

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ**

**MILANE RIBEIRO SANTOS**

**TÉCNICA DA MÁSCARA FACIAL PARA MENSURAÇÃO DA EMISSÃO DE  
METANO E PRODUÇÃO DE CALOR EM VACAS GIROLANDO NO TERÇO  
FINAL DA LACTAÇÃO**

**ILHÉUS-BA**

**2017**

**MILANE RIBEIRO SANTOS**

**TÉCNICA DA MÁSCARA FACIAL PARA MENSURAÇÃO DA EMISSÃO DE METANO E PRODUÇÃO DE CALOR EM VACAS GIROLANDO NO TERÇO FINAL DA LACTAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área: Ciência Animal

Orientador: Prof. Dr Luiz Gustavo Ribeiro Pereira

Coorientadores: Dr Alexandre Lima Ferreira e Dr. Thierry Ribeiro Tomich

**ILHÉUS-BA**

**2017**

S237

Santos, Milane Ribeiro.

Técnica da máscara facial para mensuração da emissão de metano e produção de calor em vacas girolando no terço final da lactação / Milane Ribeiro Santos. – Ilhéus, BA: UESC, 2017.  
xi, 54 f. ; anexo.

Orientador: Luís Gustavo Ribeiro Pereira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Inclui referências bibliográficas.

1. Ruminantes – Alimentação e rações. 2. Rúmen – Fermentação . 3. Bioenergética. 4. Efeito estufa. 5. Metano. I.Título.

CDD 636.0855

**MILANE RIBEIRO SANTOS**

**TÉCNICA DA MÁSCARA FACIAL PARA MENSURAÇÃO DA EMISSÃO DE  
METANO E PRODUÇÃO DE CALOR EM VACAS GIROLANDO NO TERÇO  
FINAL DA LACTAÇÃO**

Ilhéus – BA, 31/01/2017

---

Luiz Gustavo Ribeiro Pereira - D.Sc  
Embrapa  
(Orientador)

---

Rafael Dantas do Santos – D.Sc  
Embrapa

---

Stefanie Alvarenga Santos- D.Sc  
UFBA

**ILHÉUS – BA  
2017**

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais, Silvestre e Railda pelo incentivo, e por me ensinar a não desistir diante das dificuldades, a minha irmã pelo companherismo e a minha tia Rita pelo cuidado e encorajamento.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por ter me proporcionado a vida, por me dá força para prosseguir e o direito de obter mais uma vitória.

A minha família que me apoia em todas minhas escolhas, e com muito carinho e incentivo me faz querer continuar em busca da realização dos meus sonhos.

Ao meu orientador, Luiz Gustavo Ribeiro Pereira por ter me proporcionado ensinamentos, confiança e desenvolvimento profissional.

Ao Prof. José Augusto Azevedo e ao coorientador Thierry Tomich pela presteza e atenção durante essa jornada.

Ao professor Rogério Mauricio pela concessão da bolsa e auxílio na pesquisa.

A pesquisadora da Embrapa Fernanda Samarini por toda ajuda.

Aos pós-doutorandos Alexandre Ferreira pela paciência, auxílio e presteza durante todo o projeto, e a Daniela Oss, pela disposição, incentivo e ajuda na elaboração da dissertação.

Aos estagiários Ana Luisa, Bruna, Douglas, Eduardo, Susane, Samuel e Verônica por toda ajuda, companheirismo e amizade.

Aos residentes técnicos Alexandre, Higor Silva, Igor, Leonardo, Rafael, Ramon e Tiago, por toda presteza, dedicação, amizade e auxílio na execução do experimento.

A Rebeca Silvi, companheira de experimento, pela convivência e ajuda.

A João Paulo e Karol pela disponibilidade e ajuda durante o experimento.

Aos funcionários da Embrapa, em especial a José Mário, Augusto (Tetesco), Verônica, Geovane, Geraldo (Dodó), Rosemeire, Gilmar, Marcial, Marieta, Luiz do Carmo e Luiz Lopes, pela ajuda constante e acolhimento.

Aos amigos que mesmo longe se mostraram presente me encorajando e escutando.

