



METODOLOGIA *EX-SITU* DE (MICRO-RÚMEN) PARA QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METANO ENTÉRICO RELACIONADAS À SUSTENTABILIDADE AMBIENTAL¹

METHODOLOGY *EX-SITU* (MICRO-RUMEN) FOR QUANTIFICATION OF ENTERIC METHANE PRODUCTION RELATED TO ENVIRONMENTAL SUSTAINABILITY¹

Paulo Henrique Mazza Rodrigues², Lizbeth Collazos Paucar³, Lerner Arévalo Pinedo⁴, Flavio Perna Junior⁵, Maurício Furlan Martins⁵, Laura Alexandra Romero Solórzano⁵

¹Pesquisa financiada pela FAPESP (Processos 2010/15670-3 e 2011/11165-5)

²Professor do Departamento de Nutrição e Produção Animal e Bolsista em Produtividade de Pesquisa do CNPq – VNP/FMVZ/USP, Av. Duque de Caxias Norte, 225, CEP:13635-900, Campus de Pirassununga-SP/Brasil. [e.mail: pmazza@usp.br](mailto:pmazza@usp.br)

³Aluna de Doutorado da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos FZEA/USP, Av. Duque de Caxias Norte, 225, CEP:13635-900, Campus de Pirassununga-SP/Brasil. [e.mail:collazosp@usp.br](mailto:collazosp@usp.br)

⁴Pós-Doutorando do Departamento de Nutrição e Produção Animal – FMVZ/USP. Av. Duque de Caxias Norte, 225, CEP:13635-900, Campus de Pirassununga-SP/Brasil. Bolsista da FAPESP. e.mail:

lernerpinedo@gmail.com

⁵Alunos de Mestrado do Departamento de Nutrição e Produção Animal - FMVZ/USP, Av. Duque de Caxias Norte, 225, CEP:13635-900, Campus de Pirassununga-SP/Brasil. [e.mail:fpernajr@usp.br](mailto:fpernajr@usp.br)

INTRODUÇÃO

A produção animal sustentável tem sido o foco de pesquisa em todo mundo, frente às mudanças climáticas globais. Na busca por métodos acurados, simples e rápidos para mensurar a produção de metano e outros produtos da fermentação ruminal que vise à redução na emissão de gases do efeito estufa (GEE) tem sido objetivos de pesquisas na nutrição de ruminantes. As principais fontes de emissão de (GEE) do Brasil, diferentemente dos países desenvolvidos, estão concentradas nos setores (a) Uso do solo, mudança do uso do solo e florestas, que contribui com 55%, (b) Agropecuária, responsável por outros 25% da emissão total (Brasil, 2004). Grande parte desta emissão é creditada à pecuária, pela emissão de CH₄, devido ao fenômeno da fermentação entérica dos rebanhos, e emissão de N₂O, decorrente da deposição de dejetos dos animais, compreendem 68% e 43% das emissões totais destes gases no país.

Brasil possui segundo maior rebanho bovino do mundo, com 205 milhões de cabeças, que faz da pecuária uma atividade de importância econômica para o país (IBGE, 2010), esta baseada em pastagens com fonte de energia entre 70-80% na dieta de ruminantes. Pedreira e Primavesi, (2006) relatam nos sistemas de produção de bovinos em pastagens, qualidade da forragem, digestibilidade, nível de consumo são fatores determinantes na produção de metano entérico pelos animais e variam de acordo com a espécie forrageira, sistema de manejo, estação do ano, de forma a assegurar alta produtividade e sustentabilidade ao sistema. Geralmente, alimentos de elevada digestibilidade, boa qualidade reduzirá as emissões de CH₄ por unidade de produto do que dietas de baixa qualidade, mais fibrosas, lignificados e com baixos teores de proteína bruta resultando em redução na produtividade animal (Cottle et al., 2011). O objetivo deste trabalho foi descrever a técnica *ex-situ* de fermentação entérica *ex-situ* de mensuração da produção de CH₄ e AGCC do conteúdo ruminal.

METODOLOGIA *EX-SITU* DE (MICRO-RÚMEN) DE MENSURAÇÃO DE METANO

Princípio da técnica consiste em deixar as amostras de conteúdo ruminal dentro dos frascos de penicilina (micro-rúmen) incubando em banho-maria, simulando as condições predominantes no rúmen (presença de microorganismos, anaerobiose, temperatura de 39°C, saliva natural do próprio



animal, pH fisiológico) por período 30 minutos. Após o bloqueio da fermentação, as mensurações dos produtos finais da fermentação (CH_4 e AGCC) são desenvolvidas e as perdas energéticas do CH_4 são expressas em relação aos produtos da fermentação ruminal.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL DA METODOLOGIA *EX-SITU* DE MENSURAÇÃO DE METANO

A metodologia *ex-situ* de fermentação foi realizada no Departamento de Nutrição e Produção Animal FMVZ/USP, Campus de Pirassununga-SP, com o objetivo de mensurar a produção de CH_4 e AGCC. Esta metodologia pode ser desenvolvida em diferentes espécies de animais ruminantes e portadores de cânula ruminal, que sejam ou não confinados.

PREPARO E PESAGEM DOS FRASCOS

O preparo de todos os frascos tipo penicilina de 50 mL a serem utilizados nos experimentos consiste em lavagem manual com água, e enxágüe com água destilada e secagem em estufa a 65°C . Após secagem, os frascos são identificados e pesados em balança analítica e acondicionados em local seco, coberto, até o momento do uso.

OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE CONTEÚDO RUMINAL

O conteúdo ruminal para mensuração de (CH_4 e AGCC) é coletado de uma vaca por vez, em tempos de amostragem pré-determinados antes (0), 3, 6, 9 e 12 horas após alimentação matutina dos animais. A fase líquida é coletada com auxílio de sonda acoplada a uma bomba elétrica a vácuo, recuperando-se 150 mL em béquer e que a fase sólida é retirada na mesma quantidade, do rúmen, introduzindo a mão via fístula ruminal e coletando-se de três pontos distintos. As duas frações são colocadas dentro dos frascos, primeiro os 10 mL da fase sólida e após 20 mL da fase líquida, com auxílio de um funil e um bastão de plástico. Os frascos são tampados com rolhas de borracha e lacrados com lacre de alumínio próprio para frascos tipo penicilina, com auxílio de alicate de recrave, identificados com lacres de plástico. Os frascos são “lavados” com CO_2 , por meio de agulhas para entrada e saída do gás, a fim de garantir um meio anaeróbio. São preparados quatro frascos por vaca e por cada tempo de amostragem, sendo que dois frascos são considerados sem incubação (inativação imediata sob pressão e temperatura – 0 minutos) e outros dois frascos são incubados (incubação pelo tempo de 30 min em banho 39°C). Ao final de incubação, o processo fermentativo é inativado sob pressão e temperatura (autoclavagem) por 15 minutos. Após os frascos esfriarem, são levados para o Laboratório de Cromatografia gasosa para mensuração do volume de gases e concentrações de CH_4 e AGCC.

QUANTIFICAÇÃO DO GÁS METANO

A leitura do volume do gás produzido pela amostra da fermentação incubada em frascos tipo penicilina (micro-rúmen) é mensurada utilizando-se um transdutor (Datalogger universal[®] - modelo logger AG5000) conectado a um leitor digital e a uma válvula de três saídas. Para a mensuração, a agulha acoplada é introduzida à válvula através da tampa de borracha. Em seguida, o volume é mensurado, arrastando os gases acumulados na parte superior do frasco com o uso da seringa conectada na terceira saída do transdutor até chegar a uma leitura de pressão zero. Este procedimento é realizada com cada uma das amostras em ambiente climatizada com temperatura controlada (25°C). Os dados do volume deslocado pelo gás produzido no frasco são anotados, determinar a produção de gás metano na amostra. O volume total gasoso é obtido pela soma daquele obtido na seringa mais o “headspace” do frasco. Após medição pelo transdutor, a determinação da concentração de CH_4 , tanto nos frascos incubados e não incubados é realizada por cromatografia gasosa, segundo Erwin et al. (1961), injetando-se uma amostra de 0,5 mL de gás em cromatógrafo especificamente preparado para este fim.



QUANTIFICAÇÃO DOS AGCC

O volume do líquido ruminal dentro dos frascos (micro-rúmen) é calculado pela diferença entre o peso do frasco contendo a amostra após liofilização por 24 h e o peso do frasco contendo a amostra antes da liofilização, sendo este volume corrigido pelo volume líquido usado na amostragem para a determinação dos AGCC. Para determinação das concentrações dos AGCC será coletada uma amostra de 2,0 mL de líquido ruminal de cada frasco e centrifugado por 15 minutos. Em seguida, 1 mL do sobrenadante será colocado em tubo de ensaio contendo 0,2 mL de ácido fórmico P.A, sendo armazenado a -20°C até o momento da análise. A concentração dos AGCC será determinada por cromatografia gasosa, segundo Erwin et al. (1961).

CÁLCULOS DA PRODUÇÃO DE AGCC, CH₄ E PER

A quantificação da produção de CH₄ é realizada pela multiplicação entre o volume total dos gases (mL) e a concentração do CH₄ na fase gasosa (mmol/mL) obtido no frasco incubado, sendo este valor subtraído do que foi produzido no frasco sem incubação. Já a quantificação individual dos AGCC será pela multiplicação entre o volume líquido (mL) e a concentração de cada AGCC (mmol/mL) obtido no frasco incubado, sendo este valor subtraído do que foi no frasco sem incubação. A produção de CH₄ e AGCC serão expressos com base no conteúdo sólido presente nos frascos (gramas ou quilos), conteúdo esse que será obtido pela diferença de pesagem entre o peso do frasco contendo a amostra após a estufa (65°C por 15 dias) e o peso do frasco vazio. Já a perda de energia relativa (PER) é calculada através da fórmula: $PER (\%) = 100 \times (\text{Energia do CH}_4 / \text{Energia do CH}_4 + \text{C}_2 + \text{C}_3 + \text{C}_4)$. Onde: PER = perda de energia relativa; CH₄= metano; C₂ = ácido acético; C₃ = ácido propiônico e C₄ = ácido butírico.

CONCLUSÕES

O avanço do conhecimento envolve desenvolvimento a metodologia da fermentação entérica *ex-situ* de mensuração de metano e outras variáveis como AGCC, do conteúdo ruminal. Os resultados encontrados com a metodologia até o presente são animadores e espera-se que a mesma gere um substancial avanço na compreensão do processo fermentativo em ruminantes, como estratégia para reduzir o impacto ambiental.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Ministério da Ciência e Tecnologia. **Comunicação Nacional Inicial do Brasil à Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre Mudança do Clima**. Coordenação-Geral de Mudanças Globais de Clima. Brasília, 2004. 74p.

COTTLE, D.J.; NOLAN, J.V.; WIEDEMANN, S.G. Ruminant enteric methane mitigation : a review. **Animal Production Science**, v.51, p.491-514, 2011.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Censo Agropecuário**. 2010.

PEDREIRA, M.S.; PRIMAVESI, O. Impacto da produção animal sobre o ambiente. In:BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Eds). **Nutrição de Ruminantes**. 1 ed., p. 497-511, 2006.