



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE DO PARANÁ

CAMPUS LUIZ MENEGHEL

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

DANIEL SAMPAIO FERREIRA LIMA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA INCLUSÃO DE DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE ÓLEOS NA MITIGAÇÃO DE
METANO EM RUMINANTES**

**BANDEIRANTES, PR, BRASIL
2016**

DANIEL SAMPAIO FERREIRA LIMA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA INCLUSÃO DE
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÓLEOS NA
MITIGAÇÃO DE METANO EM RUMINANTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em
Agronomia, da Universidade Estadual do Norte do
Paraná, *Campus* Luiz Meneghel.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Augusto Alves da Silva
Coorientador: Prof. Dr. Thierry Ribeiro Tomich

BANDEIRANTES, PR, BRASIL
2016

S579p Silva, Diego Contiero da
Potencial poluidor de cemitério / Diego Contiero da Silva. –
Bandeirantes, 2016.
79 f. ilustr.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Teresinha Esteves da Silveira Reis.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Norte
do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel, 2016.

Banca: Dr^a. Teresinha Esteves da Silveira Reis, Dr. Luiz
Carlos Reis, Dr^a. Sonia Maria Nobre Gimenez. Suplentes: Dr.
Hatiro Tashima, Dr. Armando Castello Branco Junior.

1. Necrochorume. 2. Contaminação ambiental. 3.
Necrópolis. 4. Metais pesados. 5. Águas subterrâneas. I.
Universidade Estadual do Norte do Paraná. II. Título.

CDD - 363.7

DANIEL SAMPAIO FERREIRA LIMA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA INCLUSÃO DE
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÓLEOS NA
MITIGAÇÃO DE METANO EM RUMINANTES**

Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado em Agronomia, da Universidade
Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz
Meneghel.

Aprovada em:

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr Marcos Augusto Alves da Silva

UENP

Dr Petrônio Pinheiros Porto

UENP

Dr^a Emilyn Midori Maeda

UTFPR

Prof. Dr. Marcos Augusto Alves da Silva
Orientador
Universidade Estadual do Norte do Paraná,
Campus Luiz Meneghel

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e professores que tornaram tudo isso possível

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem ele nada disso seria possível. A Nossa Senhora Aparecida, minha primeira Mãe por me cobrir com seu manto, me proteger e ser fonte de luz para iluminar meu caminho.

Aos meus pais que sempre me deram força, incentivo e companheirismo e por serem o exemplo que sigo.

A todos os professores que fizeram parte da minha formação, em especial ao meu professor orientador Dr. Marcos Augusto Alves da Silva, aos professores Dr. Petrônio Pinheiro Porto e Dr. Marcelo Alves da Silva pela paciência, dedicação, disposição em me ajudar, pelos ensinamentos e acima de tudo por além de serem professores, orientadores, conselheiros, exemplos, serem grandes amigos que levo para toda a vida.

Aos pesquisadores da Embrapa Gado-de-Leite Dr. Luiz Gustavo Ribeiro Pereira e Dr. Thierry Ribeiro Tomich, pela orientação, ensinamentos e por todas as sugestões e imensa disposição para construção desse trabalho. A Embrapa Gado-de-Leite, por abrir as portas para que este trabalho tenha sido realizado.

Aos funcionários da Embrapa Gado-de-Leite, pela ajuda, por estarem sempre à disposição.

Aos amigos que conquistei na Embrapa, em especial Shirley e Baiano, por sempre estarem dispostos a ajudar, pela alegria e companheirismo.

A Ellen por sempre estar à disposição para ajudar no que precisei, pelo incentivo, companheirismo e apoio.

A Universidade Estadual do Norte de Paraná UENP/CLM por fazer parte da minha formação profissional e pessoal.

A Embrapa, FAPEMIG, CNPq e CAPES pelos recursos financeiros concedidos ao Projeto RumenGases, o qual este trabalho faz parte.

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO GERAL	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1. Suplementação Lipídica.....	13
2.2. Produção de metano.....	15
2.3. Degradabilidade in vitro – Técnica semi-automática de produção de gases ..	19
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivo geral.....	21
3.2. Objetivos específicos	21
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
5. AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA INCLUSÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÓLEOS NA MITIGAÇÃO DE METANO EM RUMIANTES	29
RESUMO.....	29
ABSTRACT	30
5.1. INTRODUÇÃO.....	31
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	32
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	35
5.4. CONCLUSÕES.....	42
5.5. REFERÊNCIAS	42

LIMA, D. S. F. **Avaliação *in vitro* da inclusão de diferentes concentrações de óleos na mitigação de metano em ruminantes.** 2016. Dissertação de Mestrado em Agronomia - Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel, Bandeirantes, 2016.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da inclusão de óleos na dieta sobre a cinética de fermentação, degradabilidade e produção de metano *in vitro* pela técnica de produção cumulativa de gases (PCG). Os tratamentos consistiram em níveis de inclusão (0%, 4%, 8% e 12%) de óleo de soja, óleo de amendoim, óleo de canola e óleo de girassol ao volumoso padrão (*Brachiaria brizantha*), utilizando delineamento inteiramente casualizado, com treze tratamentos e três repetições. A cinética de fermentação ruminal e a produção de metano foram avaliadas pela técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases. A cinética de fermentação ruminal *in vitro*, assim como a produção de metano, para os diferentes óleos e concentrações estudadas teve comportamento semelhante entre si, não havendo diferença estatística entre eles. Pode-se concluir que as diferentes fontes e concentrações de óleos não influenciaram a cinética de fermentação ruminal *in vitro* e a emissão de gases, porém as inclusões dos diferentes óleos reduziram a emissão de CO₂ e CH₄ em todas as porcentagens. No entanto ainda há a necessidade de mais pesquisas na área para elucidar os limites entre efeitos positivos e negativos da adição de óleo na dieta de ruminantes.

Palavras-chave: Amendoim, Canola, Soja, Girassol, Produção de gases, Suplementação lipídica.

LIMA, D. S. F. ***In vitro* evaluation of inclusion of different concentrations of oils in methane mitigation in ruminants.** 2016. Dissertação de Mestrado em Agronomia - Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel, Bandeirantes, 2016.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of inclusion of oils in the diet on the kinetics of fermentation, degradability and methane production *in vitro* by the technique of cumulative gas production (PCG). The treatments consisted of inclusion levels (0%, 4%, 8% and 12%) of soybean oil, peanut oil, canola oil and sunflower oil to standard forage (*Brachiaria*), using a completely randomized design with thirteen treatments and three replications. Ruminant fermentation kinetics and methane production was assessed by semi-automatic *in vitro* gas production technique. Ruminant fermentation kinetics *in vitro*, as well as the production of methane, oil and for different concentrations studied had similar behavior to each other, with no statistical difference between them. It can be concluded that the different sources and oil concentrations did not affect ruminal fermentation kinetics *in vitro* and greenhouse gas emissions, but the inclusion of different oils reduced the emission of CO₂ and CH₄ in all percentages. However there is still the need for more research in this area to clarify the boundaries between positive and negative effects of adding oil in the diet of ruminants.

Key-words: Peanut, canola, soybean, sunflower, gas production, lipid supplementation.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A agropecuária apresenta reconhecida importância na produção de alimentos e geração de renda, e atualmente vem sendo muito discutido sobre o impacto ambiental das atividades pecuárias e agrícolas, principalmente relativo às mudanças climáticas.

A produção animal ocupa posição de destaque na economia brasileira, sendo importante fornecedor de proteína animal para a população, sendo o Brasil líder mundial nas exportações de carne bovina e o quinto maior produtor de leite do mundo, com produção em 2014 de 36 milhões de litros de leite, estando atrás apenas da União Europeia, EUA, Índia e China. A Pecuária de corte responde por cerca de 11% do Produto Interno Bruto (PIB) do agronegócio nacional, produzindo em 2014 em torno de 9,5 milhões de toneladas de carne bovina e exportou mais de 1,5 milhões de toneladas (IBGE, 2015).

O impacto ambiental das atividades pecuárias e agrícolas, principalmente relativo às mudanças climáticas, tem sido muito debatido por especialistas. A pecuária brasileira vem sendo criticada por emitir quantidades significativas de gases de efeito estufa (GEE), uma vez que é responsável por aproximadamente 11% das emissões de gases de efeito estufa e a ineficiência do modelo de exploração tem gerado maiores quantidades destes por quilo de carne e/ou de leite produzidos (IPCC, 2007). A contribuição relativa dos diferentes GEE de origem antrópica no mundo é de 76% de CO₂ enquanto o CH₄ contribui com 14%.

As emissões de GEE provenientes da agropecuária cresceram 160% desde 1970, mas nos últimos três anos têm se mantido praticamente estáveis na casa de 406 milhões a 418 milhões de toneladas de CO₂ (AZEVEDO, 2015). Os principais contribuintes para emissões no setor são o metano emitido pela fermentação entérica na pecuária e no manejo de dejetos animais, e o uso de fertilizantes nitrogenados. As grandes oportunidades de redução de emissões diretas da atividade agropecuária estão no manejo das pastagens que, quando em estado de degradação, perdem biomassa do solo e

emitem carbono e, quando bem manejadas, tornam-se sumidouros de carbono podendo compensar as emissões de metano. Além disso, o aumento da precocidade do abate dos animais e adaptações na dieta animal pode contribuir para reduzir as emissões.

