

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CURSO DE ZOOTECNIA

MARIANA TIEPO GONÇALVES

**USO DE MONENSINA E ÓLEOS ESSENCIAIS EM DIETAS DE BOVINOS PARA
MITIGAÇÃO DE METANO ENTÉRICO**

**CURITIBA
2016**

MARIANA TIEPO GONÇALVES

**USO DE MONENSINA E ÓLEOS ESSENCIAIS EM DIETAS DE BOVINOS PARA
MITIGAÇÃO DE METANO ENTÉRICO**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Paraná, apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Zootecnia.

Orientadora: Prof. Dra. Maity Zopollatto

Orientador do Estágio Supervisionado:
Médico Veterinário Dr. Luiz Gustavo Ribeiro Pereira
(Pesquisador da Embrapa Gado de Leite – CNPGL)

**CURITIBA
2016**

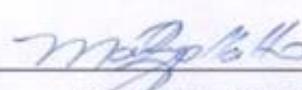
TERMO DE APROVAÇÃO

MARIANA TIEPO GONÇALVES

USO DE MONENSINA E ÓLEOS ESSENCIAIS EM DIETAS DE BOVINOS PARA
MITIGAÇÃO DE METANO ENTÉRICO

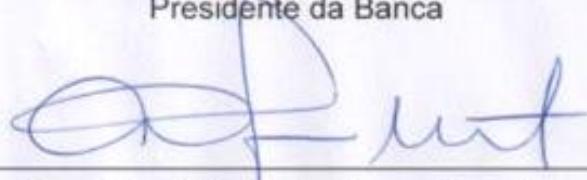
Trabalho de conclusão de curso aprovado como requisito parcial para obtenção do
grau de Bacharel em Zootecnia pela Universidade Federal do Paraná.

BANCA EXAMINADORA

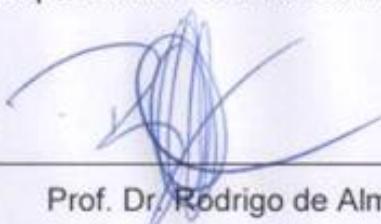

Prof. Dra. Maity Zopollato

Departamento de Zootecnia - UFPR

Presidente da Banca


Prof. Dra. Alda Lúcia Gomes Monteiro

Departamento de Zootecnia - UFPR


Prof. Dr. Rodrigo de Almeida

Departamento de Zootecnia - UFPR

Curitiba
2016

A Deus, por tudo.
Aos meus pais, Vanilde Tiepo e Amilton de Almeida
Gonçalves.
As minhas irmãs, Maria Clara, Júlia, Manuella e Marie.
Ao meu melhor amigo e namorado, Marcos Vinicios Dalmass.
A todos os meus velhos e novos amigos.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades, pela força e por sempre ouvir minhas orações.

Aos meus primeiros e eternos professores de vida, meus pais Vanilde e Amilton, por todo o amor incondicional. E também aos meus segundos pais, Adolfo e Danielle, por todo o apoio.

As minhas irmãs, Maria Clara, Júlia, Manuella e Marie, que por mais que sejam pequenas, me ajudaram com momentos de distração e alegria durante esta jornada.

Ao meu melhor amigo, namorado e companheiro, de todas as horas, Marcos, por toda paciência e carinho.

Aos meus familiares por toda a atenção.

Aos meus amigos da vida, Heloisa, Paula, Amanda, Gustavo, Marquinhos, Alysson, Lara, Aline, Dudu, Lor e Luiz, pela certeza de amizade eterna e inúmeras risadas desde que nos conhecemos e até hoje.

Aos meus amigos da faculdade, Lidiane, Jessica, Roger, Livia, Gisele, Feliphe, Fer, Gustavo, Marina e Giovana, por todo companheirismo e histórias, e claro por saberem melhor do que ninguém o que foi a caminhada até aqui.

Aos meus amigos Embrapianos, Warley, Aline, Abias, Anne, Larisse, João Paulo, Guilherme, Ed, Isabela, Milane, Dani, Taiane, Iorrano, Adolfo e Ricardo, por todas as conversas, festas, churrascos, dias e noites de *in vitro* e *in vivo*, pelo bem da pesquisa, pela amizade repentina e por tornarem os meses de estágio obrigatório inesquecíveis.

A minha professora orientadora Dra. Maity Zopollatto (e Valentina), por todo o apoio, por aceitar embarcar comigo nessa aventura, e pela orientação, paciência e atenção.

Ao meu supervisor de estágio, Dr. Luiz Gustavo Ribeiro Pereira, pela atenção, suporte e oportunidade de estagiar em um local como a Embrapa Gado de Leite. E também ao pesquisador Dr. Thierry Ribeiro Tomich por toda atenção durante o período de estágio.

A toda Embrapa Gado de Leite.

A todos os funcionários e ao corpo docente do curso de Zootecnia da Universidade Federal do Paraná.

A todos que influenciaram ou contribuíram de alguma forma para a minha formação.

EPÍGRAFE

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo”.

Martin Luther King.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ciclo da redução de CO ₂ a CH ₄ pela ação das metanogênicas.....	25
Figura 2. Porcentagem de emissões de metano (CH ₄) por diferentes atividades pecuárias	26
Figura 3. Complexo Multiusuário.....	47
Figura 4. Identificação das áreas de realização do estágio obrigatório no Complexo Multiusuário. (1) Sistema <i>free-stall</i> ; (2) Sistema <i>tie-stall</i> (Setor de Metabolismo de Grandes Ruminantes); (3) Setor de Digestibilidade e Produção de Gases <i>in vitro</i> ; (4) Setor de Bioenergética.....	48
Figura 5. Sistema <i>tie-stall</i>	49
Figura 6. (1) Bebedouro automático com balança acoplada; (2) Cochos automáticos Intergado.....	49
Figura 7. (1) Vista interna da câmara respirométrica; (2) Vista externa dos pares de câmaras respirométricas.....	51
Figura 8. (1) Câmara respirométrica para pequenos ruminantes; (2) Máscara Respirométrica.....	51
Figura 9. (1) Estufa 105°C, utilizada para esterilização dos sacos filtro; (2) Pesagem de amostras em balança de precisão; (3) Frascos de vidro âmbar de 50 mL, com sacos filtro.....	56
Figura 10. (1) Animal fistulado; (2) Coleta de líquido ruminal, via fistula; (3) Funil acoplado à garrafa térmica com uma camada de gaze e peneira para filtragem e armazenamento de líquido ruminal.....	56
Figura 11. (1) Retirada do conteúdo ruminal de animal fistulado. (2) Tambores para armazenar o conteúdo ruminal temporariamente, previamente à troca de líquido com outro animal	57
Figura 12. (1) Dispensador de líquido; (2) Frasco de vidro com rolha de borracha e anilha de alumínio; (3) Mesa agitadora.....	58
Figura 13. Sistemas vaso comunicantes para mensuração da quantidade de gases produzidos	58
Figura 14. Análise da produção de metano (CH ₄) e gás carbônico (CO ₂) por cromatografia gasosa	59

Figura 15. (1) Frascos em recipiente com gelo para cessar o processo fermentativo; (2) Mensuração do pH do inóculo.....	60
Figura 16. (1) Frascos Falcon 20 mL para armazenamento de 5 mL de sobrenadante; (2) Sacos filtro após serem retirados dos frascos de vidro.	61
Figura 17. (1) Animais com sonda urinária acoplada a galões para coleta total de urina; (2) Potes contendo amostras de urina com e sem adição de ácido sulfúrico.	65
Figura 18. (1) Coleta de fezes direto da ampola retal; (2) Tambores para armazenamento de fezes coletadas dos colchões das baías e da calha coletora.	66
Figura 19. (1) Ordenha em sistema <i>tie-stall</i> , com ordenhadeira móvel; (2) Coleta de líquido ruminal via sonda esofágica.....	67
Figura 20. (1) Animal F1 (Gir x Holandês) dentro da câmara respirométrica para grandes ruminantes; (2) Analisadores de gás (O ₂ , CH ₄ e CO ₂).	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferenças apresentadas entre <i>Archaeas</i> metanogênicas e bactérias.....	16
Tabela 2. Percentuais de perda de energia ingerida relatados por diversos autores.	
.....	27
Tabela 3. Efeitos observados sobre a produção de CH ₄ por diversos autores de acordo com as quantidades de monensina fornecidas	39
Tabela 4. Efeitos observados sobre a produção de CH ₄ por diversos autores com relação à quantidade de óleos essenciais fornecida.	44
Tabela 5. Conteúdo das amostras utilizadas em experimentos <i>in vitro</i>	53
Tabela 6. Número de animais doadores de líquido ruminal e dieta experimental fornecida aos animais.....	54
Tabela 7. Tempo de leitura e coleta de metano e tempo de avaliação da degradabilidade <i>in vitro</i> da matéria seca.	55
Tabela 8. Descrição dos experimentos de degradabilidade <i>in situ</i>	63

LISTA DE ABREVIATURAS

CH₄ – Gás Metano

GEEs – Gases de Efeito Estufa

MDL – Mecanismo de Desenvolvimento Limpo

CNPGL – Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

CO₂ – Gás Carbônico

H₂ – Gás Hidrogênio

ATP – Adenosina Trifosfato

NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleotideo Reduzido

NAD⁺ - Nicotinamida Adenina Dinucleotideo Oxidado

NO₂ – Óxido Nitroso

O₂ – Gás Oxigênio

AGCC – Ácidos Graxos de Cadeia Curta

AGVs – Ácidos Graxos Voláteis

CoA – Coenzima A

NO₃ – Nitrato

NH₃ – Amônia

H₂O - Água

CHO-FMR - Formil metano furano desidrogenase

H₄MPT - Tetrahidrometanopterina

HS-CoM – Coenzima M

CH₃-S-CoM - Metil Coenzima M

Na⁺ - Sódio

K⁺ - Potássio

OEs – Óleos Essenciais

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CEJHB – Campo Experimental José Henrique Brusch

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

DIVMS – Degradabilidade *in vitro* da Matéria Seca

N-NH₃ – Nitrogênio Amoniacal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1	Microbiologia Ruminal	14
3.1.1	<i>Archaeas</i> metanogênicas	16
3.2	Fermentação Ruminal	18
3.2.1	Principais Produtos da Fermentação Ruminal	20
3.2.1.1	Acetato	21
3.2.1.2	Butirato.....	22
3.2.1.3	Propionato.....	22
3.3	Metanogênese.....	23
3.4	Emissão de Metano	25
3.4.1	3.4.1 Fatores que afetam a emissão de metano	28
3.4.1.1	3.4.1.1 Dieta	28
3.4.1.2	3.4.1.2 Composição da dieta.....	28
3.4.1.3	3.4.1.3 Consumo	30
3.4.1.4	3.4.1.4 Digestibilidade	31
3.4.1.5	3.4.1.5 Processamento	31
3.4.1.6	3.4.1.6 Lipídios.....	32
3.4.2.7	3.4.2.7 Sistema de criação	32
3.4.3.8	3.4.3.8 pH ruminal.....	33
3.5	3.5 Formas de Mitigação	33
3.5.1	3.5.1 Aditivos.....	34
3.5.2	3.5.2 Monensina.....	35
3.5.2.1	3.5.2.1 Mecanismo de Ação	36
3.5.2.2	3.5.2.2 Resultados da utilização de monensina para mitigação de metano ..	38
3.5.3	3.5.3 Óleos Essenciais	39
3.5.3.1	3.5.3.1 Mecanismo de Ação	41

3.5.3.2 Resultados da utilização de óleos essenciais para mitigação de metano	43
4 RELATÓRIO DE ESTÁGIO.....	45
4.1 Plano de Estágio	45
4.2 Local de Estágio	45
4.2.1 Setor de Metabolismo de Grandes Ruminantes	48
4.2.2 Setor de Digestibilidade <i>in vitro</i> e Produção de Gases.....	50
4.2.3 Setor de Bioenergética	50
4.3 Atividades desenvolvidas	51
4.3.1 Auxílio em experimentos <i>in vitro</i> e <i>in situ</i>	51
4.3.1.1 Experimentos <i>in vitro</i>	52
4.3.1.2 Experimentos <i>in situ</i>	62
4.3.2 Avaliação de consumo e digestibilidade	64
4.3.3 Operação de câmaras respirométricas.....	67
4.3.4 Outras atividades realizadas simultaneamente	69
5 DISCUSSÃO	70
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
7 REFERÊNCIAS.....	73

RESUMO

O mundo tem mais de sete bilhões de habitantes com demanda cada vez maior por produtos de origem animal. O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, e grande demanda por qualidade e produtos sustentáveis ambientalmente. Na atualidade muito se discute sobre a relação entre a produção animal e os impactos causados ao meio ambiente, como as alterações climáticas e perdas de energia ingerida na forma de metano (CH_4) durante o processo de fermentação em animais ruminantes. Os ruminantes são fonte antrópica de emissão de metano, contribuindo para o aquecimento global e alterando o equilíbrio do meio ambiente, porém o metano produzido é importante para o bom funcionamento do rúmen. Devido a esses aspectos, pesquisas envolvendo a utilização de alternativas que promovam a redução da emissão de metano aliada ao bom funcionamento do rúmen têm surgido com o objetivo de minimizar impactos ambientais e promover uma pecuária de menor impacto ao meio ambiente. Sendo assim, objetivou-se por meio deste trabalho abordar as características do ambiente ruminal, a produção e emissão de metano e o uso de monensina e óleos essenciais para mitigar a produção de metano entérico por bovinos. Essas são técnicas pesquisadas pela Embrapa Gado de Leite para avaliar o efeito da inclusão de diferentes aditivos na alimentação de bovinos sobre a emissão de metano, acompanhadas durante o período de estágio curricular realizado na instituição como parte do trabalho de conclusão de curso de Zootecnia.

Palavras-chaves: alternativas, bovinos, metano, mitigação, pecuária, sustentabilidade.

1 INTRODUÇÃO

A emissão de gases de efeito estufa (GEEs) é um assunto fortemente discutido na atualidade, mundialmente. No ano de 1997, foi estabelecido o protocolo de Quioto, onde países industrializados deveriam reduzir pelo menos 5% das emissões de GEEs até qualquer período entre os anos de 2008 e 2012, com relação aos níveis apresentados no ano de 1990.

O protocolo de Quioto oferece mecanismos de flexibilização para diminuição dos custos com a redução de emissão de GEEs. Um desses mecanismos é o Mecanismo de Desenvolvimento Limpo (MDL), que envolve países em desenvolvimento, concedendo créditos para que alternativas com objetivo de mitigar a emissão de gases de efeito estufa sejam propostas e testadas, e assim prevenir mudanças climáticas e promover desenvolvimento sustentável (FELIPETTO, 2007).

No Brasil, o MDL visa uma produção animal mais sustentável, com alimentos alternativos de baixo custo, animais mais eficientes, o manejo correto de forragens e diversas estratégias para diminuição do impacto ambiental causado por esses animais. Com o aumento da preocupação com relação à emissão de GEEs e seus impactos, maior investimento foi destinado às pesquisas nesse aspecto no setor agropecuário.

A pecuária brasileira, apesar da importância na produção de alimentos, é apontada como uma das atividades que prejudicam o meio ambiente, principalmente em função do tamanho do rebanho bovino nacional, constituído por 215,2 milhões de animais (IBGE, 2016).

O gás metano é produto final do processo de fermentação ruminal e é considerado o segundo maior contribuinte do efeito estufa, sendo emitido para a atmosfera através da eructação, respiração e evacuação de ruminantes (MURRAY *et al.*, 1976).

Do total de gases de efeito estufa, 3,3% são provenientes da fermentação entérica e 22% das emissões de metano por fontes antrópicas são oriundas desse processo, e o restante é proveniente de queimadas, terras cultivadas, combustível fóssil, tratamento de esgoto, dejeto de animais e cultivo de arroz inundado (USEPA *apud* PEDREIRA *et al.*, 2005). A produção de metano através da fermentação entérica de bovinos encontra-se em torno de 250 a 500L por animal/dia, representando perda

de energia ingerida entre 2 e 12%, gerando animais menos eficientes (JOHNSON & JOHNSON, 1995).

Os bovinos, mesmo sendo apontados como grandes emissores de metano, são uma das poucas fontes de emissão deste gás que pode ser manipulada de alguma forma. Os nutricionistas de ruminantes vêm realizando pesquisas com o objetivo de encontrar alternativas, como o uso de aditivos, para reduzir a produção de metano entérico, obtendo assim melhorias na eficiência alimentar dos animais, e como consequência aumento na produtividade e menor contribuição da pecuária para o aquecimento global.

O uso de aditivos, como a monensina, está em evidência devido à discussão sobre a proibição do uso de antibióticos na nutrição animal, enquanto os óleos essenciais atuam como alternativas naturais à utilização desses aditivos, atendendo as exigências de consumidores que priorizam por produtos orgânicos.

Com base no exposto, este trabalho teve como objetivo revisar a literatura descrevendo e caracterizando o ambiente ruminal e seus componentes, a produção e a emissão de metano, reunindo informações referentes ao uso de monensina e óleos essenciais na alimentação de ruminantes como formas de mitigação de metano entérico, tendo em vista a relevância do assunto e a importância da utilização de alternativas para minimizar o impacto ambiental causado pela pecuária. E relatar as atividades desenvolvidas durante o período de estágio obrigatório para a conclusão do curso de Zootecnia da Universidade Federal do Paraná, na Embrapa Gado de Leite – Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite (CNPGL).

2 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi reunir informações referentes à utilização de monensina e óleos essenciais na alimentação de bovinos como forma de redução da emissão de metano entérico. E ainda, compor parte do trabalho de conclusão do curso de Zootecnia da Universidade Federal do Paraná, incluindo relatório do estágio realizado.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Microbiologia Ruminal

Os bovinos são animais ruminantes e herbívoros, capazes de digerir e aproveitar materiais de origem vegetal com mais eficiência devido à sua anatomia e fisiologia, tais como a presença de um estômago verdadeiro (abomaso) e outros três compartimentos gástricos (omaso, reticulo e rúmen).

O rúmen é o maior dos compartimentos gástricos, preenchendo quase por completo o lado esquerdo da cavidade abdominal, funcionando como câmara fermentativa, com movimentos reticulo-rúmen que conduzem o alimento, misturando o conteúdo sólido ao conteúdo líquido, sendo esses movimentos também responsáveis pela regurgitação do conteúdo alimentar e eliminação de gases (MARQUES, 2003; LANA, 2007). É um ambiente anaeróbico (ausência quase total de oxigênio), propício para o desenvolvimento microbiano, que apresenta temperatura entre 38 e 42 °C (média de 39°C), alta umidade e pH em torno de 6,0 - 7,0, devido à remoção constante dos ácidos (produtos da fermentação) (TEIXEIRA, 1997; FURLAN *et al.* 2006).

Os ruminantes têm capacidade de ingerir e regurgitar alimentos, remastigar e deglutar novamente, transformando o alimento ingerido em produto. O sistema digestivo recebe, fermenta, digere e absorve os nutrientes advindos dos alimentos. O retorno do bolo alimentar à boca e imediata mastigação serve para destruir grandes partículas de alimentos e manter o pH ruminal por meio da saliva, solução alcalina, rica em carbonatos e fosfatos. O rúmen fornece condições adequadas para o crescimento e colonização de microrganismos, para que estes realizem o processo digestivo dos alimentos que são deglutidos (MARQUES, 2003).

Os ruminantes apresentam relação de simbiose com os microrganismos ruminais, possibilitando o uso de compostos complexos e não utilizáveis para a maioria dos outros animais. A relação simbiótica ocorre porque o animal fornece alimento e ambiente favorável para o crescimento dos microrganismos que, por sua vez, suprem o animal com ácidos resultantes da fermentação e proteína microbiana (KAMRA, 2005).

A microbiologia do rúmen é complexa, devido ao grande número de organismos existentes (TEIXEIRA, 1997). Os microrganismos do rúmen se dividem em três

populações: os que permanecem no líquido ruminal (alimentos recém ingeridos), microrganismos aderidos à fração sólida da digesta (degradação de alimentos fibrosos) e os ligados à parede do rúmen (MARQUES, 2003). O ecossistema do rúmen consiste principalmente de bactérias, protozoários, fungos anaeróbios e *Archaeas* metanogênicas (TEIXEIRA, 1997; KAMRA, 2005; ARCURI *et al.*, 2006).