Aos amigos que fiz durante a estadia na Embrapa, que fizeram com que a caminhada fosse menos árduas, em especial, Abias, Adolfo, Brena, Danieli, Aloma, Aline, Camila, Luana, Adriana, Maria Júlia, Duarte, Larisse, Leile, Gustavo Moura, Mariana, Polinarte e Isabela.

A Embrapa Gado de Leite pelo espaço concedido para realização da pesquisa. A CAPES, pela concessão da bolsa de estudo. E a Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) pela minha formação.

Aqueles que não foram citados, mas que de alguma forma, contribuíram para a minha formação acadêmica e pessoal e para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

## TÉCNICA DA MÁSCARA FACIAL PARA MENSURAÇÃO DA EMISSÃO DE METANO E PRODUÇÃO DE CALOR EM VACAS GIROLANDO NO TERÇO FINAL DA LACTAÇÃO

### RESUMO

Mundialmente há uma pressão para a mitigação de gases de efeito estufa oriundos da pecuária e pela busca de animais mais eficientes, o que gera um crescente interesse em pesquisas que buscam um maior entendimento das perdas energéticas pela emissão de metano entérico e produção de calor pelos ruminantes. Pesquisas de validação de técnicas têm sido conduzidas para fornecer à comunidade científica opções de métodos que melhor se adequem às diferentes condições de avaliação. Assim, o objetivo do presente trabalho foi comparar a técnica da máscara facial (baseada em medição de curta duração) e a câmara respirométrica para mensurar a emissão de metano e a produção de calor em vacas leiteiras Girolando ( $\frac{3}{4}$  Holandês –  $\frac{1}{4}$  Gir) no terço final da lactação. Foram utilizadas 28 fêmeas leiteiras, agrupadas em lotes de multíparas (peso vivo inicial =  $575 \pm 40,1$  Kg) e primíparas (peso vivo inicial =  $538 \pm 112$  Kg) designadas a dois níveis de alimentação: consumo *ad libitum* ou restrito (dieta limitada para atender a 80% e 85% das energias líquidas totais para multíparas e primíparas, respectivamente). A dieta foi constituída de 75% de silagem de milho e 25% de concentrado (base na MS). A mensuração da emissão de metano e produção de calor iniciou-se aos 250 dias de lactação com a utilização da técnica da máscara facial (30 minutos/dia), seguida da câmara respirométrica (48 horas). Não foram observadas diferenças entre as técnicas para emissões de metano quando expressas em g/dia ou g/kg de consumo de matéria seca ( $P > 0,05$ ), no entanto houve diferenças entre técnicas quando as emissões de metano foram ajustadas para produção de leite. Houve diferença entre técnicas para produção de calor ( $P < 0,05$ ). Os coeficientes de correlação e concordância foram 0,86 para emissão de metano expressa em g/dia, e 0,57; 0,51; 0,79 e 0,79 para as emissões de metano expressas em g/kg de consumo de matéria seca, g/kg de produção de leite, g/kg de leite corrigido para 4% de gordura e em g/kg



de leite corrigido para teor de energia. Existe compatibilidade entre as técnicas da máscara facial e a câmara respirométrica com moderada a alta precisão e acurácia. A técnica da máscara facial, baseada em medição de curta duração pode ser utilizada como um método alternativo para mensurar metano entérico, entretanto, são necessários mais estudos para validar o uso da máscara facial para a estimativa da produção de calor em vacas Girolando no final da lactação.

**Palavras-chave:** Bioenergética. Câmara respirométrica. Gases de efeito estufa. Metano. Produção de calor.

## THE FACIAL MASK TECHNIQUE FOR MEASURING METHANE EMISSION AND HEAT PRODUCTION IN GIROLANDO COWS IN THE LATE STAGE OF LACTATION