O metano além de estar diretamente relacionado com a eficiência da fermentação ruminal e, conseqüentemente, pela perda de energia nos sistemas de produção, se caracteriza como um importante gás de efeito estufa, contribuindo com cerca de 15% do aquecimento global. Deve-se considerar que os ruminantes respondem pela produção de 22% desse gás, sendo 3,3% do aquecimento global devido à produção de metano pelos mesmos (PEREIRA, 2013).

O conhecimento dos mecanismos de síntese de metano e dos fatores que afetam sua produção é importante, visto que, além de ser um importante gás de efeito estufa o metano também é responsável por uma perda de 2 a 10 % da energia bruta ingerida. O desafio enfrentado no sistema produtivo de ruminantes, para atenuar a produção de metano (metano/kg de leite, carne ou lã), é possibilitar maior eficiência produtiva e redução da contribuição negativa da pecuária para o aquecimento global (BEAUCHEMIN, McGINN, 2014).

A manipulação ruminal através de substâncias introduzidas na ração ou naturalmente presentes nos alimentos é uma alternativa para aumentar a eficiência de utilização das dietas consumidas pelos ruminantes, propiciando a conversão dos nutrientes consumidos em produtos (carne e leite), além de reduzir os impactos dos sistemas de produção no ambiente (PEDREIRA.et al., 2005)

O emprego da suplementação lipídica na dieta de ruminantes vem sendo utilizada como estratégia de mitigação de metano e tem se mostrado promissora para o aumento da eficiência no sistema de produção animal, uma vez que podem promover a redução de CH₄ por ação deletéria sobre as bactérias metanogênicas e consumo do H₂ no processo de biohidrogenação (MACHMULLER et al., 2000). No entanto, essa suplementação possui um elevado custo financeiro. Por esse motivo, foi utilizado oleaginosas presentes na região.

2. REVISÃO DE LITERATURA

As oleaginosas são plantas que contém um alto teor de óleo, tanto nas suas sementes (soja, colza/canola, girassol) como nos seus frutos (palma, babaçu, coco), podendo ser utilizadas para a produção de óleo vegetal. Além disso, algumas dessas plantas apresentam, após a extração do óleo, qualidades nutricionais, demonstrando potencial para a utilização na alimentação animal (ABDALLA et al., 2008).

O beneficiamento de produtos agroindustriais produz resíduos e subprodutos, e segundo Lima (2005) se totalmente convertidos em produtos de origem animal por bovinos poderiam produzir 750 bilhões de litros de leite ou 4,5 milhões de toneladas de carne.

Sendo o Brasil um país de clima tropical o que facilita o cultivo de várias espécies oleaginosas, nativas ou manejadas, com grande potencialidade para todas as regiões do território nacional. As principais oleaginosas cultiváveis no Brasil são: a soja (*Glycine max*), o girassol (*Helianthus annuus*), a mamona (*Ricinus communis*), o dendê (*Elaeis guineensis*), o pinhão-manso (*Jatropha curcas*), o nabo forrageiro (*Raphanus sativus*), o algodão (*Gossypium spp. L.*), o amendoim (*Arachis hypogaea*), a canola (*Brassica napus*), o gergelim (*Sesamum orientale*), o babaçu (*Orrbignya speciosa*) e a macaúba (*Acrocomia aculeata*) (ABDALLA et al., 2008). Na Tabela 1 são apresentadas as características de algumas plantas oleaginosas com potencial para produção de biodiesel e alimentação animal.

Tabela 1- Ciclo produtivo, teor de óleo, produtividade e produção de óleo de algumas leguminosas.

Espécie	Ciclo (dias)	Teor de óleo (%)	Produtividade (kg/ha/ano)	Produção de óleo (kg/ha/ano)
Amendoim	120-180	49	3001	1470
Canola	130-140	38	1506	572
Girassol	90-140	42	1599	672
Soja	115-145	19	2842	540

Fonte: adaptado CONAB, 2014.

A maioria das culturas utilizadas para a produção de óleo são de ciclos relativamente curtos, 90 a 180 dias, o que potencializa a utilização em rotação de culturas, reforma de áreas degradadas, contribuindo ainda com o sequestro de carbono pelos solos em plantio direto (BAYER et al.,2006).

O Brasil é um grande produtor de soja, possuindo produção média de 100 milhões de toneladas ao ano. A produção nacional de soja alcançou a marca de 96,2 milhões de toneladas, número registrado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Pesca (MAPA) na safra 2014-2015.

As oleaginosas utilizadas na alimentação animal apresentam particularidades quanto ao fornecidos aos animais devido aos fatores tóxicos ou antinutricionais, quantidades máximas dentro das formulações das dietas e práticas de armazenamento (PALMQUIST, MATTOS, 2006). Segundo Church (1993), existe uma grande preocupação quanto ao fornecimento de lipídeos para ruminantes, pois em grandes quantidades pode ser tóxico para flora microbiana. Além disso, alimentos com teores de extrato etéreo elevado como as tortas com 6% a 8%, têm como preocupação a possibilidade de rancificação durante o armazenamento prolongado.

2.1. Suplementação Lipídica

A suplementação da dieta de ruminantes com lipídios tem sido utilizada para aumentar a densidade energética da dieta, evitando os efeitos nocivos de altas quantidades de concentrados ricos em amido, sobre o ambiente ruminal (DOREAU, CHILLIARD, 1997), e para manipular a fermentação ruminal através da alteração na digestão e absorção dos nutrientes. No entanto, gorduras insaturadas, como o óleo de soja, apresentam efeitos sobre a permeabilidade da membrana microbiana, inibindo principalmente a atividade de bactérias gram-positivas, modificando a fermentação ruminal. Isto resulta em alterações das proporções dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) produzidos, com aumento de propionato e redução nas concentrações de acetato, metano e amônia (NAGARAJA et al., 1997).

O consumo de energia é a principal limitação para a produção

de leite, sendo determinado pela concentração energética da dieta e por sua taxa de consumo. Com o objetivo de atender às necessidades energéticas de vacas em lactação, o uso de lipídios na alimentação desses animais têm sido recomendado para aumentar a densidade energética das dietas e evitar os efeitos prejudiciais de altas quantidades de concentrados ricos em amido sobre o ambiente ruminal (DOREAU, CHILLIARD, 1997).

Vacas leiteiras possuem alta demanda energética, principalmente no período de transição que corresponde de três semanas que antecede o parto a três semanas após o parto (GRUMMER, 1995). Devido à incapacidade de ingestão de alimentos e nutrientes suficientes, estes animais entram em balanço energético negativo. A utilização de fontes de gordura suplementar na dieta tem sido prática comum na alimentação de vacas leiteiras, principalmente por permitir melhora no perfil energético desses animais. É utilizada durante o pós-parto para aumentar a densidade calórica da dieta, sem reduzir o conteúdo de fibras, e promover aumento da ingestão de energia e produção de leite (GRUMMER, 2004).

Os ácidos graxos insaturados têm a propriedade de se adsorverem rapidamente pelas superfícies das células bacterianas inibindo o contato direto das células microbianas ao substrato ou a ligação das celulas bacterianas a celulose, diminuindo a captação de aminoácidos e a produção de ATP pela bactéria (GALBRAITH, MILLER, 1973). Isso leva a uma redução na digestão dos nutrientes e a um decréscimo no crescimento microbiano (HENDERSON et al., 1973; MACZULAK et al., 1981). O crescimento de bactérias celulolíticas é mais reduzido do que as amilolíticas (GALBRAITH et al., 1971; MACZULAK et al., 1981).

De acordo com Nagaraja et al. (1997), o efeito mais consistente na população microbiana ocorrida com a suplementação de lipídios é o considerável decréscimo na população de protozoários ciliados no rúmen. Substancial redução na contagem de protozoários no rúmen tem sido obtida com óleos de linhaça, coco e canola (MACHMULLER, KREUZER, 1999; DOHME et al., 2000; MACHMULLER et al., 2000), assim como ácido láurico, linoléico, linolênico e oléico (MATSUMOTO et al., 1991). Bovinos consumindo dietas a base de grãos e suplementados com 200 g/animal/dia de óleo de girassol rico em ácido linoléico reduziu a população de protozoários em 42%. O

decréscimo no número de protozoários, geralmente está associado a um aumento no número de bactérias ruminais e diminuição na concentração de amônia (JOUANY, 1996).

Além disso, a utilização de óleo na alimentação animal pode levar a redução no consumo de matéria seca e na fermentação ruminal da matéria orgânica e da fibra (JENKINS, 1993), aumento na produção de propionato (HONING et al., 1981) e à transferência do hidrogênio livre para a biohidrogenação dos ácidos graxos insaturados, diminuindo a disponibilidade de H₂ para síntese de metano. A utilização de lipídios para a manipulação ruminal pode representar uma vantagem em relação aos ionóforos, por persistir o efeito mesmo após longos períodos de suplementação (JENKINS, 1993; JOHNSON, JOHNSON, 1995).

Muitos pesquisadores têm atribuído a redução na produção de metano à suplementação lipídica, principalmente associada a um decréscimo no substrato fermentável no rúmen do que a um efeito direto sobre a metanogênese (HONING et al., 1981; JOHNSON, JOHNSON, 1995).

