CAPÍTULO 8

Metanogênese ruminal e métodos para quantificação de metano *in vitro*: perspectivas para uma técnica alternativa

Araxane Agne Ribeiro[1], Camila Ten Kathen Jung[1] , Eduarda Ribas de Oliveira[1], Maria Eduarda Pieniz Hamerski[1], Matheus Lehnhart de Moraes[1], Gilberto Vilmar Kozloski[1].

https://doi.org/10.69570/mp.978-65-84548-50-3.c8

Resumo

A produção de metano entérico apresenta relevância nutricional e ambiental, representando aproximadamente 57% das emissões de CH_4 do setor agropecuário brasileiro. Entretanto, métodos convencionais de quantificação, como o AMPTS® e a cromatografia gasosa, apresentam custos elevados e exigem mão de obra especializada. Nesse contexto, o estudo teve como objetivo adaptar e avaliar preliminarmente uma técnica alternativa para quantificar CH_4 em ensaios de fermentação ruminal *in vitro*. O método utiliza NaOH (3 M) para reter o CO_2 e determina o volume de CH_4 pelo deslocamento de água em proveta. Em testes preliminares de 72 horas, com 1 g de amostra e quadruplicatas, os volumes de gás total e CH_4 foram, respectivamente, 225 e 60 mL para milho moído e 204 e 48 mL para azevém/aveia. Nas primeiras 12 horas, a proporção de CH_4 variou de 37 a 49%, acima da referência de 25% a 33%. Posteriormente, variou de 22 a 32%. A técnica mostra potencial, mas necessita de validação adicional, especialmente quanto à eficiência de retenção de CO_2 nas primeiras horas e à comparação com métodos convencionais.

Palavras-chave: fermentação ruminal; metano entérico; produção de gases; técnica simplificada.

[1]Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil.

© 2024 Mérida Publishers CC-BY 4.0

1. Introdução

Um dos grandes desafios da pecuária está relacionado à emissão de metano entérico (CH_4) pelos ruminantes, devido ao seu impacto ambiental e à contribuição para as emissões de gases de efeito estufa. Além disso, a produção de CH_4 representa uma perda de 2 a 12% da energia dietética, reduzindo a eficiência de utilização da energia pelos animais (Morais *et al*., 2006; Becker, 2015). Segundo o Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicações (MCTI, 2022), aproximadamente 57% das emissões de CH_4 do setor agropecuário são provenientes da fermentação entérica, evidenciando a importância desse processo no contexto ambiental da atividade pecuária.

Diante desse cenário, a quantificação da produção de CH_4 é importante para investigar a emissão desse gás durante a fermentação ruminal e avaliar estratégias para sua mitigação. Em ensaios de fermentação in vitro, o sistema AMPTS® e a cromatografia gasosa são métodos utilizados para essa finalidade. Entretanto, o elevado custo dos equipamentos e a necessidade de mão de obra especializada podem dificultar a utilização dessas metodologias em pesquisas. Nesse contexto, o desenvolvimento de uma técnica simplificada e acessível pode contribuir para ampliar o acesso a essas avaliações. Diante disso, este trabalho teve como objetivo adaptar e avaliar preliminarmente uma técnica alternativa para a quantificação da produção de CH_4 em ensaios de fermentação ruminal *in vitro*.