### ABSTRACT

In worldwide there is a pressure to mitigate greenhouses gases from livestock, scientists seek to find ways to identify animals that are more efficient, due to that, an interest in research to understand the energy metabolism in farm animals, mainly the energy losses as CH<sub>4</sub> and heat production. Several techniques have been evaluated in attempt to offer the scientific community options of methods that better be suited to different evaluation conditions. So, the objective of this study was to compare the short term measurement face mask technique with respiration chamber for measuring CH<sub>4</sub> emissions and heat production in dairy cows Girolando (¾ Holstein - ¼ Gyr) in the late lactation. Data were derived from 28 dairy crossbred cows, grouped as multiparas multiparas (initial live weight = 575 ± 40.1 kg) and primiparous animals (initial bory weight = 538 ± 112 kg) designated at two levels of DM intake: *ad libitum* or restricted (80% and 85% of the total net energy requirements for multiparous and primiparous, respectively). Cows were fed a diet consisting of 75% of corn silage and 25% of concentrate on a (DM basis). The measurement of methane emission and heat production began at 250 days of lactation using the facial mask technique (30 minutes / day), followed by the respirometric chamber (48 hours). No differences were observed between the techniques for methane emissions when expressed in g/day or g/kg of dry matter intake (P> 0.05), however, there were differences between techniques when methane emissions were adjusted for milk production. There was a difference between techniques for heat production (P <0.05). The concordance correlation coefficient were 0.86 for methane emission expressed in g/day, and 0.57; 0.51; 0,79 and 0,79 for methane emissions expressed in g/kg dry matter intake, g/kg milk production, g/kg 4% fat corrected milk and g / kg energy-corrected milk. There is compatibility between facial mask techniques and the respirometric chamber with

moderate to high accuracy and accuracy. The facial mask technique, based on short duration measurement can be used as an alternative method for enteric methane estimation; however, further studies are needed to validate the use of the face mask for the estimation of heat production in Girolando cows in the late end of lactation.

**Keywords:** Bioenergetics. Respirometric chamber. Greenhouse gases. Methane. Heat production.

## SUMÁRIO

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>1</b>   | <b>INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>12</b> |
| <b>2</b>   | <b>OBJETIVOS.....</b>   | <b>14</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Objetivo geral.....</b>  | <b>14</b> |
| <b>2.2</b> | <b>Objetivos específicos.....</b>                                 | <b>14</b> |
| <b>3</b>   | <b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                                 | <b>15</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Emissão de CH<sub>4</sub> entérico pelos ruminantes.....</b>   | <b>15</b> |
| <b>3.2</b> | <b>Metodologias de mensuração de CH<sub>4</sub> entérico.....</b> | <b>15</b> |
| <b>3.3</b> | <b>Importância de mensurar produção de calor.....</b>             | <b>18</b> |
| <b>3.4</b> | <b>Técnicas para mensurar produção de calor.....</b>              | <b>19</b> |
| <b>4</b>   | <b>ARTIGO .....</b>   | <b>20</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Resumo.....</b>  | <b>21</b> |
| <b>4.2</b> | <b>Introdução.....</b>  | <b>22</b> |
| <b>4.3</b> | <b>Material e métodos.....</b>                                    | <b>23</b> |
| <b>4.4</b> | <b>Resultados.....</b>  | <b>28</b> |
| <b>4.5</b> | <b>Discussão.....</b>   | <b>31</b> |
| <b>4.6</b> | <b>Conclusão.....</b>   | <b>36</b> |
| <b>4.7</b> | <b>Referências bibliográficas.....</b>                            | <b>36</b> |
| <b>5</b>   | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>                                  | <b>46</b> |
| <b>6</b>   | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                            | <b>46</b> |
|            | <b>ANEXO.....</b>   | <b>51</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil possui um rebanho bovino de 215 milhões de cabeças, com posição de destaque na produção pecuária, atividade geradora de alimentos e renda. Apesar da importância para a economia do país, muito tem se discutido sobre o impacto ambiental da pecuária causado pela emissão de gases de efeito estufa (STEINFELD et al., 2006).

Dentre esses gases, o metano ( $\text{CH}_4$ ) é a principal fonte de emissão na pecuária, decorrente da fermentação entérica e parte do processo digestivo natural dos ruminantes. Considerando que o  $\text{CH}_4$  entérico representa cerca de  $\frac{1}{4}$  das emissões de processos antropogênicos (WUEBBLES e HAYHOE, 2002), o desenvolvimento de métodos alternativos de baixo custo para a estimativa da emissão desse gás pode contribuir para a realização de mais estudos e o desenvolvimento de estratégias de mitigação. Assim, estudos de comparações de acurácia e precisão das técnicas para mensuração de  $\text{CH}_4$  têm sido realizados para um melhor entendimento das vantagens e desvantagens de cada método (PINARES-PATIÑO, et al., 2011; HUHTANEN, et al., 2015; OSS et al., 2016a).