Machmüller et al. (1998) observaram que em condições *in vitro*, a produção de metano foi diminuída em 43% e 57% em dietas com 3% e 6% de óleo de coco, respectivamente, enquanto a máxima redução na produção de metano conseguida com semente de girassol e linhaça foi de 40%. Em outro estudo, Lovett et al. (2003) constataram que a suplementação com óleo de coco reduziu a produção de metano, a população de protozoários e o consumo de matéria seca sem afetar o desempenho animal, indicando aumento na eficiência alimentar dos animais ao longo de todo o período experimental.

No entanto, os resultados de estudos de desempenho com suplementação de gordura são bastante variados, provavelmente devido ao efeito de depressão no consumo causado pela presença de lipídeos no rúmen (NRC, 2001).

2.2. Produção de metano

O conhecimento dos mecanismos de síntese de metano pelos ruminantes, assim como os fatores que afetam sua produção é de suma importância para uma melhor eficiência do sistema produtivo. A fermentação

dos componentes dietéticos pela microbiota ruminal resulta na formação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), principalmente o acético, propiônico e butírico, usados pelos ruminantes como fonte de energia, e produção de gases (CO_2 e CH_4), eliminados por meio da eructação (MARTIN et al., 2008)

Segundo Jonhson & Jonhson (1995), existem dois mecanismos que alteram a emissão de metano ruminal. O primeiro é a quantidade de carboidrato fermentado no retículo-rumem, onde a interação dieta-animal altera o balanço entre a taxa de carboidrato fermentado e o fluxo de passagem da digesta. O segundo mecanismo regula o suprimento de H_2 e a subsequente produção de metano através da taxa de AGV produzido. Em particular a relação entre os ácidos acético e propiônico produzido. Essa relação tem grande impacto sobre a emissão de metano. Por exemplo, se for produzido apenas ácido propiônico a perda energética através do metano seria igual a 0%. Ao se modificar a fermentação para produzir apenas ácido acético, a perda energética passa para aproximadamente 33% (WOLIN, MILLER, 1988).

O fornecimento de forragem de alta qualidade, seja através de pasto com menor quantidade de fibra e grande quantidade de carboidratos solúveis, seja gramíneas consorciadas com leguminosas ou pasto em início de estágio vegetativo, podem reduzir a emissão de CH_4 (BEAUCHEMIN et al. 2008; ULYATT et al., 2002). O aumento da qualidade da forragem tende a aumentar a ingestão voluntária e reduzir o tempo de retenção ruminal, promovendo redução da energia da dieta transformada em CH_4 , aumentando a eficiência do sistema (BLAXTER, CLAPPERTON, 1965).

O metano entérico é derivado da atividade das *Archaeas* metanogênicas, que utilizam, principalmente, o H_2 produzido durante a fermentação microbiana do alimento como fonte de energia para a produção de metano. O formato também pode ser utilizado pelas metanogênicas como precursor do metano, contribuindo com aproximadamente 18% da produção (HUNGATE et al., 1966).

A produção de metano depende do balanço de H_2 no rúmen, sendo influenciada pelas taxas de produção de acetato e propionato. A produção de metano pelas bactérias ruminais e intestinais correspondem a uma perda energética de até 13% em relação à energia do alimento ingerido (JOHNSON; JOHNSON, 1995).

Dentre as principais variáveis que influenciam a produção de metano em ruminantes, podemos citar os fatores nutricionais que estão acoplados a quantidade e tipo de carboidratos na dieta, nível de ingestão de alimento, presença de ionóforos ou lipídios (McALLISTER et al.; 1996). Os fatores metabólicos, como a taxa de passagem da digesta, fatores ambientais ligados à temperatura, manejo dos animais, além de estado fisiológico, tamanho corporal e principalmente a população de microrganismos ruminais como protozoários e bactérias, também influenciam a produção de metano (PRIMAVESI et al.; 2004^a; PRIMAVESI et al., 2004^b).

O metano é um produto final normal da fermentação ruminal e por constituir uma perda no potencial produtivo energético tem sido estudado por décadas (HOWDEN, REYENGA, 1999).

A produção do CH₄ ocorre de forma natural, na ausência completa de oxigênio, pelo processo de degradação dos carboidratos, principalmente na fermentação dos carboidratos estruturais, pela simbiose entre ruminante hospedeiro e a microflora rumino-reticular, composta por bactérias, archaea, protozoários e fungos (AKIN, 1993). No ambiente ruminal é produzido de 87 a 92% de todo o CH₄ emitido pelos bovinos (MURRAY et al., 1976; TORRENT, JOHNSON, 1994).

Verifica-se uma relação linear entre a produção de metano e o consumo de matéria seca (27 e 34g de metano/kg de MS, para animais com dietas com alta concentração de grãos e forragens tropicais, respectivamente), sendo que o mesmo não ocorre quando comparamos a emissão de metano com o ganho de peso vivo (HOWDEN, REYENGA, 1999).

A fermentação dos carboidratos no rumem tem como produtos finais os ácidos graxos voláteis (AGV) propiônico, acético e butírico, e libera entre outros os gases dióxido de carbono (CO₂), hidrogênio (H₂) e amônia (NH₃). O CO₂ produzido serve como fonte de carbono (C) e o H₂ como receptor de elétrons, fazendo parte da via dominante da metanogênese ruminal (MORGAVI et al., 2010)

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) destacaram o consumo de alimento, quantidade de grãos na dieta, tipos de carboidratos, tamanho de partículas,

estágio de maturação das forrageiras, digestibilidade dos alimentos, manipulação da flora microbiana ruminal, adição de lipídios e ionóforos como componentes envolvidos na manipulação da produção de metano.

De acordo com Martin et al. (2008), as vias metabólicas envolvidas na formação e utilização do H_2 , bem como a população metanogênica são importantes fatores que devem ser levados em consideração no desenvolvimento de estratégias para controlar a emissão de metano por ruminantes.

A diminuição da liberação de H_2 pode ser obtida diminuindo-se o fluxo total da matéria orgânica através da fermentação ruminal, ou pela manipulação do balanço da relação acetato : propionato:butirato, conduzindo-se a fermentações que sejam consumidoras líquidas de prótons (HEGARTY, 1999).

Alguns pesquisadores sugerem a melhoria da qualidade da dieta, das pastagens e a suplementação como forma de diminuir a emissão do CH_4 por consequência da redução do ciclo de produção, aumentando a eficiência alimentar e reduzindo a produção de metano por unidade de produto (carne, leite) (PEDREIRA et al., 2005). Segundo Guimarães et al. (2010), melhorando a eficiência do sistema de produção a emissão de metano será proporcionalmente reduzida, uma vez que mais produto (carne, leite, lã, etc.) será produzido em relação aos recursos utilizados.

O uso de grãos e alimentos concentrados, processamento e conservação de forragens, leguminosas, taninos e saponinas, óleos e gorduras saturadas e insaturadas, ionóforos, nitrato, leveduras, malato e fumarato, óleos essenciais e extratos vegetais, têm sido estudado com o objetivo de reduzir as emissões de metano (BERNDT, 2010).

De acordo com Machado et al. (2011), a substituição de alimentos com maiores concentrações de carboidratos fibrosos (CF) por carboidratos não fibrosos (CNF), implica no desenvolvimento de bactérias amilolíticas e, por conseguinte em mudanças na produção dos AGCC, promovendo aumento na proporção do propionato e redução do acetato. Esta condição provoca diminuição na produção de metano devido à redução da disponibilidade de H_2 no rúmen.

A utilização de ionóforos, como a monensina, na dieta de

animais ruminantes também pode influenciar a produção de CH₄, isto porque os ionóforos selecionam as bactérias gram-negativas produtoras de propionato em detrimento as gram-positivas produtoras de acetato e butirato (geram CO₂ e H₂ para a síntese de CH₄), diminuindo assim a população de *Archaeas* metanogênicas. Porém, os ionóforos não sustentam a metanogênese por um longo período, provavelmente devido à habilidade de adaptação da microflora ruminal (MOOS, 1993; SAUER et al., 1998).

Sendo assim, é difícil encontrar uma única estratégia alimentar que seja eficiente no processo de mitigação de metano entérico. Para a obtenção de um melhor resultado na redução da emissão do CH₄, além da utilização de aditivos alimentares com potencial de mitigar metano, podem-se adotar várias medidas que em conjunto tornam-se mais eficientes (MACHADO et al., 2011).

2.3. Degradabilidade *in vitro* – Técnica semi-automática de produção de gases

Existem diversas técnicas e procedimentos utilizados para estimar a digestibilidade e degradabilidade dos alimentos, predizendo, assim, o valor nutritivo das forrageiras. Os ensaios *in vivo* envolvendo produção animal e digestibilidade são os métodos mais precisos para determinar o valor nutricional dos alimentos. Entretanto, os mesmos requerem considerável uso de animais, alimentos, mão-de-obra, tempo e alto custo financeiro (MAURICIO et al., 2003).

As metodologias *in vitro* de avaliação de alimentos vêm sendo utilizadas como alternativas para as técnicas *in vivo* para a avaliação do valor nutricional de forrageiras. Estas técnicas possuem menor custo, menor tempo de execução e melhor controle das condições experimentais (RIBEIRO et al., 2014).