As bactérias são responsáveis pela fermentação e são os maiores e principais grupos de microrganismos encontrados no rúmen (ARCURI *et al.*, 2006). Existem cerca de 22 gêneros e 63 espécies de bactérias descritas, as quais são divididas em gram-positivas e gram-negativas, sendo as gram-negativas predominantes. As bactérias resistem mais a oscilações do pH, se comparadas à protozoários e fungos e são classificadas de acordo com o tipo de substrato que fermentam e do produto final liberado por elas após a fermentação (MARQUES, 2003). O desenvolvimento das bactérias ocorre após o nascimento, principalmente pelo contato do bezerro com outros animais e pelos diferentes tipos de alimentos consumidos.

Inicialmente é encontrada uma grande flora de bactérias aeróbicas que vai desaparecendo à medida que o animal vai ingerindo forragens, fazendo com que as bactérias anaeróbicas começem a colonizar a microbiota. Estipula-se que a partir da primeira semana que bezerros são alimentados com leite, feno e concentrado, a flora começa a se desenvolver, e algumas semanas depois a população é semelhante à de animais adultos (TEIXEIRA, 1997). A população bacteriana é a mais diversa no rúmen, dividida em: celulolíticas, amilolíticas, glicolíticas, pectinolíticas, lipolíticas, lácticas, ureolíticas e proteolíticas, além de microrganismos anaeróbios facultativos que mantêm níveis baixos de oxigênio dissolvido no conteúdo ruminal (JOHNSON & JOHNSON, 1995; TEIXEIRA, 1997; ARCURI *et al.*, 2006).

Os protozoários são organismos anaeróbicos ciliados, que apresentam capacidade de degradação e fermentação de substratos, como celulose, hemicelulose, pectinas, amido, açúcares solúveis e lipídios. Todos os protozoários armazenam grande quantidade de amido, que é usado como fonte de energia. São proteolíticos, realizam a degradação de proteínas, excretando aminoácidos e amônia como produto final (TEIXEIRA, 1997), e controlam a população microbiana, evitando superpopulação (MARQUES, 2003). O estabelecimento dos protozoários no rúmen é difícil e depende, sobretudo, do contato com outros animais que tenham protozoários no rúmen. Normalmente, o estabelecimento se dá pela secreção de saliva e ruminação. Protozoários são encontrados no rúmen, em condições normais, a partir

da terceira semana de vida, aumentando consideravelmente à medida que o pH ruminal aumenta. Em bezerros lactentes, o pH ruminal é baixo, o que dificulta o estabelecimento de protozoários (sensíveis a pH baixo) (TEIXEIRA, 1997).

Os fungos representam apenas 8% da massa microbiana, sendo um grupo de microrganismos que fermentam carboidratos, produzindo formato, acetato, lactato, etanol, gás carbônico (CO_2) e hidrogênio (H_2), gerando co-culturas com *Archaea*s metanogênicas (MACHADO, 2010).

3.1.1 *Archaea*s metanogênicas

As *Archaea*s metanogênicas, são um grupo de organismos distintos filogeneticamente de bactérias (JOHNSON & JOHNSON, 1995). As *Archaea*s diferenciam-se das bactérias em algumas características, como a parede celular, que é composta por pseudopeptidoglicano, ao contrário das bactérias que apresentam parede celular composta por peptideoglicano; a membrana celular, que nas *Archaea*s é constituída por lipídios de cadeias hidrocarbonadas ramificadas que se ligam ao glicerol por ligações do tipo éter e nas bactérias essas ligações são do tipo éster. E pelo genoma, pois o DNA nas metanogênicas é único e circular e nas bactérias é fragmentado em cromossomos múltiplos (Tabela 1) (RAISMAN & GONZALEZ, 2006; KOZLOSKI, 2011).

Tabela 1. Diferenças apresentadas entre *Archaea*s metanogênicas e bactérias.

	<i>Archaea</i> s	Bactérias
Parede Celular	Pseudopeptidoglicano	Peptidoglicano
Membrana Celular	Lipídios éteres de glicerol	Lipídios ésteres de glicerol
Genoma	DNA único e circular	DNA fragmentado em cromossomos múltiplos

Adaptado de Raisman & Gonzalez (2006) e Kozloski (2011).

As metanogênicas, principais representantes do filo Euryarchaeota, ocupam um nicho metabólico exclusivo e são microrganismos estritamente anaeróbios que

crescem em ambientes com potencial redox baixo (McALLISTER *et al.*, 1996; ISHINO *et al.*, 1998). As *Archaeas* possuem cofatores exclusivos (coenzima M, F420 e F430) e lipídios únicos (ésteres de isopranyl glicerol), estes microrganismos podem estar presentes no rúmen em três formas diferentes: livres no fluido do rúmen, associadas às partículas de protozoários ou ligadas ao epitélio ruminal (McALLISTER *et al.*, 1996; JANSSEN & KIRS, 2008).

Os protozoários apresentam relação de simbiose com as *Archaeas*, pois produzem hidrogênio, que é utilizado por estes microrganismos para a formação de metano, podendo ser responsáveis por até 37% da metanogênese, enquanto as *Archaeas* fornecem ambiente adequado para o desenvolvimento desses microrganismos (VAN SOEST, 1994; WILLIAMS & COLEMAN, 1997). E essa relação também favorece a permanência das *Archaeas* no rúmen quando a taxa de passagem é elevada, como em dietas ricas em concentrado, pois os microrganismos metanogênicos são mais sensíveis às mudanças no ambiente ruminal e são afetados por muitos fatores dietéticos (VALADARES FILHO & PINA, 2006).

As *Archaeas* metanogênicas encontradas no rúmen mais citadas são: *Methanosarcina barkerii*; *Methanobrevibacter ruminantium*; *Methanobacterium formicum*; *Methanomicrobium mobile* (TEIXEIRA, 1997; JARVIS *et al.* 2000; MARQUES, 2003; KAMRA, 2005; BEAUCHEMIN & McGINN, 2006), sendo a *Methanobrevibacter* spp. a de maior presença no rúmen (McALLISTER *et al.*, 1996), estas aderem às partículas sólidas no rúmen, crescendo a uma taxa menor e mantendo-se no rúmen (JANSSEN, 2010).

De acordo com o substrato usado para o crescimento e formação de metano, as *Archaeas* metanogênicas podem ser classificadas em três grupos distintos: as metanogênicas metilotróficas, que consomem compostos metil como metilaminas, metanol e metanotiol; as metanogênicas hidrogenotróficas (maioria das espécies), que utilizam o gás carbônico e o hidrogênio, formato ou alguns álcoois e metanogênicas acetotróficas ou acetoclásticas, que usam acetato (RUSSELL *et al.*, 1992; McALLISTER *et al.*, 1996; WHITMAN *et al.*, 2006; JANSSEN & KIRS, 2008). Mas a via preferencial é a redução de CO₂, utilizando H₂ como doador de elétrons, eliminando o excesso de hidrogênio do rúmen (BAKER, 1999).

Os microrganismos metanogênicos convertem esses substratos em metano para obter energia. A produção de metano pelas *Archaeas* gera perdas de energia

ingerida, sendo maiores quanto maior for a participação de forrageiras na alimentação (MARQUES, 2003; FASSIO, *et al.* 2010).

3.2 Fermentação Ruminal

Os microrganismos presentes no rúmen são responsáveis pela secreção de enzimas que irão degradar carboidratos (estruturais e não estruturais), proteínas e lipídios consumidos pelos animais em um processo anaeróbico, conhecido como fermentação. Esse processo ocorre devido à relação de simbiose entre o animal hospedeiro e os microrganismos presentes no rúmen, para que haja aproveitamento dos componentes da parede celular de vegetais e dos demais nutrientes do conteúdo celular. Os microrganismos são divididos em dois grupos: microrganismos que fermentam os nutrientes advindos dos alimentos e microrganismos que utilizam os produtos finais da fermentação do primeiro grupo (KRUG, 1993; TEIXEIRA, 1997; ARCURI *et al.*, 2011). A população de microrganismos depende do comportamento alimentar e da composição da dieta que o animal recebe (VAN SOEST, 1994; MARQUES, 2003).

A fermentação permite que os ruminantes possam utilizar carboidratos como fonte de energia e compostos nitrogenados não proteicos como fonte de proteína (VALADARES & PINA, 2006). No rúmen, os alimentos se misturam aos microrganismos devido à movimentação peristáltica (reticulo-rúmen). Esses movimentos e a ruminação expõem os alimentos para que sejam atacados pelos microrganismos do ecossistema ruminal (TEIXEIRA, 1997). Os microrganismos ruminais associam-se e aderem às partículas de alimento ingeridas, a adesão ao substrato é feita por meio de mecanismos específicos, sendo este o passo inicial para o processo digestivo. As bactérias que estão levemente associadas às partículas de alimento e as que estão fortemente associadas são responsáveis por 70 e 85%, das atividades enzimáticas, respectivamente (VALADARES & PINA, 2006).

Após a ingestão, os carboidratos são transformados, por ação dos microrganismos, em hexoses, pentoses e ácidos urônicos. Esses substratos produzem energia e outros substratos necessários para o desenvolvimento do animal (BAKER, 1999).

A via da glicólise (Embden-Meyerhof-Parnas) é utilizada para que os microrganismos presentes no ecossistema ruminal fermentem a glicose e outros

produtos da hidrolise de carboidratos (hexoses) em piruvato (composto no qual todos os carboidratos devem ser convertidos antes de serem transformados em AGCC), proporcionando dois moles de ATP e dois moles de NADH para os microrganismos. O NADH age com a molécula de piruvato, produzindo possíveis produtos da fermentação, variando de acordo com o substrato fermentado. O ATP que é gerado durante a glicólise é fonte de energia imediata, pois recebe a energia que está na molécula de glicose, sendo utilizada para desenvolvimento dos microrganismos no rúmen (ANTUNES & RODRIGUES, 2006) e pelos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), para fornecer energia aos animais.

O ecossistema ruminal é um ambiente anaeróbico e a fermentação em ruminantes envolve um processo oxidativo, por isso, durante a oxidação, NAD é reduzido a NADH. Este cofator tem de ser re-oxidado através da desidrogenação, para que o processo de fermentação de açúcares ocorra completamente (JAYANEGARA, 2008). A fermentação ruminal ocorre normalmente em uma faixa de osmolaridade entre 260 e 340 mOsm, sendo mantida em valores próximos a 280 mOsm (VALADARES & PINA, 2006).

Durante o processo fermentativo, a matéria orgânica é transformada em compostos como ácidos graxos, aminoácidos e açúcares, que posteriormente são transformados pelas bactérias acetogênicas em compostos mais simples como ácidos graxos de cadeia curta, hidrogênio e dióxido de carbono e por último os microrganismos metanogênicos transformam esses substratos nos gases metano e CO₂ (MARÇAL JÚNIOR, 2012).

Outros gases são produzidos em menores quantidades no ambiente ruminal, como o hidrogênio, nitrogênio (N₂) e o oxigênio (O₂). A proporção média de cada gás produzido durante o processo de fermentação varia de acordo com o alimento ingerido, com a microbiota ruminal e o balanço fermentativo (VAN SOEST, 1994; TEIXEIRA, 1997).

Após a fermentação, os carboidratos não degradados são fermentados no intestino grosso, da mesma forma como ocorre no rúmen (KOZLOSKI, 2002; MARQUES, 2003). A fermentação intestinal nos ruminantes acontece principalmente no ceco e no cólon proximal, ambientes com características semelhantes ao rúmen. Porém, o tempo de permanência da digesta neste compartimento é menor com relação ao tempo de permanência do substrato no rúmen. Nesta parte do trato digestório existem bactérias anaeróbicas, assim como as que estão presentes no

rúmen, sendo a população microbiana do intestino grosso inferior. Similar à fermentação ruminal, os produtos da fermentação intestinal são os ácidos graxos de cadeia curta, acético, butírico e propiônico, e cerca de 6 a 14% da produção de CH₄ do animal ocorre no intestino (IMMIG, 1996).

3.2.1 Principais Produtos da Fermentação Ruminal

A maior parte dos nutrientes presentes nos alimentos fermentados no rúmen dá origem aos ácidos graxos de cadeia curta, principais produtos da fermentação ruminal, produzidos, principalmente, através do processo fermentativo de carboidratos, tais como celulose, hemicelulose, pectina, amido e açúcar (BAKER, 1999; KOZLOSKI, 2002; MARTIN *et al.*, 2009; GRAMINHA *et al.*, 2012; MEDEIROS & MARINO, 2015), e que são absorvidos no rúmen, enquanto outros nutrientes passam para outros compartimentos digestivos (MARQUES, 2003). Os AGCC são de natureza hidrossolúvel, compostos por até cinco carbonos e encontrados em altas concentrações no rúmen (GONZÁLEZ & SILVA, 2006). Estes ácidos contribuem com 50 a 80% da energia digestível dos alimentos, apresentando concentração total variando entre 60 e 160 mmol/L no fluido ruminal; uma maior produção desses ácidos estimula o desenvolvimento das papilas ruminais (KOZLOSKI, 2002; MARQUES, 2003; FURLAN *et al.*, 2006).

A maioria dos carboidratos são fermentados e transformados em ácidos graxos voláteis no rúmen por difusão passiva de sua forma não ionizada, que é capaz de atravessar membranas livremente. Em sua maioria, os ácidos graxos voláteis são absorvidos pelo próprio epitélio ruminal, não havendo gasto de energia para a absorção, porém, uma pequena porção pode ser degradada e absorvida no omaso e abomaso, quantidade que pode variar em torno de 10 a 20% (KOZLOSKI, 2002; MARQUES, 2003).

A taxa de absorção dos ácidos graxos é diretamente proporcional à concentração de cada ácido no líquido ruminal, e aumenta de acordo com o tamanho da cadeia de carbonos (KOZLOSKI, 2002).

A atividade microbiana e a absorção dos ácidos graxos voláteis no rúmen determinam o volume de AGVs presentes no conteúdo do retículo-rúmen. Quando a atividade microbiana aumenta, a fração de ácidos graxos também aumenta. A concentração de AGVs total e o porcentual de cada um irão depender do consumo e

composição da dieta, que também irá estabelecer a predominância de determinado ácido, influenciada pela espécie de microrganismo envolvida na fermentação. Assim, dietas à base de grãos, com maiores percentuais de concentrado, produzirão maiores quantidades de ácido propiônico e reduzirão a produção de acetato, enquanto dietas à base de forragens levarão a aumento na concentração de ácido acético em relação à concentração de ácido propiônico (TEIXEIRA, 1997; MARQUES, 2003). Em dietas à base de volumoso as proporções são de 65%, 25% e 10% para os ácidos acético, propiônico e butírico, respectivamente, e para rações à base de concentrado as proporções desses ácidos são de 50% para o ácido acético, 40% de ácido propiônico e 10% de ácido butírico, podendo variar de acordo com o pH do rúmen (NUSSIO *et al.*, 2006).

As taxas de produção dos ácidos graxos também podem variar de acordo com o tempo de ingestão dos alimentos; alimentos à base de concentrado apresentam pico de produção em torno de 2 a 3 horas após a ingestão, já em dietas à base de forragens, o pico ocorre em torno de 4 a 5 horas após a ingestão (KOZLOSKI, 2002).

Durante o processo de fermentação, a produção de ácido acético e butírico envolve a liberação de grande quantidade de hidrogênio (BAKER, 1999), gerando perda de energia na forma de metano e dióxido de carbono de, aproximadamente, 12% (RUSSELL & STROBEL, 1989).

Altos teores de hidrogênio devem ser removidos, para que os sistemas enzimáticos não sejam inibidos. Este hidrogênio é utilizado por organismos metanogênicos, juntamente com o dióxido de carbono para produção de metano. Já no processo fermentativo, que apresenta ácido propiônico como produto, há captura do hidrogênio do meio, diminuindo as concentrações disponíveis para a produção de metano (KOZLOSKI, 2002; BERTIPAGLIA, 2008).

3.2.1.1 Acetato

O acetato é considerado o principal ácido graxo volátil, por ser a fonte mais importante de energia metabolizável e o principal substrato utilizado para lipogênese, além de ser o mais produzido no rúmen pelos microrganismos (ANTUNES & RODRIGUES, 2006).

A produção de acetato se dá através da transformação de piruvato em formato e acetil-CoA, pela enzima piruvato liase. A reação que inicia o metabolismo do acetato

é a conversão de piruvato em acetil-CoA pelo sistema enzimático da acetil-CoA sintase. Após o piruvato ser convertido a formato, este é então convertido a CO₂ e H₂ (ANTUNES & RODRIGUES, 2006).

Em dietas à base de volumoso, a produção de acetato é maior em relação aos outros ácidos, porém, o percentual desse ácido após a fermentação rápida dos alimentos e de dietas ricas em proteínas pode ocasionar decréscimo na produção de ácido acético, assim como dietas à base de concentrado, devido às alterações no pH (TEIXEIRA, 1997).

3.2.1.2 Butirato

O butirato é um ácido graxo volátil, utilizado na síntese de glicose no fígado via glicogênese (TEIXEIRA, 1997). A produção desse ácido, assim como a de acetato, resulta na liberação de hidrogênio e favorece a formação de metano (HEGARTY, 2001). Além disso, as reações que envolvem a formação de acetato estão interrelacionadas às reações de formação do ácido butírico, quando estas ocorrem a partir de acetil-CoA (PEDREIRA & PRIMAVESI, 2006).

A principal via da síntese de ácido butírico é a inversão da beta oxidação, onde são usadas duas moléculas de acetato. Outra via é a do malonil-CoA, que é combinado com acetil-CoA, formando acetoacetil-CoA, que é reduzido a butirato. Com essa sequência de reações há a liberação de um ATP e um butirato (TEIXEIRA, 1997). O ácido butírico pode ser absorvido e transportado até o fígado via sistema porta-hepático, transformado em corpos cetônicos nas células da parede ruminal ou reduzido à CO₂ e água (H₂O) (VAN SOEST, 1994; TEIXEIRA, 1997; KOZLOSKI, 2002).

3.2.1.3 Propionato

O propionato é o precursor mais importante de síntese de glicose pela via gliconeogênese. As bactérias amilolíticas são responsáveis pela formação de ácido propiônico devido à fermentação do amido (KRUG, 1993; TEIXEIRA, 1997; NUSSIO *et al.*, 2006).

A síntese de ácido propiônico é realizada por duas vias: através da formação de oxaloacetato e succinato e por meio da formação de acrilato (PEDREIRA &

PRIMAVESI, 2006). O propionato, assim como os outros produtos da fermentação ruminal, é produzido a partir do piruvato, através das enzimas fosfoenol piruvato carboxiquinase, piruvato carboxilase e metilmalonil-CoA carboxittransferase, que convertem succinato a propionato. A via do acrilato é a mais importante para animais que recebem dietas ricas em concentrado. Nessa via o piruvato é transformado em lactato, posteriormente em acetil-CoA, que é reduzido a propionil-CoA, produzindo um terço da produção total de propionato, sem envolver a síntese de ATP (TEIXEIRA, 1997; KOZLOSKI, 2002; NUSSIO *et al.*, 2006).

Além da importância do propionato na formação de glicose, esse ácido também está diretamente relacionado com a produção de metano, pois a síntese de propionato é considerada uma via competitiva para a utilização de hidrogênio no rúmen, diminuindo a disponibilidade desse substrato para a produção de metano pelas metanogênicas (MOSS, 2000; HEGARTY, 2001; RODRIGUEZ & CAMPOS, 2007), ou seja, quanto maior for a produção de ácido propiônico, menor será a produção de CH_4 (JOHNSON & JOHNSON, 1995).

3.3 Metanogênese

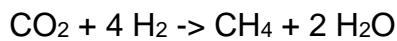
O metano é um coproduto da fermentação entérica de ruminantes, a sua formação é denominada metanogênese (ARAÚJO, 2011). A formação desse gás é a última etapa da fermentação, sendo uma reação que consome energia e funciona principalmente como dreno de hidrogênio no rúmen, evitando acidificação do pH e permitindo que a fermentação dos alimentos ocorra normalmente, com a produção de ácidos graxos voláteis, pois com a produção dos ácidos acético e butírico há grande produção de hidrogênio, que deve ser retirado do ambiente ruminal para que não haja acúmulo, permitindo que a re-oxidação de NADH ocorra (JOHNSON & JOHNSON, 1995; IMMIG, 1996; McALLISTER *et al.*, 1996; ULYATT & LASSEY, 2001; KOZLOSKI, 2011; GARCIA, 2013). Outras vias para a utilização de hidrogênio existem no rúmen, como a conversão de nitrato (NO_3) em amônia (NH_3) (FAHEY & BERGER, 1993, *apud* NEVES, 2008).

