



Efeito de diferentes fontes energéticas da dieta sobre a produção de metano utilizando a técnica de fermentação ruminal *ex situ* (microrúmen)¹

Maurício Furlan Martins², Laura Alexandra Romero Solórzano²; Flávio Perna Junior²; Alexandre Berndt³; Ari Luiz de Castro⁴; Fernanda Altieri Ferreira⁵, Lerner Arévalo Pinedo⁵; Paulo Henrique Mazza Rodrigues⁶

¹Trabalho realizado no Departamento de Nutrição e Produção Animal – VNP/FMVZ/USP, Pirassununga, SP. Parte de dissertação de mestrado do primeiro autor e financiado pela FAPESP.

²Mestrando do Departamento de Nutrição e Produção Animal – VNP/FMVZ/USP, Pirassununga, SP.

³Pesquisador da Embrapa Pecuária Sudeste.

⁴Laboratório de Cromatografia do Departamento de Nutrição e Produção Animal – VNP/FMVZ/USP. Email: aricastr@usp.br

⁵Pós-Doutorando do Departamento de Nutrição e Produção Animal – VNP/FMVZ/USP, Pirassununga, SP. Bolsista da FAPESP.

⁶Professor Associado do Departamento de Nutrição e Produção Animal – VNP/FMVZ/USP. e-mail: pmazza@usp.br.

Resumo: O objetivo do experimento foi avaliar o efeito de diferentes fontes energéticas da dieta sobre a fermentação ruminal em bovinos. O delineamento adotado foi o quadrado latino 3x3 replicado, com período de 16 dias e 3 tratamentos: **Controle:** Dieta de baixo extrato etéreo; **Soja:** Dieta de alto extrato etéreo (inclusão de 15% de soja grão); **Polpa:** Dieta de baixo extrato etéreo e alta participação de pectina (inclusão de 15% de polpa cítrica). As coletas de conteúdo ruminal foram realizadas no 16^o dia experimental, sendo realizadas antes, 3, 6, 9 e 12 horas após a alimentação matinal. Utilizou-se a técnica de fermentação ruminal *ex situ*, a qual consiste em incubar frascos de penicilina contendo conteúdo ruminal sólido e líquido em banho termostático por 30min. Após a incubação era realizada a mensuração de metano e ácidos graxos de cadeia curta por cromatografia gasosa. A partir desta técnica consegue-se estimar a produção de ácidos graxos de cadeia curta, metano e a perda de energia reativa (PER). A PER estima a eficiência da fermentação dos alimentos, ou seja, com ela é possível avaliar a perda de metano em relação aos outros produtos da fermentação. A Polpa aumentou a produção de acético e butírico e a dieta Soja diminuiu os mesmos ácidos graxos de cadeia curta. Nenhuma das dietas alterou a produção de metano ou a perda de energia relativa ao metano.

Palavras chave: ácidos graxos de cadeia curta, fermentação ruminal, gases de efeito estufa, grãos de soja, polpa cítrica

Effect of different energy sources in diet on methane production using the technique of ruminal fermentation *ex situ* (micro-rumen)

Abstract: The objective of the experiment was to evaluate the effect of different energy sources in diet on ruminal fermentation in cattle. The design adopted was a replicated 3x3 Latin square, with 16 d period and 3 treatments: **Control:** Low ether extract diet; **Soybean:** High ether extract diet (15% inclusion of soybean grain); **Citrus pulp:** Low ether extract and high pectin diet (15% inclusion of citrus pulp). Rumen content sampling was performed at the 16 experimental day, before, 3, 6, 9 and 12 hours after morning meal. The technique of ruminal fermentation *ex situ* was used, which consists in the incubation of penicillin bottles containing solid and liquid rumen content in a thermostatic bath for 30min. After the incubation, the measurement of methane and short chain fatty acids was performed by gas chromatography. From this technique, it is able to estimate the production of short chain fatty acids, methane and relative energy loss (REL). The REL estimates the efficiency of feed fermentation, in other words, it is possible to evaluate the methane loss in relation to other fermentation products. Citrus pulp diet increased acetate and butirate production and soybean diet decreased the same short chain fatty acids. No diet altered methane production or the relative energy loss to methane.