A técnica de Tilley e Terry (1963) era capaz de estimar a digestibilidade *in vitro* da matéria seca com boa precisão, mas com uma mínima referência à dinâmica da fermentação ruminal. As técnicas *in vitro* geralmente são conduzidas em duas fases, onde a primeira, chamada de fase

fermentativa, simula a digestão que ocorre no rúmen e, portanto, pode ser empregada para a predição da digestão ruminal dos alimentos. Todavia, não descreve a cinética, mas apenas a extensão da digestão.

Tomich et al. (2006) propôs adaptações metodológicas com objetivo de prever a cinética de degradação ruminal da matéria seca de volumosos. Para tal, comparou os resultados da cinética de degradação ruminal obtidos pela técnica *in situ* aos resultados obtidos pela fase fermentativa da técnica de Tilley e Terry (1963) empregando diferentes tempos de incubação das amostras de forrageiras, demonstrando o potencial da técnica adaptada para determinar os parâmetros da cinética de degradação ruminal da matéria seca de volumosos e destacaram vantagens sob a técnica *in situ* devido a mais alta capacidade de análise da metodologia *in vitro*, indicando a aplicação da metodologia adaptada para a execução de estudos que requerem análise de grande número de substratos em um mesmo experimento.

Por volta do ano 2000 começou a ser adotada a metodologia de produção de gases sugerida por Maurício et al. (1999) com a utilização de transdutor manual para a mensuração dos gases de fermentação em intervalos regulares. Após as adaptações para avaliação de forrageiras tropicais sugeridas por Maurício et al. (2003), a metodologia passou a ser empregada em ensaios com grande número de amostras, permitindo a caracterização da extensão e cinética da fermentação ruminal *in vitro* da fração carboidrato de recursos forrageiros tropicais.

A metodologia foi importante como ferramenta auxiliar para a determinação do ponto ótimo de ensilagem, fenação ou de uso na forma verde das principais espécies forrageiras (PEREIRA et al., 2005; PIRES et al., 2006; CASTRO et al., 2007; JAYME et al., 2009). Também vem sendo utilizada para a avaliação de mistura de alimentos (FARIA et al., 2008) e de efeitos associativos, já que a técnica permite a incubação de mais de um alimento em um mesmo frasco de fermentação. Recentemente, a técnica vem sendo utilizada para a avaliação nutricional de forrageiras implantadas na forma de sistemas de integração lavoura pecuária floresta, como a *Brachiaria brizantha*, por meio da cinética de fermentação ruminal *in vitro* (SOUSA et al., 2011).

A partir do começo desta década, a técnica *in vitro* semi-

automática de produção de gases vem sendo adaptada para permitir a avaliação da emissão de metano. Para tal, além da mensuração do volume de gases produzidos e da matéria seca / orgânica degradada (método gravimétrico) os metabólitos da fermentação vêm sendo quantificados (ácidos graxos voláteis, dióxido de carbono, metano, nitrogênio amoniacal). Este detalhamento metodológico representa um dos desafios da técnica *in vitro* semi-automática, já que a produção dos gases é influenciada pela relação estequiométrica dos ácidos graxos de cadeia curta produzidos. As análises das concentrações de metano e dióxido de carbono vêm sendo realizadas por meio de cromatografia gasosa. Os resultados gerados poderão complementar os parâmetros agronômicos, a composição bromatológica e os testes biológicos já realizados, contribuindo para o desenvolvimento de técnicas de manejo e desenvolvimento de genótipos forrageiros superiores que apresentem potencial para a mitigação de gases de efeito estufa (GONÇALVES et al., 2012).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos da utilização de óleos de oleaginosas na mitigação de metano, cinética da fermentação ruminal e degradabilidade da matéria seca.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a cinética de fermentação *in vitro*;
- Avaliar a produção de metano *in vitro*;
- Avaliar a degradabilidade da matéria seca *in vitro*.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, A.L et al. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.260-258, 2008.

AKIN, D.E. **Perspectives of cell wall biodegradation – session synopsis**. In JUNG, H.G.; BUXTON, D.R.; HATFIELD, R.D.; RALPH, J. (eds.) Forage cell wall structure and digestibility, Wisconsin. 1993.

BAYER, C.; LOVATO, T.; DIECKOW, J. et al. A method for estimating coefficients of soil organic matter dynamics based on long-term experiments. **Soil and Tillage Research**, 91:217-226, 2006.

BEAUCHEMIN, K.A.; KREUZER, M.; O'MARA, F. et al. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, 48, 21–27.

BEAUCHEMIN, K.A.; MCGINN, S.M. Methane emissions from beef cattle: Effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. **Journal of animal Science**, v. 84, n. 6, 2014.

BERNDT, A. **Impacto da pecuária de corte brasileira sobre os gases do efeito estufa**. In: 7º Simpósio de Produção de Gado de Corte. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2010.

BLAXTER, K.L.; CLAPPERTON, L. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. **The British Journal of Nutrition**, v19, p 511–522, 1965.

CASTRO, G.H.F.; GRAÇA, D.S.; GONÇALVES, L.C. et al. Cinética de degradação e fermentação ruminal da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu colhida em diferentes idades ao corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.6, p.1538-1544, 2007.

CHURCH, D. C. **El rumiant: fisiologia digestiva y nutrición**. Zaragoza: Acribia, 1993. 652p.

CONAB - Companhia Nacional de abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira: **grãos, décimo primeiro levantamento**. Brasília: Conab, 2014. 87p. Disponível em:

<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_08_07_08_59_54_boletim_graos_agosto_2014.pdf>. Acesso em: Fevereiro de 2016.

DOHME, F.; MACHMÜLLER, A.; WASSERFALLEN, A. et al. 2000. Comparative efficiency of fats rich in medium chain fatty acids to suppress ruminal methanogenesis as measured with RUSITEC. **Canadian Journal of Animal Science**. 80:473–482.

DOREAU, M.; CHILLIARD, Y. 1997. Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. **British Journal of Nutrition**. 78, S15–S35.

FARIA, B.N.; REIS, R.B.; MAURÍCIO, R.M.; et al. Efeitos da adição de propilenoglicol ou monensina à silagem de milho sobre a cinética de degradação dos carboidratos e produção cumulativa de gases in vitro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, p. 896-903, 2008.

GALBRAITH, H.; MILLER, T.B.; PATON, A.M. et al. Antibacterial activity of long-chain fatty acids and the reversal with calcium, magnesium, ergocalciferol and cholesterol. **Journal of Applied Bacteriology**, v.34, p.803-813, 1971.

GALBRAITH, H.; MILLER, T.B. Effect of long chain fatty acids on bacterial respiration and amino acid uptake. **Journal of Applied Bacteriology**, v.36, p.659-675, 1973.

GRUMMER, R. R. 1995. Impact in changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition cow. **Journal Animal Science**, 73:2820- 2833.

GRUMMER, R. R. **Gordura da dieta: Fonte energética e/ou regulador metabólico**. In: NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 8., 2004, Uberlândia. Anais... Uberlândia: CONAPEC Jr - UNESPBOTUCATU, 2004. p.83-108.

GUIMARÃES JÚNIOR, R.; MARCHADO, R. L.; VILELA, L. et al. **Produção**

animal na integração lavoura-pecuária. In: Simpósio Mineiro de Nutrição de Gado de Leite, 5., 2010, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: UFMG, 2010. p. 111-123.

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

HENDERSON, C. The effects of fatty acids on pure cultures of rumen bacteria. **Journal of Agricultural Science**, v.81, p.107-112, 1973.

HONING, Y.V.D.; WIEMAN, B.J.; STEG, A. et al. The effect of fat supplementation of concentrates on digestion and utilization of energy by productive dairy cattle. **Netherlands Journal of Agricultural Science**, v.29, p.79, 1981.

HOWDEN, S. M.; REYENGA, P. J. Methane emissions from Australian livestock: implications of the Kyoto Protocol. **Australian Journal Agricultural Research**, v. 50, p.1285 – 1291. 1999.

HUNGATE, R. E. **The Rumen and Its Microbes**. Academic Press, New York, 1966.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA (IBGE). Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: janeiro de 2015.

IPCC - Intergovernmental Panel on Climate Change. Fourth Assessment Report (AR4): Mitigation of Climate Change. Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 2007. Disponível em: <http://www.ipcc.ch/publications_and_data/ar4/wg3/en/contents.html > Acesso em: Fevereiro de 2016.

JAYME, D.G.; GONÇALVES, L.C.; MAURÍCIO, R.M. et al. Avaliação pela técnica semi-automática de produção de gases (RTP) das silagens de quatro genótipos de girassol (*Helianthus annuus*) (Rumbosol 91, Victoria 627, Victoria 807 e Mycogen 93338). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, p.621-627, 2009.

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

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

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

LIMA, M.L.M. **Uso de subprodutos da agroindústria na alimentação de bovinos**. IN: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 42., 2005, Goiânia. **Anais...** SBZ: UFG, 2005. p.322-329.

LOVETT, D.; LOVELL, S.; STACK, L. et al. Effect of forage/concentrate ratio and dietary coconut oil level on methane output and performance of finishing beef heifers. **Livestock Production Science**, v.84, p.135-146, 2003.

MACHADO, F. S., PEREIRA, L. G. R. P., JÚNIOR, R. G. J. et al. **Emissões de metano na pecuária: conceitos, métodos de avaliação e estratégias de mitigação** – Juiz de Fora : Embrapa Gado de Leite, 2011. 92 p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 147).