Grande parte do hidrogênio presente no rúmen é utilizado para o crescimento da microbiota ruminal, para a biohidrogenação de ácidos graxos insaturados e para a produção de glicogênio, e o restante é usado para a formação de metano pelas *Archaeas*, que reduzem dióxido de carbono e hidrogênio em metano e água

(BENCHAMAR *et al.*, 2001; BEAUCHEMIN *et al.*, 2008). Quantidades elevadas de H₂ são importantes para o crescimento e sobrevivência das metanogênicas, evitando que esses microrganismos sejam levados do rúmen em altas taxas de passagem, em valores de pH ruminal subótimos ou na presença de mecanismos de mitigação de metano (JANSSEN, 2010).

A produção de metano pode variar devido à quantidade de carboidrato fermentado e de acordo com a proporção de acetato e propionato que é produzida (JOHNSON & JOHNSON, 1995). Segundo Ulyatt & Lassey (2001), 80 a 90% do metano é sintetizado durante a fermentação da dieta no reticulo-rúmen, e os outros 10 a 20% são formados no ceco e intestino grosso.

Para a realização da metanogênese, H₂ e CO₂ livres no rúmen são os substratos mais utilizados, onde a formação de metano envolve uma molécula de CO₂ e quatro moléculas de hidrogênio (MOSS, 2000):



A metanogênese é constituída por várias reações de redução, como ilustrado na Figura 1. A primeira reação da metanogênese é a ligação de CO₂ ao metano furano, sendo reduzido a formil pelos elétrons advindos de hidrogênio, produzindo a enzima formil metano furano desidrogenase (CHO-FMR). Em seguida, o grupo formil é transferido para tetrahidrometanopterina (H4MPT), uma pterina exclusiva de organismos metanogênicos, que funciona como transportador de compostos intermediários da formação de metano. Durante a transformação de 5-formil-H4MPT em metenil-H4MPT, ocorre a liberação de H₂O. As reduções de metenil ao metileno e de metileno à metil são realizadas pela coenzima F420 reduzida. Antes da redução a metano, o grupo metil do metil-H4MPT é transferido para a coenzima M (HS-CoM), e só então o metil coenzima-M (CH₃-S-CoM) é reduzido a metano com ação da metil coenzima redutase (McALLISTER *et al.*, 1996; THAUER, 1998; PARÉS & JUÁREZ, 1997).

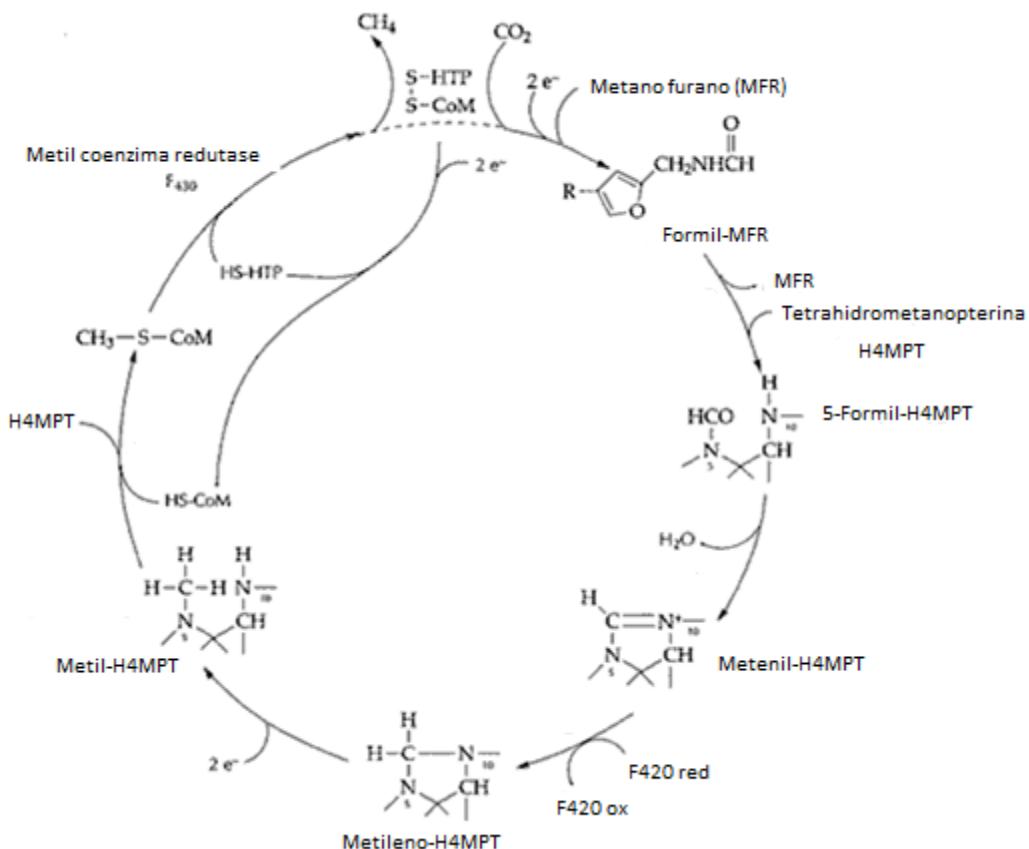


Figura 1. Ciclo da redução de CO_2 a CH_4 pela ação das metanogênicas. Adaptado de Parés & Juárez (1997).

3.4 Emissão de Metano

O metano é um hidrocarboneto gasoso, inodoro e incolor, pouco solúvel em água, de molécula tetraédrica (CH_4) e apolar, sendo, dentre os gases de efeito estufa, o segundo maior contribuinte do aquecimento global (VIEIRA *et al.*, 2010), com taxa de crescimento de 7% ao ano e capacidade para armazenar calor 25 vezes maior do que o CO_2 , e com tempo de vida na atmosfera de 12 anos (GASTALDI, 2003; IPCC, 2006).

A produção total de metano é, em sua maioria (70%), relacionada a fontes antrópicas, dentre elas a agropecuária, e o restante da produção (30%) advém de fontes naturais de emissão (IPCC, 2001). A principal fonte de emissão de gases pelo setor agropecuário é a fermentação entérica, seguida pelos solos agrícolas, processamento anaeróbico de dejetos animais, cultivo de arroz e queimadas (MCTI, 2014).

Devido ao processo de fermentação entérica, os bovinos são apontados como responsáveis por 96,8% das emissões de metano da pecuária para a atmosfera (BERNDT *et al.*, 2015). E uma fonte adicional de emissão que pode ser associada a esses animais, é a fermentação anaeróbica de dejetos produzidos pelos ruminantes (PEDREIRA & PRIMAVESI, 2006; PATINO *et al.*, 2012). Outros animais, incluído ruminantes e não ruminantes, contribuem com 3,2% das emissões de metano entérico (BERNDT *et al.*, 2015).

A maior parte do metano produzido no rúmen (95%) é eliminada pela eructação, junto com outros gases, e o restante é absorvido pelo epitélio ruminal, transportado via corrente sanguínea e eliminado na respiração (MARQUES, 2003; KOZLOSKI, 2011). Do metano produzido no intestino grosso, 89% é excretado via respiração e 11% pelo ânus (MURRAY *et al.*, 1976).



Figura 2. Porcentagem de emissões de metano (CH₄) por diferentes atividades pecuárias. Adaptado de MCTI (2014).

A Figura 2 mostra os diferentes percentuais de emissões de CH₄ provenientes dos setores da pecuária, no ano de 2012, apontando a fermentação entérica de bovinos de corte como a principal fonte emissora, seguida pela fermentação entérica de bovinos leiteiros. Essa grande variação de emissão entre os setores se justifica pelo tamanho dos rebanhos bovinos presentes no Brasil, sendo em sua maioria populações de bovinos criados para corte. O restante das emissões é

dado por outros ruminantes e não-ruminantes (MCTI, 2014), corroborando com os dados encontrados por Pinedo *et al.* (2009), onde os bovinos de corte e leite foram os principais contribuintes nas emissões de metano geradas pela pecuária entre os anos de 1990 a 1995 e 2000 a 2005.

A produção de metano por ruminantes representa perda de energia ingerida significativa para os animais (JOHNSON & JOHNSON, 1995; McALLISTER *et al.*, 1996). De acordo com Johnson & Johnson (1995), a perda de energia para a produção de metano pode chegar a 12%, enquanto Blaxter & Clapperton (1965), Johnson & Ward (1996) e Jayanegara (2008) encontraram valores mais baixos, cerca de 5 a 10% de perda da energia bruta ingerida. Pesquisas mais atuais mostram que as perdas de energia na forma de metano apresentam valores em torno de 4 a 15% (Tabela 2) (MCT, 2004). Essa perda de energia reflete diretamente na eficiência do animal, podendo gerar queda no seu desempenho (PRIMAVESI *et al.*, 2004b).

Tabela 2. Percentuais de perda de energia ingerida relatados por diversos autores.

Perdas de energia	Referência
6,7 - 9,3%	Blaxter & Clapperton (1965)
2 - 12%	Johnson & Johnson (1995)
5,5 – 6,5%	Johnson & Ward (1996)
4 – 15%	MCT (2004)
6 - 10%	Jayanegara (2008)

O Intergovernamental Panel on Climate Change (IPCC) recomenda a utilização de dois métodos para calcular fatores de emissão de metano. O método **Tier 1**, que envolve o uso de fatores de emissão padrão, como o número de animais por categoria; enquanto o método **Tier 2** envolve o uso de informações específicas do país, como o consumo de ração diário e percentual de energia perdido na produção de metano, para calcular os fatores de emissão. O método **Tier 2** é recomendado para estimar as emissões de metano em países com grandes populações de bovinos ou ovinos (IPCC, 2006).

3.4.1 Fatores que afetam a emissão de metano

A emissão de metano depende de vários fatores, entre eles estão a raça do animal, o sistema de produção, a categoria animal, o nível de consumo, o tipo de carboidrato fermentado, o processamento da dieta, a adição de lipídios, a suplementação mineral, a digestibilidade e a modificação da microbiota ruminal, sendo a composição da dieta e o consumo de alimentos os principais reguladores da produção e emissão de metano entérico (McALLISTER *et al.*, 1996; PEDREIRA & PRIMAVESI, 2006).

3.4.1.1 Dieta

A dieta fornecida ao animal é o primeiro fator que afeta a produção de metano, pois é fonte direta e indireta de substrato para os microrganismos metanogênicos. A fisiologia dos animais pode interagir com as metanogênicas e com a dieta, levando a variação na emissão de metano (JOHNSON & JOHNSON, 1995; ULYATT & LASSEY, 2001).

3.4.1.2 Composição da dieta

A adição de concentrado na dieta de ruminantes gera modificações na população microbiana do rúmen, levando ao desenvolvimento de bactérias amilolíticas, resultando em mudança nas proporções de AGVs, aumentando a produção de propionato e minimizando a produção de acetato. Esse processo acarreta em queda na disponibilidade de H₂ no rúmen e, consequentemente, em menor produção de metano (JOHNSON & JOHNSON, 1995; PEREIRA *et al.*, 2011). Dietas à base de grãos podem reduzir a população de metanogênicas ou torná-las menos ativas (VAN KESSEL & RUSSELL, 1996), pois o ambiente apresenta-se menos favorável à sobrevivência desses microrganismos metanogênicos.

Segundo Berchielli *et al.* (2003), a adição de 60% de concentrado na dieta torna o ambiente ruminal desfavorável para as metanogênicas, devido às alterações no pH do rúmen. Segundo relatos de Johnson & Johnson (1995), animais recebendo dietas com 90% de concentrado, apresentaram redução de 2 a 3% na produção de metano. O aumento no consumo de concentrado pode diminuir a proporção de energia

proveniente da dieta que seria convertida em metano, devido à menor produção desse gás (BLAXTER & CLAPPERTON, 1965).

Em estudo realizado por Benchaar *et al.* (2001) a produção de metano foi menor (-22%) devido à substituição de alimentos fibrosos por alimentos com maiores teores de amido. Estremote (2016), utilizando animais da raça Guzerá, recebendo dieta com 50% de concentrado, observou aumento de 10% na produção de CH₄ do que em animais que receberam dietas com 70% de concentrado.

Cuidados devem ser tomados com a adição de altos teores de concentrado nas dietas, pois pode haver queda do pH ruminal, levando a distúrbios metabólicos como acidose ruminal, e gerando desnaturação das bactérias celulolíticas (sensíveis a pH ácido), proporcionando transtornos na digestão da porção fibrosa (PRIMAVESI *et al.*, 2004b). Além disso, a emissão de outros gases de efeito estufa como CO₂ e NO₂ devido aos processos envolvidos na produção de grãos, podem superar os resultados positivos da adição de concentrado na dieta.

No Brasil a maioria dos sistemas de produção animal ocorre em pastagens, apresentando menor número de sistemas que fornecem dietas com altas proporções de grãos (PEDREIRA *et al.*, 2005). Animais que recebem maior proporção de volumoso, tendem a aumentar a relação acetato:propionato, fazendo com que grande quantidade de H₂ seja liberada no rúmen, sendo consumida pelos microrganismos metanogênicos para síntese de metano (GARCIA, 2013).

As forragens apresentam características que levam a menor taxa de passagem, aumentando a permanência das partículas de alimento no rúmen. A quantidade de metano produzida aumenta de acordo com a quantidade de forragem ingerida (JOHNSON & JOHNSON, 1995; McALLISTER *et al.*, 1996).

A emissão de metano pela ingestão de volumosos também pode ser influenciada pelo tipo de volumoso ingerido. As leguminosas geram menos metano em relação às gramíneas, devido à presença de tanino (metabólito secundário de plantas) (VARGA & KOLVER, 1997; PEREIRA *et al.*, 2011).

Benchaar *et al.* (2001) observaram que a produção de metano foi menor (-28%) com o fornecimento de Alfafa (leguminosa) em relação ao fornecimento de Timothy (gramínea), e que a produção de CH₄ diminuiu 20%, com silagem de Alfafa comparada ao feno, devido à maior taxa de passagem desses alimentos que apresentam melhor digestibilidade.

Com a realização de três experimentos, Martinez (2013) sugeriu que a produção de metano em sistemas à pasto pode ser reduzida por meio de práticas de manejo que exercem influência sobre as características da dieta. A condição fisiológica das forragens (estágio de maturação), as características das espécies (C3 e C4), a presença de compostos secundários e a inclusão de leguminosas na dieta, podem modificar a degradação de nutrientes e possivelmente os fatores fisiológicos dos animais podem permitir a diminuição da produção de metano. Forrageiras C4 apresentam maiores proporções de parede celular do que plantas de metabolismo C3, favorecendo a fermentação acética e maior produção de metano. Porém, a parede celular de plantas C4 apresentam baixa digestibilidade e menor velocidade de fermentação em relação às plantas C3, fornecendo menos substrato para os microrganismos metanogênicos (PEDREIRA & PRIMAVESI, 2006). Kurihara *et al.* (1999) estipularam que dietas com plantas de metabolismo C4 emitem 144 g/d a mais de metano do que dietas com plantas de metabolismo C3 e 97 g/d de metano a mais do que dietas ricas em grãos.

Para Neves (2008), maiores relações acetato:propionato e altas produções de metano foram observadas em tratamentos contendo 70% de volumoso se comparados a tratamentos com 30% de volumoso.

Primavesi *et al.* (2004a) realizaram medições de emissão de metano durante a época de chuvas em vacas lactantes, vacas secas e novilhas recebendo adequada oferta de forrageiras de clima temperado e adubadas, e também mediram emissões de novilhas em pastagens de clima tropical não adubadas. A emissão de CH_4 foi maior em vacas lactantes (13,8 a 16,8 g/hora) em relação a vacas secas (11,6 a 12,3 g/hora) e novilhas (9,5 g/hora). Novilhas em pastagem não adubada apresentaram emissões de 7,6 a 8,3 g/hora, sendo estas as que mostraram maior emissão de CH_4 por matéria seca (MS) digestiva ingerida (58 a 62 g/kg), em relação a vacas lactantes (42 a 69 g/kg), secas (46 a 56 g/kg) e novilhas em pastagens adubadas (45 a 58 g/kg).

3.4.1.3 Consumo

O consumo de matéria seca influencia a emissão de metano, pois em condições de melhora na qualidade do alimento, há maior ingestão de MS e maiores níveis na emissão de metano, que também são altos em animais que necessitam de mais energia (PRIMAVESI *et al.*, 2004b).

Quanto maior o consumo de matéria seca, maior será a produção de metano em valores absolutos, porém, em valores relativos há menor produção de metano por kg de matéria seca ingerida (JOHNSON & JOHNSON, 1995).

Benchaar *et al.* (2001) encontraram que maior ingestão de matéria seca diminui as perdas de energia na forma de CH₄ entre 9 e 23%, pois a taxa de passagem do alimento é maior, permanecendo menos tempo retido no rúmen.

3.4.1.4 Digestibilidade

A produção de metano varia com o aumento da digestibilidade da dieta, sendo que o aumento da digestibilidade eleva as taxas de passagem, fazendo com que a produção de metano seja menor e a produção de propionato aumente. Conforme o alimento vai sendo digerido a taxas de passagem menores, as concentrações de H₂ no rúmen são reduzidas, e a produção de metano aumenta e de propionato diminui (JANSSEN, 2010).

A oferta de concentrado para ruminantes melhora o aproveitamento dos nutrientes, pois a digestibilidade é alta e a fermentação é rápida, levando a maior eficiência e menor produção de metano (LOPES *et al.*, 2013).

Dietas com alimentos de baixa digestibilidade e com teores de proteína bruta menores do que 7% resultam em maior tempo de retenção no rúmen, maior atividade de bactérias celulolíticas e maior emissão de metano se comparados a dietas com teores de proteína adequados e maior taxa de passagem no rúmen (PRIMAVESI *et al.*, 2012).

3.4.1.5 Processamento

O processamento de forragens pode diminuir a produção de metano em até 40%, pois há redução na fibra efetiva da dieta, gerando queda no pH do fluido ruminal, fazendo com que a atividade de microrganismos celulolíticos seja menor, minimizando a produção de acetato e aumentando a taxa de passagem da forragem (JOHNSON & JOHNSON, 1995; JAYANEGARA, 2008).

3.4.1.6 Lipídios

A adição de lipídios na dieta de bovinos diminui a metanogênese através da utilização de H₂ livre na rota da biohidrogenação de ácidos graxos insaturados; redução da fermentação ruminal dos constituintes fibrosos da dieta e da matéria orgânica fermentável, maior produção de ácido propiônico e a inativação de protozoários (MORAIS *et al.*, 2006; ARAÚJO, 2010; BASSI *et al.*, 2012). A influência da biohidrogenação dos ácidos graxos insaturados sobre a metanogênese é pequena, sendo que a hidrogenação de 1 mol de ácido linolênico afeta apenas a formação de 0,75 mol de CH₄ (MARTIN *et al.*, 2009).

O efeito da suplementação lipídica na emissão de metano irá depender do tipo de lipídio e da dieta fornecida, nível de suplementação e a forma de fornecimento (BEAUCHEMIN *et al.*, 2008).

Segundo Pereira *et al.* (2011), a adição de lipídios na dieta não deve passar de 7% da matéria seca, para que não haja depressão no consumo e para que o efeito da suplementação lipídica não gere acúmulo de H₂ no rúmen, inibindo a atividade dos microrganismos ruminais, e prejudicando o processo de digestão dos alimentos.

3.4.1.7 Sistemas de criação

Animais confinados apresentaram redução de 2% na produção de metano entérico, devido à utilização de níveis elevados de concentrado e ao menor tempo de permanência desses animais no confinamento, pela menor idade de abate quando comparado a sistemas à pasto (BEAUCHEMIN, 2011), embora a fase de terminação de animais confinados gere impacto ambiental significativo devido à concentração animal, aumentando as concentrações de fezes e urina, e consequentemente, as emissões de metano (PEDREIRA & PRIMAVESI, 2006).

