram: 20 mg de monensina sódica/kg MS, 20 mg de monensina sódica/kg MS + 300 mg de Fator P®/kg MS; 300 mg de Fator P®/kg MS; 600 mg de Fator P®/kg MS; 900 mg de Fator P®/kg MS, 100 mg de óleo essencial/kg MS; 500 mg de leveduras/kg MS; e 5 g de farinha de algas/kg MS e caulim como tratamento controle. As medições das produções de gases foram realizadas nos tempos de 4, 8, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 72 e 96 horas após a incubação *in vitro*; nos tempos de 4, 8, 12, 18 e 24 horas também foram coletados os gases para mensuração da produção de metano. Foram mensuradas também as



concentrações de nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>), dos ácidos acético, propiônico e butírico e dos ácidos graxos voláteis totais (AGV) em 24 e 96 horas após a incubação. O uso de monensina, Fator P em dose duplicada e leveduras reduziu (P<0,05) a produção de metano. Não houve diferença (P>0,05) nas produções de AGV e N-NH<sub>3</sub> em 24 e 96 horas após incubação. A degradação *in vitro* da matéria seca foi aumentada por todos os aditivos após 96 horas de incubação. Conclui-se que a monensina, o Fator P e as leveduras são eficientes para reduzir a produção *in vitro* de metano.

## ABSTRACT

GARCIA, Liéber de Freitas, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, January, 2013. **In vitro evaluation of different additives on methane emission, the degradability of dry matter, production of gases, and the concentrations of ammonia and volatile fatty acids.** Adviser: Sebastião de Campos Valadares Filho. Co-Adviser: Raul Franzolin Neto.

Methane is a major greenhouse gas. The issue has intensified in recent years, becoming one of the objects in the study of nutritionists, since its production is also given by fermentation ruminal. The objective of this research was to evaluate in vitro the effect of organic and inorganic additives (monensin, monensin + Fator P, Fator P, Fator P dose doubled, tripled dose Fator P, AGE, yeasts and algae meal) to mitigate CH<sub>4</sub> and also evaluate the effect of these additives on ruminal concentrations of ammonia nitrogen and volatile fatty acids and on the degradability of dry matter and organic matter Tifton hay 85. The dosages of additives studied were 20 mg monensin/kg DM, 20 mg monensin/kg DM + 300 mg of Fator P ®/kg DM, 300 mg of Fator P ®/kg DM, 600 mg of Fator P ®/kg DM and 900 mg of Factor P ®/kg DM, 100 mg essential oil/kg DM, 500 mg yeast/kg DM and 5 g of algae meal/kg DM and Caulin as control treatment. Measurements of gas productions were performed at times 4, 8, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 72 and 96 hours after in vitro incubation, and at times of 4, 8, 12, 18 and 24 hours also were collected for the measurement of methane production gases. Were also measured concentrations of ammonia nitrogen (NH<sub>3</sub>-N), acetic, propionic and butyric and total volatile fatty acids (VFA) at 24 and 96 hours after incubation. The use of monensin, Fator P dose duplicate and yeast reduced (P <0.05) methane production.

There was no difference ( $P > 0.05$ ) in the production of VFA and  $\text{NH}_3\text{-N}$  at 24 and 96 hours after incubation. The in vitro degradation of dry matter was increased by every additives at 96 hours of incubation. Was concluded that monensin, Factor P dose doubled and yeasts are effective to reduce methane production in vitro.

## 1. INTRODUÇÃO

A atividade antrópica acelerada, em busca do desenvolvimento das sociedades, tem levado a mudanças climáticas bruscas em todo o globo. Como resultado dessas atividades, o aumento nas emissões de gases responsáveis pela concentração da radiação solar em forma de calor tem contribuído para o agravamento das situações climáticas desfavoráveis.

Estima-se que nos últimos 200 anos a temperatura média na superfície da terra tenha subido aproximadamente 6 °C; se a taxa atual de aumento de gases de efeito estufa (GEE) continuar pelo próximo século no planeta, as temperaturas médias globais subirão de 0,2 °C a 0,3 °C por década (STEINFELD et al., 2006; COTTON; PIELKE, 1995).

Os principais gases responsáveis pelo chamado efeito estufa são o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), metano (CH<sub>4</sub>), óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), clorofluorcarbonos (CFCs) e ozônio (O<sub>3</sub>).

As atividades agrícolas são promovedoras e ao mesmo tempo estão vulneráveis às mudanças climáticas, sendo responsáveis por aproximadamente 15% das emissões antropogênicas de CO<sub>2</sub>, por 49% do CH<sub>4</sub> e por 66% do N<sub>2</sub>O (BRUINSMA, 2003). Segundo previsões do IPCC (2001), a atividade agrícola é um dos setores da atividade humana mais vulneráveis aos efeitos das possíveis alterações climáticas, com repercussões negativas no que se refere à segurança alimentar em escala global, em razão da dependência do desenvolvimento e produtividade das culturas quanto aos fatores climáticos.

O CH<sub>4</sub> é produzido a partir da fermentação entérica, do cultivo de arroz inundado, da fermentação anaeróbica da matéria orgânica em ambientes alagados, das queimadas e do tratamento anaeróbico de resíduos animais. O N<sub>2</sub>O é resultado do uso de fertilizantes nitrogenados, da deposição de dejetos animais no solo, da fixação biológica de nitrogênio, da lixiviação dos solos e da queima de resíduos agrícolas. A emissão de CO<sub>2</sub> é, na sua maioria, proveniente do uso e queima de combustíveis fósseis e renováveis.

Uma variedade de processos do ecossistema e o uso da terra podem afetar os fluxos de gases de efeito estufa, como fotossíntese, respiração, nitrificação/desnitrificação, fermentação intestinal e combustão.

Os fluxos de CO<sub>2</sub> entre a atmosfera e os ecossistemas são controlados principalmente pela absorção através da fotossíntese das plantas e liberação através da respiração, decomposição e combustão da matéria orgânica. A emissão de N<sub>2</sub>O nos ecossistemas ocorre, principalmente, como subproduto da nitrificação e desnitrificação. Já o CH<sub>4</sub> é emitido por meio da metanogênese em condições anaeróbicas em solos e na armazenagem de estrume, através da fermentação entérica, e durante a combustão incompleta da matéria orgânica.

O Brasil possui uma população de aproximadamente 180,4 milhões de bovinos (ANUALPEC, 2012) e emitiu 9,77 Teragramas (Tg – 10<sup>12</sup>g) de CH<sub>4</sub> no ano de 1994, provenientes da pecuária, sendo 9,38 Tg de CH<sub>4</sub> (96%) correspondente ao processo de fermentação entérica (incluindo bovinos, bubalinos, ovinos, caprinos, muares, asininos, equinos e suínos) e 0,39 Tg (4%) por dejetos animais (MCT, 2006; LIMA et al., 2001), o que salienta a responsabilidade ambiental para o País.

Nutricionistas depararam com o desafio de desenvolver estratégias para atenuar a produção de metano no sistema produtivo de ruminantes (MCALLISTER et al., 1996), possibilitando maior eficiência alimentar (produção/kg de alimento ingerido) e consequente melhoria na produtividade animal.

A emissão total de metano proveniente da pecuária doméstica no Brasil aumentou 20,9% no período de 1986 a 1995, passando de 8,22 para 9,94 Tg. A bovinocultura de corte representa 82,1% da produção de metano via fermentação ruminal, e a bovinocultura de leite, 52,5% das emissões de metano via geração e manejo das fezes (EMBRAPA, 2006a).

A produção de metano no rúmen é parte do processo digestivo normal dos herbívoros ruminantes. A fermentação ruminal do material vegetal ingerido é um processo anaeróbico que converte os carboidratos (estruturais ou não estruturais) em

ácidos graxos de cadeia curta, como os ácidos acético, propiônico e butírico. Ao se produzir essa transformação, libera-se calor, que é dissipado como calor metabólico pela superfície corporal, e são produzidos dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e metano (CH<sub>4</sub>), as quais são eliminados, pelo menos em parte, com os gases respiratórios (DUKES; SWENSON, 1977).

A conversão anaeróbica da matéria orgânica em CH<sub>4</sub> no rúmen envolve um consórcio de microrganismos ruminais com etapa final realizada pelas bactérias metanogênicas. Várias espécies metanogênicas foram isoladas em diversos *habitats* anaeróbios, mas somente duas, *Methanobrevibacter ruminantium* e *Methanosarcina* sp. são encontradas em grande número no rúmen (MCALLISTER et al., 1996).

Franzolin et al. (2012) observaram maior diversidade de *Archaeas* metanogênicas relacionadas ao gênero *Methanobrevibacter* em búfalos; entretanto, destacaram a complexidade da população metanogênica no ambiente microbiano ruminal em resposta ao tipo de dieta dos animais.

A relação acetato:propionato pode variar entre 0,9 e 4,0, sugerindo que as perdas por metano podem variar amplamente (JOHNSON; JOHNSON, 1995). A produção indesejável de gás metano pelas bactérias ruminais e intestinais corresponde a uma perda energética de até 13% em relação à energia do alimento ingerido (LANA, 1998).

Para reduzir ou desviar a formação de CH<sub>4</sub> entérico, deve-se lançar mão de alternativas que envolvam a manipulação da fermentação ruminal, como: uso de dietas que diminuam a relação acetato:propionato e/ou ação direta sobre os microrganismos metanogênicos e produtores de H<sub>2</sub>.

O uso de aditivos nas dietas tem sido uma alternativa promissora. No entanto, alguns desses aditivos são classificados como antibióticos, podendo trazer algum risco para a população. Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar *in vitro* o efeito de aditivos orgânicos e inorgânicos para mitigar CH<sub>4</sub>, bem como o efeito desses aditivos sobre as concentrações ruminais de nitrogênio amoniacal e de ácidos graxos voláteis e sobre a degradabilidade da matéria seca e matéria orgânica.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Após 2002, com a ratificação do protocolo de Kyoto, vários países de clima tropical se comprometeram a levantar dados sobre as emissões de gases de efeito estufa e maior investimento foi destinado às pesquisas nesse aspecto no setor agropecuário.