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

MACHMÜLLER, A.; OSSOWSKI, D.A.; KREUZER, M. Comparative evaluation of the effects of coconut oil, oilseeds and crystalline fat on methane release, digestion and energy balance in lambs. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.85, p. 41-69, 2000.

MACHMÜLLER, A.; OSSOWSKI, D.A.; WANNER, M. 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.

MARTIN, C.; ROUEL, J.; JOUANY, J.P. et al. 2008. Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed,

or linseed oil. **Journal of Animal Science**. 86, 2642–2650.

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

MAURICIO, R. M. et al. Relação entre pressão e volume para implantação da técnica in vitro semi-automática de produção de gases na avaliação de forrageiras tropicais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 2, p.1013-1020, 2003.

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

MACZULAK, A.E.; DEHORITY, B.A.; PALMQUIST, D.L. Effect of long-chain fatty acids on growth of rumen bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.42, p.856-862, 1981.

MATSUMOTO, M.; KOBAYASHI, T.; TAKENAKA, A. et al. Defaunation effects of medium-chain fatty acids and their derivatives on goat rumen protozoa. **Journal of Genetic Applied and Microbiology**, v.37, p.439-445, 1991.

MILLER, T.L. Ecology of methane production and hydrogen sink in the rumen. In: ENGELHART, 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.

MORGAVI, D. P.; FORANO, E.; MARTIN, C. et al. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. **Animal**, v 4,p 1024–36, 2010.

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

MURRAY, A.R.; BRYANT, A. M.; LENG, R.A. 1976. Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. **British Journal of Nutrition**, v36:p 1- 14, 1976.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7.rev.ed. Washinton, D.C.: 2001. 381p.

NAGARAJA, T.G.; NEWBOLD, C.J.; VAN NEVEL, C.J. Manipulation of ruminal fermentation. In: HOBSON, P.N.; STWART, C.S. **The rumen microbial ecosystem**. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1997. p.523-632.

PALMQUIST, D.L.; MATTOS, W.R.S. **Metabolismo de lipídeos**. In: BERCHIELLI, T.T. et al. *Nutrição de ruminantes*. Jaboticabal: FUNEP, 2006. Cap.10, p.287-310.

PEDREIRA, M.S.; OLIVEIRA, S.G.; BERCHIELLI, T.T.; PRIMAVESI, O.. Aspectos relacionados com a emissão de metano de origem ruminal em sistenas de produção de bovinos. (*Ruminal methane emission related aspects in cattle production systems*) **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 3, p. 24-32, 2005 Printed in Brazil ISSN: 1517-784X.

PEREIRA, L.G.R; MAURÍCIO, R.M.; GONÇALVES, L.C; et al. Avaliação das silagens de girassol (híbrido m734) obtidas em diferentes épocas de ensilagem pela técnica in vitro semi-automática de produção de gases. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, p. 276-283, 2005.

PEREIRA, L.G.R. Métodos de avaliação e estratégias de mitigação de metano entérico em ruminantes. **Revista Colombiana de Ciências Pecuárias**, 26:264-277, 2013.

PIRES, D.A.A.; GONÇALVES, L.C; RODRIGUES, J.A.S. et al. Qualidade e valor nutritivo das silagens de três híbridos de sorgo (*Sorghum bicolor* L.) colhidos em diferentes estádios de maturação. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.5, p.53-55, 2006.

PRIMAVESI, O. **Técnica do gás traçador SF6 para medição de campo do metano ruminal em bovinos: adaptações para o Brasil**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2004^a.

PRIMAVESI, O.; FRIGHETTO, R.T.S.; PEDREIRA, M.S. et al. Metano entérico

de bovinos leiteiros em condições tropicais brasileiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.277–283, 2004^b.

RIBEIRO, A.F. et al. Chemical composition, in vitro digestibility and gas production of *Brachiaria* managed under different forage allowances. **Italian Journal of Animal Science**. Volume 13:3034, 2014.

SAUER, F.D.; FELLNER, V.; KINSMAN, R. 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.

SOUSA, L.F.; MAURÍCIO, R.M.; GONÇALVES, L.C. et al. Cinética de fermentação ruminal in vitro da forrageira *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em sistema silvipastoril. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, p.382-391, 2011.

TILLEY, J. M. A.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the digestion of forage crops. **The Journal of the British Grassland Society**, v.18. p.104-111. 1963.

TOMICH, T.R; PEREIRA, L.G.R.; GUIMARÃES JÚNIOR, R. et al. **Adaptação de uma técnica *in vitro* para descrição da cinética de degradação ruminal da matéria seca de volumosos**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2006, 4p. (Embrapa Pantanal, Comunicado Técnico, 57).

TORRENT, J.; JOHNSON, D.E. **Methane production in the large intestine of sheep**. In Aguilera, J.F. (compiler). Energy metabolism of farm animals: proceedings of the 13th Symposium. Mojácar, Spain, p 391-394, 1994.

ULYATT, M.J.; LASSEY, K.R.; SHELTON, I.D. et al. Methane emission from dairy cows and wether sheep fed subtropical grass-dominant pastures in midsummer in New Zealand. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v45, p227–234, 2002.

WOLIN, M.J.; MILLER, T.L. **Microbe-microbe interactions**. In: HOBSON, P.N. (Ed.) The rumen microbial ecosystem. New York: Elsevier, 1988. p.343-359.

5. AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA INCLUSÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÓLEOS NA MITIGAÇÃO DE METANO EM RUMIANTES

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da inclusão de óleos na dieta sobre a cinética de fermentação, degradabilidade e produção de metano *in vitro* pela técnica da produção cumulativa de gases (PCG). Os tratamentos consistiram em níveis de inclusão (4%, 8% e 12%) de óleo de soja, óleo de amendoim, óleo de canola e óleo de girassol ao volumoso padrão (*Brachiaria brizantha*), utilizando delineamento inteiramente casualizado, com treze tratamentos e três repetições. A cinética de fermentação ruminal e a produção de metano foram avaliadas pela técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases. A cinética de fermentação ruminal *in vitro*, assim como a produção de metano, para os diferentes óleos e concentrações estudadas teve comportamento semelhante entre si, não havendo diferença estatística entre eles. Pode-se concluir que as diferentes fontes e concentrações de óleos não influenciaram a cinética de fermentação ruminal *in vitro* e a emissão de gases, porém as inclusões dos diferentes óleos reduziram a emissão de CO₂ e CH₄ em todas as porcentagens. No entanto ainda há a necessidade de mais pesquisas na área para elucidar os limites entre efeitos positivos e negativos da adição de óleo na dieta de ruminantes.

Palavras-chave: Amendoim, Canola, Soja, Girassol, Produção de gases, Suplementação lipídica.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of inclusion of oils in the diet on the kinetics of fermentation, degradability and methane production in vitro by the technique of cumulative gas production (PCG). The treatments consisted of inclusion levels (4%, 8% and 12%) of soybean oil, peanut oil, canola oil and sunflower oil to standard forage (*Brachiaria*), using a completely randomized design with thirteen treatments and three replications. Ruminant fermentation kinetics and methane production was assessed by semi-automatic vitro gas production technique. Ruminant fermentation kinetics in vitro, as well as the production of methane, oil and for different concentrations studied had similar behavior to each other, with no statistical difference between them. It can be concluded that the different sources and oil concentrations did not affect ruminal fermentation kinetics in vitro and greenhouse gas emissions, but the inclusion of different oils reduced the emission of CO₂ and CH₄ in all percentages. However there is still the need for more research in this area to clarify the boundaries between positive and negative effects of adding oil in the diet of ruminants.

Key-words: Peanut, canola, soybean, sunflower, gas production, lipid supplementation.

5.1. INTRODUÇÃO

A agropecuária apresenta reconhecida importância na produção de alimentos e geração de renda, e atualmente vem sendo muito discutido sobre o impacto ambiental das atividades pecuárias e agrícolas, principalmente relativo às mudanças climáticas. A pecuária brasileira vem sendo criticada por emitir quantidades significativas de gases de efeito estufa (GEE), uma vez que é responsável por aproximadamente 11% das emissões de gases de efeito estufa e a ineficiência do modelo de exploração tem gerado maiores quantidades destes por quilo de carne e/ou de leite produzidos (IPCC, 2007). A contribuição relativa dos diferentes GEE de origem antrópica no mundo é de 76% de CO₂ enquanto o CH₄ contribui com 14%.

O metano além de estar diretamente relacionado com a eficiência da fermentação ruminal e, conseqüentemente, pela perda de energia nos sistemas de produção, se caracteriza como um importante gás de efeito estufa, contribuindo com cerca de 15% do aquecimento global. Deve-se considerar que os ruminantes respondem pela produção de 22% desse gás, sendo 3,3% do aquecimento global devido à produção de metano pelos mesmos (PEREIRA, 2013).

O conhecimento dos mecanismos de síntese de metano e dos fatores que afetam sua produção é importante, visto que, além de ser um importante gás de efeito estufa o metano também é responsável por uma perda de 2 a 10 % da energia bruta ingerida. O desafio enfrentado no sistema produtivo de ruminantes, para atenuar a produção de metano (metano/kg de leite, carne ou lã), é possibilitar maior eficiência produtiva e redução da contribuição negativa da pecuária para o aquecimento global (BEAUCHEMIN, McGINN, 2014).