Como exemplos de técnicas para mensuração de  $\text{CH}_4$ , podem ser citadas a técnica do gás traçador hexafluoreto de enxofre ( $\text{SF}_6$ ) (JOHNSON et al., 1994), *Green Feed* (HAMMOND et al., 2015) e a técnica da câmara respirométrica, a qual é considerada o método referência, devido a baixa variabilidade.

A compreensão do metabolismo energético e os estudos de partição energética podem gerar informações importantes para estabelecer critérios para nortear a busca por animais mais eficientes. A maior parte da perda de energia da alimentação ocorre via fezes e produção de calor (FERREL e OLTJEN, 2008).

A mensuração da produção de calor via câmara respirométrica é um dos métodos mais aceitos e utilizados. É baseada na mensuração das diferenças de concentração de  $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$  e  $\text{CH}_4$  no ar que entra e sai da câmara respirométrica, além da quantificação da perda de nitrogênio (N) urinário (BROUWER, 1965). O abate comparativo é outro método utilizado na mensuração da produção de calor e é fundamentado na relação entre o consumo de energia metabolizável e a energia retida corpo vazio dos animais (RESENDE et al., 2006). A técnica do abate comparativo por envolver o sacrifício de

animais, pode tornar-se limitante, principalmente para avaliação de vacas leiteiras que apresentam elevado valor comercial.

Nesse contexto, nos últimos anos tem-se buscado métodos alternativos para estimar a mensuração de CH<sub>4</sub> e produção de calor baseadas em medições “spot”, ou seja, de curta duração. Oss et al. (2016a) mostrou o potencial da técnica da máscara facial para avaliação de CH<sub>4</sub> entérico em novilhos de origem leiteira.

A técnica da máscara facial apresenta como vantagem a simplicidade de manuseio, o baixo custo e a possibilidade de avaliação de maior número de animais em curto espaço de tempo. Entretanto, são necessários mais estudos em diferentes condições experimentais, envolvendo distintos grupos genéticos, estádios fisiológicos e manejos alimentares, a fim de que o método possa ser consolidado.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Comparar as técnicas da máscara facial e câmara respirométrica para estimativa da emissão de CH<sub>4</sub> entérico e da produção de calor em vacas leiteiras Girolando ( $\frac{3}{4}$  Holandês  $\times$   $\frac{1}{4}$  Gir) de diferentes ordens de lactação (multípara vs. primípara), submetidas a dois níveis de alimentação (*ad libitum* vs. restrito) no terço final da lactação,.

### 2.2 Objetivos específicos

- ✓ Comparar os valores médios de emissão de CH<sub>4</sub> e produção de calor gerados pelas diferentes técnicas;
- ✓ Avaliar a variabilidade associada a máscara facial e câmara respirométrica para mensuração de CH<sub>4</sub> e produção de calor;
- ✓ Avaliar a precisão e acurácia da técnica da máscara facial.

### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1 Emissão de CH<sub>4</sub> entérico pelos ruminantes**

A pecuária é uma importante fonte antropogênica de emissões de gases do efeito estufa, gerando os gases CH<sub>4</sub>, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e óxido nitroso (NO<sub>3</sub>) (STEINFELD et al., 2006). O CH<sub>4</sub> é o principal gás originado nesse setor, principalmente pela fermentação entérica (85 a 90%) dos bovinos, o restante sendo produzido dos dejetos destes animais. Da produção de CH<sub>4</sub> pela fermentação ruminal, 95% é excretado via respiração/eructação e, dos 5% de CH<sub>4</sub> gerado no trato digestivo posterior, 89% é excretado pela respiração e 11% via retal (MURRAY et al., 1976). As perdas de energia na forma de CH<sub>4</sub> entérico podem representar de 2 a 14% da energia consumida (MCALLISTER et al., 1996). Assim, é desafiante e desejável que sejam desenvolvidas estratégias que minimizem a emissão de CH<sub>4</sub>, possibilitando uma maior eficiência de aproveitamento da energia pelo animal.