Segundo estudos de Lima *et al.* (2014) com bovinos de corte, a redução da idade de abate de 44 para 14 meses em sistemas confinados, gerou redução no consumo de matéria seca de 4015 kg e, consequentemente, reduziu a emissão de metano (kg) de 0.62 para 0.13 por kg de carcaça produzida, devido à melhora na qualidade do alimento fornecido e à redução de idade ao abate.

Chizzotti *et al.* (2011), avaliando os efeitos da redução da idade de abate sobre a emissão de metano por bovinos de corte, mostraram que a redução do tempo de

abate de 44 para 30, 26, 20 e 14 meses reduziu a emissão de CH₄ em 23,4%, 31,2%, 53% e 67,7%, respectivamente.

Cota (2013) mensurou a emissão de metano de bovinos em diferentes sistemas, e observou que a emissão de CH₄ por dia, pelos animais em confinamento foi maior (5%), porém, a perda de energia consumida para produção de metano foi menor em relação ao sistema à pasto. No confinamento obteve-se menor (-26%) emissão de metano por quilos de matéria seca consumida.

A menor emissão de metano por animais confinados pode ser explicada devido à qualidade da dieta, mostrando que o manejo alimentar é uma estratégia mitigadora de metano, fazendo com que o sistema seja mais produtivo e sustentável.

3.4.1.8 pH ruminal

As metanogênicas têm sua atividade inibida, sua taxa de crescimento cai e sua população é menos ativa em níveis baixos de pH. Valores de pH em torno de 6,0 a 7,5 favorecem o crescimento dos microrganismos metanogênicos. Em condições de pH ácido, a concentração de H₂ deve ser elevada para que a taxa de crescimento das Archaeas aumente, mantendo sua população no rúmen, independente da taxa de passagem. Porém concentrações altas de H₂ no rúmen, em pH ácido, geram queda na produção de H₂ pelos microrganismos responsáveis pela fermentação, reduzindo a produção de metano. Adicionalmente, com o aumento da concentração de H₂ no rúmen, há maior formação de propionato (JARVIS *et al.*, 2000; JANSSEN, 2010).

3.5 Formas de Mitigação

Mitigação é uma intervenção realizada com o intuito de reduzir ou remediar determinado impacto ambiental. Alternativas para mitigar metano podem ser utilizadas em termos de redução por animal ou por unidade de produto animal. A partir do conhecimento sobre a fermentação ruminal e dos microrganismos que habitam o rúmen, alternativas para manipular este processo estão sendo desenvolvidas para que haja maior aproveitamento da dieta por parte dos animais, tornando-os mais eficientes e diminuindo as quantidades de gás metano emitidas.

Para a mitigação do gás metano são apresentadas algumas alternativas como a redução do número de animais, mantendo a produtividade, a seleção de animais

que produzam menos metano, o fornecimento de dietas à base de concentrado, a inclusão de forrageiras com compostos que induzam a redução de metano, melhor qualidade da forragem, defaunação, uso de aditivos e vacinação (BEAUCHEMIN & McGINN, 2006; LONGO, 2007; BEAUCHEMIN *et al.*, 2008; VÁSQUEZ, 2015).

A manipulação ou alteração do processo fermentativo é todo processo que aumente ou diminua o metabolismo ruminal normal, alterando as vias metabólicas e a população de microrganismos ruminais, como por exemplo, a adição de produtos que gerem aumento na produção de propionato (VAN ZIJDERVELD *et al.*, 2010).

O metabolismo ruminal pode ser modificado direta ou indiretamente, com o intuito de melhorar a digestibilidade do alimento. A modificação direta está relacionada ao uso de aditivos, biológicos ou químicos, que alteram a fermentação ruminal. E a modificação indireta relaciona-se com as características apresentadas pelo alimento (DOMINGUEZ BELLO & ESCOBAR, 1997).

O maior desafio dos responsáveis pela nutrição animal é o desenvolvimento de alternativas que melhorem o funcionamento ruminal, mitiguem a produção de metano e não gerem impactos sobre a produtividade animal (McALLISTER *et al.*, 1996).

As alternativas adotadas devem reduzir a produção de H_2 , estimular a utilização de H_2 por outras vias, inibir as metanogênicas, sem afetar a digestão dos alimentos e funcionamento normal da microbiota do rúmen. A metanogênese pode ser reduzida de 10 a 15% sem prejudicar quaisquer efeitos das principais funções do rúmen (JAYANEGARA, 2008).

3.5.1 Aditivos

Os aditivos são ingredientes sem valor nutritivo, incluídos a dieta, fornecidos junto aos alimentos, utilizados para melhorar a eficiência alimentar, estimular o crescimento dos animais e melhorar a saúde e o metabolismo dos mesmos (REIS *et al.*, 2006). O uso de aditivos alimentares é uma das formas de controlar a emissão de metano, diminuindo as perdas de energia pela formação desse gás.

A atuação dos aditivos ocorre primeiramente sobre a população de microrganismos ruminais, deprimindo ou inibindo o crescimento dos mesmos, podendo variar em função da resistência ou sensibilidade à suplementação do aditivo, e com base no substrato que será fermentado, gerando alteração na proporção de

ácidos graxos voláteis e na produção de metano (NICODEMO, 2001; FONSECA, 2012).

Os aditivos são estratégias mitigadoras de metano amplamente testadas, que apresentam grande potencial para a utilização em dietas de bovinos para redução na emissão de metano entérico.

3.5.2 Monensina

A monensina sódica é um aditivo poliéster carboxílico produzido pela bactéria *Streptomyces cinnamonensis* (LIMA *et al.*, 2006). Inicialmente, este aditivo era utilizado como coccidiostático para aves, mas desde a década de 70, a monensina vem sendo utilizada como aditivo ionóforo na dieta de ruminantes, com o objetivo de melhorar a conversão alimentar e o desempenho dos animais. No Brasil, este aditivo é registrado pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAPA), e utilizado como promotor de crescimento para animais (NICODEMO, 2001).

A monensina age sobre a microbiota ruminal, modificando o padrão de fermentação, gerando maior produção de propionato em relação ao ácido acético, e diminuindo as perdas de energia devido à emissão de metano. E também pode atuar prevenindo distúrbios metabólicos como acidose, cetose e timpanismo (SCHELLING, 1984; RUSSELL & STROBEL, 1989; MOURO *et al.* 2006; JOURNAY & MORGAVI, 2007; ZOTTI & PAULINO, 2009; MACHADO *et al.*, 2011).

Com o aumento da produção de propionato devido ao uso do aditivo, há melhora na eficiência metabólica, pois o propionato é o ácido graxo volátil mais utilizado na formação de glicose no fígado (SCHELLING 1984; RUSSELL & WALLACE, 1997).

A introdução da monensina na dieta pode reduzir a produção de H_2 , pela diminuição do consumo, promovendo menor concentração deste no rúmen, pela mudança na relação acetato:propionato, pela manipulação da microbiota ruminal e pela ação da enzima formato-liase, que inibe a liberação de hidrogênio do formato (PATINO *et al.*, 2012).

A monensina reduz a degradação da proteína dos alimentos (NICODEMO, 2001) e, além disso, também diminui a produção de lactato, aumenta o pH ruminal, estabiliza o consumo ao longo do dia e, em dietas à base de volumoso, aumenta o ganho de peso dos animais (GRAMINHA *et al.*, 2012). Os ionóforos inibem a

metanogênese, mas não são tóxicos para os organismos metanogênicos (RUSSELL & STROBEL, 1989).

A melhora na eficiência alimentar com a inclusão dos ionóforos está relacionada à redução no consumo de matéria seca, com variações no ganho de peso de animais confinados e à pasto (ZANINE *et al.*, 2006; TEDESCHI *et al.*, 2011). A redução do consumo de 5 a 6% reduz a quantidade de alimento fermentado no rúmen, diminuindo as proporções de metano por unidade de produto (JOHNSON & JOHNSON, 1995). Com uma menor ingestão de alimentos, a monensina apresenta taxa de passagem mais lenta, melhorando a digestibilidade, o aproveitamento das proteínas e aumentando a fermentação das fibras ao longo do trato digestivo, gerando maior ganho de peso e melhor conversão alimentar (NICODEMO, 2001; RANGEL, *et al.*, 2008).

3.5.2.1 Mecanismo de Ação

Os ionóforos são substâncias altamente lipofílicas, e que podem ser tóxicas para algumas bactérias, fungos e protozoários, sendo classificados como antibióticos, que apresentam exterior hidrofóbico e interior hidrofílico e capacidade de se ligar a cátions. Alguns ionóforos se ligam apenas a um cátion, mas outros são aptos a se ligarem a mais de um cátion.

A ação dos ionóforos sobre as bactérias presentes no rúmen está relacionada com as características estruturais da parede celular, que é responsável pela regulação do balanço químico entre o meio celular externo e interno, que é mantido por bombas iônicas (RANGEL *et al.*, 2008).

Por apresentarem uma membrana celular porosa e não seletiva, com uma camada lipídica, as bactérias gram-positivas, responsáveis pelo maior volume de gases (CO_2 e CH_4), são mais sensíveis à ação dos ionóforos (GARCIA, 2013). Enquanto as bactérias gram-negativas, encarregadas pela produção de ácido propiônico, sofrem menos a ação da monensina, pois realizam fosforilação oxidativa e apresentam uma camada de peptideoglicano na membrana celular (CHEN & WOLLIN, 1979).

A monensina é capaz de se ligar a vários cátions, embora tenha afinidade maior por sódio (Na^+), mas também é capaz de transportar potássio (K^+). No rúmen, o Na^+

é o cátion predominante no meio extracelular, a concentração de K^+ é normalmente de quatro a cinco vezes menor (RUSSELL & STROBEL, 1989).

A monensina sódica desorganiza o transporte de cátions pela membrana de bactérias gram-positivas em duas reações. Na primeira reação, a sua forma aniónica junta-se com um cátion, e ao combinar-se com o hidrogênio forma um complexo que se torna lipossolúvel e liga-se à membrana celular. Ao aderir o meio intracelular, a monensina se dissocia do H^+ e retorna a sua forma aniónica. O mesmo acontece dentro da célula, desencadeando a saída de K^+ . Na segunda reação, o aditivo combina-se com o sódio no meio extracelular e adere à bactéria, atravessando a parede celular, se solubilizando na membrana celular lipídica. Assim, o cátion é liberado no meio intracelular e trocado por um próton (H^+), que é transportado para fora da célula. Essa reação ocorre devido à queda do pH, provocada pelo acúmulo de hidrogênio no meio interno da célula.

O acúmulo de hidrogênio no interior da célula promove maior gasto de energia para manter a homeostase entre o ambiente interno e externo da célula. Como as bactérias gram-positivas são fosforoclásticas (produzem menos ATP por mol de glicose formado), utilizam energia em excesso e deprimem suas reservas, provocando rompimento da membrana celular e o desaparecimento dessas bactérias do meio (RUSSELL & STROBEL, 1989; RANGEL *et al.*, 2008).

Com o desaparecimento das bactérias gram-positivas há diminuição na competição por substrato energético, e as gram-negativas acabam dominando o meio. Além disso, como as gram-positivas são produtoras de H^+ , há menor quantidade deste próton no meio, promovendo menor produção de metano, melhorando a eficiência da dieta (HENDERSON *et al.*, 1981; McCaughey *et al.*, 1997; LIMA *et al.*, 2006).

Para que o máximo potencial de ação da monensina seja atingido, os níveis de potássio no meio extracelular devem ser baixos, para que não haja trocas iônicas apenas entre sódio e potássio (bombas de sódio e potássio). Com níveis altos de sódio no meio externo, as trocas iônicas realizadas pela monensina ocorrem entre Na^+ e hidrogênio.

Fungos e protozoários, por não possuírem membrana protetora externa, são sensíveis aos efeitos da monensina (DENNIS *et al.*, 1986 *apud* BERTIPAGLIA, 2008). Com a diminuição no número de protozoários, fornecedores de H_2 para as metanogênicas, há menor formação de metano. Isto indica que a melhora na eficiência alimentar devido à inclusão de monensina é resultante da manipulação da

fermentação e da microbiota ruminal (RUSSELL & STROBELL, 1989). Embora, segundo Guan *et al.* (2006), o crescimento dos protozoários volte ao normal entre 3 a 4 semanas após o início do fornecimento da monensina.

Algumas bactérias gram-negativas podem ser sensíveis à monensina, assim como bactérias gram-positivas podem se adaptar ao efeito do aditivo (McALLISTER *et al.*, 1996; RUSSELL & HOULIHAN, 2003). Segundo Johnson & Johnson (1995), os efeitos da adição de monensina sobre a redução da metanogênese ruminal são variados, e que qualquer efeito de ionóforos sobre a metanogênese é de curta duração e que o metano retorna a níveis normais em duas semanas.

3.5.2.2 Resultados da utilização de monensina para mitigação de metano

Segundo estudos de Rivera (2006), com bovinos de corte, o uso de monensina na dieta gerou menor consumo de matéria seca, não influenciou a digestibilidade da MS e dos nutrientes e diminuiu a relação acetato:propionato se comparada à adição de outros aditivos, porém, a produção de metano não apresentou alterações com a adição de monensina (Tabela 3).

Para Beauchemin *et al.* (2008), doses de inclusão menores que 15 ppm de monensina não tiveram efeito sobre a metanogênese (g de metano/kg de MS ingerida) em vacas leiteiras. Enquanto que para Guan *et al.* (2006), um acréscimo de 33 mg/kg reduziu a produção de metano em 30%, com a inclusão de monensina em dietas de alto ou baixo volumoso. Porém, o efeito foi de curto prazo, mostrando que os possíveis efeitos da monensina são dose-dependentes.

Garcia (2013) avaliou que a inclusão de 20 mg de monensina sódica/kg de MS na dieta de vacas Holandesas, recebendo uma dieta 70:30 de feno de Tifton 85 e concentrado, se comparada com a adição de outros aditivos, levou à redução da produção de metano *in vitro* entre 9 e 26%.

Perna Junior (2013) observou o efeito da monensina sobre a produção de metano ruminal em bovinos, utilizando a técnica de fermentação ruminal *ex situ*, com adição de 300 mg de monensina em dietas com 50% de volumoso e 50% de concentrado. O tratamento com monensina foi responsável por reduzir a produção de metano em 10,7%, sem interferir no consumo, digestibilidade e excreção dos nutrientes.

Em reprodução experimental *in vitro*, Benetel (2014) verificou o potencial de produção do gás metano com a inclusão de 0, 200, 400 e 600 mg/dia de monensina sobre dieta com feno de *Brachiaria decumbens* e suplemento proteico de baixo consumo, constatando que quanto maior a adição de monensina menor é a produção de metano.

Vásquez (2015) avaliou o efeito da monensina sobre a emissão de metano utilizando a técnica de gás traçador hexafluoreto de enxofre (SF6), em animais recebendo 300 mg de monensina sódica por dia. O tratamento contendo monensina reduziu em 24,3% a produção de CH₄ (g/dia) em relação ao tratamento controle.

Os efeitos dos ionóforos sobre a produção de metano ocorrem devido à menor ingestão de matéria seca e maior produção de ácido propiônico. As implicações do uso de aditivos como preço e possível resistência por parte das bactérias, associadas com a pressão atual para que o uso de antimicrobianos (antibióticos) seja reduzido na produção animal, geram dúvida com relação ao potencial de mitigação de metano entérico a longo prazo por essas substâncias (PEREIRA *et al.*, 2011).

Tabela 3. Efeitos observados sobre a produção de CH₄ por diversos autores de acordo com as quantidades de monensina fornecidas.

Quantidade adicionada	Efeito sobre a produção de CH ₄	Referências
5 g/dia	-	Rivera (2006)
33 mg/kg MS	-30%	Guan <i>et al.</i> (2006)
15 mg/kg MS	-	Beauchemin <i>et al.</i> (2008)
20 mg/kg MS	-26%	Garcia (2013)
300 mg/dia	-10,7%	Perna Jr. (2013)
600 mg/dia	-16%	Benetel (2014)
300 mg/dia	-24,3%	Vásquez (2015)

3.5.3 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais (OEs) são aditivos aromatizantes (ANVISA), usados a séculos pelo homem, seja pelo odor e sabor característico ou por suas propriedades

conservantes e antibacterianas; são extraídos de plantas aromáticas, por métodos de destilação, e usados como matéria prima pelas indústrias brasileiras farmacêuticas, alimentícias, de higiene e de cosméticos (RODRIGUES, 2002; GREATHEAD, 2003; WALLACE, 2004; TAIZ & ZIEGER, 2004; BAKKALI *et al.*, 2008).

Esses metabólitos vêm sendo utilizados como aditivos alternativos ao uso de monensina. Em 1957, Crane *et al.*, demonstraram os primeiros efeitos dos óleos essenciais sobre a fermentação ruminal, onde estes inibiam a formação de metano.

O interesse nesses compostos é a utilização de aditivos naturais na nutrição animal, como manipuladores da fermentação ruminal, beneficiando o homem e o meio ambiente, sendo uma estratégia na melhoria da eficiência alimentar e na mitigação de metano. Há também maior demanda dos consumidores por produtos de origem animal produzidos organicamente, e por isso o crescente interesse na exploração de produtos naturais, que não apresentem riscos para a saúde e que possam melhorar a nutrição e produção animal (WALLACE, 2004; SALLAM *et al.*, 2011).

Os OEs são metabólitos secundários de plantas e diferem de compostos lipídicos, pois são moléculas complexas e hidrofóbicas, com compostos voláteis e variam de acordo com a parte da planta em que são encontrados (DORMAN & DEANS, 2000). Podem ser extraídos de várias regiões das plantas, e sua composição pode variar de acordo com o local do qual foram extraídos (LOSA, 2001). Geralmente estão concentrados nas cascas, flores, folhas, rizomas e sementes (ARAÚJO, 2008).

A composição dos óleos essenciais é determinada geneticamente, porém as condições ambientais têm a possibilidade de causar variações no ciclo vegetativo da planta, fazendo com que a concentração dos constituintes dos óleos varie durante o seu desenvolvimento (OLIVEIRA & IGARASI, 2003).

O termo “essencial” vem do latim quinto elemento, mas nutricionalmente não são essenciais (GREATHEAD, 2003). Melhoram a estabilidade do pH ruminal e a digestão da fração fibrosa do alimento (SILVA, 2014), diminuindo a relação acetato:propionato, e assim, reduzem as perdas de energia devido à produção de metano (ARAÚJO, 2010). Os OEs podem alterar a dinâmica da degradação proteica no rúmen pela diminuição das atividades microbianas, como a metanogênese (TEDESCHI *et al.*, 2011).

Os metabólitos secundários podem ser divididos em três grupos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (VIZZOTTO *et al.*, 2010). Os compostos mais importantes estão nos grupos dos terpenos (monoterpenos e

sesquiterpenos) e no grupo dos compostos fenólicos (fenilpropanóides) (ARAÚJO, 2010). Os óleos essenciais pertencem ao grupo dos terpenos, grupo de compostos antimicrobianos, ativos contra uma grande quantidade de microrganismos. Os monoterpenos mais conhecidos e ativos são o carvacrol (orégano), timol (tomilho), limoneno (polpa cítrica), guaiacol (guaiaco) e eugenol (cravo-da-india) (BENCHAAR *et al.* 2007). O limoneno é o principal produto obtido do aproveitamento de OEs no Brasil, utilizado como solvente e na fabricação de produtos de limpeza (BIZZO *et al.*, 2009).

Os óleos essenciais atuam de forma isolada, porém quando estão em conjunto permitem a manipulação de doses menores, e apresentam melhor funcionalidade (BURT, 2004). Por isso, empresas de nutrição animal apostam em *blends* (combinações) de compostos de óleos essenciais de natureza idêntica para melhor eficiência do produto.

Os óleos essenciais são de alto custo e com baixo retorno financeiro, o que é um fator contrário à sua utilização (CHIZZOTTI *et al.*, 2012). Outro problema para a utilização de óleos essenciais é que estes afetam menos espécies bacterianas do que aditivos como a monensina (WALLACE, 2004). Por serem compostos voláteis, os óleos podem ser perdidos via eructação ou podem atravessar a parede ruminal e serem absorvidos pela corrente sanguínea, demonstrando assim menor efeito sobre os microrganismos do rúmen (MISRA *et al.*, 1996; MALECKY, *et al.*, 2009).