A manipulação ruminal através de substâncias introduzidas na ração ou naturalmente presentes nos alimentos é uma alternativa para aumentar a eficiência de utilização das dietas consumidas pelos ruminantes, propiciando a conversão dos nutrientes consumidos em produtos (carne e leite), além de reduzir os impactos dos sistemas de produção no ambiente (PEDREIRA.et al., 2005)

O emprego da suplementação lipídica na dieta de ruminantes vem sendo utilizada como estratégia de mitigação de metano e tem se mostrado promissora para o aumento da eficiência no sistema de produção animal, uma vez que podem promover a redução de CH₄ por ação deletéria sobre as bactérias metanogênicas e consumo do H₂ no processo de biohidrogenação (MACHMULLER et al., 2000).

Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da inclusão de óleos na dieta sobre a cinética de fermentação, degradabilidade e produção de metano in vitro pela técnica da produção cumulativa de gases (PCG).

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

Localização, amostragem e tratamentos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Digestibilidade e Produção de Gases do Complexo Experimental Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade da Pecuária, localizado no Campo Experimental José Henrique Bruschi, pertencente a Embrapa, localizado no município de Coronel Pacheco – MG (23°35'16" de latitude sul e 43°15'56" de longitude oeste).

Todos os procedimentos de manejo dos animais foram conduzidos conforme os princípios éticos da experimentação animal, estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e com a legislação vigente, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Embrapa Gado de Leite (processo nº 03/2014).

Os substratos avaliados consistiram na inclusão de quatro óleos: soja; girassol; canola e amendoim; nas concentrações de 4, 8 e 12% e de um tratamento controle sem a inclusão de óleo, no qual foi utilizada amostra de *Brachiaria brizantha* como padrão (tratamento controle). O delineamento foi inteiramente casualizado (com treze tratamentos x três repetições).

Para a extração do óleo, os grãos foram processados em prensa extrusora (Bindgalvão®), onde 70% do óleo contido nos grãos foram extraídos a frio, sem uso de qualquer química, apenas por prensagem, ficando no equipamento a torta. A máquina coleta o grão automaticamente o qual entra

no eixo cilíndrico gerando uma pressão de 60bar, ocorrendo assim sua prensagem.

Determinação das características fermentativas

Como doadores de líquido ruminal, foram utilizadas três vacas mestiças Holandesas x Gir, não lactante, adultas, e providas de cânula ruminal, com peso vivo médio de 500 Kg \pm 15 kg. Esses animais foram previamente adaptados à dieta com níveis de óleo, onde o animal controle recebeu concentrado sem a adição de óleo, um segundo animal recebeu o concentrado contendo 250g de óleo e o terceiro animal recebeu a dieta com 500g de óleo, visando melhor padrão de fermentação para o experimento proposto. Ao final do período de adaptação, todos os animais receberam 8 kg do concentrado ao dia, divididos em 2 fornecimentos o qual foi feito diretamente pela cânula ruminal. O óleo utilizado para adaptação dos animais continha a mesma proporção dos quatro óleos utilizados neste experimento.

A coleta do líquido ruminal foi realizada ao amanhecer e antes do fornecimento do concentrado, via cânula ruminal. O inóculo foi filtrado em sacos de náilon e dupla camada de gases, sendo então acondicionado em garrafas térmicas pré-aquecida com água à 39°C. O inóculo final foi obtido a partir da mistura do líquido ruminal de três animais.

A cinética de fermentação ruminal foi avaliada pela técnica *in vitro* semiautomática de produção de gases segundo a metodologia descrita por Maurício et al. (1999). Foram utilizados frascos de 50 mL, nos quais foi adicionado 0,5 g de MS do substrato padrão em filtros F57 da Ankom[®], 25 mL da mistura de meio de cultura tamponado conforme recomendações de Menke e Steingass (1988) e líquido ruminal, com fluxo constante de CO₂, para manter a atmosfera livre de O₂. As diferentes concentrações de óleo foram adicionadas diretamente no inóculo. Posteriormente os frascos foram vedados com rolhas de silicone e anilhas de alumínio para prevenir o escape dos gases provenientes da fermentação. As amostras foram incubadas em triplicata em sala climatizada a 39°C. Frascos contendo apenas meio de cultura e inóculo foram utilizados como branco.

A pressão originada pelos gases foi mensurada por meio de um transdutor de pressão (DPI 705 – GE) e as leituras foram realizadas nos tempos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 17, 20, 24, 28, 34, 48, 72 e 96 horas. Os valores de libra por polegada quadrada (PSI) foram convertidos em volume conforme a equação $\text{Volume} = -0,0125x^2 + 3,6015x - 0,1118$; $R^2 = 0,9874$, estabelecida para as condições do laboratório, corrigidos em base na matéria seca, e os valores obtidos nos frascos sem substrato (branco) foram descontados.

A degradabilidade da MS foi determinada por gravimetria após 6, 12, 24, 48 e 96h de fermentação. Após cada tempo de fermentação, os frascos foram imersos em gelo para cessar a fermentação, posteriormente foram abertos, e retirados os saquinhos contendo os resíduos dos substratos incubados.

Os saquinhos contendo os resíduos da incubação foram lavados em água corrente, pré-secos em estufa de ventilação forçada de ar, a 65°C por 72h, e posteriormente levados à estufa a 105°C, até peso constante.

Nos tempos de 12 e 24 h foram coletadas amostras de gases para a avaliação da concentração de metano e líquido ruminal para análise de nitrogênio amoniacal e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). O pH foi determinado por peagâmetro digital no próprio frasco de fermentação apenas para aferir se esta dentro do padrão.

Os gases provenientes da fermentação foram transferidos para tubos *exetainer* (Labco), e a mensuração foi feita utilizando cromatógrafo gasoso.

A determinação dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) foi realizada por meio de cromatógrafo HPLC Waters 2695 com Detector PAD 2998 (*photodiodearray detector*), onde foram coletados 5mL de líquido dos frascos, sendo adicionado 1 mL de ácido metafosfórico a 20%.

O teor de nitrogênio foi determinado, pelo método de Kjeldahl, segundo Detmann et al. (2012). Foram coletados 5mL de líquido dos frascos e acidificado com ácido sulfúrico a 50%.

Cálculos

Para a descrição matemática da cinética de fermentação ruminal obtida pela técnica *in vitro* de produção de gases, utilizou-se o modelo logístico unicompartimental de France *et al.* (1993):

$$Y = A \{1 - \exp [- b (t - L) - c x (\sqrt{t} - \sqrt{L})]\}$$

Em que:

Y = produção cumulativa de gases (mL);

A = assíntota ou potencial máximo de produção de gases;

L = tempo de colonização (lag time);

b (h⁻¹) e c (h^{-0,5}) = taxas fracionais constantes;

μ = taxa de produção de gases (h⁻¹);

t = tempo de incubação em horas.

A análise dos dados e as equações de regressão para os desaparecimentos dos componentes nutricionais foram feitos utilizando-se o programa Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG) e foi aplicado o teste de média Tukey a 5% de significância.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A cinética de fermentação ruminal *in vitro* estimados pelo modelo de France *et al.* (1993) está demonstrada na Tabela 1. A produção cumulativa de gás (A) produzida pelo uso dos óleos de oleaginosas não diferiram (P>0,05) do tratamento controle, variando de 153,82 a 177,48 mL/g MS. Da mesma maneira, não foram observadas diferenças quanto ao tempo de colonização, onde a introdução de 8% de óleo de girassol e soja apresentaram 0,4316 h e 1,2824 h, respectivamente.

Tabela 1 - Parâmetros do modelo de France et al. (1993) e produções relativas de gases com adição de óleos de oleaginosas.

Tratamento	A (mL/g MS)	b (h ⁻¹)	C (h)	L (h)
OS 12	157,01	0,0455	0,0407	0,9982
OS8	163,25	0,0420	0,0396	1,2824
OS4	168,36	0,0488	0,0426	0,9317
OA 12	155,15	0,0530	0,0439	0,4644
OA8	159,85	0,0525	0,0437	0,6119
OA4	157,63	0,0554	0,0456	1,1317
OG 12	153,82	0,0472	0,0420	0,9322
OG8	154,60	0,0535	0,0446	0,4316
OG4	165,33	0,0501	0,0426	0,6782
OC12	154,75	0,0465	0,0407	0,8243
OC8	159,55	0,0433	0,0395	0,9953
OC4	169,19	0,0422	0,0384	1,0838
<i>Brachiaria</i>	177,48	0,0365	0,0347	0,8428

* A: volume final ou produção potencial de gases; b e c: constantes do modelo; L: tempo de colonização;

*OS: óleo de soja; OA: óleo de amendoim; OG; óleo de girassol; OC: óleo de canola.

Contudo, quando realizada a inclusão de óleo em níveis crescentes, observa-se diminuição de aproximadamente 12% da produção cumulativa de gases em todos os tratamentos no nível maior de inclusão comparado ao controle, provavelmente devido ao efeito do óleo sobre a fermentação ruminal (Figura 1). De acordo com Kozloski (2009), altos níveis dietéticos de lipídios podem causar alteração da fermentação ruminal, uma vez que os ácidos graxos insaturados podem formar uma cobertura hidrofóbica na partícula da fibra dos alimentos, impedindo o ataque microbiano e seu metabolismo. Além disso, podem causar efeito tóxico aos microrganismos, por incorporar-se à membrana celular das bactérias, alterando a permeabilidade, podendo acarretar em maior tempo de colonização, fato esse não observado no presente trabalho.