A emissão de CH<sub>4</sub> pelos ruminantes é influenciada pela ingestão de MS, a natureza e qualidade do alimento, tamanho do animal e componentes dietéticos. A fermentação ruminal resulta na produção de ácidos graxos voláteis (AGVs), gases e proteínas microbianas (PEREIRA et al., 2005; MARTIN et al., 2009). A disponibilidade de hidrogênio (H<sub>2</sub>) no rúmen é influenciada pelas concentrações de acetato, butirato e propionato (MARTIN et al., 2009). A formação de acetato e butirato favorece a metanogênese, resultando na liberação do H<sub>2</sub>, já a formação do propionato capta o H<sub>2</sub> reduzindo a produção de CH<sub>4</sub>, favorecendo a maior eficiência no aproveitamento da energia (RESENDE et al., 2006).

Pesquisas com foco na eficiência da produção animal, permitindo a redução na emissão de CH<sub>4</sub> entérico sem prejudicar o desempenho produtivo, estão em constante desenvolvimento. Existem várias técnicas para mensurar as emissões de CH<sub>4</sub> e as perdas energéticas, todas com qualidades e limitações específicas.

#### **3.2 Metodologias de mensuração de CH<sub>4</sub> entérico**

As técnicas podem ser aplicadas a diferentes condições de criação e apresentam vantagens e desvantagens, sendo importante o conhecimento avançado para planejar



experimentos, compreender e interpretar resultados e compará-los com outros estudos. A pesquisa para aprimoramento de metodologias de mensuração de CH<sub>4</sub> é importante para o estabelecimento de soluções científicas de mitigação dos gases de efeito estufa.

A mensuração de CH<sub>4</sub> pode ser realizada usando metodologias *in vivo* e *in vitro*. As técnicas *in vitro* têm sido amplamente utilizadas para a avaliação do valor nutritivo dos alimentos (RYMER et al., 2005) e para mensurar a produção de CH<sub>4</sub> (NAVARRO-VILLA et al., 2011; PELLIKAAN et al., 2011). O método *in vitro* permite a avaliação de grande diversidade de ingredientes, sendo considerada menos onerosa e rápida para *screening* de agentes mitigadores de CH<sub>4</sub> (MAKKAR e VERCOE, 2007).

Entre os métodos *in vivo*, o que utiliza câmaras respirométricas é considerado referência (*Gold Standard*) para a mensuração de CH<sub>4</sub> devido a baixa variabilidade dos resultados gerados. Já a técnica do gás traçador SF<sub>6</sub> (JOHNSON et al., 1994) tem sido amplamente utilizada para mensurar CH<sub>4</sub> de animais em pastejo (GRAINGER et al., 2010; HEGARTY et al., 2007), porém, ao contrário da câmara respirométrica, não é possível mensurar o CH<sub>4</sub> eliminado pela via retal, além de ser bastante laborioso e exigir metodologia criteriosa para minimizar erros experimentais. Deighton et al. (2014) propuseram melhorias no método pela incorporação de placas de orifício como limitadores de fluxo ao invés de tubos capilares nos cabrestos coletores e, assim, conseguiram a liberação do gás traçador em taxas constantes contornando um dos pontos críticos da técnica.

Uma vez que a perda de CH<sub>4</sub> é parte inerente ao metabolismo energético em ruminantes, as câmaras respirométricas têm sido utilizadas há muitos anos para o estudo do metabolismo energético (MCLEAN, 1987). Na avaliação por esse método, os animais são confinados individualmente por aproximadamente 2 a 4 dias, e as emissões são calculadas pelo fluxo de ar e concentrações de CH<sub>4</sub> no ar que entra e sai das câmaras (RODRIGUEZ et al., 2007).