Primavesi et al. (2004) mostraram que vacas holandesas em lactação, consumindo pasto adubado de capim Tobiatã (*Panicum maximum* L.) e suplementados com concentrado contendo 20% de proteína bruta, produziram anualmente 147 kg de CH<sub>4</sub>/animal, enquanto vacas mestiças (Holandês x Zebu) em lactação sob pasto de *Brachiaria decumbens* Stapf. adubada e suplementada com concentrado com 18% de proteína bruta emitiram apenas 121 kg CH<sub>4</sub>/animal. Além das diferenças entre raças, observa-se que esses valores são altos quando comparados aos valores médios encontrados na América do Norte (118 kg de CH<sub>4</sub>/animal/ano) e teste Europeu (100 kg de CH<sub>4</sub>/animal/ano), onde a produção média anual de leite é, em média, de 6.700 e 4.200 kg/animal, respectivamente (IPCC, 1996), maior que a produção média do Brasil em 1997, estimada em aproximadamente 722 kg/animal (MCT, 2006).

O rúmen é um dos quatro compartimentos do sistema digestório dos ruminantes, sendo câmara fermentativa que propicia ao animal o aproveitamento de alimentos fibrosos, pouco digeríveis por animais monogástricos. Nesse ambiente anaeróbico, há uma gama de microrganismos agrupados em bactérias, protozoários e fungos. Muitas relações existem entre esses microrganismos, nas quais o subproduto da digestão de um torna-se substrato para outra espécie (MOSS, 1993).

Os microrganismos degradam o alimento que chega ao rúmen, gerando energia na forma de ATP para seu próprio crescimento. Os ácidos graxos voláteis (AGV), utilizados pelos ruminantes como fonte de energia, e a  $\text{NH}_3$ , um dos fatores para a síntese de proteína microbiana, são produtos finais do metabolismo microbiano. Além desses, a fermentação anaeróbica ruminal também produz compostos inadequados para o animal e também para os microrganismos, como o  $\text{NO}_3$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$  e H (CHURCH, 1993).

O  $\text{CH}_4$  é produzido por um grupo específico de microrganismos, chamado de metanogênicos, do domínio *Archaeobacteria* (MOSS, 1993). O  $\text{CH}_4$  pode também ser produzido por protozoários, os quais constituem até 20% dos microrganismos metanogênicos no rúmen. Bactérias metanogênicas podem utilizar principalmente H e formato como doadores de elétrons, produzindo metano, embora algumas bactérias possam também reduzir metanol, metilaminas e acetato (MOSS, 1993).

Parte do metano produzido pode ser absorvida pelas paredes ruminais, entrar na corrente sanguínea e ser eliminada via expiração. Entretanto, a maior parte é eliminada por eructação juntamente com  $\text{CO}_2$  e traços de H,  $\text{H}_2\text{S}$ , N, e  $\text{O}_2$ , na proporção de 1/3 de  $\text{CH}_4$  e 2/3 de  $\text{CO}_2$  (KOZLOZKI, 2009).

O H é produzido em maior ou menor concentração em função do tipo de carboidratos, ou seja, da proporção relativa dos principais AGV (acetato, propionato e butirato) (MAYNARD et al., 1984; MACKIE et al., 2002).

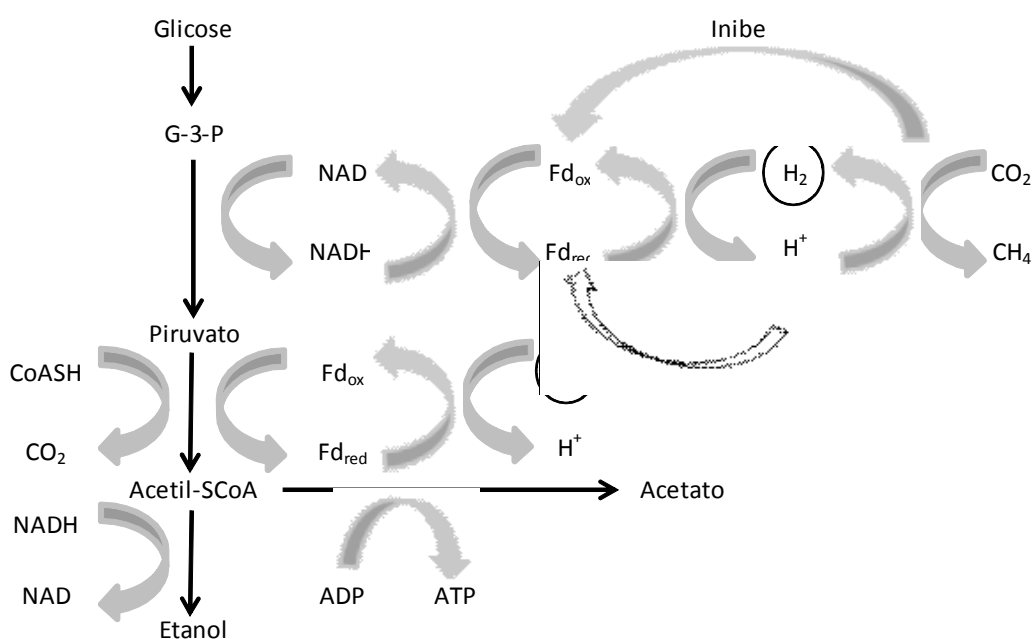
Animais que recebem dietas ricas em grãos propiciam maior produção de propionato, não eliminando H no rúmen no final do processo de sua produção. Por outro lado, dietas ricas em volumosos propiciam maior desenvolvimento de bactérias celulolíticas, as quais geram no rúmen maior relação acetato:propionato, promovendo excesso de H no rúmen. Para manutenção do pH ruminal, as bactérias metanogênicas consomem o H, formando o  $\text{CH}_4$ , que funciona como um dreno de H.

Valadares Filho e Pina (2011) (Tabela 1) demonstraram as reações e substratos para a metanogênese e a fermentação da glicose por *R. albus* produzindo acetato, etanol,  $\text{H}_2$  e  $\text{CO}_2$  em monocultura e com formação de metano na presença de bactérias metanogênicas (Figura 1).



**Tabela 1** - Substratos utilizados para metanogênese

Substrato	Equação
H <sub>2</sub> e CO <sub>2</sub>	$4 \text{ H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$
Formato	$4 \text{ HCO}_2\text{H} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O}$
Metanol	$4 \text{ CH}_3\text{OH} \rightarrow 3 \text{ CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O}$
Metanol e H <sub>2</sub>	$\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$
Metilamina	$4 \text{ CH}_3\text{NH}_2\text{Cl} + 2 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{ CH}_4 + \text{CO}_2 + 4 \text{ NH}_4\text{Cl}$
Dimetilamina	$2 \text{ (CH}_3)_2 \text{ NHCl} + 2 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{ CH}_4 + \text{CO}_2 + 4 \text{ NH}_4\text{Cl}$
Trimetilamina	$4 \text{ (CH}_3)_3 \text{ NHCl} + 6 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 9 \text{ CH}_4 + 3 \text{ CO}_2 + 4 \text{ NH}_4\text{Cl}$
Acetato	$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$



**Figura 1** - Fermentação da hexose por *R. albus* na ausência e presença de bactérias metanogênicas.

## 2.1. Formas de mitigação do metano entérico

Diversos fatores podem influenciar a produção de metano via fermentação entérica. Estudos realizados por Miller (1995), Johnson e Johnson (1995) e McAllister et al. (1996) citaram consumo de alimento, quantidade de grãos na dieta e tipo de carboidratos, tamanho de partículas, estágio de crescimento da planta forrageira, digestibilidade dos alimentos, suprimento de minerais, manipulação da microflora ruminal, espécie animal e adição de lipídeos e/ou ionóforos como componentes envolvidos na produção de CH<sub>4</sub> ruminal.

### **2.1.1. Ionóforos**

Existem mais de 120 tipos de antibióticos ionóforos, apesar de apenas monensina, lasalocida, salinomina e laidomina propionato serem aprovados para uso em dietas de ruminantes (REIS et al., 2006). Os ionóforos têm a capacidade de aumentar a eficiência de utilização da energia, diminuindo os distúrbios digestivos (RODRIGUES et al., 2000). A utilização de ionóforos é capaz de reduzir a produção de metano, propiciando ao animal maior eficiência na conversão de energia (BEACOM, 1998).

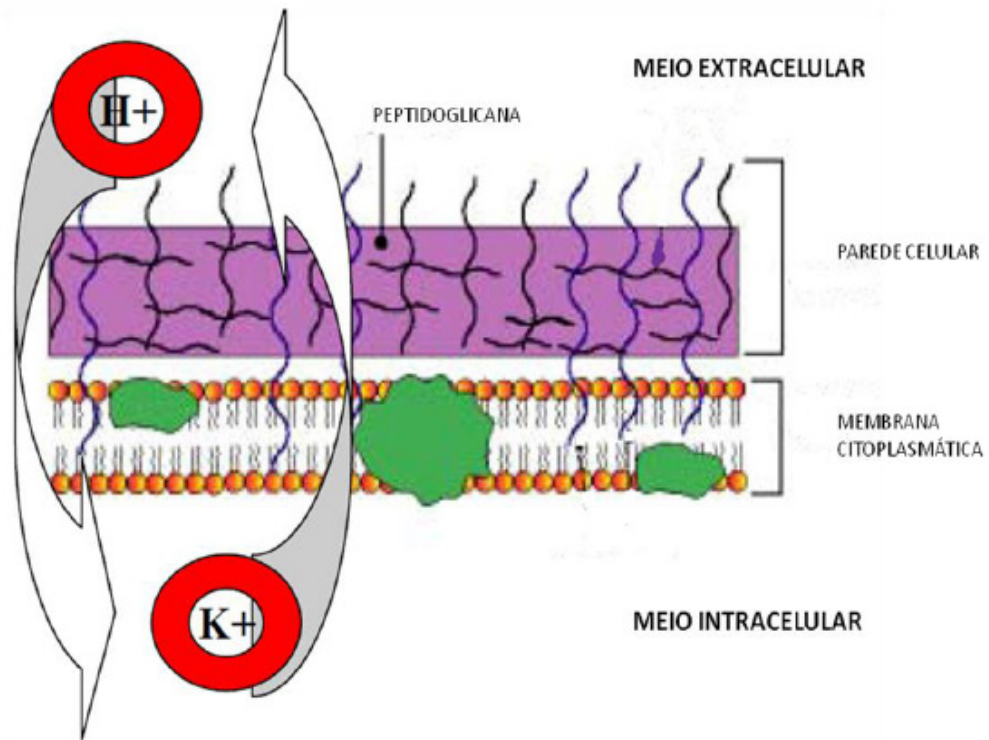
As bactérias existentes no rúmen são classificadas em dois grandes grupos: gram-positivas e gram-negativas. De acordo com Russel e Strobel (1989), o modo de ação distinto dos ionóforos entre os microrganismos se deve à diferença entre os envoltórios celulares das bactérias dos dois grupos. As gram-negativas possuem parede celular e uma membrana externa de proteção com canais (orifícios que ligam o meio intracelular ao extracelular) com aproximadamente 600 Daltons. Já as bactérias gram-positivas apresentam apenas uma membrana porosa, não seletiva, sendo, portanto, sensíveis aos ionóforos.