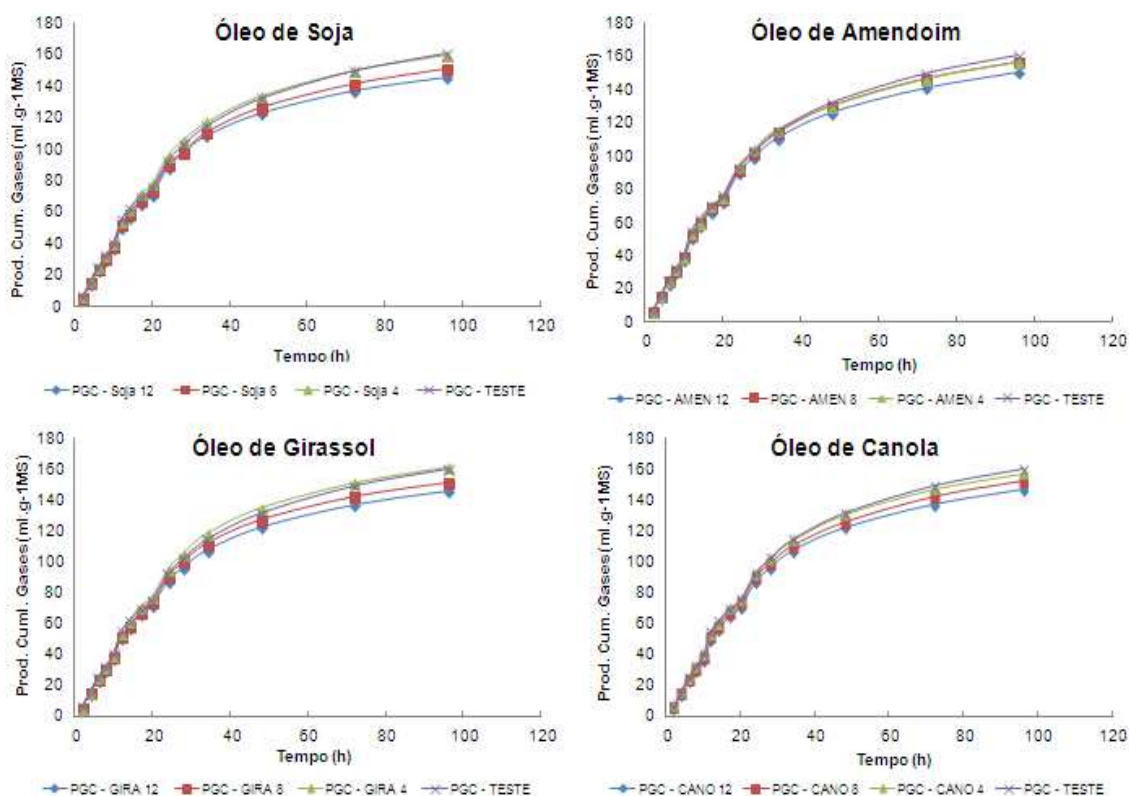


Figura 1 - Curva de produção cumulativa de gases (ml.g-1MS) em função do tempo em horas para os diferentes níveis de inclusão de óleo. PGC: produção cumulativa de gases; Porcentagens de inclusão de óleo nos níveis: 12, 8, 4 e teste (0).

Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) na concentração molar de $N-NH_3$, AGV totais, ácidos acético, propiônico e butírico entre os tratamentos avaliados e o controle em 12 e 24 horas de incubação, bem como quando comparado entre os tratamentos (Tabela 2). As concentrações de $N-NH_3$ variaram 20,5 a 24,0% e de 22,2 a 25,7% para 12 e 24 horas, respectivamente. As concentrações foram suficientes para suportar o crescimento bacteriano, estando bem acima do valor mínimo citado por Satter e Slyter (1974), de 5 mg $N-NH_3$ /100 mL. Salienta-se que os valores de $N-NH_3$ obtidos no presente trabalho estão dentro do valor recomendado por Mehrez et al. (1977), de 24 mg/% para o máximo desaparecimento de substrato.

Tabela 2 - Concentrações de nitrogênio amoniacal (mg/100ml), ácidos acético (Ac), propiônico (Prop), butírico (But) e dos ácidos graxos voláteis totais (AGV), expressas em mM ou em % molar, após 12 e 24 horas de incubação.

Tratamento	12 horas					24 horas				
	N-NH ₃	AC	PROP	BUT	AGV Totais	N-NH ₃	AC	PROP	BUT	AGV Totais
OS 12	23,80	15,50	7,40	3,80	26,70	25,20	24,80	13,60	6,60	45,00
OS 8	21,70	14,20	6,90	3,90	25,00	25,70	20,80	11,60	6,00	38,40
OS 4	22,40	16,60	7,80	5,60	30,00	25,40	24,90	13,30	7,50	45,70
OA 12	20,50	16,00	7,70	5,10	28,80	25,70	24,80	13,30	7,80	45,90
OA 8	22,90	16,70	7,90	5,10	29,70	24,00	23,90	12,80	6,50	43,20
OA 4	23,10	17,60	8,10	4,70	30,40	24,50	25,70	13,70	7,60	46,30
OG 12	23,10	14,90	7,20	3,70	25,80	24,30	24,50	13,30	6,50	44,30
OG 8	23,80	15,50	7,10	3,70	26,30	24,70	19,40	10,30	5,60	35,30
OG 4	22,90	14,80	6,70	4,40	25,90	24,00	19,50	10,30	5,20	35,00
OC 12	24,00	16,80	7,20	5,20	29,20	23,10	23,00	12,50	6,20	41,70
OC8	22,90	15,80	7,30	4,80	27,90	22,20	21,80	12,10	8,10	42,00
OC 4	23,60	12,70	6,70	4,00	23,40	23,10	22,40	11,90	6,40	40,70
Teste	23,80	17,50	8,60	5,00	31,10	22,20	22,90	11,90	6,30	41,10

*OS- óleo de soja; OA- óleo de amendoim; OG- óleo de girassol; OC- óleo de canola.

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) representam a maior fonte de energia para os ruminantes, sendo absorvidos através da parede ruminal (BERGMAN, 1990). O acetato é o principal ácido graxo de cadeia curta produzido pela microbiota ruminal, podendo representar até 75% dos AGCC no rúmen nas dietas ricas em volumosos e mais de 50% em dietas ricas em concentrados. No presente experimento, as concentrações de ácido acético representaram em média 57% dos AGCC totais, estando dentro do esperado.

Segundo Chalupa et al. (1986), lipídios insaturados estimulam as bactérias ruminais produtoras de propionato, causando decréscimo na razão acetato:propionato e na produção de metano. Segundo estes autores, as gorduras insaturadas inibem as bactérias ruminais gram-positivas e estimulam as produtoras de propionato, agindo de maneira similar aos ionóforos (aditivo alimentar utilizado nas rações para modificar a flora ruminal), fato não observado no presente trabalho.

Os óleos vegetais, que são fonte de gordura insaturada, são mais tóxicos no rúmen do que gorduras animais, de uso proibido (MAPA-IN 08/2004). Como os ácidos graxos insaturados são os mais tóxicos, a microbiota

ruminal desenvolveu a estratégia de reduzir a insaturação dos ácidos graxos com a colocação de hidrogênios nestas duplas ligações (biohidrogenação), transformando-as em ligações simples ou saturadas (PALMQUIST, MATTOS, 2011).

A forma como a gordura é oferecida influi nos efeitos deletérios no rúmen, uma vez que os ácidos graxos do grão de oleaginosas (caroço de algodão, soja, girassol, etc.) são liberados mais lentamente em função das estruturas da semente, o que permite uma biohidrogenação comparativamente mais eficiente se ofertado de maneira imediata (BEAUCHEMIN et al., 2008; PALMQUIST, MATTOS, 2011). Considera-se que a intensidade com que ocorre a inibição da produção de metano é determinada pelo grau de saturação da gordura e a quantidade suplementada (PALMQUIST, MATTOS, 2011).

Os ruminantes apresentam certas limitações no aproveitamento de dietas com alto teor de gordura, pois estas acarretam modificações nos padrões de fermentação ruminal podendo prejudicar a degradação e absorção dos nutrientes (PAULA et al., 2012).

Na tabela 3, podemos observar os dados de degradabilidade para os tempos de 6, 12, 24, 48 e 96 horas. Nos tempos de 6, 12, 24 e 48 não houve diferença estatística para os diferentes tratamentos. Já no tempo de 96 horas, ocorreu diferença entre o óleo de amendoim a 4% e o óleo de canola a 12% de inclusão. Uma possível explicação para este fato seja por sua diferença nas concentrações de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados onde pra o óleo de canola é 5, 64 e 25 e o de amendoim é 19, 48 e 25 respectivamente.