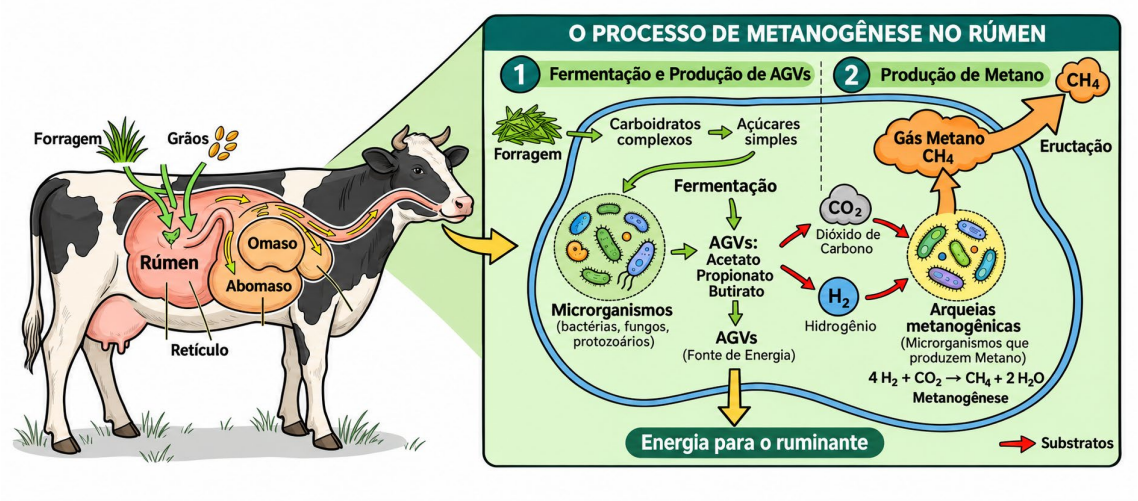
2. Desenvolvimento

2.1 Fermentação ruminal e formação de metano

A metanogênese ruminal está diretamente relacionada à fermentação dos alimentos, que ocorre em ambiente anaeróbio, sob temperatura em torno de 39 °C e pH tipicamente entre 6,0 e 7,0 (Kozloski, 2021). Conforme ilustrado na Figura 1, a degradação dos nutrientes pelos microrganismos resulta na produção de ácidos graxos voláteis (AGVs), principalmente acetato, propionato e butirato,

responsáveis por suprir aproximadamente 70% das exigências energéticas do ruminante (Bergman, 1990). Além disso, são produzidos hidrogênio (H_2) e dióxido de carbono (CO_2), que podem ser utilizados pelas arqueias metanogênicas para a formação de metano (CH_4), posteriormente eliminado principalmente por eructação (Janssen & Kirs, 2008). Esse processo representa uma via de utilização do H_2 gerado durante a fermentação ruminal e, simultaneamente, energia alimentar que o animal não consegue aproveitar para suas funções metabólicas, além de contribuir para as emissões de gases de efeito estufa.

Figura 1 - Infográfico esquemático do processo de metanogênese ruminal.



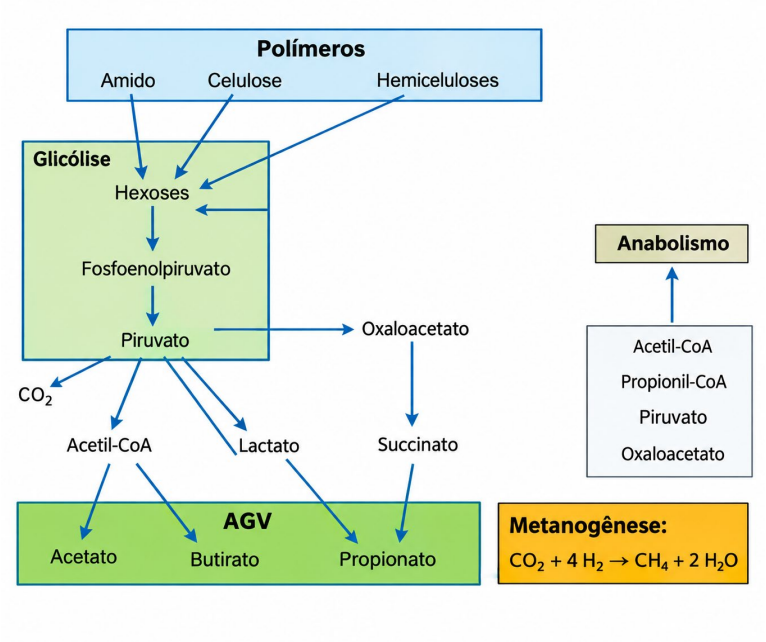
Fonte: Elaborado com o auxílio de IA (Gemini), baseado no modelo fermentativo ruminal descrito por Kozloski (2011)