O modo básico de ação dos ionóforos resulta da interferência no fluxo iônico normal através da membrana dos microrganismos e dissipação do gradiente de prótons e cátions (ROMATOWSKI, 1979; ISICHEI, 1980).

Por possuírem tanto regiões apolares como polares, os ionóforos têm como características a capacidade de interagir com as membranas celulares e de reter cátions. O resultado é que os ionóforos podem formar complexos lipossolúveis com os cátions polares  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$ , que atravessam as paredes celulares porosas compostas por peptidoglicanas dos microrganismos gram-positivos (GOULART, 2010).

O complexo ionóforo + cátion adere à bactéria, atravessa a parede celular e se solubiliza na membrana celular lipídica bilaminar. Uma vez solubilizado, o cátion é trocado por um próton ( $H^+$ ). A concentração citoplasmática de  $K^+$  é maior do que a concentração extracelular, o que favorece a saída do  $K^+$  intracelular, com concomitante entrada de  $H^+$  extracelular (Figura 2).

A consequência é a redução da concentração de  $K^+$  no interior da célula bacteriana, bem como do pH, causada pelo influxo de  $H^+$ . Esses distúrbios ativam os mecanismos homeostáticos, que consomem energia, causando a morte da bactéria gram-positiva (RUSSEL; STROBEL, 1989).



Fonte: Adaptada de Goulart (2010).

**Figura 2** - Mecanismo de ação de ionóforo em gram-positivos.

O uso de ionóforos altera a fermentação ruminal, com aumento na retenção de energia, devido à maior produção de propionato em relação ao acetato. Experimentos demonstraram melhora de até 7,5% na conversão alimentar e redução de 4% da excreção de compostos nitrogenados pelos animais (TEDESCHI, 2003). Lana e Russel (1996) observaram melhoria de aproximadamente 31% na relação acetato:propionato com o uso de ionóforos.

A suplementação com monensina em dietas de bovinos pode diminuir de 27 a 30% a emissão de metano entérico por duas a quatro semanas, dependendo do conteúdo de energia da dieta (GUAN, 2006).

Estudos com vacas Holandesas em lactação, avaliando a suplementação com monensina, mostraram redução na produção de metano de 10 a 21%, em período de 65 dias (SAUER, 1998).

### 2.1.2. Leveduras

As leveduras, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*, têm sido utilizadas na alimentação animal como probiótico devido aos benefícios que provocam na digestão.

As culturas de leveduras podem operar modificando a fermentação ruminal fundamentalmente de duas formas: fornecendo fatores estimulatórios para as bactérias ruminais e absorvendo o oxigênio que entra no ambiente ruminal (MARTIN; NISBET, 1992). O ácido málico parece ser um dos principais fatores estimulatórios fornecidos pelas leveduras, pois favorece o crescimento e a atividade de bactérias utilizadoras de lactato e previne flutuações do pH ruminal. Assim, o pH do rúmen torna-se mais estável: a metanogênese e a proporção de ácidos graxos de cadeia curta são alteradas; conseqüentemente, a concentração de ácido láctico diminui.

Com o aumento das bactérias celulolíticas, a taxa de degradação ruminal e a digestibilidade aparente da matéria seca (MS), especialmente a fração fibrosa, tendem a se elevar. A utilização de amônia, a síntese e o fluxo de proteína microbiana para o duodeno também podem aumentar como consequência da maior atividade das bactérias no rúmen. Tudo isso pode contribuir para melhorar o consumo de matéria seca, a eficiência do metabolismo energético e o desempenho animal (NEWBOLD et al., 1996).

Williams (1988), avaliando o efeito da adição de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) na dieta de bovinos, relatou aumento de até 25% no número de bactérias celulolíticas e melhoria na concentração total de ácidos graxos voláteis, com incremento de ácido acético e redução da produção de metano. As leveduras promovem aumento da competição entre bactérias acetogênicas e metanogênicas por hidrogênio; assim, reduzem a produção de metano e aumentam a retenção de energia (CHAUCHEYRAS et al., 1995).

Mwenya et al. (2004), em estudo do efeito da inclusão de  $\beta$ 1-4 galacto-oligosacarídeos (GOS), bactérias lácticas (LAB – *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Mesenteroides*) e cultura de levedura (YC – *Trichosporon sericeum*) sobre a metanogênese, energia e metabolismo de compostos nitrogenados em ovinos alimentados com dieta contendo feno e concentrado, observaram redução de 10% na produção de metano (L/dia) em ovinos que receberam dieta com adição de levedura. Gamo et al. (2002) também relataram menor produção de metano *in vitro* com a inclusão de GOS na dieta.

### **2.1.3. Ácidos graxos essenciais**

Os ácidos graxos têm como principais funções a constituição de fosfolípidos e glicosídeos, a modificação de proteínas pela união covalente e o direcionamento para os locais de membrana. São também moléculas fornecedoras de energia, e alguns de seus derivados atuam como hormônios e mensageiros intracelulares. Os mamíferos não têm enzimas para introduzir duplas ligações além do C-9 na cadeia de ácidos graxos, portanto, não podem sintetizar os ácidos linoleico e linolênico, que são ácidos graxos; essenciais e precursores de vários outros compostos. O termo essencial significa que eles têm de ser supridos pela dieta por não terem síntese endógena (WAKIL, 1989).

A adição de lipídeos à dieta, dependendo da quantidade suplementada, do grau de insaturação e do comprimento da cadeia do lipídeo, pode reduzir a fermentação ruminal dos carboidratos estruturais e, conseqüentemente, as emissões de CH<sub>4</sub>. O fornecimento de lipídeos insaturados está associado à redução na produção de CH<sub>4</sub> ruminal, por exercer ação deletéria sobre as bactérias metanogênicas e protozoários, devido ao consumo de H<sub>2</sub> no processo de bio-hidrogenação (MACHMÜLLER et al., 1998). A adição de lipídeos às dietas e o grau de redução dependem das fontes de fibra e de lipídeos (VALADARES FILHO; PINA, 2011).

Ferreira e Bonifácio (1996) observaram que o polímero de óleo vegetal teve ação eficaz sobre bactérias patogênicas e fungos. Sua ação promove a lise celular nos microrganismos (CHIERICE, 1995). Ito (1999) avaliou o tempo de atuação do *Ricinus assept* e verificou que ele foi capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, e de *Echerichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2327.

Fernandes (2001), trabalhando com feno de capim tifton e sua substituição por casca de soja nos níveis de 20 e 80%, adicionados ou não de 1 g de ácidos graxos essenciais (AGE), observou aumento significativo na degradação efetiva da FDN, sugerindo o seu uso para melhorar a eficiência de utilização da fibra.

### **2.1.4. Fator P®**

O Fator P® é um aditivo desenvolvido pela empresa Premix, sendo composto por polímeros de ácidos graxos essenciais, levedura, aminoácidos e mineral orgânico. Tem sido utilizado como promotor de eficiência alimentar para animais ruminantes e equídeos.

Dados de campo têm demonstrado que seu uso regular tem melhorado o ganho de peso, os parâmetros ruminais, a digestibilidade da FDN, além de apresentar resposta imunológica aumentada.

Padua et al. (2003), trabalhando com suplementação proteica, com e sem Fator P®, em quatro grupos genéticos constituídos de Nelore, Tricross (Santa Gertrudes x Angus x Nelore), Montana e Bonsmara, observaram 26% de aumento no desempenho entre os tratamentos com Fator P®, em relação aos não tratados com o aditivo.

Uma vez que o Fator P® melhora o desempenho animal, devido aos seus constituintes ácidos graxos essenciais e leveduras, é de interesse seu estudo na metanogênese ruminal.

#### **2.1.5. Farinha de algas**

O *Lithothamnium calcareum* pertence ao grupo das algas vermelhas ou rodofíceas, da família das coralináceas. É uma alga de aspecto calcário, pois absorve o carbonato de cálcio e magnésio. Não é fonte de proteína, vitaminas, carboidratos e lipídeos, somente de macro e microminerais em concentrações variadas, dependendo do local, da estação do ano e da profundidade.

Há várias pesquisas com farinha de algas no que tange a dose-resposta. Contudo há uma lacuna a ser elucidada quanto aos parâmetros ruminais e seus efeitos nos microrganismos ruminais.

Em revisão bibliográfica realizada por Melo e Moura (2009), foram apresentados estudos acerca de seu uso na produção animal. Para ruminantes, houve trabalhos que demonstraram aumento na produção e teor de gordura no leite e incremento de 26% no ganho de peso em vacas em lactação e bovinos de corte, respectivamente. As dosagens que obtiveram o melhor desempenho foram de 50 g/animal/dia para animais leiteiros e 10% de substituição da mistura mineral comercial para animais de corte.

Desconhece-se a relação da farinha de algas com o aumento na produção e do teor de gordura no leite, porém o aumento do teor de cálcio e magnésio no sangue dos animais pode estar relacionado à maior biodisponibilidade destes nutrientes (MELO; MOURA, 2009).

Os resultados de melhoria no ganho de peso podem estar relacionados com o aumento da digestibilidade aparente da proteína bruta de forragens, fato também observado por Orsine et al. (1989) e Melo et al. (2002), os quais relataram que a adição

da farinha de algas calcárias na dieta de bovinos melhorou a qualidade e a produção de leite, promoveu aumento no ganho de peso e melhorou a digestibilidade aparente da proteína bruta de forragens de baixa qualidade.

Montañez-Valdez et al. (2007) relataram que a inclusão de *Lithothamnium calcareum* como tamponante em dietas com 70% de concentrado aumentou o pH ruminal e o desenvolvimento de protozoários ruminais e não prejudicou a degradabilidade *in situ* da matéria seca e da FDN.