A técnica da câmara respirométrica é precisa e acurada para a mensuração das emissões de CH<sub>4</sub>, uma vez que o ambiente pode ser controlado e a confiabilidade e estabilidade dos instrumentos podem ser medidas, além de computar as emissões por respiração, eructação e via retal. No entanto, existem limitações quanto ao seu uso, uma vez que é necessário alto investimento em equipamentos e estrutura. Adicionalmente, as

câmaras respirométricas podem propiciar ambiente artificial que altera o comportamento animal, devido à restrição da movimentação, além de poder impor restrições sobre a alimentação e comportamentos naturais.

A simplicidade para as mensurações das emissões de CH<sub>4</sub> por técnicas de curta duração fez com que esses métodos fossem desenvolvidos, aumentando a capacidade de avaliação de estratégias de mitigação, permitindo a avaliação dos animais em momentos de rotina de manejo (por exemplo, durante a ordenha ou durante a alimentação), de forma não invasiva, não influenciando o comportamento e desempenho animal.

Uma técnica de mensuração de curta duração atualmente muito utilizada é a que emprega o sistema *GreenFeed* (HAMMOND et al., 2015), e permite a mensuração da emissão de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>, associado a um sistema de alimentação automatizado, onde as medições são feitas por 3 a 7 minutos em cada visita aos alimentadores, várias vezes ao dia (HAMMOND et al., 2015). Essa técnica pode apresentar como desvantagem uma abordagem de períodos muito curto de tempo, portanto as correlações com as emissões totais diárias devem ser interpretadas cautelosamente.

Hammond et al., (2015) compararam as emissões de CH<sub>4</sub> estimadas pelo *GreenFeed*, câmaras respirométricas e a técnica do gás traçador SF<sub>6</sub>, sob duas situações: novilhas alimentadas com dietas a base de silagem de milho ou de gramíneas suplementadas ou não com linhaça extrusada, e um segundo experimento com novilhas alimentadas com silagem pré-secada de diferentes forrageiras. As estimativas de emissão de metano obtidos com o sistema *GreenFeed* e câmara respirométrica foram semelhantes, mas o método não permitiu detectar diferenças significativas entre tratamentos e a variação entre animais da mesma forma que as técnicas do gás traçador SF<sub>6</sub> e câmara respirométrica detectaram.

O método da máscara facial foi utilizado por Washburn e Brody (1937) e mais recentemente por Oss et al. (2016a) para estimar a produção de CH<sub>4</sub> com base em coletas de curta duração (*spot*). O princípio é semelhante ao da câmara respirométrica baseando na mensuração das concentrações gasosas (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>) no ar que entra e no ar que sai da máscara e do fluxo de ar que passa pela máscara (L/min). Oss et al. (2016a) compararam o método da máscara facial e duas técnicas convencionais (câmara respirométrica e a técnica SF<sub>6</sub>) para medir as emissões de CH<sub>4</sub> em tourinhos alimentados

com 59,6% silagem de milho e 40,4% concentrado, em 3 níveis de consumo de matéria seca: 1,2% do PV, 1,8% do PV e *ad libitum*. Os resultados foram altamente concordantes, e a máscara facial gerou dados de produção de CH<sub>4</sub> compatíveis aos encontrados nas técnicas avaliadas.

Apesar das vantagens da técnica da máscara facial como método alternativo para mensuração de CH<sub>4</sub>, são necessários mais estudos em diferentes condições experimentais, envolvendo mais raças, estádios fisiológicos e manejos alimentares para que o método possa ser consolidado.

### **3.3 Importância de mensurar a produção de calor em ruminantes**

A produção de calor nos ruminantes é ocasionada pelas reações metabólicas associadas ao metabolismo de manutenção, produção e outras funções como atividade física, regulação da temperatura corporal e resposta imune (NRC, 1996).

Em estudos de metabolismo energético, há um grande interesse na medição da produção de calor com objetivo de obter informações sobre a eficiência metabólica do animal. O processamento da dieta (mastigação e calor de fermentação), o processo de circulação, respiração, locomoção e o custo energético para a renovação de tecidos são os principais contribuintes para a produção de calor (LAWRENCE e FOWLER, 1997). Além disso, a produtividade animal exerce influência sobre a produção de calor em bovinos.