A fermentação dos carboidratos tem início com a hidrólise dos polissacarídeos da dieta, como celulose, hemicelulose e amido, em açúcares simples. Esses açúcares são convertidos em piruvato pela via glicolítica. Nessa etapa, cofatores como o NAD+ são reduzidos a NADH. Em ambiente anaeróbio, sem a presença de oxigênio para atuar como aceptor final de elétrons, esses cofatores precisam ser reoxidados para que a fermentação continue. Grande parte desses equivalentes redutores é liberada na forma de H_2, que é transferido entre os microrganismos e incorporado em diferentes rotas metabólicas, o que

determina a produção de metano e o perfil de AGVs (Ungerfeld, 2020).

De forma simplificada na Figura 2, a formação de acetato ocorre a partir do piruvato, que é convertido em acetil-CoA, com liberação de CO_2 e produção de equivalentes redutores durante a oxidação do piruvato. Posteriormente, o acetil-CoA é convertido em acetato, processo associado à geração de ATP. A formação de butirato também envolve a utilização de acetil-CoA, cujas moléculas são condensadas para formar acetoacetil-CoA, que é posteriormente convertido em butirato (Kozloski, 2021).

Figura 2 - Esquema simplificado da fermentação de carboidratos no rúmen



Fonte: adaptado de Ungerfeld, 2020.

As vias fermentativas de formação do acetato e butirato estão relacionadas à produção de equivalentes redutores, principalmente o H_2, que precisa ser continuamente removido do ambiente ruminal para a manutenção do equilíbrio redox, ou seja, do balanço entre as reações de oxidação e redução, que envolvem a transferência de elétrons durante o metabolismo microbiano (Ungerfeld, 2020). Dessa forma, as arqueias metanogênicas desempenham importante função como consumidoras de H_2, utilizando ele predominantemente

na redução do CO_2 a CH_4. Assim, o fluxo de H_2 vindo da fermentação dos carboidratos determina a disponibilidade de substrato para a metanogênese (Janssen, 2010; Ungerfeld 2020).

Já o propionato pode ser formado pela via do succinato, na qual o piruvato é convertido em oxaloacetato, posteriormente reduzido a malato e transformado em fumarato e convertido em succinato, até a formação de propionato. Ao longo dessa via, ocorrem reações que utilizam H_2, influenciando em menor disponibilidade de H_2 para a metanogênese (Ungerfeld, 2020; Kozloski, 2021).

O balanço estequiométrico da fermentação ruminal mostra que a formação de acetato libera H_2, a de butirato libera uma quantidade menor e a de propionato consome H_2 (Kozloski, 2021).

$$\text{Glicose} \rightarrow 2 \text{ acetato} + 2\ CO_2 + 4\ H_2$$
$$\text{Glicose} \rightarrow \text{butirato} + 2\ CO_2 + 2\ H_2$$
$$\text{Glicose} + 2H_2 \rightarrow 2 \text{ propionato}$$

2.2 Fatores nutricionais associados à metanogênese

A produção ruminal de CH_4 é influenciada pela dieta e pelas condições de fermentação. Já foi visto que a fermentação dos carboidratos do alimento forma diferentes AGVs cuja proporção é determinada pelas características do substrato. Dessa forma, alterações na composição da dieta podem modificar as proporções das diferentes vias fermentativas dos AGVs e, consequentemente, a disponibilidade de equivalentes redutores para a metanogênese (Janssen, 2010). Essas proporções variam, conforme a composição da dieta, em aproximadamente 75:15:10 a 40:40:20 para acetato, propionato e butirato respectivamente (Bergman, 1990).