3.5.3.1 Mecanismo de Ação

O modo de ação dos óleos essenciais depende do componente químico predominante e da concentração deste (BENCHAAR *et al.*, 2008). Devido à vasta quantidade de compostos presentes nos óleos, considera-se que há muitas formas de ação, não havendo um mecanismo específico para a atividade antimicrobiana (LAMBERT *et al.*, 2001). Esses mecanismos não são isolados, mas sim interdependentes (CARSON *et al.*, 2002).

As bactérias gram-positivas e gram-negativas sofrem a ação de moléculas biologicamente ativas presentes nos óleos essenciais (DABBAH *et al.*, 1970; PEREIRA *et al.*, 2011; SILVA, 2014). A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais geralmente ocorre sobre as bactérias gram-positivas, inibindo-as, porém, também apresentam efeitos sobre as bactérias gram-negativas. A ação sobre as bactérias

gram-negativas é mais difícil, devido à camada peptideoglicana desses microrganismos, que promove proteção extra contra várias substâncias, incluindo os óleos essenciais (ARAÚJO, 2010). As bactérias gram-negativas apresentam uma bicamada lipídica, formando uma barreira contra a permeabilidade de compostos hidrofóbicos, justificando a resistência dessas bactérias perante a ação dos óleos (SMITH-PALMER *et al.*, 1998). Mesmo com a presença da camada polipeptídica (hidrofílica) das bactérias gram-negativas, os metabólitos secundários atravessam a membrana, pois são pequenos e conseguem acessar o citoplasma através de porinas que estão na membrana externa. Nas bactérias gram-positivas, os metabólitos secundários tornam as membranas celulares fluidas e permeáveis, permitindo o transporte de íons e outros conteúdos celulares através da membrana. Este desbalanço do gradiente de íons causa problemas em processos essenciais para a sobrevivência das células, podendo levar a morte celular (DORMAN & DEANS, 2000).

Segundo Helander *et al.* (1998), os compostos fenólicos presentes nos óleos essenciais (carvacrol e timol) inibem não só o crescimento de bactérias gram-positivas como também das negativas, rompendo a membrana celular externa desses microrganismos devido à interação com a água, por pontes de hidrogênio. Isso faz com que a seletividade dos óleos essenciais em relação às bactérias gram-positivas e negativas seja ineficiente, diminuindo o potencial desses compostos como manipuladores da fermentação ruminal.

Pressupõe-se que a maioria das atividades exercidas pelos óleos essenciais seja interagindo com outros processos que ocorrem na membrana celular das bactérias, como inibir o transporte de elétrons, translocação de proteína, gradiente de íons e reações enzimáticas (ULTEE *et al.*, 1999; DORMAN & DEANS, 2000).

O fenol ligado ao grupamento hidroxila dos óleos essenciais realiza o carreamento de cátions monovalentes e de prótons através da membrana celular, trocando um próton hidroxila por outro íon, como por exemplo, potássio (K^+). No citoplasma da célula, o óleo se dissocia do próton H^+ , e retorna ao exterior da célula carreando um cátion do citoplasma. No exterior da célula, um próton é combinado com o óleo, e este, em sua forma protonada atravessa a membrana celular e dissocia-se do próton, liberando-o no interior da célula (ULTEE *et al.*, 2002).

O mecanismo de ação dos óleos é semelhante ao dos ionóforos, estes estimulam a produção de ácido propiônico, sem afetar a concentração total de ácidos graxos voláteis, reduzindo a concentração de hidrogênio livre no rúmen e assim,

inibindo a produção de CH₄. O efeito da adição de óleos em dietas é dose-dependente, podendo variar de acordo com as quantidades ofertadas (MORAIS *et al.*, 2006; BEAUCHEMIN *et al.*, 2008).

3.5.3.2 Resultados da utilização de óleos essenciais para mitigação de metano

Os efeitos dos óleos essenciais na mitigação de metano entérico estão relacionados com a defaunação de microrganismos no rúmen. Beauchemin & McGinn (2006) analisaram um *blend* de óleos essenciais para bovinos de corte, consumindo dieta à base de forragem e com adição de 1g/dia da mistura de óleos. As emissões de CH₄ não foram afetadas e a digestibilidade da dieta diminuiu (Tabela 4).

Segundo Calsamiglia *et al.* (2007), o fornecimento de dietas à base de concentrado, potencializam os efeitos dos óleos essenciais. Isto acontece devido ao baixo pH ruminal, aumentando a capacidade de interação dos óleos essenciais com proteínas e lipídios da membrana celular das bactérias.

Souza (2014), utilizando diferentes óleos essenciais, analisou o efeito da inclusão destes sobre o volume de metano (VCH₄), observando que todos os tratamentos foram eficientes na redução do mesmo. Os tratamentos com óleo de alho reduziram o VCH₄ em 66,2 e 77,5%, enquanto os tratamentos com óleo de canela e orégano reduziram o VCH₄ em 55 e 80,9%, e 81,3 e 94,8%, respectivamente, nas doses de 0,3 e 0,6 ml/L. Os tratamentos com resveratrol (uva) e timol, nas doses de 300 e 600 mg/L, reduziram o volume de metano entre 37,7 e 92,2%.

Chagas (2015) relatou que a suplementação de óleos essenciais melhorou o desempenho de bovinos confinados em fase inicial se comparado ao não uso de aditivos, contudo, esse efeito não é de longo prazo e não apresentou efeito sobre a redução do impacto ambiental.

Tabela 4. Efeitos observados sobre a produção de CH₄ por diversos autores com relação à quantidade de óleos essenciais fornecida.

Quantidade adicionada	Efeito sobre a produção de CH ₄	Referencia
1 g/dia (<i>blend</i>)	-	Beauchemin & McGinn (2006)
0,3 – 0,6 mL/L (alho)	-66,2; -77,5%	Souza (2014)
0,3 - 0,6 mL/L (canela)	-55%; -80,9%	Souza (2014)
0,3 – 0,6 mL/L (orégano)	-81,3%; -94,8%	Souza (2014)
300 – 600 mg/L (resveratrol)	-37,7%; -79,57%	Souza (2014)
300 – 600 mg/L (timol)	-76,66%; -92,25%	Souza (2014)
300 – 500 mg/kg (<i>blend</i>)	-	Chagas (2015)

Conclui-se que óleos essenciais têm potencial de uso como mitigadores de metano entérico, pois exercem impacto sobre a fermentação ruminal, mas a intensidade e amplitude dos efeitos dependem da composição química do óleo essencial, da dosagem e do tipo de dieta que o animal recebe (BENCHAAR *et al.*, 2006).

4 RELATÓRIO DE ESTÁGIO

4.1 Plano de Estágio

As atividades propostas no plano de estágio foram realizadas na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Gado de Leite, no Campus Experimental José Henrique Bruschi (CEJHB), nas dependências do Complexo Multusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade da Pecuária. As atividades foram realizadas durante um período de três meses (08 de agosto a 08 de novembro), somando 520 horas, e estão listadas abaixo:

- Apoio às análises laboratoriais relacionadas aos ensaios experimentais com bovinos;
- Processamento e condicionamento de amostras para procedimentos laboratoriais de cromatografia e avaliação da composição bromatológica;
- Suporte aos ensaios experimentais com bovinos;
- Produzir, em co-autoria com pesquisadores e/ou analistas da Embrapa Gado de Leite, obras passíveis de proteção por propriedade intelectual, citando dentre eles, mas sem a eles se limitar, trabalhos a serem publicados em anais de congressos, periódicos indexados, revistas de divulgação ou qualquer outro veículo de divulgação de trabalhos técnico-científicos, bem como livros, manuais, etc.

4.2 Local de Estágio

O estágio obrigatório foi realizado no Complexo Multusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade da Pecuária, da Embrapa Gado de Leite, vinculado ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), no Campus Experimental José Henrique Bruschi, na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais, no município de Coronel Pacheco.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) é uma instituição pública de pesquisa fundada em 26 de abril de 1973, composta por várias unidades de pesquisa. Um ano e meio após a sua criação, no dia 04 de outubro de 1974, foi deliberada a criação do Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite (CNPGL). A

inauguração do CNPGL ocorreu em 26 de outubro de 1976, tendo como sede a Fazenda Água Limpa, em Coronel Pacheco (MG), antiga Estação Experimental de Café do Departamento Nacional de Pesquisa e Experimentação Agropecuária.

Em 1978, uma fazenda produtora de café (Fazenda Santa Mônica) foi incorporada ao CNPGL como Campo Experimental Santa Mônica (CESM), sediado na cidade de Valença (RJ). No ano de 1996, o CNPGL passou a ser denominado Embrapa Gado de Leite, e um ano depois a sede da unidade foi transferida para Juiz de Fora (MG), e a antiga sede foi transformada no Campo Experimental José Henrique Bruschi.

Além dos dois campos experimentais, a Embrapa Gado de Leite possui Núcleos Avançados nas regiões Sul (Pelotas – RS), Centro-oeste (Santo Antônio de Goiás – GO), Norte (Porto Velho – RO) e Nordeste (Aracaju – SE), criados para atender as demandas das diferentes regiões brasileiras.

O Campo Experimental José Henrique Bruschi está localizado na Zona Rural da cidade de Coronel Pacheco (MG), com área total de 1.037 hectares, no km 42 da Rodovia MG 133, situado a 38 km da sede, em Juiz de Fora. Esta área está dividida em áreas de pastagem e produção de volumoso, experimentação à campo, laboratórios e dois sistemas de produção: à pasto e *free-stall*. O campo experimental comporta o Núcleo de Transferência, Treinamento e Capacitação da Pecuária Leiteira (NUTTEC), o Núcleo Sudeste da Embrapa Caprinos e Ovinos, a Vitrine Forrageira e o Complexo Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade da Pecuária, oferecendo também Residência Zootécnica.

A implantação do complexo multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade da Pecuária (Figura 3) no CEJHB ocorreu por etapas, com início no ano de 2012 e término no ano de 2015, com o objetivo de aumentar a eficiência dos sistemas de produção, com menor impacto ambiental. O complexo é composto por quatro laboratórios, sendo eles, o **Laboratório de Metabolismo e Impactos Ambientais da Pecuária**, onde são realizadas pesquisas com relação às exigências nutricionais, eficiência alimentar de ruminantes, tratamento de dejetos, gases de efeito estufa na pecuária e avaliação do valor nutricional de alimentos e forrageiras; **Laboratório de Biotecnologia e Ambiência**, que realiza estudos com biotécnicas da reprodução, endocrinologia, ambiência e comportamento animal para aumento da eficiência dos animais; **Laboratório de Pecuária de Precisão**, onde são conduzidas pesquisas que visam maximizar o retorno econômico e minimizar o impacto ao meio ambiente; e o

Laboratório de Saúde Animal, que comporta linhas de pesquisa para diagnóstico, controle e prevenção de doenças de animais de produção e avaliação e desenvolvimento de fármacos.



Figura 3. Complexo Multiusuário. Fonte: Embrapa (2014).

A maioria das atividades do plano de estágio foram realizadas no Laboratório de Metabolismo e Impactos Ambientais da Pecuária, mais especificamente no setor de Digestibilidade *in vitro* e Produção de Gases, onde são feitas análises laboratoriais *in vitro* para mensuração da produção de metano e desenvolvimento de alternativas para mitigação desse gás. No setor de Metabolismo de Grandes Ruminantes, composto por um sistema *tie-stall* para realização de ensaios de digestibilidade e um sistema *free-stall*, para permanência dos animais durante a adaptação às novas dietas, animais fistulados para coleta de líquido ruminal e espera de parição, no caso de experimentos que envolvam animais prenhes e produção de leite. E no Setor de Bioenergética, composto por quatro câmaras respirométricas (Figura 4) que são utilizadas para mensuração do consumo de oxigênio, produção de gás carbônico e emissão de metano pelos animais em períodos de 48 horas, sob a supervisão do Médico Veterinário, Dr. Luiz Gustavo Ribeiro Pereira (CRMV/MG – 5930).

O Dr. Luiz Gustavo Ribeiro Pereira é pesquisador da Embrapa Gado de Leite e coordenador do projeto RumenGases, realizado no Complexo Multiusuário, para avaliação da produção de metano entérico, gerando dados de emissão desse gás pelas principais espécies de ruminantes, e desenvolvendo tecnologias, produtos, processos e alternativas com potencial para redução da emissão de gases de efeito estufa pela pecuária.



Figura 4. Identificação das áreas de realização do estágio obrigatório no Complexo Multiusuário. (1) Sistema *free-stall*; (2) Sistema *tie-stall* (Setor de Metabolismo de Grandes Ruminantes); (3) Setor de Digestibilidade e Produção de Gases *in vitro*; (4) Setor de Bioenergética. Fonte: Google Earth (2016).

4.2.1 Setor de Metabolismo de Grandes Ruminantes

O setor de metabolismo de grandes ruminantes conta com um sistema *tie-stall* com 36 baias individuais com colchões de borracha, bebedouros com boias e cochos tradicionais, para alocação de animais durante experimentos com ensaios de digestibilidade e coleta de sangue (Figura 5).

O sistema *free-stall* tem 87 baias individuais, com colchões de borracha cobertos de maravalha, distribuídas em 7 divisões, com dispositivos eletrônicos com sensores para alimentação individual (*calan-gates*) e balança para monitoramento da frequência de visitas ao cocho e consumo de alimento em tempo real, e bebedouros automáticos acoplados a uma plataforma de pesagem, capazes de mensurar o consumo de água e o peso dos animais quando estes entram na plataforma.

Os dados de consumo de alimento e de água são enviados para o sistema Intergado, software de gestão que permite acesso aos dados gerados pelos equipamentos utilizados. Os animais permanecem no sistema *free-stall* para adaptação às novas dietas de experimentos, coleta de líquido ruminal e estimativa de exigências nutricionais para diferentes fases fisiológicas (Figura 6).



Figura 5. Sistema *tie-stall*. Fonte: Arquivo Pessoal.



Figura 6. (1) Bebedouro automático com balança acoplada; (2) Cochos automáticos Intergado. Fonte: Arquivo Pessoal.

4.2.2 Setor de Digestibilidade *in vitro* e Produção de Gases

O setor de digestibilidade *in vitro* e produção de gases é composto por um laboratório com estrutura para a realização de experimentos *in vitro* para mensuração da emissão de gases de efeito estufa. No laboratório há uma estufa mantida à temperatura de $39 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ para simulação da fermentação ruminal em frascos de vidro inoculados com microrganismos ruminais, com mesa agitadora que comporta 240 frascos simultaneamente, dois aparelhos com sistema de vasos comunicantes para leitura e mensuração de gases, um peagâmetro digital para medir o pH dos líquidos utilizados durante os experimentos, duas balanças de precisão para pesagem de amostras e uma estufa 105°C para retirada de umidade dos sacos de filtro (F57 Ankom®).

4.2.3 Setor de Bioenergética

O setor de bioenergética é composto por quatro câmaras respirométricas de aço, para grandes ruminantes, usadas em estudos de bioenergética, construídas em pares, com uma janela de acrílico vedada entre as câmaras, possibilitando a visualização entre os animais alocados e do interior da câmara (Figura 7). A temperatura dentro das câmaras é de 23°C , com duas aberturas opostas, a porta maior permite a entrada e saída do animal, e a através da porta menor é colocada a alimentação do animal correspondente ao período de mensuração, com o mínimo de deslocamento de ar.

O setor conta ainda com um conjunto de medidores de fluxo de ar (fluxômetros FK2K) e analisadores que permitem mensurações precisas das trocas gasosas (O_2 , CO_2 e CH_4) e da pressão de vapor d'água. Há também uma câmara para pequenos ruminantes e uma máscara facial respirométrica, utilizada para mensurar a produção de gases *in vivo* (Figura 8).

Todas as câmaras são monitoradas através do sistema ExpeData (Sable International Systems, Las Vegas, EUA), que executa com precisão o condicionamento e amostragem do ar, análise de gases, umidade relativa do ar e registro de dados.



Figura 7. (1) Vista interna da câmara respirométrica; (2) Vista externa dos pares de câmaras respirométricas. Fonte: Arquivo Pessoal.



Figura 8. (1) Câmara respirométrica para pequenos ruminantes; (2) Máscara Respirométrica. Fonte: Arquivo Pessoal.

4.3 Atividades desenvolvidas

4.3.1 Auxílio em experimentos *in vitro* e *in situ*

Durante o período de estágio foram realizados seis experimentos, sendo quatro experimentos *in vitro*, um experimento *in situ* e um experimento *in vitro* e *in situ*.

Os experimentos fazem parte do mestrado do Zootecnista Abias Santos Silva e do Engenheiro Agrônomo Duarte Carvalho Minighin, e do doutorado da Zootecnista Aline Fernanda Oliveira Ramos, que têm como objetivo propor e testar alternativas para a mitigação de metano entérico produzido por grandes ruminantes.

4.3.1.1 Experimentos *in vitro*

- I - Avaliação do efeito da inclusão de amilase e óleos essenciais na cinética de fermentação ruminal *in vitro*;
- II - Cinética de produção de gás e degradabilidade *in vitro* da MS de dois híbridos de milho em diferentes estádios de maturidade;
- III - Produção de gases e degradabilidade *in vitro* da MS de dois híbridos de milho e um híbrido de sorgo (BRS 332) e degradabilidade *in situ* da MS;
- IV - Coprodutos da Amazônia na alimentação de ruminantes;
- V - Extratos e óleos vegetais da Amazônia na alimentação de ruminantes;

A metodologia de avaliação da cinética de fermentação ruminal por meio da técnica *in vitro* foi descrita por Maurício *et al.* (1999). Nos experimentos, essa metodologia foi aplicada e adaptada de acordo com o que seria avaliado. Os aditivos adicionados à dieta e os substratos utilizado como amostra (Tabela 5), o tipo de dieta e a quantidade de animais doadores de líquido ruminal (Tabela 6), os horários de leitura e coleta de metano (CH_4) e o tempo de avaliação da degradabilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) (Tabela 7) foram diferentes entre os experimentos.

Durante os experimentos foram avaliados os parâmetros de produção de gases e a degradabilidade *in vitro* de dietas experimentais utilizando tratamentos controle e a adição de aditivos e coprodutos.

Tabela 5. Conteúdo das amostras utilizadas em experimentos *in vitro*.

Experimentos	Substrato	Amostras	
		Tratamentos	
I - Avaliação do efeito da inclusão de amilase e óleos essenciais na cinética de fermentação ruminal <i>in vitro</i> ;	Silagem de milho, feno Tifton 85 e concentrado.	Controle Amilase + Monensina Amilase + blend de óleos essenciais Monensina	
II - Cinética de produção de gás e degradabilidade <i>in vitro</i> da MS de silagem de dois híbridos de milho em diferentes estádios de maturidade;	Silagem dos híbridos RB9004 e RB9308, nos estádios leitoso, pastoso, farináceo e farináceo duro.	Controle Monensina + Amilase (Amilase exógena*)	
III - Produção de gases e degradabilidade <i>in vitro</i> da MS de dois híbridos de milho e um híbrido de sorgo (BRS 332) e degradabilidade <i>in situ</i> da MS;	Híbridos de milho: AG1051 (semi-dentado) e 1N1932 (duro). Híbrido de sorgo: BRS 332.	Controle Monensina + Amilase (Amilase exógena*)	
IV - Coprodutos da Amazônia na alimentação de ruminantes	Silagem de milho e dieta de alto grão. Silagem de milho.	Controle Tortas de Açaí, Andiroba, Babaçu, Castanha-do-Pará, Coco, Murumuru, Patauá, Dendê, Pracaxi, Amêndoas do Tucumã, Ucuúba e Bacuri.	
V- Extratos e óleos vegetais da Amazônia na alimentação de ruminantes	Silagem de milho.	Controle Óleos: Andiroba, Copaíba, Pracaxi e Tucumã. Extratos: Curauá e Açoita-cavalo	

*adicionada ao meio de cultura.

Tabela 6. Número de animais doadores de líquido ruminal e dieta experimental fornecida aos animais.