O custo energético de manutenção, perdido na forma de calor, pode representar 70-75% do consumo total de energia (FERRELL e JENKINS, 1984; NRC, 1984). Assim, esforço significativo tem sido empregado na tentativa de desenvolver métodos que permitam estimar a produção de calor em ruminantes e identificar fenótipos relacionados a eficiência bioenergética, permitindo a seleção de animais que perdem menor quantidade de energia na forma de calor e apresentem menor exigência para manutenção (CARSTENS et al., 1989; BISHOP et al., 1991).

### 3.4 Técnicas para mensurar a produção de calor animal

A estimativa da produção de calor pela técnica da câmara respirométrica baseia-se na avaliação das trocas gasosas ( $O_2$ ,  $CO_2$  e  $CH_4$ ) e a perda de N urinário. Mesmo sendo uma medida acurada e precisa, o uso da calorimetria indireta envolve a avaliação de animais enclausurados, não representando o ambiente real de produção e restringindo as atividades dos animais, o que pode alterar as exigências nutricionais de energia para manutenção e produção.

Liang et al. (1989) ao avaliarem a eficácia do método da máscara facial em bovinos reportaram que o método subestima a produção de calor. No entanto, a metodologia utilizada na pesquisa (LIANG et al., 1989), pode ter interferido no resultado, já que as mensurações foram realizadas em período muito curto de tempo (6 minutos /3 dias) e a produção de calor é originada de processos como o movimento do aparelho digestivo, o calor de fermentação e o incremento calórico associado à transformação dos nutrientes, temperatura corporal e outras atividades como o processo de circulação, respiração, locomoção e o custo energético para a renovação de tecidos (LAWRENCE e FOWLER, 1997).

Oss et al. (2016b) compararam a produção de calor de novilhos leiteiros recebendo diferentes níveis alimentares obtida por meio de abate comparativo, câmara respirométrica e método do pulso de oxigênio com base no consumo de oxigênio obtido por máscara facial. Os resultados de produção de calor foram comparáveis entre as técnicas e o método do pulso de oxigênio apresentou elevada acurácia, mas moderada precisão comparada aos métodos tradicionais.

O método da máscara fácil pode ser utilizado como alternativa de baixo custo em relação a câmara respirométrica e de simples manuseio para estimativas de curto duração para a determinação da produção de calor em ruminantes. Entretanto, são necessários mais estudos em diferentes condições experimentais, envolvendo distintos grupos genéticos, estádios fisiológicos e manejos alimentares a fim de que o método possa ser consolidado.

#### **4 ARTIGO CIENTÍFICO**

### **TÉCNICA DA MÁSCARA FACIAL PARA MENSURAÇÃO DA EMISSÃO DE METANO E DA PRODUÇÃO DE CALOR EM VACAS GIROLANDO NO TERÇO FINAL DA LACTAÇÃO\***

\*O artigo foi elaborado segundo as normas para submissão no periódico *Livestock Science*

1 **Técnica da máscara facial para mensuração da emissão de metano e da produção de**  
2 **calor em vacas Girolando no terço final da lactação**

3 Milane Ribeiro Santos<sup>(1)</sup>, Fernanda Samarini Machado<sup>(2)</sup>, Rebeca Ribeiro Silvi<sup>(1)</sup>,  
4 Alexandre Lima Ferreira<sup>(2,3)</sup>, Daniela Batista Oss<sup>(2)</sup>, Thierry Ribeiro Tomich<sup>(2)</sup>, Rogério  
5 Martins Maurício<sup>(3)</sup>, Mariana Magalhães Campos<sup>(2)</sup>, Alexandre Vieira Chaves<sup>(4)</sup> Luiz  
6 Gustavo Ribeiro Pereira<sup>(2)\*</sup>

7  
8 <sup>(1)</sup> Universidade Estadual de Santa Cruz, CEP 45662-900, Ilhéus, BA, Brasil.

9 <sup>(2)</sup> Embrapa Gado de Leite, Caixa Postal 610, CEP 36038-330, R. Eugênio do  
10 Nascimento, Juiz de Fora, MG, Brasil.

11 <sup>(3)</sup> Universidade Federal de São João Del Rei, CEP 36307-356, São João Del Rei, MG,  
12 Brasil.