Em dietas com elevada participação de carboidratos fibrosos, como a celulose e a hemicelulose, a fermentação ruminal tende a apresentar maior contribuição das vias do acetato e do butirato, essas que liberam H_2 no ambiente ruminal que ocasiona em maior produção de CH_4. Por outro lado, o aumento da

disponibilidade de carboidratos de rápida fermentação, geralmente associado à maior inclusão de concentrados na dieta, como o amido, pode reduzir a produção de CH_4, pelo fato da via de fermentativa de propionato consumir o H_2 livre no rúmen (Johnson & Johnson, 1995). O favorecimento da produção de propionato em relação ao acetato e butirato reduz a disponibilidade de H_2 para as arqueias metanogênicas, diminuindo a formação de CH_4. Entretanto, essa redução refere-se à intensidade de emissão de CH_4, expressa em gramas de metano por quilograma de matéria seca ingerida (g CH_4/kg de MS ingerida), e não necessariamente à emissão diária total de metano (Min *et al*., 2020).

Além disso, a maior inclusão de concentrados pode reduzir o pH ruminal, prejudicando a atividade das arqueias metanogênicas. Com a redução da utilização de H_2 por esses microrganismos, esse gás pode se acumular no rúmen, aumentando sua pressão parcial. Nessas condições, a formação de acetato torna-se termodinamicamente menos favorável, em comparação às vias que favorecem a utilização de equivalentes redutores, como a formação de propionato. Assim, as condições do ambiente ruminal podem modificar a distribuição dos produtos da fermentação e influenciar a produção de CH_4 (Ungerfeld, 2020).

2.3 Métodos de avaliação da produção de metano em sistemas *in vitro*

A avaliação da produção de CH_4 em sistemas de fermentação *in vitro* pode ser realizada por diferentes abordagens, entre as quais se destacam o Sistema Automático de Teste de Potencial de Metano (AMPTS®) e a cromatografia gasosa. O AMPTS® consiste em um sistema integrado que compreende desde a incubação das amostras até a quantificação automática do CH_4. Já a cromatografia gasosa trata-se de uma técnica analítica utilizada para identificar e quantificar o CH_4 em amostras gasosas coletadas de sistemas de fermentação *in vitro*.

O AMPTS® é um sistema automatizado de avaliação do potencial de produção de CH_4, desenvolvido pela empresa sueca BPC Instruments. Seu

funcionamento ocorre de forma integrada em três unidades: na Unidade A são realizadas a incubação das amostras e a produção de gases; posteriormente, esses gases são conduzido à Unidade B, onde passam por uma solução alcalina de NaOH (3 M), responsável pela retenção do CO_2; por fim, o CH_4 remanescente é direcionado à Unidade C, na qual seu volume é mensurado automaticamente por meio de células de fluxo (BPC Instruments, 2024).

Essa metodologia possibilita o monitoramento automático e contínuo da produção de CH_4 ao longo do período experimental, reduzindo a necessidade de coletas manuais e erros associados a essas operações. Entretanto, sua utilização apresenta limitações relacionadas ao custo de aquisição do equipamento e ao número de amostras que podem ser avaliadas simultaneamente, que varia de 9 a 18 conforme o modelo utilizado. Além disso, a instalação requer o nivelamento adequado do sistema para assegurar o funcionamento das unidades de mensuração.

A cromatografia gasosa, por sua vez, é uma técnica analítica amplamente utilizada para a quantificação do CH_4, baseada na separação, identificação e quantificação dos diferentes componentes de uma amostra gasosa. Essa técnica possibilita determinar a concentração de CH_4 em amostras coletadas de diferentes sistemas experimentais, incluindo ensaios *in vitro* de produção de gás total, conforme a metodologia proposta por Theodorou *et al*. (1994).

Seu funcionamento baseia-se na injeção de amostras gasosas em um cromatógrafo, no qual um gás de arraste, como nitrogênio (N_2) ou hélio (He), conduz esta amostra através de uma coluna capilar, a qual realiza a separação dos seus componentes. Para a identificação e quantificação do CH_4, utiliza-se o Detector de Ionização de Chama (FID ou DIC), que realiza a comparação do sinal gerado pela amostra com curvas de calibração obtidas a partir de padrões de concentrações conhecidas (Becker, 2015).