Experimentos	Nº de Animais doadores de líquido ruminal	Dieta Experimental
I - Avaliação do efeito da inclusão de amilase e óleos essenciais na cinética de fermentação ruminal <i>in vitro</i> ;	4	50:50 - Silagem de milho, feno Tifton 85 e concentrado (farelo de milho e farelo de soja) com adição de aditivos*.
II - Cinética de produção de gás e degradabilidade <i>in vitro</i> da MS de silagem de dois híbridos de milho em diferentes estádios de maturidade;	2	50:50 - Silagem de milho, feno Tifton 85 e concentrado (farelo de milho e farelo de soja) com adição de aditivos**.
III - Produção de gases e degradabilidade <i>in vitro</i> da MS de dois híbridos de milho e um híbrido de sorgo (BRS 332) e degradabilidade <i>in situ</i> da MS;	2	50:50 - Silagem de milho, feno Tifton 85 e concentrado (farelo de milho e farelo de soja) com adição de aditivos**.
IV - Coprodutos da Amazônia na alimentação de ruminantes	3	50:50 - Silagem de milho, feno Tifton 85 e concentrado (farelo de milho e farelo de soja).
V - Extratos e óleos vegetais da Amazônia na alimentação de ruminantes	3	50:50 - Silagem de milho, feno Tifton 85 e concentrado (farelo de milho e farelo de soja).

*adição de monensina, monensina+amilase e amilase+blend de OEs. **monensina+amilase.

Tabela 7. Tempo de leitura e coleta de metano e tempo de avaliação da degradabilidade *in vitro* da matéria seca.

Experimentos	Leitura e Coleta de CH ₄	DIVMS
I - Avaliação do efeito da inclusão de amilase e óleos essenciais na cinética de fermentação ruminal <i>in vitro</i> ;	24 h	96 h
II - Cinética de produção de gás e degradabilidade <i>in vitro</i> da MS de silagem de dois híbridos de milho em diferentes estádios de maturidade;	24 h	96 h
III - Produção de gases e degradabilidade <i>in vitro</i> da MS de dois híbridos de milho e um híbrido de sorgo (BRS 332) e degradabilidade <i>in situ</i> da MS;	24 h	48 h*
IV - Coprodutos da Amazônia na alimentação de ruminantes	12 h	96 h
V - Extratos e óleos vegetais da Amazônia na alimentação de ruminantes	12 h	96 h

*devido à alta degradabilidade do grão de milho.

Para avaliação da cinética de fermentação ruminal foram feitas incubações com amostras da dieta armazenadas em sacos de filtro (F57 Ankom[®]), previamente esterilizados em estufa à 105°C e pesados, mantidos em frascos de vidro âmbar de 50 mL (Figura 9). O material utilizado como amostra para as incubações é o mesmo fornecido aos animais, após ser congelado e moído em peneira de malha 1mm.



Figura 9. (1) Estufa 105°C, utilizada para esterilização dos sacos filtro; (2) Pesagem de amostras em balança de precisão; (3) Frascos de vidro âmbar de 50 mL, com sacos filtro. Fonte: Arquivo Pessoal.

Para iniciar as incubações, o líquido ruminal de vacas não lactantes, fistuladas no rúmen, era coletado duas horas após o fornecimento da dieta no período da manhã. O fluido colhido de cada animal era imediatamente filtrado com peneira e uma camada de gaze, sendo acondicionado em um recipiente térmico, previamente aquecido com água a 39°C, e então transportado para o laboratório e utilizado como inóculo para a incubação (Figura 10).



Figura 10. (1) Animal fistulado; (2) Coleta de líquido ruminal, via fistula; (3) Funil acoplado à garrafa térmica com uma camada de gaze e peneira para filtragem e armazenamento de líquido ruminal. Fonte: Arquivo Pessoal.

Para o experimento I houve troca de fluido ruminal entre os animais durante o período de adaptação à nova dieta, onde o animal que estava recebendo o tratamento com determinado aditivo troca de conteúdo ruminal com o animal que vai começar a receber esse aditivo para eliminar o efeito do animal, para que não restem sobras do antibiótico no rúmen e para que a flora microbiana do outro animal vá se adaptando

ao antibiótico (Figura 11). Nos experimentos **II, III, IV** e **V** foi realizado *pool* dos líquidos de todos os animais para eliminação do efeito da vaca.



Figura 11. (1) Retirada do conteúdo ruminal de animal fistulado. (2) Tambores para armazenar o conteúdo ruminal temporariamente, previamente à troca de líquido com outro animal. Fonte: Arquivo Pessoal.

O pH do líquido ruminal foi mensurado dentro da estufa, a 39°C, e misturado a uma solução tampão, gerando o meio de cultura para a incubação, sendo mensurados também os valores de pH da solução tampão e do meio de cultura.

Nos frascos de 50 mL foram adicionados 25 mL do meio através de um dispensador, e posteriormente os frascos foram gaseificados com CO₂ e fechados com rolhas de borracha, sendo estas rolhas perfuradas com agulhas hipodérmicas de 25x0,80 mm para que o gás O₂ (menos denso que CO₂) saia e a atmosfera dentro do frasco fique livre de oxigênio. Foram usadas anilhas de alumínio para a vedação dos frascos, prevenindo o escape dos gases provenientes da fermentação. Os frascos foram colocados na mesa agitadora da sala climatizada a 39°C, que era acionada por 2 minutos de duas em duas horas durante todo o experimento (Figura 12).



Figura 12. (1) Dispensador de líquido; (2) Frasco de vidro com rolha de borracha e anilha de alumínio; (3) Mesa agitadora. Fonte: Arquivo Pessoal.

Após a incubação iniciaram-se as leituras de produção de gases, sendo que nas primeiras 12 horas de experimento as leituras eram feitas de duas em duas horas, a partir do horário de início da incubação, e depois eram feitas nos horários de 15, 19, 24, 30, 36, 48, 72 e 96 horas, tempos de degradação da matéria seca. Para a leitura do volume de gases produzidos, foi utilizado um sistema vaso comunicante com deslocamento da coluna de água no interior de um tubo graduado (Figura 13).

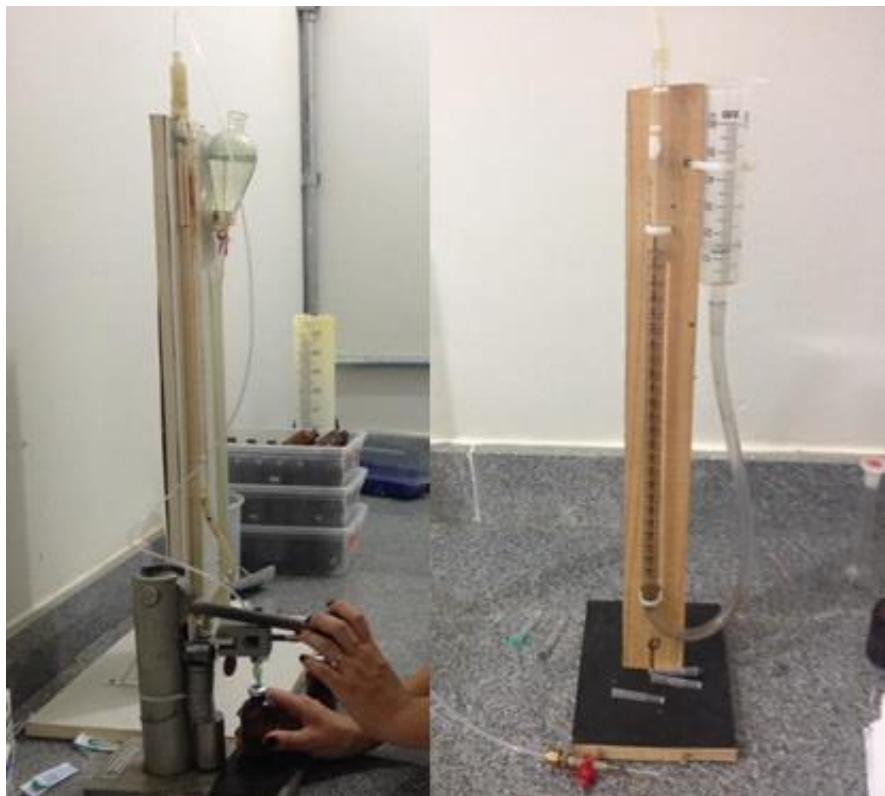


Figura 13. Sistemas vaso comunicantes para mensuração da quantidade de gases produzidos. Fonte: Arquivo Pessoal.

A coleta de metano nos experimentos **I**, **II** e **III** foi feita 24 horas após o início do experimento, e nos experimentos **IV** e **V** com 12 horas, pois a produção de gases estava muito alta e os gases mais leves poderiam escapar ou a pressão aumentaria, fazendo com que boa parte dos gases ficasse em estado líquido.

Após a mensuração do volume de metano produzido, foram coletados 10mL de gases por meio da inserção de uma seringa de 20mL no septo dos frascos. Os gases coletados foram imediatamente transferidos para *vials* com tampa de rosca previamente evacuados (*exetainers*) que eram embalados e enviados para a sede da Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora (MG), onde uma subamostra de 5mL é retirada dos *exetainers* para análise das concentrações de metano e gás carbônico por cromatografia gasosa (Figura 14).



Figura 14. Análise da produção de metano (CH_4) e gás carbônico (CO_2) por cromatografia gasosa. Fonte: Arquivo Pessoal.

Após a coleta de metano, a cinética de produção de gases foi lida e os frascos colocados em recipientes com gelo para cessar o processo fermentativo. As anilhas e

rolhas de borracha foram removidas e o pH dos inóculos medido, fora da estufa, utilizando um peagâmetro digital (Figura 15).

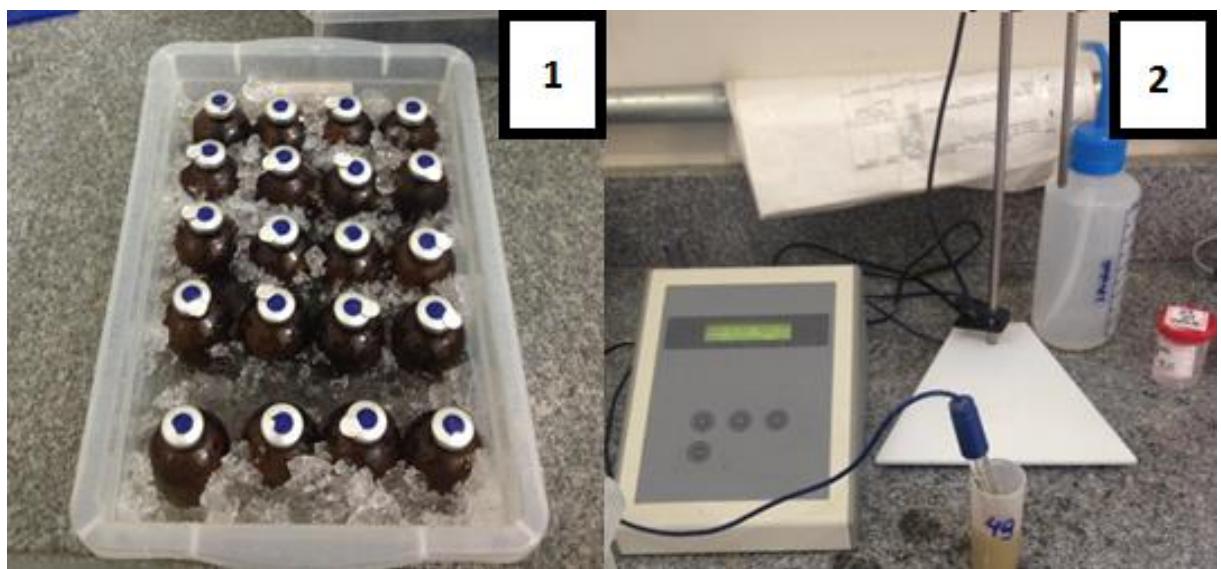


Figura 15. (1) Frascos em recipiente com gelo para cessar o processo fermentativo; (2) Mensuração do pH do inóculo. Fonte: Arquivo Pessoal.

Do líquido presente nos frascos foram coletados 10 mL do sobrenadante, sendo 5 mL armazenados em frascos Falcon® contendo 1mL de ácido metafosfórico como conservante, para avaliação das concentrações de AGVs. Os frascos contendo as amostras acidificadas foram congelados a -20°C até serem analisados por cromatografia líquida de alta eficiência. Os outros 5 mL do sobrenadante foram utilizados para determinação da concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃), onde o líquido foi armazenado em frascos contendo 0,030mL de ácido sulfúrico como conservante, que foram imediatamente congelados a -20°C até serem analisados por colorimetria (Figura 16-1).

Os sacos, armazenados dentro dos frascos, contendo resíduos das amostras incubadas foram retirados, colocados no gelo (Figura 16-2) e lavados com água destilada, e em seguida foram colocados em uma estufa a 55°C, por 48 horas, e posteriormente foi realizada a pesagem para determinação da degradabilidade *in vitro* da matéria seca.

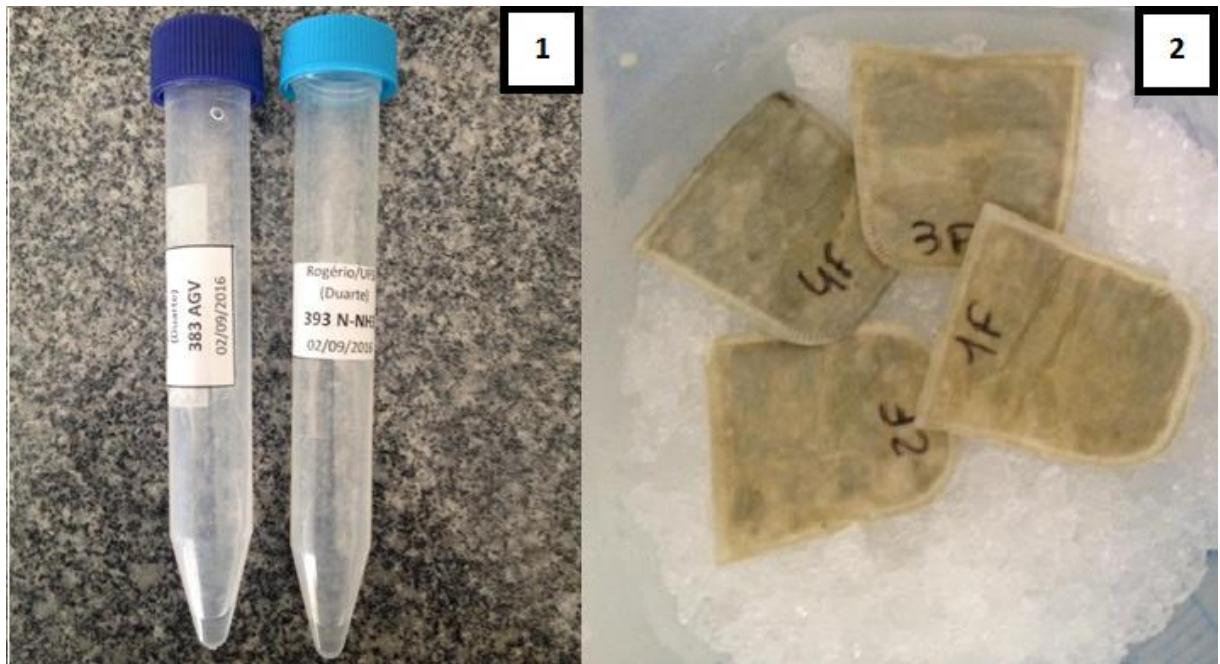


Figura 16. (1) Frascos Falcon 20 mL para armazenamento de 5 mL de sobrenadante; (2) Sacos filtro após serem retirados dos frascos de vidro. Fonte: Arquivo Pessoal.

No tempo de 48 horas para o experimento **III** e no tempo de 96 horas para os experimentos **I**, **II**, **IV** e **V**, foram abertos o restante dos frascos, que foram utilizados para avaliação da cinética ruminal, e assim como na hora da coleta de metano, os valores de pH dos inóculos foram medidos, e foi feita a retirada de 10 mL do sobrenadante para determinação de ácidos graxos voláteis e concentração de nitrogênio amoniacial. Os sacos contendo os resíduos das amostras foram retirados dos frascos, lavados com água destilada, secos a 55ºC por 48 horas, e pesados para estimar a DIVMS.

As incubações ocorreram aos quinze dias de adaptação dos animais à dieta, devido à coleta de líquido ruminal. No experimento **I** os aditivos comerciais (amilase e óleos essenciais) foram adicionados ao concentrado que era utilizado como amostra. Os experimentos **II** e **III** recebiam adição de amilase exógena no meio de cultura utilizado para a incubação. Já nos experimentos com extratos e óleos da Amazônia, estes eram adicionados diretamente nos frascos de simulação do processo fermentativo no rúmen.

4.3.1.2 Experimentos *in situ*

- **I - Parâmetros ruminais de vacas leiteiras suplementadas com amilase e óleos essenciais;**
- **II - Produção de gases e degradabilidade *in vitro* da MS de dois híbridos de milho e um híbrido de sorgo (BRS 332) e degradabilidade *in situ* da MS;**

Para o experimento I foram utilizadas quatro vacas não-lactantes, fistuladas no rúmen, uma para controle e as outras três recebendo tratamentos com aditivos, sendo duas delas também utilizadas no experimento II. No experimento I o tempo de degradação da MS foi de 96 horas, enquanto no experimento II o tempo de degradação da MS foi de 48 horas devido ao milho apresentar alta degradabilidade (Tabela 8). O experimento I foi composto por 14 dias de adaptação dos animais à nova dieta, com 10 avaliações de escore de fezes durante a última semana de adaptação à dieta e 7 dias de coleta de dados sobre consumo. Não houve avaliação do escore de fezes, nem coleta de dados sobre consumo no experimento II.

Nos experimentos *in situ* também houve troca de líquido ruminal entre os animais, para garantir que não houvesse resíduos de antibiótico no rúmen, evitar efeito do animal nos resultados e que ocorresse a adaptação da flora microbiana ao novo tratamento.

Tabela 8. Descrição dos experimentos de degradabilidade *in situ*.

Experimentos	Nº de animais utilizados por incubação	Conteúdo das amostras	Tempo de degradação das amostras
I - Parâmetros ruminais de vacas leiteiras suplementadas com amilase e óleos essenciais;	4	Silagem de milho, feno de Tifton 85 e concentrado com adição de aditivos.	96 horas
II - Produção de gases e degradabilidade <i>in vitro</i> da MS de dois híbridos de milho e um híbrido de sorgo (BRS 332) e degradabilidade <i>in situ</i> da MS;	2	Híbridos de milho: AG1051 (semi-dentado) e 1N1932 (duro). Híbrido de sorgo: BRS 332	48 horas

A dieta dos animais era composta por feno de Tifton 85, silagem de milho e concentrado, sendo que os animais tiveram acesso *ad libitum* à água e à suplementação mineral.

Os experimentos seguiram a metodologia descrita por Chaves *et al.* (2006), que foi adaptada de acordo com o substrato utilizado como amostra. No experimento I, uma amostra de silagem e feno fornecidos aos animais foi separada e congelada a -20°C, e essa amostra, ainda congelada, era moída para mimetizar a mastigação animal. Como o material é moído congelado, há uma menor perda de compostos solúveis, pois ocorre pouca ruptura da parede celular vegetal. A amostra de volumoso foi adicionada juntamente com a amostra de concentrado contendo aditivos, em sacos de *nylon* (previamente secos a 55°C e pesados), para incubação *in situ*. Os sacos foram selados e armazenados a -20°C até o momento da incubação. No experimento II, os grãos de híbridos de milho e do híbrido de sorgo foram moídos em peneira de malha 2 mm, em moinho tipo Willey, e adicionados em sacos de filtro (F57 Ankom®). Para cada tratamento (dieta experimental), foram utilizados três sacos (triplicata) por tempo de incubação. O mesmo procedimento foi realizado para todos os animais. Os tratamentos foram avaliados nos tempos 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 e 96h de incubação para o experimento I, e até 48 horas para o experimento II.

Os sacos referentes a cada tempo de degradação foram colocados dentro de sacos de poliéster, juntamente com pesos metálicos (de aproximadamente 300g), os quais os mantiveram submersos no líquido ruminal. Todos os sacos de poliéster foram colocados no rúmen ao mesmo tempo, e retirados um a um, aleatoriamente, respeitando cada tempo de degradação. Após a retirada, os sacos de poliéster foram lavados em água corrente, identificados e congelados a -20°C.