Keywords: citrus pulp, greenhouse gas, ruminal fermentation, short chain fatty acids, soybean grain

Introdução

A manipulação da fermentação ruminal visando à melhor eficiência alimentar (e.g., diminuição de perdas energéticas da dieta via metanogênese) tem sido bastante estudada nas últimas décadas. A utilização de estratégias, como a inclusão de aditivos alimentares (Beauchemin et al., 2007) e diferentes combinações de ingredientes em dietas para ruminantes (Christophersen et al., 2008), tem apresentado resultados expressivos. Neste contexto, fontes vegetais de lipídios, como os grãos de soja, podem colaborar para a diminuição da metanogênese na fermentação ruminal (Czerwinski et al., 1966). Em contrapartida, a inclusão de uma fonte rica em pectina (polpa cítrica), uma fibra de rápida fermentação, pode contribuir para aumento da produção de metano, uma vez que o aumento deste ingrediente na dieta foi associado à maior relação acético:propiónico (Pinzon e Wing, 1976).

Desta forma, o presente trabalho avaliou a inclusão de diferentes fontes energéticas sobre o processo da fermentação ruminal, com ênfase na produção de metano em relação aos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), utilizando a nova técnica de fermentação ruminal *ex situ* (microrúmen).



Material e Métodos

O experimento foi realizado nas instalações do Estábulo Experimental do VNP/FMVZ/USP, campus de Pirassununga. Foram utilizadas seis vacas não gestantes e não lactantes com peso vivo médio de $767,33 \pm 62,31$ kg e portadoras de cânula ruminal, com 10 cm de diâmetro e 7,5 cm de espessura. Os animais foram mantidos em instalação coberta, provida de baias individuais, com cochos de cimento, bebedouros automáticos comuns a cada dois animais e também de camas de areia individual. As vacas foram distribuídas em uma das três dietas experimentais isoenergéticas (1,55 Mcal/kg de MS) e isoprotéicas (14% de PB) de acordo com a fonte energética utilizada, sendo: 1) **Controle**: Dieta de baixo extrato etéreo (3,20% de EE); 2) **Soja**: Dieta de alto extrato etéreo (5,70% de EE), com inclusão de 15% de soja grão; 3) **Polpa**: Dieta de baixo extrato etéreo (2,60% de EE) e alta participação de pectina, com inclusão de 15% de polpa cítrica.

As dietas foram oferecidas *ad libitum*, duas vezes ao dia, às 08:00 e 16:00 horas, na forma de ração completa. Na manhã seguinte eram retiradas e pesadas as sobras. Ofertou-se a dieta para garantir sobras de 5 a 10% do ofertado. As coletas de conteúdo ruminal foram realizadas no 16^a dia experimental, antes, 3, 6, 9 e 12 horas após a alimentação matinal. A técnica utilizada foi a metodologia de fermentação ruminal *ex situ* (microrúmen), a qual está sendo desenvolvida por nosso grupo de pesquisa. A técnica consiste em coletar líquido e sólido ruminais, misturar em liquidificador, alocar em frascos de penicilina, previamente pesados e lavados, tampando-os com rolha de borracha e lacre de alumínio e incubando-os em banho termostático por 30 minutos. A coleta de líquido ruminal foi realizada por bomba a vácuo e o sólido ruminal foi coletado manualmente em três pontos diferentes do rúmen. Foram preparados 4 frascos por animal e por hora, sendo 2 brancos, cuja ação microbiana foi imediatamente bloqueada, e outros 2 incubados, os quais foram colocados em banho termostático por 30 min. Nestes, somente depois da incubação se bloqueou a fermentação. Para cessar a fermentação, os frascos foram autoclavados por 15 min, sob pressão. Finalizando este processo, os frascos foram resfriados em temperatura ambiente e levados ao laboratório da FMVZ/USP, onde permaneceram à temperatura ambiente de 25°C, para a leitura da pressão e o volume produzido com auxílio do transdutor (Datalogger Universal - modelo logger AG100) conectado a um leitor digital. Também se mensurou a concentração do metano na fase gasosa e dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) na fase líquida, por cromatografia gasosa. Após a mensuração dos produtos da fermentação (metano e AGCC), os frascos foram secos em estufa 65°C por 15 dias e 105°C por 2 dias, sendo pesados para determinar o conteúdo líquido e sólido dos mesmos.