Essa técnica apresenta elevada sensibilidade e precisão, além de possibilitar a análise de múltiplas amostras e quantificação de diferentes gases, conforme a configuração do equipamento. Entretanto, sua aplicação demanda coleta e armazenamento das amostras gasosas em frascos apropriados

(*extainers/vials*), além de mão de obra especializada para operação do equipamento e a interpretação dos resultados. O elevado custo de aquisição e manutenção do sistema também pode limitar sua disponibilidade.

A escolha do método para quantificação de CH_4 deve considerar aspectos como a precisão das mensurações, a estrutura disponível e os custos envolvidos. Essas características reforçam a importância de avaliar alternativas que permitam a mensuração da produção de CH_4 em ensaios de fermentação ruminal *in vitro*.

2.4 Avaliação preliminar de uma metodologia alternativa

Visando ampliar e facilitar o acesso a avaliações da produção de CH_4, um método alternativo vem sendo adaptado no Laboratório de Bromatologia e Nutrição de Ruminantes (Labrumen), vinculado ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). A metodologia baseia-se no princípio de retenção do CO_2 por meio de uma solução alcalina de NaOH (3 M), conforme empregado no sistema AMPTS®, associado à mensuração volumétrica do CH_4 por meio do deslocamento de um líquido, decorrente da pressão exercida pelo gás produzido.

Para realização dos testes, foram pesadas amostras de milho moído e de forragem de azevém/aveia (1 g), em quadruplicatas, utilizando frascos de vidro âmbar de 150 mL. As amostras foram incubadas com inóculo ruminal, coletado de um bovino fistulado, e solução tampão, conforme Mould *et al*., 2005. Todos os frascos foram gaseificados com CO_2 para expulsar o O_2 presente em seu interior, a fim de manter um ambiente anaeróbico. Em seguida, foram vedados e mantidos em banho-maria, sob agitação lenta durante 72 horas.

Para cada tipo de amostra, dois frascos foram destinados à quantificação do CH_4 e dois à determinação do gás total. Os frascos de fermentação destinados ao CH_4 foram conectados a um segundo frasco contendo solução de NaOH (3 M), responsável pela retenção do CO_2. Na sequência, o CH_4

remanescente foi direcionado a um terceiro frasco contendo água, cujo deslocamento provocado pela pressão exercida pelo gás, foi mensurado em proveta, permitindo determinar o volume de CH_4 produzido em mililitros (mL).

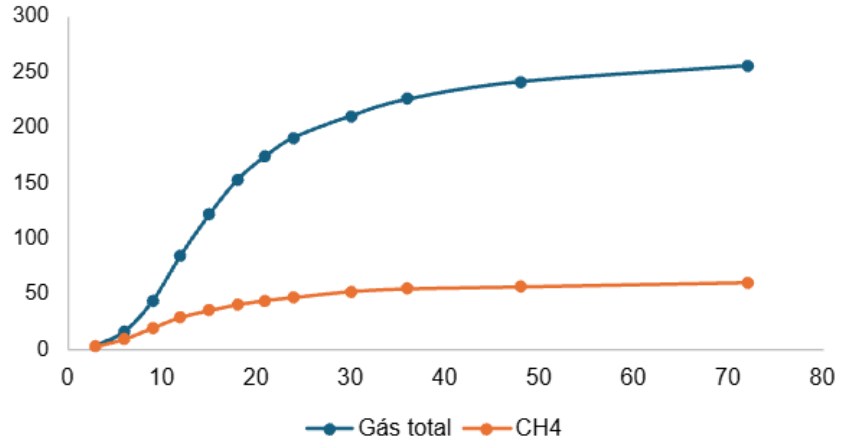
Os demais frascos de fermentação foram destinados à determinação da produção de gás total, conforme a metodologia proposta por Theodorou *et al*. (1994). Ambas as mensurações foram realizadas após 03, 06, 09, 12, 15, 18, 21, 24, 30, 36, 48 e 72 horas de incubação, permitindo acompanhar a evolução da produção de gases ao longo do período experimental.