Os sacos referentes ao tempo de incubação zero não foram colocados no rúmen dos animais, sendo apenas congelados e posteriormente lavados, juntamente com os demais sacos referentes aos tempos de incubação subsequentes. Após a lavagem, os sacos foram levados para estufa (55°C) e pesados. Desta forma, é possível quantificar a fração solúvel (tempo zero) das dietas e o desaparecimento de MS ao longo dos tempos avaliados.

4.3.2 Avaliação de consumo e digestibilidade

Para avaliação do efeito do tamanho de partícula sobre o desempenho e produção de metano de vacas com 100 dias de lactação, foram realizados dois ensaios de digestibilidade, com intervalo de um mês entre os ensaios e duração de 20 dias, sendo 14 dias de adaptação à dieta e 6 dias de coleta de dados em sistema *tie-stall*, no setor de metabolismo de grandes ruminantes.

Foram utilizados oito animais, quatro 7/8 Holandês e quatro F1 mestiças (Holandês x Gir), divididos em dois grupos, cada grupo com dois animais de cada linhagem, um recebendo dieta previamente misturada em vagão forrageiro e outro com dieta misturada na betoneira, testando dois tamanhos de partícula de silagem de milho, como parte do experimento de doutorado do Zootecnista Rafael Sandin Ribeiro.

Os animais eram alimentados no período da manhã e da tarde, de acordo com o grupo em que estavam divididos. O período de adaptação à dieta ocorreu em sistema *free-stall*, com dieta fornecida uma vez ao dia, com água permanentemente à disposição.

Ao longo dos ensaios foram coletados dados para avaliação do consumo de matéria seca (MS), produção e composição do leite, digestibilidade aparente da matéria seca e FDN, balanço de nitrogênio, parâmetros ruminais, partição energética e sequenciamento microbiano.

O consumo de MS e dos nutrientes foi calculado de acordo com a quantidade ingerida diariamente, obtida pela diferença entre o fornecido e as sobras. As sobras eram pesadas somente quando ocorriam, pois, por ser um experimento que avaliou o efeito do tamanho de partícula, não deveria haver sobras, mas se houvessem a dieta era corrigida para que isso não ocorresse. Além da pesagem do oferecido, era realizada a avaliação do tamanho de partículas da silagem fornecida pelo método *Penn State* (Penn State Particle Size Separator, University Park, PA).

No período de ensaio era feito escore de fezes dos animais para avaliação da saúde ruminal, quantificação de fibras na dieta e taxa de passagem. Além do escore de fezes, foram coletadas amostras de leite, urina, fezes e líquido ruminal via sonda esofágica.

Nas primeiras 48 horas de cada ensaio foram realizadas coletas totais de urina com auxílio de sondas (Figuras 17-1), com período prévio de adaptação, sendo a cada 24 horas coletada uma amostra de 60 mL de urina, sendo 50 mL armazenados em potes vazios para análise de urina, e os outros 10 mL acondicionados em potes contendo 50 mL de ácido sulfúrico, como conservante (Figura 17-2).



Figura 17. (1) Animais com sonda urinária acoplada a galões para coleta total de urina; (2) Potes contendo amostras de urina com e sem adição de ácido sulfúrico. Fonte: Rafael Sandin (2016).

As coletas de fezes foram realizadas diariamente durante os ensaios, duas vezes por dia. Para determinação da composição das fezes foram coletadas amostras de 500 g direto da ampola retal (Figura 18-1), e para avaliação da digestibilidade da matéria seca foram coletadas amostras homogêneas de 500 g, retiradas de tambores que foram cheios com fezes coletadas do piso das baías e da calha coletora (Figura 18-2). As amostras de fezes foram armazenadas em sacos plásticos, pesadas, secas em estufa a 65°C por 72 horas, e posteriormente armazenadas para serem moídas e analisadas.



Figura 18. (1) Coleta de fezes direto da ampola retal; (2) Tambores para armazenamento de fezes coletadas dos colchões das baías e da calha coletora. Fonte: Rafael Sandin (2016).

Do primeiro ao quinto dia de coleta de dados houve pesagem do leite e retirada de amostras individuais de animais ordenhados duas vezes por dia com ordenhadeira móvel no sistema *tie-stall*, para análise de produção e composição do leite. No último dia do ensaio de digestibilidade foi coletada uma amostra de líquido ruminal via sonda esofágica para determinar o pH e avaliar o perfil de AGVs e N-NH₃ (Figura 19).



Figura 19. (1) Ordenha em sistema *tie-stall*, com ordenhadeira móvel; (2) Coleta de líquido ruminal via sonda esofágica. Fonte: Rafael Sandin (2016).

4.3.3 Operação de câmaras respirométricas

Assim que o período de adaptação às dietas experimentais acabava, os animais passavam por avaliação do consumo de O₂ e produção de CO₂ e CH₄ em câmaras respirométricas (Figura 20-1), sendo realizados dois períodos de avaliação seguidos, com duração de 20-22 horas cada.

Previamente à entrada nas câmaras, foi realizada a pesagem e adaptação dos animais ao procedimento de respirometria e aos equipamentos. No dia em que os animais entram nas câmaras, estas passam por um processo de calibração dos analisadores de gás (Figura 20-2), que consiste em injetar um fluxo constante de gases (N₂, CO₂, CH₄ e O₂) em concentrações conhecidas no sistema de análise, para estabilização dos valores de concentração dos gases detectados no interior da câmara. A calibração com N₂, CO₂ e CH₄ é feita toda vez que os animais vão entrar na câmara, enquanto a calibração de O₂, que é um gás mais estável, é feita de 15 em 15 dias.

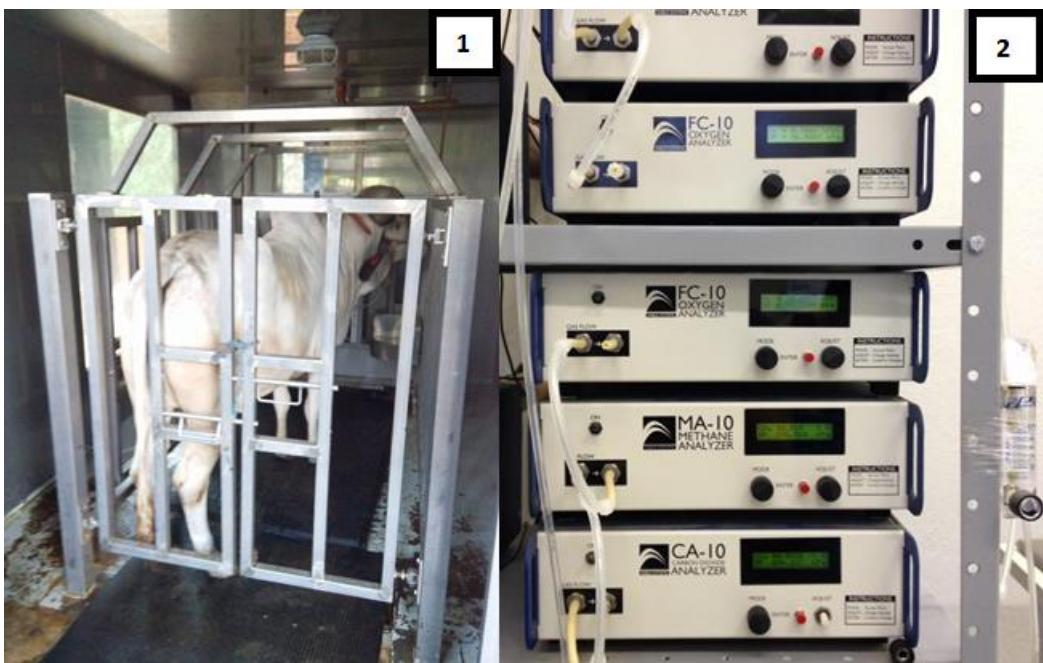


Figura 20. (1) Animal F1 (Gir x Holandês) dentro da câmara respirométrica para grandes ruminantes; (2) Analisadores de gás (O_2 , CH_4 e CO_2). Fonte: Arquivo Pessoal.

Durante o funcionamento normal das câmaras, a leitura é feita separadamente, uma câmara de cada vez. O amostrador de ar puxa uma amostra de ar da câmara para os analisadores, essa amostra passa pela entrada do sistema que lê a umidade, e após, eram lidos gás carbônico, metano e oxigênio, sempre nessa ordem. O N_2 é utilizado apenas para limpeza do sistema durante a calibração. O intervalo de leitura utilizado é de 200 segundos, definido pelo software de aquisição de dados (ExpeData). Quando as quatro câmaras estão funcionando ao mesmo tempo, a sequência de leitura é: linha base (ar externo), câmara 1, câmara de 2, linha base (ar externo), câmara 3 e câmara 4, com tempo total de 20 minutos por ciclo.

As câmaras eram limpas antes da entrada dos animais, o esgoto de água verificado para descartar possíveis vazamentos, os cochos calibrados, tarados e travados um a um. Os animais entravam nas câmaras pelo período da manhã, e assim que as portas eram fechadas era medida a pressão (Pa), esta deveria estar negativa (entre -50 e -150 Pa).

A leitura no programa ExpeData era iniciada 20 minutos após a entrada dos animais na câmara, para estabilização das concentrações dos gases dentro da câmara. O alimento era colocado nos cochos assim que a leitura era iniciada, sendo a quantidade de dieta fornecida nos dois períodos igual à quantidade ofertada ao animal no sistema *free-stall*.

Animais lactantes em experimento tiveram sua produção de metano mensurada em relação à produção de leite e foram retirados das câmaras para ordenha, no período da manhã e da tarde.

Os dados de mensuração de gases eram arquivados em formato ExpeData e exportados para planilhas no Excel, para interpretação dos resultados. Os resultados eram analisados e se os valores de consumo de MS, produção de metano e produção de calor apresentassem variações, os animais teriam que passar novamente por avaliação nas câmaras.

O consumo de ração era registrado diariamente, e amostras de alimento oferecido e respectivas sobras de cada animal eram recolhidas para análises, quando os animais eram retirados das câmaras. Após a retirada dos animais, as câmaras eram higienizadas.

4.3.4 Outras atividades realizadas simultaneamente:

- Acompanhamento e auxílio nas atividades do setor de reprodução.
- Acompanhamento e auxílio nos experimentos do setor de metabolismo de pequenos ruminantes.
- Ordenha de animais em experimento.
- Organização do banco de dados do programa Intergado.
- Alimentação dos animais.
- Curso de atualização em Pecuária de Leite.

5 DISCUSSÃO

O plano de estágio foi cumprido totalmente, pois as atividades propostas foram muito amplas, dando ênfase nas atividades laboratoriais de mensuração da produção de metano após as aplicações de alternativas para redução da produção de metano proveniente da fermentação ruminal. Foi possível acompanhar a realização de seis experimentos completos, desde a fase de pesagem de amostras até a mensuração de gases liberados na fermentação *in vitro*, o que foi de extrema importância, pois essa experiência contribuiu para que fosse compreendida a forma com que novas pesquisas são criadas e implantadas, e como na prática é feita a experimentação *in vitro*. Além dos experimentos envolvendo ensaios de digestibilidade e a passagem dos animais em câmaras respirométricas, tecnologia pouco conhecida por parte do aluno.

Outras atividades foram executadas, sempre com a finalidade de auxiliar em experimentos que estavam acontecendo simultaneamente aos que envolviam a nutrição de grandes ruminantes. As atividades que foram realizadas em outros setores ampliaram o contato com diversos pesquisadores e estagiários, e permitiram proximidade com áreas que foram amplamente estudadas durante a graduação, como as atividades do setor de reprodução.

Pesquisas na área de nutrição de ruminantes que relacionem melhora na eficiência alimentar dos animais com questões ambientais, com a diminuição de possíveis impactos causados pela pecuária são de extrema importância. As técnicas de produção de gases *in vitro* podem ser realizadas previamente a experimentos *in vivo*, para avaliação dos alimentos usados nas dietas e determinação da eficiência na produção e o impacto ambiental.

O estágio final em uma empresa de pesquisa de renome como a Embrapa Gado de Leite estimula o pensamento de permanência na área acadêmica, a execução da prática na pesquisa e a importância de um Zootecnista, não só na questão da nutrição animal, mas também no âmbito da redução dos impactos ambientais.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A oportunidade de estagiar em uma empresa como a Embrapa e vivenciar na prática as atividades que envolvem o desenvolvimento e elaboração de pesquisas, fez com que mais conhecimento fosse agregado, além do adquirido ao longo dos anos no curso de Zootecnia. O estágio permitiu um aprimoramento em uma das áreas do pilar da Universidade, a pesquisa. Apesar da maioria das atividades terem sido desenvolvidas no campo experimental José Henrique Bruschi, os conhecimentos repassados foram satisfatórios e ajudaram a enxergar mais um campo de atuação do Zootecnista. Conseguir conviver e trabalhar em grupo, e compreender como e por que as atividades eram realizadas foram pontos determinantes para o bom desempenho das atividades durante o período de estágio.

A experiência do estágio foi positiva, o período de estagio permitiu o acompanhamento de diversos experimentos em diferentes áreas, possibilitando aliar os conhecimentos práticos e teóricos adquiridos durante a graduação com as atividades desenvolvidas no local de estágio, sendo de grande importância para a formação profissional. A convivência com funcionários, pesquisadores, analistas e outros estagiários, além de estimular o trabalho em equipe proporcionou um crescimento profissional. E o desenvolvimento da revisão bibliográfica permitiu uma releitura de assuntos discutidos durante a graduação e o aprendizado de novos conhecimentos.

A Embrapa disponibilizou condições para que o estágio curricular fosse uma experiência única (profissional e pessoal) e indispensável para a minha formação. A oportunidade de viver diariamente em uma grande empresa, participar das atividades desenvolvidas, se relacionar com as pessoas em um local diferente, viver em outra cidade, em outro Estado e sair da Universidade foram desafios essenciais para a formação de um bom profissional da área de Zootecnia.

Essa experiência permitiu que a necessidade de melhoria fosse enxergada em alguns pontos, como na maior pró-atividade do setor de recursos humanos, melhorando o funcionamento da empresa e por consequência das atividades ali realizadas. Outro ponto importante a ser levantado em consideração, é a demora para manutenção dos equipamentos que apresentavam defeitos, atrapalhando o andamento dos experimentos. Porém, vale ressaltar que os funcionários foram

receptivos e estavam sempre dispostos a sanar dúvidas, auxiliar nos experimentos e resolver os problemas que apareceram durante o estágio. E a oportunidade de participar do curso de atualização da pecuária de leite, que reforçou alguns conceitos aprendidos na universidade e proporcionou novos conhecimentos.

Ao final do curso de graduação, percebe-se a importância da realização do estágio curricular para a formação e o amadurecimento profissional. O desenvolvimento da revisão bibliográfica permitiu a releitura de assuntos discutidos durante a graduação e o aprendizado de novos conhecimentos, evidenciando que para formação de um bom profissional é preciso saber de diferentes áreas de atuação e atualizar-se constante sobre novos assuntos.

7 REFERÊNCIAS

ANTUNES, R.C.; RODRIGUES, N.M. Metabolismo dos carboidratos não estruturais. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de ruminantes**. 1^a ed. Jaboticabal: Funep, 2006. p.229-248.

ARAÚJO, J.M.A. Óleos Essenciais. In: ARAÚJO, J.M.A. **Química de Alimentos: Teoria e Prática**. 4^a ed. Viçosa: UFV, 2008. p.273-284.

ARAÚJO, R.C. **Óleos essenciais de plantas brasileiras como manipuladores da fermentação ruminal *in vitro***. 2010. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2010.

ARAÚJO, E.P. **Predição da produção do metano entérico de vacas leiteiras**. 2011. 27p. Seminário Aplicado. Universidade Federal de Goiás Escola de Veterinária e Zootecnia programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2011.

ARCURI, P.B.; LOPES, F.C.F.; CARNEIRO, J.C. Microbiologia do rúmen. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de ruminantes**. 1^a ed. Jaboticabal: Funep, 2006. p.111-140.

BAKER, S.K. Rumen methanogens, and inhibition of methanogenesis. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.50, n.8, p.1293-1298, 1999.

BASSI, M.S.; LADEIRA, M.M.; CHIZZOTTI, M.L. et al. Grãos de oleaginosas na alimentação de novilhos zebuínos: consumo, digestibilidade e desempenho. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.41, n. 2, p.353-359, 2012

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, 2008, p. 446-475, 2008.

BEAUCHEMIN, K.A.; McGINN, S.M. Methane emissions from beef cattle: effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, n. 6, p.1489- 1496, 2006.

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

BEAUCHEMIN, K.A. Mitigation of greenhouse gas emissions from beef production in western Canada – Evaluation using farm-based life cycle assessment. **Animal Feed Science and Technology**, Lethbridge, v.166–167, p.663– 677, 2011.

BENCHAAR, C.; POMAR, C.; CHIQUETTE, J. Evaluation of dietary strategies to reduce methane production in ruminants: A modelling approach. **Canadian Journal of Animal Science**, Nova Scotia, v.81, p.563-574, 2001.

BENCHAAR, C.; DUYNISVELD, J. L.; CHARMLEY, E. Effects of monensin and increasing dose levels of a mixture of essential oil compounds on intake, digestion and growth performance of beef cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, Rockhampton, v.86, p. 91–96, 2006.

BENCHAAR, C.; CHAVES, A.V.; FRASER, G.R. *et al.* Effects of essential oils and their components on *in vitro* rumen microbial fermentation. **Canadian Journal of Animal Science**, Quebec, v. 87, p.413-419, 2007.

BENCHAAR, C.; CALSAMIGLIA, S.; CHAVES, A.V.; *et al.* A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. **Animal Feed Science and Technology**, v.145, n.1/4, p.209-228, 2008.

BENETEL, G. **Efeitos da inclusão de monensina sódica em suplementos proteicos sobre o desempenho, fermentação ruminal, degradabilidade do feno de *Brachiaria decumbens* e produção de metano em bovinos.** 2014. 104f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

BERCHIELLI, T.T.; PEDREIRA, M.S.; OLIVEIRA, S.G. *et al.* Determinação da produção de metano e pH ruminal em bovinos de corte alimentados com diferentes relações volumoso:concentrado. In: Reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia, 2003. Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: SBZ, 2003.

BIZZO, H.R.; HAVEL, A.M.C.; REZENDE, C, M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v.32, n.3, p.588-594, 2009.

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

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n.3, p.223-253, 2004.

CARSON, C.F.; MEE, B.J.; RILEY, T.V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Australia, v. 46, p. 1914-1920, 2002.

CHAGAS, L.J. **Desempenho, metabolismo e emissão de metano de bovinos Nelore em terminação recebendo óleos funcionais em substituição ou combinação com monensina sódica na dieta.** 2015. 135f. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2015.

CHAVES, A.V.; WAGHORN, G.C.; BROOKES, I.M. *et al.* Effect of maturation and initial harvest dates on the nutritive characteristics of ryegrass (*Lolium perenne L.*). **Animal Feed Science and Technology**, v.127, p.293-318, 2006.

CHEN, M.; WOLLIN, M.J. Effect of monensin and lasalocid-sodium on the growth of methanogenic and rumen saccharolytic bacteria. **Applied Environment Microbiology, Albany**, v.38, p.72-77, 1979.

CHIZZOTTI, M. L.; LADEIRA, M.M.; MACHADO NETO, O.R. et al. **Eficiência da produção de bovinos e o impacto ambiental da atividade pecuária**. In: VII SIMPEC – Simpósio de Pecuária de Corte e II Simpósio Internacional de Pecuária de Corte, Lavras, 2011. p.37-60.

CHIZZOTTI, M.L.; PEREIRA, L.G.R.; CHIZZOTTI, F.H.M. et al. **Uso da nutrição para redução na geração de metano: eficiência no uso da energia para ruminantes x meio ambiente**. 2012. Acessado em: 30 de set. 2016. Online. Disponível em: <<http://www.sprc.famev.ufu.br/node/111>>

COTA, O.L. **Emissão de metano por bovinos nelore submetidos a diferentes planos nutricionais**. 2013. 53f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2013.