Tabela 3 – Tempo de degradação da matéria seca de diferentes fontes de óleo (%)

Tratamentos	Tempo de degradação				
	6 h	12 h	24 h	48 h	96 h
OS12%	30,20	29,10	47,80	57,30	65,70 ^{ab}
OS8%	28,00	44,10	48,10	57,50	67,60 ^{ab}
OS4%	27,20	43,20	48,00	61,70	68,80 ^{ab}
OA12%	27,50	46,50	58,40	59,20	65,00 ^{ab}
OA8%	25,70	32,90	47,90	60,30	65,50 ^{ab}
OA4%	23,70	35,20	49,50	74,10	71,80 ^a
OG12%	27,90	37,30	58,40	57,20	65,90 ^{ab}
OG8%	25,20	33,70	48,50	60,45	65,50 ^{ab}
OG4%	23,50	57,30	48,10	61,80	67,10 ^{ab}
OC12%	29,20	34,20	48,20	57,70	62,00 ^b
OC8%	28,10	40,50	47,00	61,50	65,00 ^{ab}
OC4%	24,40	32,60	47,60	59,30	68,10 ^{ab}
TESTE	24,20	33,00	44,10	58,20	67,40 ^{ab}

*OS- óleo de soja; OA- óleo de amendoim; OG- óleo de girassol; OC- óleo de canola

No presente experimento não foram encontradas diferenças ($P>0,05$) na concentração de CO_2 e CH_4 para os tempos de 12 e 24 horas em todos os tratamentos (Tabela 4), com exceção da soja 12% no tempo de 12 horas, e girassol 12% no tempo de 24 horas, provavelmente por erro na determinação devido à técnica laboratorial. Os coeficientes de variação foram altos, tanto para o CO_2 quanto para o CH_4 nos tempos de 12 e 24 horas, demonstrando elevada amplitude nos resultados das repetições avaliadas. Tal fato se deve, provavelmente, a dificuldade de padronização na técnica de determinação do mesmo, necessitando de maior refinamento.

Tabela 4 - Produção de CO₂ e CH₄ no tempo de 12 e 24 horas (ml/g/MS).

Tratamentos	12 horas		24 horas	
	CO ₂	CH ₄	CO ₂	CH ₄
OS 12	175,90 ^a	13,90 ^a	112,60 ^a	12,40 ^a
OS 8	13,70 ^b	1,10 ^b	107,90 ^a	11,40 ^a
OS 4	30,20 ^b	2,60 ^b	107,50 ^a	12,10 ^a
OA 12	33,30 ^b	2,80 ^b	91,20 ^a	10,10 ^a
OA 8	43,10 ^b	3,50 ^b	103,30 ^a	11,50 ^a
OA 4	41,30 ^b	3,30 ^b	114,20 ^a	12,70 ^a
OG 12	34,90 ^b	2,80 ^b	1,90 ^b	0,40 ^b
OG 8	33,80 ^b	2,80 ^b	106,60 ^a	11,90 ^a
OG 4	27,20 ^b	2,20 ^b	115,50 ^a	13,20 ^a
OC 12	35,80 ^b	2,90 ^b	108,30 ^a	12,30 ^a
OC8	41,10 ^b	3,40 ^b	118,70 ^a	12,70 ^a
OC 4	48,90 ^b	4,00 ^b	113,10 ^a	12,00 ^a
BB	47,00 ^b	3,70 ^b	125,20 ^a	13,30 ^a
Coefficiente de Variação	47,15	41,64	39,12	34,59

*OS- óleo de soja; OA- óleo de amendoim; OG- óleo de girassol; OC- óleo de canola; BB- teste.

Segundo Machmüller e Kreuzer (1999), o uso de óleo nas rações pode proporcionar efeitos desejáveis, como inibição da produção de metano e amônia no rúmen e aumento na eficiência de síntese microbiana. Em revisão realizada por Cieslak et al. (2006), foi descrito decréscimo na produção de metano *in vitro* com uso de óleo de linhaça e também que o nível de emissão pelos ruminantes é diretamente proporcional à biohidrogenação dos ácidos graxos, o que indica interação entre os processos no rúmen. Martin et al. (2008) encontraram significativa redução na produção de metano por vacas alimentadas com ração contendo 5% de óleo de linhaça, confirmando efeito ambiental positivo do uso deste ingrediente. A inibição da metanogênese ruminal parece estar positivamente correlacionada com a disponibilidade dos ácidos graxos no rúmen, pois, neste estudo foram testadas diferentes formas de apresentação de linhaça na ração, sendo o óleo a mais efetiva em reduzir síntese de metano.

Beauchemin e McGinn (2014) trabalharam com inclusão de 4,6% na matéria seca de óleo de canola em dietas de novilhas Angus, onde observaram redução de 20% das emissões de metano. No entanto, esta estratégia pode não ser comercialmente viável, dado o elevado custo da maior

parte das fontes de gordura e o negativo impacto na ingestão de matéria seca. Da mesma maneira Dohme et al. (2000) observaram *in vitro* que o óleo de canola adicionados em 5,3% da matéria seca da dieta, também diminuiu a produção de metano em 20%.

Boadi et al. (2004), revisando a utilização de óleo de canola, o qual é rico em gordura insaturada, demonstrou ocorrer reduções na emissões de metano. A biohidrogenação de gordura mono e poliinsaturada fornece um dissipador de hidrogênio como alternativa para redução de dióxido de carbono no interior do rúmen. Contudo, a biohidrogenação pode ter apenas um papel menor na redução das emissões de metano, quando comparado seus efeitos da adição de gordura que acarretam na depressão do consumo de alimentos e digestão ruminal. McGinn et al. (2004) adicionaram quantidade similar (5% de MS da dieta) de óleo de girassol para uma dieta à base de cevada também diminuiu metano (<21%), em percentagem do consumo de energia bruta.

5.4. CONCLUSÕES

As diferentes fontes e concentrações de óleos não influenciaram a cinética da fermentação ruminal *in vitro* e a emissão de gases na técnica utilizada. No entanto, há necessidade de mais pesquisas para elucidar os limites entre efeitos positivos e negativos da adição de óleo na dieta de ruminantes.

5.5. REFERÊNCIAS

BEAUCHEMIN, K.A.; KREUZER, M.; O'MARA, F. et al. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, 48, 21–27.

BEAUCHEMIN, K.A.; MCGINN, S.M. Methane emissions from beef cattle: Effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. **Journal of animal Science**, v. 84, n. 6, 2014.

BERGMAN, E. N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological reviews**, v. 70, n. 2, p. 567-590, 1990.

BOADI, D.; BENCHAAR, C.; CHIQUETTE, J. et al. 2004. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: Update review. **Canadian Journal of Animal Science**. 84:319–335.

CHALUPA, W.; VECCHIARELLI, B.; ELSER, A.E. et al. Ruminal fermentation in vivo as influenced by long chain fatty acids. **Journal of Dairy Science**, v.69, p.1293-1301, 1986.

CIESLAK, A.; SZUMACHER-STRABEL, M.; SZYMANKIEWICZ, E. et al. 2006 Coconout oil reduces protozoa amount and methane release during fermentation in a RUSITEC system. **Journal of Animal Feed and Sciences**, 15, 19-22

DETMANN, E.; SOUZA, M. A.; VALADARES FILHO, S. C.; et. al. **Métodos para Análise de Alimentos –Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência Animal**. 1 ed., Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 2012. 214p.

DOHME, F.; MACHMÜLLER, A.; WASSERFALLEN, A. et al. 2000. Comparative efficiency of fats rich in medium chain fatty acids to suppress ruminal methanogenesis as measured with RUSITEC. **Canadian Journal of Animal Science**. 80:473–482.

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

IPCC - Intergovernmental Panel on Climate Change. Fourth Assessment Report (AR4): Mitigation of Climate Change. Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 2007. Disponível em:

<http://www.ipcc.ch/publications_and_data/ar4/wg3/en/contents.html > Acesso em: Fevereiro de 2016.

KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica dos Ruminantes**. 2nd. ed. Santa Maria: Ed. UFSM, 2009. 216p.

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

MACHMÜLLER, A.; OSSOWSKI, D.A.; KREUZER, M. Comparative evaluation of the effects of coconut oil, oilseeds and crystalline fat on methane release, digestion and energy balance in lambs. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.85, p. 41-69, 2000.

MARTIN, C.; ROUEL, J.; JOUANY, J.P. et al. 2008. Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil. **Journal of Animal Science**. 86, 2642–2650.

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

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

MEHREZ, A.Z.; ORSKOV, E.R. A study of the artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feed in the rumen. **Journal of Agricultural Science**, v.88, n.3, p.645-650, 1977.

MENKE, K.H.; STEINGASS, H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and gas production using rumen fluid. **Animal Research Development**, v. 28, p. 7-55, 1988.

PALMQUIST, D.L.; MATTOS, W.R.S. **Metabolismo de lipídeos**. In: BERCHIELI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Ed.). *Nutrição de ruminantes*. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2011. p.299-322.

PAULA, E.F.E.; MAIA, F.P.; CHEN, R.F.F. , Óleos vegetais na nutrição de ruminantes. Revista Eletrônica Nutrime, artigo 182, v. 9, n. 06, p. 2075 – 2103, 2012. Disponível em:

<http://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/182-%20Oleos%20vegetais%20na%20nutricao%20de%20ruminantes_.pdf>

Acesso em: Fevereiro de 2016.

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. (*Ruminal methane emission related aspects in cattle production systems*) **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 3, p. 24-32, 2005 Printed in Brazil ISSN: 1517-784X.

PEREIRA, L.G.R. Métodos de avaliação e estratégias de mitigação de metano entérico em ruminantes. **Revista Colombiana de Ciências Pecuárias**, 26:264-277, 2013.

SATTER, L. D., SLYTER, L. L. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. **British Journal of Nutrition**. 32:199-208.