## **2.2. Técnica *in vitro* da produção de gases**

A técnica *in vitro* da produção de gases, assim como a técnica *in situ*, é baseada na degradação dos alimentos pelos microrganismos ruminais. Essa técnica permite, pela simulação *in vitro* do ambiente ruminal, medir o desaparecimento de material no decorrer do tempo, pela quantificação dos resíduos após a incubação, e observar a cinética de fermentação, uma vez que mensura a formação de gases da ação microbiana durante o processo de degradação (BUENO, 2002).

Há alta correlação entre a produção de gases, a digestibilidade e a degradabilidade do alimento (MENKE et al., 1979; THEODOROU et al., 1994; BLÜMEL et al., 1997; MAURICIO et al., 1998; BUENO et al., 1999a). A produção de gases na técnica *in vitro* é proporcional ao ataque microbiano. Assim, com a medição dos gases produzidos em intervalos frequentes, é possível estimar a quantidade de substrato que foi digerida.

Essa técnica tem como vantagens a praticidade de medição na produção de gases, usando um transdutor, e a pequena quantidade necessária de amostra para o ensaio (THEODOROU et al., 1994; MAURICIO et al., 1998).

Entre os diversos modelos matemáticos utilizados para expressar os dados de cinética fermentativa, são citados o de Ørskov e McDonald (1979) e o de France et al. (1993). Como a técnica de produção de gases é mais sensível que a técnica de sacos de náilon, o modelo de France et al. (1993) representa melhor o perfil sigmoidal da cinética fermentativa.

Assim, devido aos fatores supracitados, os estudos sobre uso de aditivos na mitigação de metano vem atender ao anseio da sociedade em produzir uma pecuária sustentável e altamente produtiva.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, *Campus* da USP, na cidade de Pirassununga, São Paulo. As análises laboratoriais, bem como o período de incubação, foram realizadas no Laboratório de Metabolismo Ruminal (LABRUMEN) da referida instituição.

Quatro fêmeas da raça Holandesa, com 510 kg de peso vivo médio, fistuladas no rúmen, alimentadas com 70% de feno de capim Tifton 85 e 30% de concentrado, foram utilizadas para doação de inóculos na fermentação *in vitro*. Ficaram alojadas em baias individuais providas de comedouros e bebedouros automáticos, no *Campus* de Pirassununga da USP, durante 21 dias.

O volumoso utilizado foi o feno de capim Tifton 85 (*Cynodon* sp.), cuja composição é mostrada na Tabela 2, e o concentrado foi uma ração comercial denominada de Bovinos 18 Premix, que apresenta a seguinte composição por quilograma do produto: proteína bruta – 180 g; NNP eq. proteína – 40 g; FDA – 190 g; extrato etéreo – 30 g; matéria mineral – 70 g; Ca – 20 g; P – 4,5 g; S – 1 g; Co – 0,21 mg; I – 0,5 mg; Se – 0,3 mg; Na – 1,9 g; Zn – 60 mg.

Um dia antes da coleta dos inóculos, os frascos foram pesados e identificados, sendo adicionados de 1 g de feno e mantidos em estufa a 39 °C. No dia da coleta, foram adicionados 90 mL de meio final nos frascos e os aditivos. O meio final foi composto de solução de microminerais, solução de macrominerais, solução-tampão, solução rezasurim, meio B e água destilada (Tabela 3). Foram coletadas proporções iguais de



líquido e conteúdo ruminal (fase sólida), que foram acondicionados em garrafas térmicas e sacos plásticos, para serem levados imediatamente ao laboratório.

**Tabela 2** - Composição químico-bromatológica do feno de capim Tifton 85

Nutriente	% MS
Matéria Seca	92,51
Proteína Bruta	14,91
FDN	84,48
FDA	40,71
Hemicelulose	43,77
Extrato Etéreo	1,31
Matéria Mineral	7,60
NDT (estimado)*	52,83

\* segundo equação para volumosos do NRC (2001).

**Tabela 3** - Soluções e Meio Final para preparo do inóculo

Solução de microminerais		Solução de macrominerais		Solução Tampão	
Reagente	g/L	Reagente	g/L	Reagente	g/L
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	132,00	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,75	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	4,00
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	100,00	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,32	NaHCO <sub>3</sub>	35,00
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	10,00	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,60		
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	80,00				
Meio B		Solução de rezasurin		Meio Final	
Reagente	un/100 mL	Reagente	g/L	Ingrediente	mL/L
Cysteine HCl (g)	625,00	Rezasurin	0,100	Água destilada	520,30
Água destilada (ml)	95,00			Sol. Micronutrientes	0,11
NaOH 1M (ml)	4,00			Sol. Macronutrientes	208,10
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> (g)	328,13			Sol. Tampão	208,10
				Sol. Rezasurin	1,00
				Meio B	62,40

O liquidificador foi insuflado com CO<sub>2</sub> e, em seguida, colocou-se metade do volume do liquidificador em conteúdo ruminal e metade do volume em líquido ruminal, misturado por aproximadamente 10 segundos. Posteriormente, a mistura foi filtrada em dois tecidos de algodão novos e interpostos de forma que as fibras ficassem em direções diferentes em um béquer de plástico.

O filtrado foi então transferido para um erlenmeyer em banho-maria a 39 °C e insuflado com CO<sub>2</sub>. Essa operação foi repetida para cada um dos quatro inóculos.

Após o preparo de cada inóculo, foram adicionados 10 mL deles em cada frasco, tampados imediatamente, homogeneizados e incubados em estufa de circulação forçada à 39 °C.

O perfil cumulativo de gases foi medido utilizando um transdutor e um *datalogger* (PressDATA 800).

Foram avaliados nove tratamentos constituídos de aditivos para mensuração dos efeitos na modulação da fermentação: monensina sódica, Fator P®, Fator P® em dose duplicada, Fator P® em dose triplicada, monensina sódica associada ao Fator P®, óleo essencial (ácido oleico), levedura, farinha de algas e caulim como tratamento controle, nas dosagens de: 20 mg de monensina sódica/kg MS, 20 mg de monensina + 300 mg de Fator P®/kg MS, 300 mg de Fator P®/kg MS, 600 mg de Fator P®/kg MS, 900 mg de Fator P®/kg MS, 100 mg de óleo essencial/kg MS, 500 mg de levedura/kg MS, 5 g de farinha de algas/kg MS e 300 mg de caulim/kg MS como tratamento controle. Todos os aditivos foram diluídos em 25 mL de água destilada, para homogeneização; posteriormente, foram pipetadas alíquotas correspondentes, nas concentrações desejadas.

Para efeito de análise laboratorial, todos os tratamentos foram realizados em triplicatas, sendo um dos frascos destinado ao ensaio de produção de metano.

As medições das produções de gases foram feitas nos tempos de 4, 8, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 72 e 96 horas após incubação (Figura 3); nos tempos de 4, 8, 12, 18 e 24 horas também foram coletados os gases para mensuração da produção de metano (Figura 4).

Em cada tratamento, os gases para a produção de metano foram transferidos para tubos de *vacuntainer*, onde foi obtido o acumulado em 24 horas de fermentação, e a mensuração foi feita utilizando cromatógrafo Shimadzu GC2014.

Às 24 e 96 horas, foram coletados 2 mL de líquido dos frascos, sendo adicionado 0,4 mL de ácido fórmico, para determinação de ácidos graxos voláteis (acético, butírico e propiônico), utilizando cromatografia líquida de alta precisão (HPLC) em equipamento Shimadzu GC2014, no Laboratório de Cromatografia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ/USP, utilizando 1 µL da amostra, com repetições quando a diferença entre as leituras foi superior a 5%.

Para determinação do N-amoniaco (N-NH<sub>3</sub>) nos tempos de 24 e 96 h, foram coletados 2 mL de líquido das garrafas, sendo posteriormente acidificados com 1 mL de ácido sulfúrico (1N); essa concentração foi determinada por colorimetria, segundo método descrito por Weatherburn (1967).

A degradabilidade *in vitro* da matéria seca e matéria orgânica foi determinada às 24 e 96 horas pela recuperação da fração não degradada, utilizando filtração do resíduo de acordo com a técnica descrita por Bueno et al. (2005, 2008).



**Figura 3** - Verificação da pressão de gás.



**Figura 4** - Amostragem de gás para mensuração de metano.

O modelo matemático usado para expressar a cinética fermentativa foi o de France et al. (1993):

$$A = A_f \times \{ 1 - e^{[-b \times (t-t_0) - c \times (\sqrt{t} - \sqrt{t_0})]} \}$$

em que A é o volume acumulado de gases produzidos até o tempo t;  $A_f$  é o volume assintótico dos gases produzidos; b e c são constantes do modelo; e  $t_0$  representa o tempo de colonização discreto.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo nove tratamentos e quatro repetições (inóculos). Nas análises estatísticas foi utilizado o PROC GLM do programa estatístico SAS (SAS, 2000), considerando o teste de hipóteses a 5% de probabilidade de aceitação ou rejeição.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O volume final de produção de gás (A),  $t_{1/2}$  e *lag time* (L) produzidos pelo uso dos aditivos não diferiram ( $P>0,05$ ) do tratamento controle (Tabela 4) e (Figura 5).

O tempo de colonização (L) foi alto para todos os tratamentos, provavelmente devido à utilização exclusiva de volumoso, no ensaio de fermentação.

O  $t_{1/2}$  representa o tempo necessário para que metade da assíntota seja atingida; assim, quanto menor o  $t_{1/2}$ , maior a eficiência de fermentação.

Todos os aditivos, com exceção do AGE, aumentaram ( $P<0,05$ ) a degradação da matéria seca após 96 horas de incubação.

O fator de partição (PF) dos diferentes aditivos diferiu ( $P<0,05$ ) do tratamento controle, com exceção do tratamento com ácido graxo essencial (AGE), mostrando que a eficiência de degradação (PF) foi maior e a perda de energia menor para a maioria dos aditivos.

A produção de metano ( $\text{CH}_4$ ) foi influenciada ( $P<0,05$ ) pelos aditivos monensina (Mon), Fator P em dose duplicada (FP2x) e leveduras (Lev) (Tabela 5 e Figura 6). No entanto, a combinação de monensina com Fator P não diferiu ( $P>0,05$ ) do tratamento controle. Uma possível explicação poderia ser o fato de a quantidade administrada de Fator P junto ao inóculo ser pequena e a diluição da monensina junto ao Fator P.