CRANE, A.; NELSON, W.O.; BROWN, R.E. Effects of D-Limonene and α -D-Pinene on *in vitro* Carbohydrate Dissimilation and Methane Formation by Rumen Bacteria. **Journal of Dairy Science**, v.40, n.10, p.1317-1323, 1957.

DABBAH, R.; EDWARDS, V.M.; MOATS, W.A. Antimicrobial action of some citrus fruit oils on selected food-borne bacteria. **Applied Microbiology**, Beltsville, v.19, n.1, p.27-31, 1970.

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

DORMAN, H.D.J.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.88, n. 2, p.308-316, 2000.

ESTREMOTE, M. **Produção e emissão de gases de efeito estufa de bovinos alimentados com teores de concentrado**. 2016. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Animal) – Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Ilha Solteira, 2016.

FARRÁS, R.P.; GIMÉNEZ, A.J. **Bioquímica de los microrganismos**. 1^a ed. Barcelona: Revérte, 1997. 404p.

FASSIO, P.O.; FASSIO, L.O.; MARTINS, A.C. et al. **Estratégias Nutricionais para reduzir a emissão de Metano em Bovinos**. In: III Semana de Ciência e Tecnologia do IFMG campus Bambuí. 2010.

FELIPETTO, A.V.M. **Mecanismo de Desenvolvimento Límpio – Conceito, planejamento e oportunidades**. IBAM, 2007. 40p.

FONSECA, M.P. **Consumo, digestibilidade aparente e emissão de metano em novilhos f1 Holandês x Gir suplementados com monensina e ou virginiamicina.** 2012. 66f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

FURLAN, R.L.; MACARI, M.; FARIA FILHO, D.E. Anatomia e fisiologia do trato gastrointestinal. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de ruminantes.** 1^a ed. Jaboticabal: Funep, 2006. p.1-21.

GARCIA, L.F. **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.** 2013. 45f. Dissertação (mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

GASTALDI, K.A. **Produção in vitro de metano, dióxido de carbono e oxigênio utilizando líquido ruminal de bovinos alimentados com diferentes rações.** 2003.104f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária.** 2^a ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006. 357p.

GRAMINHA, C.V.; MARTINS, A.L.M.; FAIÃO, C.A. *et al.* **Aditivos na Produção de Bovinos Confinados.** 2012. Acessado em: 20 de ago. 2016. Disponível em: <http://www.grupoapb.com.br/pdf/bovinos_confinados.pdf>

GREATHEAD, H. Plants and plant extracts for improving animal productivity. *The Proceedings of the Nutrition Society*, Leeds, v.62, p.279–290, 2003.

GUAN, H.; WITTENBERG, K.M.; OMINSKI, K.H. *et al.* Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. *Journal of Animal Science*, Manitoba, v.84, p.1896–1906, 2006.

HEGARTY, R. **Greenhouse gas emissions from the Australian livestock sector what do we know, what can we do?** Canberra: NSW Agriculture Australian Greenhouse Office, 2001. 52p.

HELANDER, I.M.; ALAKOMI, H.L.; LATVA-KALA, K. *et al.* Characterization of the action of selected essential oil components on gram negative bacteria. *Journal of Agricultural and food chemistry*, Washington, v. 46, n. 9, p.3590-3595, 1998.

HENDERSON, C.; STEWART, C.S.; NEKREP, F.V. The effect of monensin on pure and mixed cultures of rumen bacteria. *The Journal of applied bacteriology*, Aberdeen, v. 51, p. 159-69, 1981.

IBGE. **Pesquisa Pecuária Municipal - 2015.** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Brasília, 29 set. 2016. Acessado em: 18 out. 2016. Online. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2015/>>

IMMIG, I. The rumen and hindgut as source of ruminant methanogenesis. **Environmental Monitoring and Assessment**, Germany, v.42, p.57–72.

IPCC - Intergovernmental Panel on Climate Change. **Climate change 2001: the scientific basis.** Acessado em: 18 out. 2016. Disponivel em: <http://www.grida.no/climate/ipcc_tar/wg1/index.htm>

IPCC - Intergovernmental Panel on Climate Change. **Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories - 2006.** Emissions from livestock and Manure Management. Acessado em: 18 out 2016. Disponivel em: <<http://www.ipcc-ccip.iges.or.jp/public/2006gl/>>

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

JANSSEN, P.H.; KIRS, M. Structure of the archaeal community of the rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, Palmerston North, v.74, n. 12, p.3619-3625, 2008.

JANSEEN, P.H. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. **Animal Feed Science and Technology**, Palmerston North, v.160, n.1, p.1-22. 2010.

JARVIS, G.N.; STROMPL, C.; BURGESS, D.M. *et al.* Isolation and identification of ruminal methanogens from grazing cattle. **Current Microbiology**, New Zealand, v. 40, p.327–332, 2000.

JAYANEGARA, A. Reducing methane emissions from livestock: nutritional approaches. **Indonesian Students Scientific Meeting (ISSM)**, Delft, v.13-15, p.18–21, 2008.

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

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

JOUANY, J.P.; MORGAVI, D.P. Use of 'natural' products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. **Animal**, Saint-Genès-Champanelle, v. 1, n. 10, p.1443–1466, 2007.

KAMRA, D.N. Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, India, v.89, n.1, p.124-134, 2005.

KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica dos ruminantes.** 1^a ed. Santa Maria: UFSM, 2002, 139p.

KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica dos ruminantes.** 3^a ed. Santa Maria: UFSM, 2011, 216p.

KRUG, E.E.B.; REDIN, O.; KODAMA, H.K. *et al. Manual da Produção Leiteira.* 2^a ed. Porta Alegre: CCGL – Cooperativa Central Gaúcha de Leite Ltda, 1993. 680p.

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

LANA, R.P.; RUSSELL, J.B. Efeitos da monensina sobre a fermentação e sensibilidade de bactérias ruminais de bovinos sob dietas ricas em volumosos ou concentrados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.30, n.1, p.254, 2001.

LANA, R.P. **Nutrição e alimentação animal (mitos e realidades).** 2^a ed. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora Ltda, 2007. 344p.

LIMA, M.A.; PESSOA, M.C.P.Y.; LIGO, M.A.V. **Emissões de metano da pecuária.** Brasília: Embrapa. 2006. 77p.

LIMA, J.G.; BANNINK, A.; DESSELAAR, A.V.P. *et al.* Emissão de metano em sistemas de produção de bovinos de corte brasileiro. In: VI Jornada Científica – Embrapa São Carlos 2014. **Anais...** São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2014.

LONGO, C. **Avaliação *in vitro* de leguminosas taníferas tropicais para mitigação de metano entérico.** 2007. 154p. Tese (Doutorado em Ciências, Energia Nuclear na Agricultura) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

LOPES, K.S.M.; YOKOBATAKE, K.L.A.; PINHEIRO, R.S.B.; **Sistemas de produção de bovinos e a emissão de metano.** In: IX Fórum Ambiental da Alta Paulista, São Paulo, v. 9, n. 7, 2013, p. 14-25.

LOSA, R. The use of essential oils in animal nutrition. **Cahiers Options Méditerranéennes**, Zaragoza, v. 54, p. 39-44, 2001.

MALECKY, M.; BROUDISCOU, L.P. Disappearance of nine monoterpenes exposed *in vitro* to the rumen microflora of dairy goats: effects of inoculum source, redox potential, and vancomycin. **Journal Animal Science**, Paris, v. 87, n. 4, p. 1366-1373, 2009.

MACHADO, F.S. **Consumo, digestibilidade aparente, partição de energia e produção de metano em ovinos alimentados com silagens de sorgo em diferentes estádios de maturação.** 2010. 107f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2010.

MACHADO, F.S.; PEREIRA, L.G.R.; GUIMARÃES JÚNIOR, R. *et al.* **Emissões de metano na pecuária: conceitos, métodos de avaliação e estratégias de mitigação.** Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite. 2011. 92p.

MARÇAL JÚNIOR, E. **Tratamento Anaeróbico.** In: Curso de Tratamento de Esgoto. Empresa de Engenharia Ambiental. Acesso em: 10 set. 2016. Online. Disponível em: <www.comitepcj.sp.gov.br>

MARQUES, D.C. **Criação de Bovinos.** 7^a ed. Belo Horizonte: CVP – Consultoria Veterinária e Publicações, 2003. 586p.

MARTIN, C.; MORGAVI, D.P.; DOREAU, M. Methane mitigation in ruminants: from microbes to the farm scale. **Animal**, v.4, n.3, p. 351-365, 2009

MARTÍNEZ, J.J.V. **Producción de metano *in vitro* e *in vivo* de gramíneas y leguminosas presentes en sistemas de producción bovina em trópico alto colombiano.** 2013. 137f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Departamento de Produção Animal, Universidade Nacional da Colômbia, Bogotá. 2013.

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.

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

McCAUGHEY, W.P.; WITTENBERG, K., CORRIGAN D. Methane production by steers on pasture. **Canadian Journal of Animal Science**, Manitoba, v. 77, p. 519-24, 1997.

McINTOSH, F.M.; WILLIAMS, P.; LOSA, R. *et al.* Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. **Applied Environmental Microbiology**, v.69, p5011–5014, 2003.

MCT. **Influência do manejo da produção animal a emissão de metano em bovinos de corte.** Ministério da ciência e tecnologia. 2004. Acessado em: 25 set. 2016. Online. Disponível em: <<http://www.mct.gov.br/clima>>

MCTI. **Estimativas anuais de emissões de gases de efeito estufa no brasil.** 2^a ed. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, 2014. 168p.

MEDEIROS, S.R.; MARINO, C.T.; Carboidratos na nutrição de gado de corte. In: MEDEIROS, S. R.; GOMES, R.C.; BUNGENSTAB, D.J. **Nutrição de bovinos de corte.** 1^a ed. Brasília: Embrapa, 2015. P.45-62.

MISRA, G.; PAVLOSTATHIS, S.G.; PERDUE, E.M. *et al.* Aerobic biodegradation of selected monoterpenes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 45, n. 6, p. 831-838, 1996.

MORAIS, J.A.S.; BERCHIELLI, T.T.; REIS, R.A. Aditivos. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de ruminantes.** 1.^a ed. Jaboticabal: Funep, 2006. p.539-561.

MOSS, A.R.; JOUANY, J.P.; NEWBOLD, J. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. **Annales de Zootechnie**, v.49, p.231–253, 2000.

MOURO, G.F.; BRANCO, A.F.; HARMON, D.L. *et al.* Fontes de carboidratos e ionóforo em dietas contendo óleo vegetal para ovinos: digestibilidade, balanço de nitrogênio e fluxo portal de nutrientes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.35, n.5, p.2144-2153, 2006.

MURRAY, R.M.; BRYANT, A.M.; LENG, R.A. Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. **British Journal of Nutrition**, Australia, v.36, n.1, p.1-14, 1976.

NETO, O.C.; RAMOS, A. A.; ESCOBAR, M.J. *et al.* Avaliação da monensina sódica em vacas leiteiras. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.52, n.2, p.268-273, 1995.

NEVES, C.M. **Produção *in vitro* de metano e análise da diversidade genética das Archaeas metanogênicas do rúmen de bovinos.** 2008. 134f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade do Estado de São Paulo, Jaboticabal, 2008.

NICODEMO, M.L.F. **Uso de aditivos na alimentação de bovinos de corte.** Campo Grande: Embrapa Gado de Corte. 2001. 56p.

NUSSIO, L.G.; CAMPOS, F.P.; LIMA, M.L.M. Metabolismo de carboidratos estruturais. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de ruminantes.** 1ª ed. Jaboticabal: Funep, 2006. p.183-223.

OLIVEIRA, M.V.M.; LANA, R.P.; JHAM, G.N. *et al.* Influência da monensina no consumo e na fermentação ruminal em bovinos recebendo dietas com teores baixo e alto de proteína. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.34, n.5, p.1763-1774, 2005.

OLIVEIRA, J.S.; ZANINE, A.M.; SANTOS, E.M. Processo fermentativo, digestivo e fatores antinutricionais de nutrientes para ruminantes. **Revista Electrónica de Veterinária**, Viçosa, v.8, n.2, p.1695-7504, 2007.

OLIVEIRA, R.C.; IGARASI, M.S. Utilização de óleos essenciais na mitigação da metanogênese. **Pubvet**, Londrina, v. 7, n. 6, 19p., 2013.

PATINO, H.O.; ESCOBAR, L.F.; CHÁVES, L.F. *et al.* **Alternativas de Manejo para Mitigar as Emissões de Metano em Ruminantes.** Acessado em: 8 de out. 2016. Online. Disponível em:<<http://www.ufrgs.br/agronomia/materiais/7578360001.pdf>>

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

PEDREIRA, M.S.; PRIMAVESI, O. Impacto da produção animal sobre o ambiente. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. de. **Nutrição de ruminantes.** 1ª ed. Jaboticabal: Funep, 2006. p.497-509.

PEREIRA, L.G.R.; MACHADO, F.S.; CAMPOS, M.M., et al. **Avanço conceitual em diagnóstico e estratégicas de mitigação de metano entérico em bovinos de leite no Brasil.** In: MARCONDES, M.I.; VELOSO, C.M.; GUIMARÃES, J.D., et al. III Simpósio Nacional de Bovinocultura Leiteira e I Simpósio Internacional de Bovinocultura Leiteira – SIMLEITE. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora LTDA, 2011. p.75-122.

PERNA JUNIOR, F. **Efeito de aditivos alimentares sobre a produção de metano ruminal utilizando a técnica de fermentação ruminal ex situ (micro-rúmen) digestibilidade aparente total e excreção de nutrientes em bovinos.** 2013. 101f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Produção Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

PINEDO, L.A., JACOMINI, A., VENDRAMIN, D. et al. Inventário de emissões de gás metano provenientes da fermentação entérica e óxido nitroso do manejo de dejetos animais - período 1990 a 2005. **Pubvet**, Londrina, v.3, n.11, 2009.

PRIMAVESI, O., FRIGHETTO, R.T.S., LIMA, M.A. et al. Metano entérico de bovinos leiteiros em condições tropicais brasileiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, p.277-283, 2004a.

PRIMAVESI, O.; PEDREIRA, M.S.; FRIGUETTO, R.T.S. et al. **Manejo alimentar de bovinos leiteiros e sua relação com produção de metano ruminal.** Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, 2004b.

PRIMAVESI, O.; BERNDT, A.; LIMA, M.A. Produção de gases de efeito estufa em sistemas agropecuários. In: LIMA, M.A.; BODDEY, R.M.; ALVES, B.J.R. et al. **Estoques de carbono e emissões de gases de efeito estufa na agropecuária brasileira.** Brasília: Embrapa, 2012. p.239-270.

RAISMAN, J.S.; GONZALEZ, A.M. **Hipertextos del área de la Biología.** 2006. Acesso em: 29 de set. 2016. Disponível em: <<http://www.biologia.edu.ar/bacterias/arqueobacterias.htm>>.

RANGEL, A.H.N.; LEONEL, F.P.; SIMPLÍCIO, A.A. et al. Utilização de ionóforos na produção de ruminantes. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.8, n.1, p.264-273, 2008.

REIS, R.A.; MORAIS, J.A.S.; SIQUEIRA, G.R. **Aditivos alternativos para alimentação de ruminantes.** In: Congresso Latino-Americano de Nutrição Animal (CLANA), São Paulo, 2006.

RIVERA, A.R. **Estudo da fermentação ruminal por bovinos consumindo feno de tifton 85 e concentrado com aditivos.** 2006. 56f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade do Estado de São Paulo, Jaboticabal, 2006.

RODRIGUES, M.R.A. **Estudo dos óleos essenciais presentes em manjericão e orégano.** 2002. 181f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

RODRIGUEZ, N.M.; CAMPOS, W.E. Manipulação ruminal para redução da emissão de metano. In: Simpósio Nacional sobre Produção Animal e Ambiente, 2007, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: UFMG, 2007, p.1-28.

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

RUSSELL, J. B.; O'CONNOR, J. D.; FOX, D. G.; VAN SOEST, P. J.; SNIFFEN, C. J. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. **Journal of Animal Science**, v.70, n.11, p.3551-3561, 1992.

RUSSELL, J.B.; WALLACE, R.J. Energy-yielding and energy-consuming reactions. In: ROBSON, P. N.; STEWART, C.S. **The rumen microbial ecosystem.** 2^a.ed. Londres: Blackie Academic & Professional, 1997. p.246-282.

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

SALLAM, S.M.A.; ABDELGALEIL, S.A.M.; BUENO, I.C.S. *et al.* Effect of essential oils on ruminal fermentation, microbial population and methane emission *in vitro*. **Cahiers Options Méditerranéennes**, Zaragoza, n.9, p. 149-156, 2011.

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

SILVA, A.P. **Efeito da monensina, da virginiamicina e dos óleos funcionais de mamona e caju em bovinos Nelore submetido a mudança abrupta para dietas com elevado teor de concentrado.** 2014. 103f. Dissertação (Mestrado em Qualidade de Produtividade Animal) - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

SMITH-PALMER, A.J.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters of Applied Microbiology**, Edimburgo, v.26, n.2, p.118-122, 1998.

SOUZA, C.E. **Utilização de compostos secundários de plantas para mitigação de metano em ruminantes.** 2014. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Metabólitos secundários e defesa vegetal. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** 3^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.309-332.

TEDESCHI, L.O.; CALLAWAY, T.R.; MUIR, J.P. AND ANDERSON, R.C. Potential environmental benefits of feed additives and other strategies for ruminant production. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p.291-309, 2011.

TEIXEIRA, J.C. **Nutrição de ruminantes**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 200p.

THAUER, R.K. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. **Microbiology**, Marburgo, v.144, p.2377-2406, 1998.

ULTEE, A.; KETS, E.P.W.; SMID, E.J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied Environmental Microbiology**, v.65, p.4606-4610, 1999.

ULTEE, A.; BENNIK, M.H.J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied Environmental Microbiology**, v.68, p.1561-1568, 2002.

ULYATT, M.J.; LASSEY, K.R. Methane emissions from pastoral systems: the situation in New Zealand. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v.9, n.1, p.118-126, 2001.

VALADARES FILHO, S.C.; PINA, D.S. **Fermentação ruminal**. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. Nutrição de ruminantes. 1^a ed. Jaboticabal: Funep, 2006. p.151-179.

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

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

VAN ZIJDERVELD, S.M.; GERRITS, W.J.J.; APAJALAHTI, J.A. *et al.* Nitrate and sulfate: Effective alternative hydrogen sinks for mitigation of ruminal methane production in sheep. **Journal of Dairy Science**, New South Wales, v.93, n. 12, p.5856-5866, 2010.

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

VÁSQUEZ, D.C.Z. **Inclusão de monensina ou tanino na dieta de bovinos sobre a emissão de metano determinada pela técnica de gás traçador SF6**. 2015. 64f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Produção Animal) - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

VIEIRA, S.S.; ZOTTI, C.A.; PAULINO, V.T. **Práticas de manejo para minimizar a emissão de gases do efeito estufa associadas ou não ao uso de fertilizantes**. Curso de Pós-graduação em Produção Animal Sustentável. Instituto de Zootecnia, APTA/SAA, 45p., 2010.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A.C.; WEBER, G.E.B. **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. 2010. 16p.

WALLACE, R.J. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *The Proceedings of the Nutrition Society*, Aberdeen, v.63, p.621–629, 2004.

WHITMAN, W.B.; BOWEN, T.L.; BOONE, D.R. The methanogenic bacteria. In: DWORKIN, M., FALKOW, S.; ROSENBERG, E. *et al. The Prokaryotes*. 3^a ed. New York: Springer, 2006. p.165-207.

WILLIAMS, A.G.; COLEMAN, G.S. The rumen protozoa. In: HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. *The rumen microbial ecosystem*. 2^a ed. Londres: Blackie Academic & Professional, 1997. p.73-139.

ZANINE, A.M.; OLIVEIRA, J.S.; SANTOS, E.M. Importância, uso, mecanismo de ação e retorno econômico dos ionóforos na nutrição de ruminantes. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Viçosa, v. 3, n. 6, 18p., 2006.

ZOTTI, C.A.; PAULINO, V.T. **Metano na produção animal: Emissão e minimização de seu impacto**. 2009. Acessado em: 28 de ago. 2016. Disponível em: <<http://www.iz.sp.gov.br/pdfs/1259324182.pdf>>