A partir da concentração determinada pela cromatografia, calculou a produção de metano e AGCC através das seguintes fórmulas:

- Quantidade de metano (mg) = Volume total (ml) x Concentração de metano (mg/ml)
- Produção AGCC (mM) = (Conc. AGCC Incubado (mM) – Conc. AGCC Branco (mM)) x volume líquido do frasco
- PER (perda de energia relativa em %) = $100 \times \left[\frac{\text{Energia do CH}_4}{\text{Energia do CH}_4 + \text{C}_2 + \text{C}_3 + \text{C}_4} \right]$

Com o cálculo da produção de AGCC e metano, os dados foram convertidos em produção de moles ou gramas de produtos por quilo de MS, por hora ou por dia. A PER estima a eficiência da fermentação dos alimentos, ou seja, a perda de energia do metano em relação à energia dos demais produtos.

Os dados de AGCC e Metano foram analisados pelo procedimento MIXED do programa estatístico Statistical Analysis System 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). O modelo incluiu o efeito de tratamento como fator fixo e os efeitos de animal dentro de quadrado, quadrado e período como fatores aleatórios. O efeito de tratamento foi separado pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resultado e Discussões

Referente aos AGCC foi observado efeito de dieta ($p < 0,05$) para a produção dos ácidos acético, butírico e AGCC Total, sendo que a polpa apresentou maior produção quando comparada à dieta controle. O ácido propiônico, a produção de metano e a PER não foram alteradas significativamente pela fonte de energia na dieta.

A dieta Polpa aumentou a produção de AGCC Totais por kg de MS de conteúdo ruminal por aumentar a produção de acético e butírico. Embora a produção de acético fosse maior, o mesmo tem menos energia por mol, fazendo com que a diferença não fosse tão expressiva. A produção de metano/kg de MS de conteúdo ruminal não foi alterada ($p > 0,05$) pelos tratamentos, não sendo também alterada a variável PER referente ao metano, indicando que a eficiência fermentativa não foi alterada por esta fonte energética.

A dieta Soja diminuiu a produção de AGCC Totais ($p < 0,05$), por diminuir especificamente os ácidos acético e butírico. Esta dieta também diminuiu, embora não estatisticamente significativo, a produção de metano, não resultando, portanto, em qualquer melhoria na PER. Este resultado contradiz Jordan et al. (2006), que avaliaram grãos de soja ou óleo de soja, os quais resultaram em redução na produção de metano por quilo de matéria seca consumida, ao utilizarem a técnica de gás traçador SF₆.



Conclusões

Dietas contendo até 15% de inclusão de soja grão ou polpa cítrica como fontes energéticas podem afetar a o perfil ou a extensão da fermentação ruminal, mas não se mostraram capazes em alterar a perda de energia relativa referente ao metano, não alterando, portanto, a eficiência da fermentação ruminal.

Referências Citadas

- BEAUCHEMIN, K.A.; MCGINN, S.M.; MARTINEZ, T.F.; MCALLISTER, T.A. Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, v.85, n.8, p.1990-1996, 2007.
- CHRISTOPHERSEN, C.T.; WRIGHT, A.D.G; VERCOE, P.E. In vitro methane emission and acetate:propionate ratio are decreased when artificial stimulation of the rumen wall is combined with increasing grain diets in sheep. **Journal of Animal Science**, v.86, n.2, p.384-389, 2008.
- CZERWASKI, J.W.; BLAXTER, K.L.; WAINMAN, F.W. The metabolism of oleic, linoleic, and linolenic acids by sheep with reference to their effects on methane production. **British Journal of Nutrition**, v.20, n.3, p.349-362, 1966.
- ERWIN, E.S.; MARCO, G.J.; EMERY, E.M. Volatile fatty acids analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, v.44, n.9, p.1768-1771, 1961.
- JORDAN, E.; KENNY D.; HAWKINS M.; MALONE R.; LOVETT D.K.; O'MARA F.P. Effect of refined soy oil or whole soybeans on intake, methane output, and performance of young bulls. **Journal Animal Science**, v.84, p.2418-2425, 2006.
- PINZON, F.J.; WING, J.M. Effects of citrus pulp in high urea rations for steers **Journal of Dairy Science**, v.59, n.6, p.1100-1103, 1976.