**Tabela 4** - Parâmetros do modelo de France et al. (1993) e produções relativas de gases com diferentes aditivos

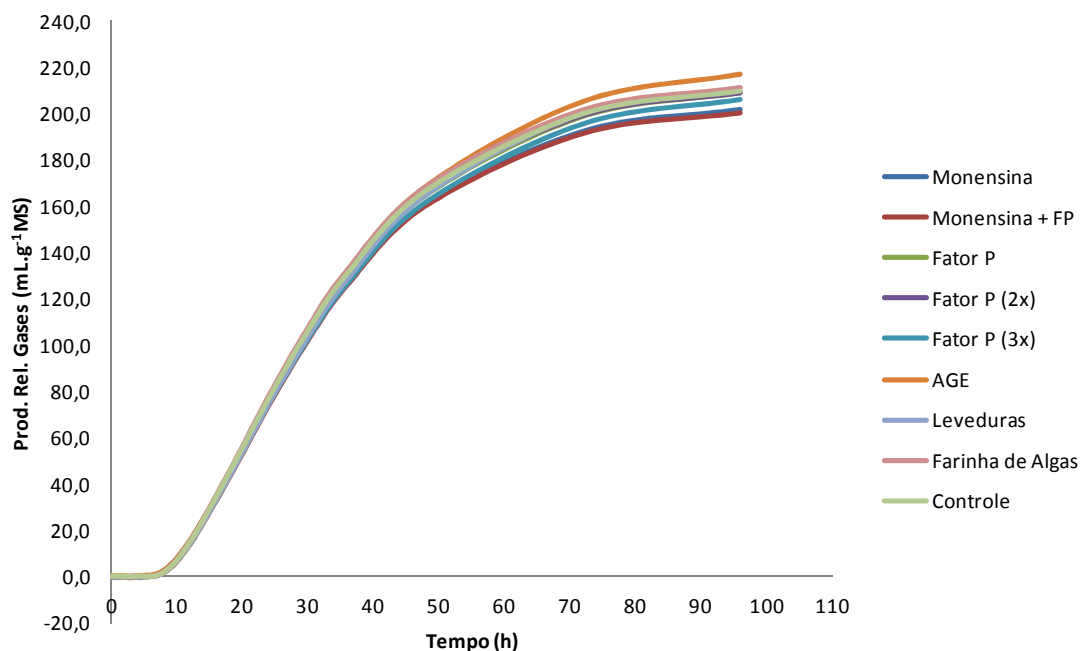
Variável*	Aditivos***									EPM**
	Controle	Mon	Mon+FP	FP	FP2x	FP3x	AGE	Lev	Algas	
A (mL.g <sup>-1</sup> MS)	212,925 <sup>abcd</sup>	205,000 <sup>cd</sup>	203,125 <sup>d</sup>	212,425 <sup>abcd</sup>	212,250 <sup>abcd</sup>	210,125 <sup>bcd</sup>	221,450 <sup>a</sup>	215,425 <sup>ab</sup>	214,550 <sup>abc</sup>	3,098
b (h <sup>-1</sup> )	0,077 <sup>ab</sup>	0,077 <sup>abc</sup>	0,080 <sup>a</sup>	0,077 <sup>abc</sup>	0,078 <sup>ab</sup>	0,073 <sup>bc</sup>	0,072 <sup>c</sup>	0,074 <sup>bc</sup>	0,078 <sup>ab</sup>	0,001
c (h <sup>-1/2</sup> )	-0,391 <sup>ab</sup>	-0,383 <sup>ab</sup>	-0,410 <sup>b</sup>	-0,391 <sup>ab</sup>	-0,396 <sup>ab</sup>	-0,364 <sup>a</sup>	-0,360 <sup>a</sup>	-0,378 <sup>ab</sup>	-0,395 <sup>ab</sup>	0,011
t <sub>1/2</sub> (h)	30,212	29,950	29,990	30,585	30,225	30,635	31,152	31,010	29,995	0,362
L (h)	6,600	6,155	6,475	6,435	6,370	6,150	6,182	6,345	6,285	0,219
DG MS 96 (%)	56,578 <sup>b</sup>	67,138 <sup>a</sup>	67,545 <sup>a</sup>	68,148 <sup>a</sup>	68,288 <sup>a</sup>	68,245 <sup>a</sup>	62,428 <sup>ab</sup>	67,668 <sup>a</sup>	68,195 <sup>a</sup>	3,181
DG MO 96 (%)	63,518 <sup>b</sup>	66,365 <sup>ab</sup>	66,980 <sup>ab</sup>	68,068 <sup>a</sup>	67,763 <sup>a</sup>	67,513 <sup>a</sup>	65,833 <sup>ab</sup>	67,238 <sup>ab</sup>	67,765 <sup>a</sup>	1,186
PF 96 (mg MSd/mL)	2,702 <sup>b</sup>	3,332 <sup>a</sup>	3,377 <sup>a</sup>	3,265 <sup>a</sup>	3,270 <sup>a</sup>	3,315 <sup>a</sup>	2,897 <sup>ab</sup>	3,207 <sup>a</sup>	3,232 <sup>a</sup>	0,154

\* A: volume final ou produção potencial de gases; b e c: constantes do modelo; t<sub>1/2</sub>: tempo no qual a metade de V<sub>f</sub> é atingida; L: tempo de colonização; DG MS 96: degradabilidade da matéria seca em 96h de incubação; DG MO 96: degradabilidade da matéria orgânica em 96h de incubação; PF: fator de partição, quantidade de MS degradada por mL de gás produzido em 96 h de incubação.

\*\*EPM: erro-padrão da média.

\*\*\* Mon: monensina sódica; Mon+FP: monensina sódica associada ao Fator P®; FP2x: Fator P® em dose duplicada; FP3x: Fator P® em dose triplicada; AGE: ácido graxo essencial; Lev: leveduras; algas: farinha de algas.

<sup>a, b, c, d</sup> médias seguidas por letras diferentes, nas linhas, diferem entre si (P<0,05).



**Figura 5** - Perfis da cinética de fermentação *in vitro* do feno de Tifton 85 com diferentes aditivos.

Considerando a média de produção de metano entre monensina, Fator P em dose duplicada e leveduras e supondo um ruminante ingerindo 10 kg de MS/dia, esse animal poderia deixar de eliminar na atmosfera 2,853 litros de CH<sub>4</sub>/dia, em comparação ao animal que não ingeriu aditivos.

As degradações da matéria seca e da orgânica após 24 horas de incubação, o PF24 e a produção de gases após 96 horas de incubação não diferiram entre os aditivos e o tratamento controle.

Durante o processo de fermentação, são produzidos ácidos graxos voláteis (AGV) e amônia (N-NH<sub>3</sub>) (Tabelas 6 e 7 e Figuras 7 e 8). Entre os que se destacam pela maior produção durante o processo de fermentação estão os ácidos acético, propiônico e butírico. Também são produzidos em menor quantidade os ácidos fórmico, isobutírico, isovalérico e valérico (VALADARES FILHO; PINA, 2011).

Não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) na concentração molar de N-NH<sub>3</sub>, AGV totais, ácidos acético, propiônico e butírico entre os aditivos estudados e o controle em 24 horas de incubação. As produções de AGV totais e de ácido acético após 96 horas não diferiram ( $P>0,05$ ) entre os aditivos. No entanto, somente o aditivo FP diferiu ( $P>0,05$ ) do controle nas concentrações dos ácidos acético e butírico.

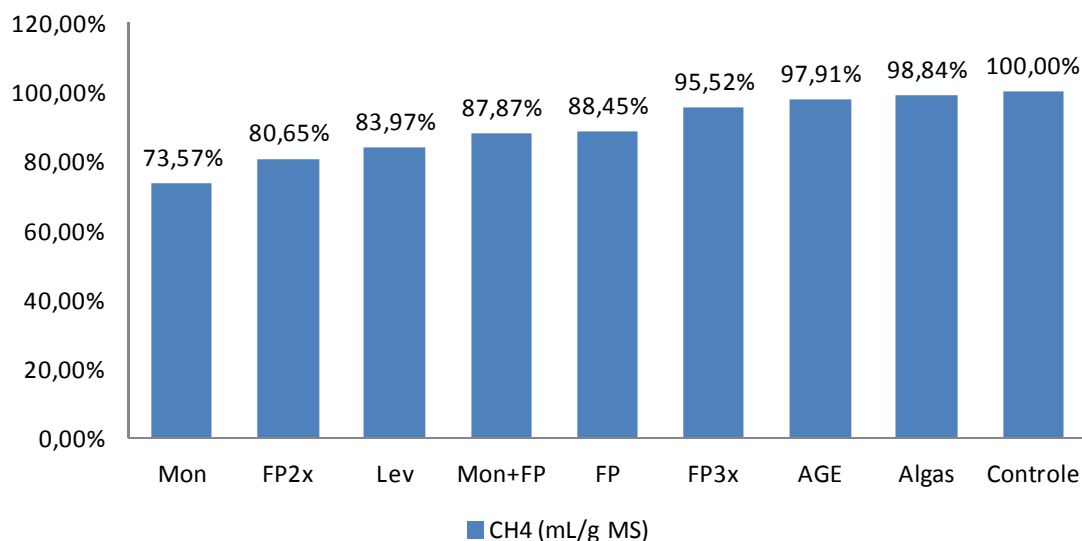
**Tabela 5** - Produção de gases totais (PG expressa em mL.g<sup>-1</sup>MS), metano e degradação da MS e MO *in vitro* com diferentes aditivos