A avaliação simultânea da produção de gás total e de CH_4 é necessária para determinar a proporção desse gás em relação ao volume total produzido durante a fermentação. Segundo Johnson e Johnson (1995) e Becker (2015), espera-se que o CH_4 represente aproximadamente 25 a 33% do volume total de gases produzidos no rúmen. Dessa forma, a comparação entre os volumes de CH_4 e de gás total permite verificar a coerência dos resultados obtidos pela metodologia alternativa, constituindo uma etapa preliminar importante para sua avaliação.

2.4.1 Resultados preliminares e discussão

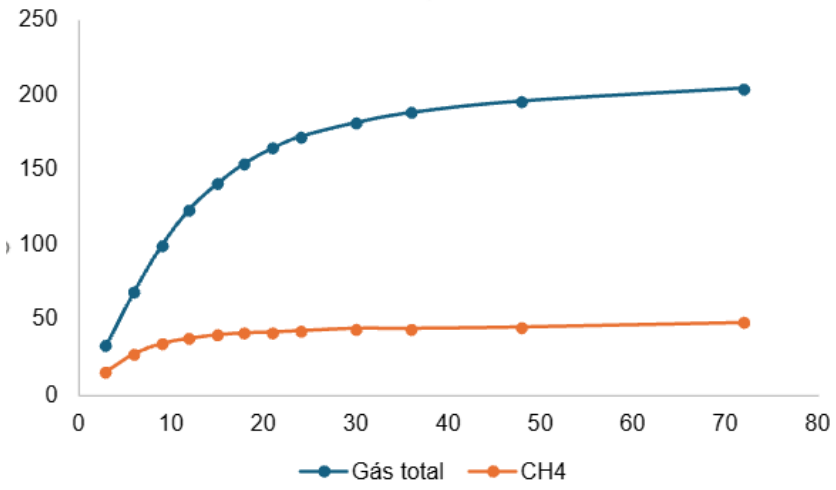
A produção acumulada de gás total e de CH_4 ao longo das 72 horas de fermentação *in vitro* está apresentada para o milho moído na Figura 3 e para a forragem de azevém/aveia na Figura 4. Ao final do período experimental, os volumes acumulados de gás total e de CH_4 foram de 255 e 60 mL para o milho moído e de 204 e 48 mL para a forragem de azevém/aveia, respectivamente.

Figura 3 – Produção acumulada de gás total e metano (CH_4) durante fermentação *in vitro* de milho moído.



Fonte: Elaborada pelos autores, 2026.

Figura 4 – Produção acumulada de gás total e metano (CH_4) durante fermentação *in vitro* de forragem de azevém/aveia.



Fonte: Elaborada pelos autores, 2026.

Nas primeiras 12 horas de incubação, a proporção de CH_4 em relação ao volume total de gases foi de 0,49 para o milho moído e de 0,37 para a forragem de azevém/aveia, valores superiores à faixa de 0,25 a 0,33 esperada, com base na estequiometria da fermentação ruminal (Johnson & Johnson, 1995; Becker,

2015). Esse comportamento indica a necessidade de investigar possíveis fontes de variação nas mensurações, incluindo a eficiência de retenção do CO_2 pela solução alcalina e o procedimento utilizado para determinar o volume de CH_4.

A partir das 12 horas de incubação, a proporção de CH_4 no volume total de gases variou de 0,22 a 0,32 para ambos os substratos, permanecendo, de modo geral, próxima à faixa de referência. Embora esse resultado não permita, isoladamente, confirmar a precisão da metodologia, constitui um indicativo do seu potencial de aplicação.