Tabela1. Efeito de diferentes fontes energéticas sobre a produção de AGCC e metano

Variáveis	Tratamentos			EPM	Probabilidade		
	Controle	Soja	Polpa		Trat. ¹	Hora	Inter. ²
Acético							
Branco (mMol/L)	70,00 ^b	67,84 ^b	78,77 ^a	0,8621	<,0001	0,0048	0,4512
Incubado (mMol/L)	76,40 ^b	73,05 ^b	86,67 ^a	0,9917	<,0001	0,0014	0,9078
Diferença (mMol/L)	6,39 ^b	5,21 ^c	7,89 ^a	0,2230	<,0001	<,0001	0,9988
Produção (mMol/g/h)	0,14 ^b	0,11 ^b	0,18 ^a	0,0062	<,0001	0,0053	0,9439
Produção (Mol/kg/dia)	3,43 ^b	2,76 ^b	4,42 ^a	0,1492	<,0001	0,0045	0,9357
Produção (g/kg/dia)	206,01 ^b	135,75 ^c	265,17 ^a	8,9546	<,0001	0,0045	0,9348
Propiônico							
Branco (mMol/L)	21,82	21,12	20,14	0,5509	0,0852	<,0001	0,6951
Incubado (mMol/L)	24,92	23,85	22,38	0,6370	0,7053	<,0001	0,4922
Diferença (mMol/L)	3,10	2,74	2,53	0,1445	0,5563	<,0001	0,6643
Produção (mMol/g/h)	0,067	0,060	0,058	0,0027	0,5552	<,0001	0,9012
Produção (Mol/kg/dia)	1,60	1,44	1,42	0,6042	0,6042	<,0001	0,6579
Produção (g/kg/dia)	118,18	106,37	104,75	4,8246	0,6019	<,0001	0,6616
Butírico							
Branco (mMol/L)	9,50 ^b	8,66 ^b	13,03 ^a	0,2793	0,0275	<,0001	0,5593
Incubado (mMol/L)	13,01	11,18	15,84	0,3214	0,0519	<,0001	0,7275
Diferença (mMol/L)	1,78a ^b	1,41 ^b	2,04 ^a	0,0571	0,0123	0,0001	0,6128
Produção (mMol/g/h)	0,039 ^b	0,032 ^b	0,047 ^a	0,0016	0,0002	<,0001	0,9111
Produção (Mol/kg/dia)	0,94 ^a	0,75 ^b	1,12	0,0378	0,0031	<,0001	0,8782
Produção (g/kg/dia)	83,25 ^a	65,61 ^b	98,58 ^a	3,3303	0,0031	<,0001	0,8931
Total AGCC							
Branco (mMol/L)	103,05 ^b	98,72 ^b	112,75 ^a	1,3700	<,0001	<,0001	0,8436
Incubado (mMol/L)	114,33 ^{ab}	108,07 ^b	125,19	1,5670	0,0020	<,0001	0,7384
Diferença (mMol/L)	11,28 ^a	9,36	12,43 ^a	0,3402	<,0001	<,0001	0,9865
Produção (mMol/g/h)	0,25 ^{ab}	0,21 ^b	0,30 ^a	0,0090	0,0002	<,0001	0,9638
Produção (Mol/kg/dia)	5,98 ^b	4,95 ^c	6,95 ^a	0,2164	0,0002	<,0001	0,9572
Produção (g/kg/dia)	407,45 ^b	337,73 ^c	468,51 ^a	14,5224	0,0004	<,0001	0,9547
Metano							
Branco (mMol/Fr. ³)	0,023	0,019	0,022	0,0002	0,3429	0,0006	0,6775
Incubado (mMol/Fr. ³)	0,124	0,103	0,126	0,0029	0,1933	<,0001	0,0282
Produção (mMol/Fr. ³)	0,102	0,085	0,102	0,0025	0,1268	<,0001	0,0412
Produção (mMol/g/h)	0,052	0,055	0,043	0,0017	0,1616	0,0002	0,2986
Produção (Mol/kg/dia)	1,252	1,040	1,313	0,0407	0,2334	0,0083	0,8402
Produção (g/kg/dia)	20,025	16,625	20,997	0,6509	0,2338	0,0083	0,8443
PER* (%)	13,037	12,766	12,887	0,2326	0,9446	0,0310	0,0950

¹Tratamento, ²Interação entre tratamento e hora, ³mMol por frasco, *PER = Perda de energia relativa.

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