Variável*	Aditivos***									EPM**
	Controle	Mon	Mon+FP	FP	FP2x	FP3x	AGE	Lev	Algas	
PG 12 h	14,475	15,425	13,650	14,000	14,250	14,975	14,950	14,025	14,950	0,997
24h	76,350	74,850	73,375	74,450	75,850	74,275	76,050	74,250	77,625	1,864
48 h	166,300	160,600	159,975	164,475	165,825	161,625	168,175	164,825	168,350	2,680
72h	199,625 <sup>abc</sup>	192,350 <sup>bc</sup>	191,275 <sup>c</sup>	198,600 <sup>abc</sup>	199,100 <sup>abc</sup>	195,500 <sup>abc</sup>	205,000 <sup>a</sup>	200,150 <sup>abc</sup>	201,575 <sup>ab</sup>	2,933
96 h	209,450 <sup>abc</sup>	201,725 <sup>bc</sup>	200,200 <sup>c</sup>	208,825 <sup>abc</sup>	208,875 <sup>abc</sup>	206,075 <sup>bc</sup>	216,775 <sup>a</sup>	211,150 <sup>ab</sup>	211,225 <sup>ab</sup>	3,033
CH <sub>4</sub>	1,385 <sup>a</sup>	1,019 <sup>d</sup>	1,217 <sup>abcd</sup>	1,225 <sup>abcd</sup>	1,117 <sup>cd</sup>	1,323 <sup>abc</sup>	1,356 <sup>ab</sup>	1,163 <sup>bcd</sup>	1,369 <sup>ab</sup>	0,067
DG MS 24 (%)	35,537	35,037	35,402	34,375	35,296	34,890	35,807	35,015	34,750	0,495
DG MO 24 (%)	31,696 <sup>ab</sup>	31,067 <sup>b</sup>	32,267 <sup>ab</sup>	31,207 <sup>b</sup>	31,856 <sup>ab</sup>	31,872 <sup>ab</sup>	33,060 <sup>a</sup>	31,630 <sup>ab</sup>	31,960 <sup>ab</sup>	0,467
PF 24 (mgMSd/mL)	4,670 <sup>ab</sup>	4,747 <sup>ab</sup>	4,855 <sup>a</sup>	4,630 <sup>ab</sup>	4,636 <sup>ab</sup>	4,705 <sup>ab</sup>	4,717 <sup>ab</sup>	4,727 <sup>ab</sup>	4,480 <sup>b</sup>	0,101

\* PG12: produção de gases com 12 horas de incubação; PG24: produção de gases com 24 horas de incubação; PG48: produção de gases com 48 horas de incubação; PG72: produção de gases com 72 horas de incubação; PG96: produção de gases com 96 horas de incubação; DG MS 24: degradabilidade da matéria seca com 24 horas de incubação; DG MO 24: degradabilidade da matéria orgânica com 24 horas de incubação; PF 24: Fator de Partição, quantidade de MS degradada por mL de gás produzido com 24 horas de incubação; CH<sub>4</sub>: produção de gás metano com 24 horas de incubação.\*\*EPM: erro-padrão da média.\*\*\*Mon: monensina sódica; Mon+FP: monensina sódica associada ao Fator P®; FP2x: Fator P® em dose duplicada; FP3x: Fator P® em dose triplicada; AGE: ácido graxo essencial; Lev: leveduras; algas: farinha de algas.

<sup>a, b, c, d</sup> médias seguidas por letras diferentes, nas linhas, diferem entre si (P<0,05)





**Figura 6** - Produção de CH<sub>4</sub> (%) de diferentes aditivos em relação ao tratamento controle.

As concentrações de N-NH<sub>3</sub> foram suficientes para suportar o crescimento bacteriano, estando bem acima do valor mínimo citado por Satter e Slyter (1974), de 5 mg N-NH<sub>3</sub>/100 mL. Destaca-se que os valores de N-NH<sub>3</sub> obtidos no presente trabalho estão dentro do valor recomendado por Mehrez et al. (1977), de 24 mg/% para o máximo desaparecimento de substrato, embora esses autores tenham afirmado não ser necessário manter, de forma constante, altas concentrações de N-NH<sub>3</sub> no líquido ruminal.

Rivera et al. (2010), utilizando feno de capim Tifton 85 concentrado na proporção de 80:20 e comparando os aditivos Fator P e monensina em ensaio *in vitro*, não encontraram diferença entre eles na produção de metano e digestibilidade da MS – resultado contrário ao do presente trabalho.

Gomes et al. (2010), comparando a utilização de leveduras e monensina e a associação entre eles nos parâmetros ruminais e degradabilidade *in situ*, não encontraram efeito sobre N-NH<sub>3</sub>, e degradação para os aditivos. No entanto, a monensina e a associação desta com leveduras diminuíram a população de protozoários e a produção total de AGV.

A produção de metano está diretamente relacionada com a concentração de H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> dissolvidos no líquido ruminal, sendo o acetato e o formato produzidos por bactérias celulolíticas e protozoários, os principais precursores de substrato para a metanogênese (VALADARES FILHO; PINA, 2011).

**Tabela 6** - Concentrações de nitrogênio amoniacal (mg/%), dos ácidos acético (Ac), propiônico (Prop), butírico (But) e dos ácidos graxos voláteis totais (AGV), expressas em mM ou em % molar, e relação acético:propiônico (Ac:Pr) após 24 horas de incubação com diferentes aditivos

Variável	Aditivos**									EPM*
	Controle	Mon	Mon+FP	FP	FP2x	FP3x	AGE	Lev	Algas	
N-NH <sub>3</sub>	15,675	15,200	16,655	15,300	17,055	14,975	14,898	15,275	16,855	0,834
AC	25,275	27,488	26,415	29,010	27,348	25,363	28,810	27,210	28,275	1,620
Prop	8,920	9,522	9,165	9,772	9,415	8,687	9,907	9,257	9,715	0,440
But	2,525	2,730	2,630	2,982	2,707	2,562	2,927	2,760	2,812	0,180
AGV	36,715	39,738	38,209	41,765	39,470	36,614	41,645	39,230	40,798	2,817
Ac (%)	68,828	69,181	69,151	69,451	69,340	69,108	69,192	69,315	69,275	0,360
Prop (%)	24,369	24,029	24,022	23,432	23,843	23,902	23,788	23,705	23,863	0,379
But (%)	6,803	6,790	6,827	7,117	6,817	6,990	7,020	6,979	6,862	0,201
Ac:Pr	2,827	2,881	2,879	2,966	2,911	2,902	2,912	2,928	2,905	0,058

\*EPM: erro-padrão da média.

\*\*Mon: monensina sódica; Mon+FP: monensina sódica associada ao Fator P®; FP2x: Fator P® em dose duplicada; FP3x: Fator P® em dose triplicada; AGE: ácido graxo essencial; Lev: leveduras; algas: farinha de algas.

Não houve diferença significativa (P>0,05).

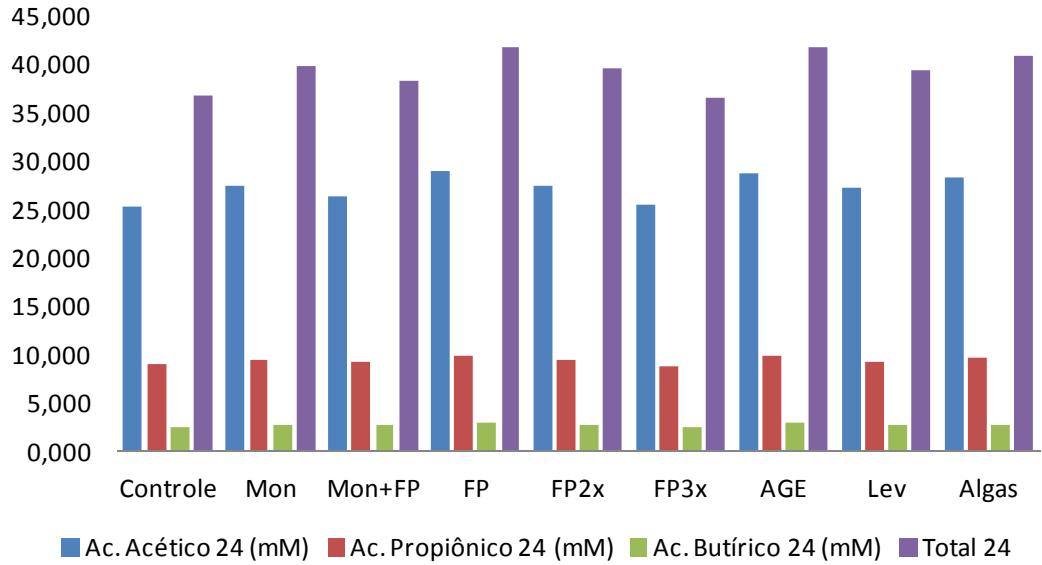
**Tabela 7** - Concentrações médias de nitrogênio amoniacal (mg%), dos ácidos acético (Ac), propiônico (Prop), butírico (But) e dos ácidos graxos voláteis totais (AGV), expressas em mM ou em % molar, e relação acético:propiônico (Ac:Pr) após 96 horas de incubação com diferentes aditivos

Variável	Aditivos**									EPM*
	Controle	Mon	Mon+FP	FP	FP2x	FP3x	AGE	Lev	Algas	
N-NH <sub>3</sub>	24,305 <sup>a</sup>	24,133 <sup>a</sup>	21,198 <sup>b</sup>	23,730 <sup>ab</sup>	24,080 <sup>a</sup>	22,348 <sup>ab</sup>	24,030 <sup>a</sup>	23,503 <sup>ab</sup>	24,383 <sup>a</sup>	0,813
AC	51,373 <sup>a</sup>	44,638 <sup>ab</sup>	46,525 <sup>ab</sup>	40,185 <sup>b</sup>	45,835 <sup>ab</sup>	45,195 <sup>ab</sup>	45,948 <sup>ab</sup>	47,303 <sup>ab</sup>	44,455 <sup>ab</sup>	2,449
Prop	16,210	15,445	16,220	13,683	14,813	15,063	15,555	15,780	14,983	0,824
But	5,3725 <sup>a</sup>	4,8125 <sup>ab</sup>	4,9675 <sup>ab</sup>	4,3175 <sup>b</sup>	5,0675 <sup>ab</sup>	4,8500 <sup>ab</sup>	4,9475 <sup>ab</sup>	5,0975 <sup>ab</sup>	4,7475 <sup>ab</sup>	0,272
AGV	72,954 <sup>a</sup>	64,898 <sup>ab</sup>	67,711 <sup>ab</sup>	58,185 <sup>b</sup>	65,712 <sup>ab</sup>	65,107 <sup>ab</sup>	66,445 <sup>ab</sup>	68,178 <sup>ab</sup>	64,187 <sup>ab</sup>	3,694
Ac (%)	70,3990	68,815	68,775	68,960	69,744	69,454	69,225	69,404	69,319	0,561
Prop (%)	22,232	23,751	23,896	23,600	22,549	23,109	23,344	23,127	23,305	0,561
But (%)	7,368	7,433	7,329	7,439	7,707	7,436	7,430	7,469	7,376	0,136
Ac:Pr	3,189	2,901	2,887	2,931	3,099	3,010	2,972	3,003	2,975	0,098