Por se tratar de uma avaliação preliminar, algumas limitações potenciais devem ser consideradas. A metodologia parte do princípio de que, após a retenção do CO_2 pela solução de NaOH, o gás remanescente corresponde ao CH_4. Conforme Kozloski (2021), além do CO_2 e do CH_4, predominantes nos gases ruminais, outros gases como o hidrogênio (H_2) e sulfeto de hidrogênio (H_2S) também estão presentes. Dessa forma, esses gases não retidos podem levar a uma possível superestimação do volume de CH_4. Além disso, a eficiência de retenção pelo NaOH pode ser influenciada pelo tempo e pela superfície de contato entre o gás e a solução. Quanto à mensuração do volume por deslocamento de água, as condições de temperatura e pressão também podem influenciar os valores obtidos.

Dessa forma, ensaios adicionais são necessários para aprimorar os procedimentos experimentais, avaliar a repetibilidade das mensurações e comparar os resultados obtidos pela metodologia alternativa com aqueles de métodos consolidados, como o AMPTS® e a cromatografia gasosa. Essas comparações devem ser realizadas utilizando as mesmas amostras, a fim de avaliar a concordância entre os métodos, estabelecer precisão e confiabilidade à metodologia proposta.

3. Considerações finais

A metodologia alternativa, baseada na retenção do CO_2 por solução alcalina de NaOH e na mensuração volumétrica do gás remanescente, apresentou potencial para a quantificação da produção de CH_4 em ensaios de fermentação ruminal *in vitro*. Entretanto, os resultados obtidos ainda não permitem confirmar sua precisão e confiabilidade, sendo necessários estudos complementares para aprimorar os procedimentos experimentais e comparar os resultados com métodos consolidados, como a cromatografia gasosa e o sistema AMPTS®.

4. Referências bibliográficas

BECKER, E. G. Suplementação com ácidos graxos de cadeia média na emissão de metano, produção e qualidade do leite em vacas lactantes. **Dissertação de Mestrado.** Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil, 2015.

BERGMAN, E. N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiol. Rev**. 70:567–590, 1990. https://doi.org/10.1152/physrev.1990.70.2.567.

BPC INSTRUMENTS. 2024. AMPTS III Biochemical Methane Potential (BMP)/Biogas Potential Handbook. BPC Instruments AB, Lund, Sweden. Accessed Oct. 14, 2026. https://bpcinstruments.com/products/respirometer-systems/ampts-iii/.

JANSSEN, P. H. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. **Anim. Feed Sci. Technol.** 160:1–22, 2010. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.07.002.

JANSSEN, P. H., KIRS, M. Structure of the archaeal community of the rumen. **Appl. Environ. Microbiol.** 74:3619–3625, 2008. https://doi.org/10.1128/AEM.02812-07.

JOHNSON, K. A., JOHNSON, D. E. Methane emissions from cattle. **J. Anim. Sci.** 73:2483–2492, 1995. https://doi.org/10.2527/1995.7382483x.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos Ruminantes**. 3rd ed. Editora UFSM, Santa Maria, Brazil, 2021.

MCTI (Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação). 2022. Estimativas Anuais de Emissões de Gases de Efeito Estufa no Brasil. MCTI, Brasília, Brazil. Accessed Oct. 15, 2026. https://www.gov.br/mcti/pt-br/acompanhe-o-mcti/sirene/publicacoes/estimativas-anuais-de-emissoes-gee.

MIN, B. R. *et al*. Dietary mitigation of enteric methane emissions from ruminants: A review of plant tannin mitigation options. **Anim. Nutr.** 6:231–246, 2020. https://doi.org/10.1016/j.aninu.2020.05.002.

MOULD, F. L. *et al*. A review and simplification of the in vitro incubation medium. **Anim. Feed Sci. Technol.** 123–124:155–172, 2005. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.05.002.

THEODOROU, M. K. *et al*. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Anim. Feed Sci. Technol.** 48:185–197, 1994. https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90171-6.

UNGERFELD, E. M. Metabolic hydrogen flows in rumen fermentation: Principles and possibilities of interventions. **Front. Microbiol.** 11:589, 2020. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00589.