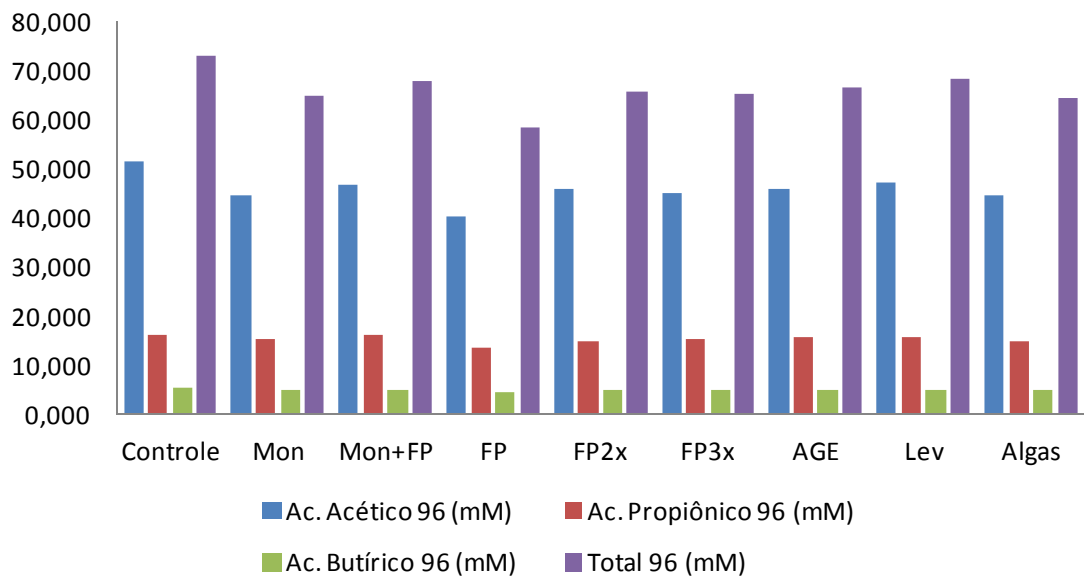
\*EPM: erro-padrão da média.

\*\* Mon: monensina sódica; Mon+FP: monensina sódica associada ao Fator P®; FP2x: Fator P® em dose duplicada; FP3x: Fator P® em dose triplicada; AGE: ácido graxo essencial; Lev: leveduras; algas: farinha de algas.

<sup>a, b</sup> médias seguidas por letras diferentes, nas linhas, diferem entre si (P<0,05).



**Figura 7** - Concentrações molares médias dos ácidos acético, propiônico, butírico e total (mM) em líquido ruminal incubado em 24 horas com diferentes aditivos.



**Figura 8** - Concentrações molares médias dos ácidos acético, propiônico, butírico e total (mM) em líquido ruminal incubado em 96 horas com diferentes aditivos.

Segundo Klieve e Hegarty (1999), existem basicamente três vias de inibir a produção de metano no processo de fermentação: inibir a produção de H<sub>2</sub>; desviar H<sub>2</sub> para outras populações de microrganismos não metanogênicos; e inibir bactérias metanogênicas e protozoários.

Tem sido observado grande número de bactérias metanogênicas associadas aos protozoários após períodos de alimentação, assim conseguem captar H<sub>2</sub> para posterior síntese de ATP (HEGARTY, 1999). Na ausência de protozoários, o H<sub>2</sub> pode ser incorporado na formação de AGV (MACHMÜLLER et al., 1998) ou para saturar ácidos graxos poli-insaturados com decréscimo do substrato que precisam das bactérias metanogênicas para produzir CH<sub>4</sub> (FIEVEZ et al., 2003).

Neste estudo, como não houve substrato para o aumento de propionato, os aditivos monensina, FP2x e leveduras podem ter atuado sobre a população de protozoários e diretamente sobre as bactérias metanogênicas, diminuindo assim o H<sub>2</sub> como substrato para a formação de metano.

A diminuição da população de protozoários com o uso de leveduras tem sido relatada em alguns trabalhos (CALLAWAY; MARTIN, 1997; WU, 1997). Em contraponto, Ortolan (2010) e Gomes et al. (2010) observaram aumento no número de protozoários ciliados utilizando leveduras e diminuição na população empregando virginiamicina e monensina, respectivamente.

No entanto, algumas investigações mostraram que os efeitos da levedura sobre a fermentação ruminal podem ser variáveis em função da cepa utilizada e da concentração do aditivo na dieta (SULLIVAN; MARTIN, 1999).

Não foi observada redução de metano e outros efeitos nos parâmetros ruminiais com o uso de ácido graxo essencial. Uma possível explicação seria a quantidade do aditivo que foi adicionado ao sistema de fermentação *in vitro*. Entre todos os aditivos estudados, o AGE foi adicionado em menor quantidade, o que pode ter influenciado na diluição dele no sistema. Contudo, pesquisas apontam como promissor o seu uso na mitigação de metano.

Abdalla et al. (2012), estudando a produção de gases e metano *in vitro*, tendo como aditivos óleo essencial, coprodutos de biodiesel e plantas ricas em tanino, observaram redução significativa na produção de metano. Kamra et al. (2008), Calsamiglia et al. (2007) e Sallam et al. (2009a) também obtiveram sucesso na mitigação de metano por óleos essenciais.

## **5. CONCLUSÃO**

Os aditivos monensina sódica, Fator P na dosagem de 600 mg/kg MS e levedura são eficientes *in vitro* na mitigação de gás metano em dietas exclusivas de volumosos tropicais com alto teor de FDN.

## REFERÊNCIAS

ABDALLA, A. L.; LOUVANDINI, H.; SALLAM, S. M. A.; BUENO, I. C. S.; TSAI, S. M.; FIGUEIRA, A. V. O. *In vitro* evaluation, *in vivo* quantification and microbial diversity studies of nutritional strategies for reducing enteric methane production. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, p. 953-964, 2012.

ANUALPEC 2012. Anuário da Pecuária Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2012. 378 p.

BEACON, S. E. Effect of the feed additives chlortetracycline, monensin and lasalocid on feedlot performance of finishing cattle, liver lesions and tissue levels of chlortetracycline. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 68, n. 4, p. 1131-1141, 1988.

BLÜMMEL, M.; STEINGAB, H.; BECKER, K. The relationship between *in vitro* gas production, *in vitro* microbial biomass yield and <sup>15</sup>N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. **British Journal of Nutrition**, v. 77, p. 911-921, 1997.

BRUINSMA, J. (Ed.). **World agriculture: towards 2015/2030. An FAO perspective.** London: Earthscan Publications Ltd., 2003. 432 p.

BUENO, I. C. S. et al. Comparison of inocula from sheep and cattle for the *in vitro* gas production under tropical conditions. In: ANNUAL MEETING OF THE BRITISH SOCIETY OF ANIMAL SCIENCE, Scarborough, 1999a. Penicuik **Proceedings...** Penicuik: BSAS, p. 151. 1999a.

BUENO, I. C. S. Cinética digestiva e síntese microbiana ruminal em ovinos alimentados com feno de três qualidades distintas. 97 f. Tese (Doutorado em Ciência) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2002.

BUENO, I. C. S. et al. A new approach for in vitro bioassay to measure tannin biological effects based on a gas production technique. **Animal Feed Science and Technology**, v. 141, p. 153-170, 2008.

BUENO, I. C. S. et al. Influence of inoculums source in a gas production method. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123-124, p. 95-105, 2005.

CALLAWAY, E. S.; MARTIN, S. A. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, n. 9, p. 2035-2044, 1997.

CALSAMIGLIA, S.; BUSQUET, M.; CARDOZO, P. W.; CASTILLEJOS, L.; FERRET, A. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation, **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 2580-2595, 2007.

CHAUCHEYRAS, F. et al. In vitro H<sub>2</sub> 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, p. 3466-3467, 1995.

CHIERICE, G. **Desenvolvimento de polímeros a base de *Ricinus comunis***. São Carlos: Instituto de Química de São Carlos, 1995 (Comunicação Verbal)

CHURCH, D. C. **The ruminant animal, digestive physiology and nutrition**. Englewood Cliffs, N.J: Prentice Hall, 1993. 564 p.

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

DUKES, H. H.; SWENSON, M. J. 1977. **Fisiologia de los animals domesticos**. Funciones vegetativas. Madrid: Aguilar p. 1054.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Emissões de metano da pecuária**. Primeiro inventário de emissões antrópicas de gases de efeito estufa. Relatórios de referência. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006a. 77 p.

FIEVEZ, V.; DOHME, F.; DANELS, 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, n. 1, p. 41-58, 2003.

FERNANDES, L. B. Efeitos da adição de ácidos graxos essenciais em dietas com dois níveis de feno de gramínea e película de soja sobre o metabolismo e digestão ruminal em bovinos. 2001. 63 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade de São Paulo, Pirassununga-SP, 2001.

FERREIRA, C. M.; BONIFÁCIO, K. C. Atividade antimicrobiana. Estudo *in vivo* da atividade antimicrobiana do gel de papaína a 0,4%, detergente de mamona a 10%, hipoclorito de sódio a 5% utilizados como soluções irrigantes em Endodontia. Ribeirão Preto: USP, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, 1996. 83 p. (Monografia)



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

FRANZOLIN, R.; ST-PIERRE, B.; NORTHWOOD, K.; WRIGHT, A. D. G. Analysis of rumen methanogen diversity in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) under three different diets. **Microbial Ecology**, v. 64, p. 131-39, 2012.

GAMO, Y. et al. Effects of lactic acid bacteria, yeasts and galactooligosaccharide supplementation on *in vitro* rumen methane production. In: TAKAHASHI, J. YONG, B. A. (Eds.). **Greenhouse Gases and Animal Agriculture**. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science BV, 2002. p. 201-204.

GOULART, R. C. D. **Avaliação de antimicrobianos como promotores de crescimento via mistura mineral para bovinos de corte em pastejo**. 2010. 128 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2010.

GOMES, R. C. et al. Leveduras vivas e monensina em dietas de alto concentrado para bovinos: parâmetros ruminais e degradabilidade “*in situ*”. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v. 11, n. 1, p. 202-216 jan/mar 2010.

GUAN, H. et al. Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 7, p. 1896-1906, 2006.

HEGARTY, R. S. Reducing rumen methane emissions through elimination of rumen protozoa. In: Meeting the Kyoto Target. Implications for the Australian Livestock Industries. (Eds.) REYENGA, P. J.; HOWDEN, S. M. **Bureau of Rural Sciences**, p. 55-61, 1999.

IPCC – Intergovernmental Panel on Climate Change. **Climate change 2001: The scientific basis**. Cambridge, UK: Cambridge University Press. p. 183-237. Disponível em: <[http://www.grida.no/climate/ipcc\\_tar/wg1/index.htm](http://www.grida.no/climate/ipcc_tar/wg1/index.htm)>. Acesso em: 12 abr. 2012.

IPCC – Intergovernmental Panel on Climate Change. 1996: **Impacts, adaptations and mitigation of climate change: Scientific-technical analysis 1995**. Cambridge, UK: Cambridge University Press. p. 183-237. Disponível em: <[http://www.grida.no/climate/ipcc\\_tar/wg1/index.htm](http://www.grida.no/climate/ipcc_tar/wg1/index.htm)>. Acesso em: 12 abr. 2012.

ISICHEI, C. O. **The role of monensin in protein metabolism in steers**. Ph.D. Thesis. Michigan State Univ., East Lansing, 1980.

ITO, I. Y. Laudo documentado no Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, **USP: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto**, 1999.

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

KLIEVE, A.; HEGARTY, R. S. Opportunities of biological control of methanogenesis. In: Meeting the Kyoto Target. Implications for the Australian Livestock Industries. (Eds.) REYENGA, P. J.; HOWDEN, S. M. **Bureau of Rural Sciences**, p. 63-69, 1999.

KAMRA, D. N.; PATRA, A. K.; CHATTERJEE, P. N. et al. Effect of plant extracts on methanogenesis and microbial profile of the rumen of buffalo: a brief overview, **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 48, p. 230-237, 2008.

KOZLOSKI, G. B. **Bioquímica dos ruminantes**. 2.ed. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2009. 214 p.

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

LANA, R. P.; RUSSELL, J. B. Use of potassium depletion to assess adaptation of ruminal bacteria to ionophores. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 62, p. 4499-4503, 1996.

LIMA, M. A.; BOEIRA, R. C.; CASTRO, V. L. S. S.; LIGO, M. A. V.; CABRAL, O. M. R. Estimativa das emissões de gases de efeito estufa provenientes de atividades agrícolas no Brasil. In: LIMA, M. A.; CABRAL, O. M. R.; MIGUEZ, J. D. G. (Eds). **Mudanças climáticas globais e a agropecuária brasileira**, Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2001. p. 169-189.

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, n. 3, p. 117-130. 1998.

MACHMÜLLER, A. et al. 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.

MACKIE, R. I.; McSWEENEY, C. S.; KLIEVE, A. V. Microbial ecology of the ovine rumen. In: FREER, M.; DOVE, H. **Sheep nutrition**. Wallingford: CAB Publishing, 2002. cap. 4, p. 71-94.

McLLISTER, A. T. et al. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 76, p. 231-243, 1996.

McLLISTER, A. T. et al. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 76, p. 231-243, 1996.

MARTIN, A. S.; NISBET, D. J. Effect of direct-feed microbial on rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 75, p. 1736-1744, 1992.

MCT – MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA. **Primeiro Inventário Brasileiro de Emissões Antrópicas de Gases de Efeito Estufa** – Relatórios de Referência: Emissões de Metano pela Pecuária. Brasília: MCT, 2006.

MAURICIO, R. M. et al. Uso de líquido ruminal e fezes como fonte de inóculo para técnica *in vitro* de produção de gases. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35., 1998. Botucatu, **Anais...** Botucatu-SP: SBZ, p. 314-316, 1998.

- MAYNARD, L. A. **Nutrição animal**. 3.ed. São Paulo: Freitas Bastos, 1984. 726 p.
- MEHREZ, A. Z.; ØRSKOV, E. R.; McDONALD, I. Rates fermentation in relation to ammonia concentration. **British Journal of Nutrition**, v. 38, n. 3, p. 437-443, 1977.
- MELO, P. C.; SILVA, F. C.; SOUZA, M. W. R. Efeito de doses do SUMINAL® na produção leiteira. In: XII CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA; IV CONGRESSO INTERNACIONAL DE ZOOTECNIA 4., Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, RJ, 2002.
- MELO, T. V.; MOURA, A. M. A. Utilização de farinha de algas na alimentação animal. **Archivos de Zootecnia**, v. 58(R), p. 99-107, 2009.
- MENKE, K. H. et al. The estimation of digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuff from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. **Journal Agricultural Science**, v. 93, p. 217-222, 1979.
- 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.
- MONTAÑES-VALDEZ, O. D.; GARCIA-FLORES, E. O.; BARBACENA-GAMA, J. R.; GONZALES-MUÑOZ, S. S.; ORTEGA-CERRILLA, M. E.; PERALTA-ORTIZ, J. G.; AVELLANEDA-CEVALLOS, J. H. Effect of two buffers on nutrient digestibilities and ruminal fermentation in Holstein steers. Disponível em: <<http://adsa.asas.org/meetings/2007/abstracts/0545.PDF>>. Acesso em: 11 dez. 2012.
- MOSS, A. R. **Methane: global warming and production by animals**. Kingston, United Kingdom: Chalcombe Publications, 1993. 105 p.
- MWENYA, B. et al. Effects of including (1-4 galacto-oligosaccharides, lactic acid bacteria or yeast culture on methanogenesis as well as energy and nitrogen metabolism in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v. 115, p. 313-326, 2004.
- NEWBOLD, C. J.; WALLACE, R. J.; McINTOSH, F. M. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 76, n. 2, p. 249-261, 1996.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 6.ed. Washington: National Academy Press, 2001. 381 p.
- ORSINE, G. F.; COSTA, C. P.; OLIVEIRA, B. et. al. Efeito da fonte de cálcio (calcário vs *Lithothamnium calcareum*) na digestibilidade aparente do feno de capim *Brachiaria decumbens* Stach cv. Basiliski. **Anais das Escolas de Agronomia e Veterinária**, v. 19, p. 49-58, 1989.
- ØRSKOV, E. R.; McDONALD, P. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal Agricultural Science**, v. 92, p. 499-503, 1979.

- ORTOLAN, J. H. **Efeito de aditivos no metabolismo ruminal e parâmetros sanguíneos em bovinos**. 2010. 66 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, 2010.
- PADUA, J.; MIYAGI, E. S.; RESTLE, J.; VIEIRA, L. S.; GRECO, L. F. ; NUNES, A. G.; GONZAGA, B. C. F.; FERNANDES, L. B. Desempenho de quatro grupos genéticos de bovinos de corte mantidos a pasto, utilizando suplementação com e sem aditivo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, RS, 2003.
- PRIMAVESI, O. et al. Metano entérico de bovinos leiteiros em condições tropicais brasileiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n 3, p. 277-283, 2004.
- REIS, R. A.; MORAES, J. A. S.; SIQUEIRA, G. R. Aditivos alternativos para alimentação de ruminantes. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE NUTRIÇÃO ANIMAL 2., São Paulo. **Anais...** São Paulo, SP: CBNA, 2006. p. 1-40.
- RIVERA, A. R.; BERCHIELLI, T. T et al. Fermentação ruminal e produção de metano em bovinos alimentados com feno de capim tifton-85 e concentrado com aditivos. **R. Bras. Zootec.**, v. 39, n. 3, p. 617-624, 2010.
- RODRIGUES, P. H. M.; LUCCI, C. S.; MELOTTI, L. Efeitos da lasalocida sódica e proporção volumoso/concentrados sobre a degradabilidade *in situ* do farelo de soja e do feno Coast Cross [*Cynodon dactylon* (L.) Pers]. em vacas secas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 3, p. 127-133, 2000.
- ROMATOWSKI, J. **Mechanism of action of monensin in rumen**. M. S. Thesis. Univ. of Delaware, Newark, 1979.
- RUSSEL, J. B.; STROBEL, H. J. Effect of ionophores on ruminal fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 55, p. 1-6, 1989.
- SALLAM, S. M. A.; BUENO, I. C. S. ; BRIGIDE, P.; GODOY, P. B.; VITTI, D. M. S. S.; ABDALLA, A. L. Efficacy of eucalyptus oil on *in vitro* ruminal fermentation and methane production. **Options Méditerranéennes**, v. 85, p. 267-272, 2009.
- SAS, 2000. **SAS system for windows**. Release 8.01, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. 2000.
- SATTER, L. D.; SLYTER, L. L. Effect of ammonia concentration of rumen microbial protein production *in vitro*. **British Journal of Nutrition**, v. 32, p. 199-203, 1974.
- SAUER, F. D. et al. Methane output and lactation response in holstein cattle with monensine or unsaturated fat added to the diet. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 906-914, 1998.
- SULLIVAN, H. M.; MARTIN, S. A. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture *in vitro* mixed ruminal microorganisms fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 2, p. 2011-2016, 1999.

STEINFELD, H. et al. **Livestock's long shadow: environmental issues and options.** Rome: Food and Agriculture Organization, Animal Production and Health Division. 2006. 408 p. Disponível em: <[www.virtualcentre.org/em/library/key\\_pub/longshad/A0701E00.pdf](http://www.virtualcentre.org/em/library/key_pub/longshad/A0701E00.pdf)>. Acesso em: 10 abr. 2012.

TEDESCHI, L. O.; FOX, D. G.; TYLUTK, T .P. Environmental benefits of ionophores in ruminants diets. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 32, p. 1591-1602, 2003.

THEODOROU, M. K. et al. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminants feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 48, p. 185-197, 1994.

VALADARES FILHO, S. C.; PINA, D. S. Fermentação ruminal. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes.** 1.ed. Jaboticabal. FUNEP, 2006, p. 151-182.

WAKIL, S. J. Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. **Biochemistry**, v. 28, p. 4523-4530, 1989.

WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**, v. 39, n. 8, p. 971-974, 1967.

WILLIAMS, P. E. V. Understanding the biochemical mode of action of yeast culture. In: LYONS, T. P. (Ed.). **Biotechnology in the feed industry. Proceedings of the Alltech's Fourth Annual Symposium**, Alltech Technical Publications, USA, p. 79-100, 1988.

WU, J. S. The microbiologist's function in developing action-specific microorganisms. In: LYONS, T. P. (Ed.). **Biotechnology in the feed industry.** Nicholasville: Alltech Technical Publications, 1997. p. 181-198.