13 <sup>(4)</sup> The University of Sydney, Faculty of Veterinary Science, School of Life and  
14 Environmental Sciences, Sydney, NSW, 2006, Australia

15

16 \*Autor correspondente: [luiz.gustavo@embrapa.br](mailto:luiz.gustavo@embrapa.br)

17

18 **RESUMO**

19

20 O objetivo do estudo foi comparar as técnicas da máscara facial e câmara respirométrica  
21 para mensurar a emissões de metano e estimar a produção de calor em vacas leiteiras  $\frac{3}{4}$   
22 Holandês x  $\frac{1}{4}$  Gir no terço final da lactação. Foram utilizadas 28 fêmeas leiteiras,  
23 agrupadas em lotes de multíparas (peso vivo inicial =  $575 \pm 40,1$  Kg) e primíparas (peso  
24 vivo inicial =  $538 \pm 112$  Kg) e designadas a dois níveis de alimentação: consumo *ad*  
25 *libitum* e restrito (dieta limitada para atender a 80% e 85% das energias líquidas totais  
26 para multíparas e primíparas, respectivamente). As vacas foram alimentadas com dieta  
27 constituída por 75% de silagem de milho e 25% de concentrado. A mensuração de  
28 metano e a avaliação da produção de calor foram realizadas aos 250 dias de lactação.  
29 Iniciou-se a avaliação pela técnica da máscara facial (30 minutos/dia), seguida pelas  
30 mensurações na câmara respirométrica (48 horas). As emissões de metano (g/dia ou g/kg  
31 por consumo de matéria seca) foram semelhantes entre técnicas, no entanto, houve  
32 diferença quando as emissões de metano foram estimadas em relação à produção de leite.

33 Houve diferença entre técnicas para produção de calor ( $P < 0,05$ ). Os coeficientes de  
34 correlação e concordância foram altamente concordantes (0,86) para emissão de metano  
35 expressa em g/dia, e moderados (0,57, 0,51, 0,79 e 0,79) para as emissões de metano  
36 expressas em g/kg por consumo de matéria seca, g/kg produção de leite, g/kg produção  
37 de leite corrigido para 4% de gordura e em g/kg produção de leite corrigido para energia.  
38 A técnica da máscara facial gera resultados comparáveis aos obtidos em câmara  
39 respirométrica para emissões de metano, entretanto, são necessários mais estudos para  
40 que o método da máscara facial possa ser utilizado para a estimativa da produção de  
41 calor.

42

43 **Palavra-chave:** bioenergética, câmara respirométrica, gases de efeito estufa, girolando,  
44 metano, produção de calor

45

## 46 INTRODUÇÃO

47

48 A busca por animais mais eficientes tem sido alvo de pesquisa em todo o mundo e  
49 pode contribuir para a melhoria dos indicadores econômicos e ambientais em sistemas de  
50 produção de leite. Os ruminantes contribuem com a emissão do gás metano ( $\text{CH}_4$ )  
51 oriundo da fermentação ruminal, um dos principais gases causadores do efeito estufa. Os  
52 ruminantes são responsáveis por aproximadamente um terço das emissões antropogênicas  
53 do  $\text{CH}_4$  (IPCC, 2006).

54 Diferentes métodos têm sido desenvolvidos e avaliados para a mensuração da  
55 emissão de  $\text{CH}_4$  e da produção de calor (Martin et al., 2010; Patra, 2012; Chaves et al.,  
56 2015; Oss et al., 2016a,b). As diferentes técnicas de quantificação apresentam vantagens  
57 e desvantagens para distintas condições de utilização.

58 O método que utiliza câmara respirométrica é considerado referência (*Golden*  
59 *standard*) para a avaliação da produção de  $\text{CH}_4$  e calor, apresenta baixa variabilidade  
60 entre as medições e contempla as emissões via eructação, flatulência e respiração. A  
61 produção de calor é calculada com base nas trocas gasosas (consumo de oxigênio e  
62 produção de  $\text{CO}_2$  e  $\text{CH}_4$ ) e perda de nitrogênio (N) na urina utilizando a fórmula de  
63 Brouwer (1965). Apesar das vantagens, a técnica da câmara respirométrica exige elevado

64 investimento para aquisição e manutenção dos equipamentos, além de não possibilitar  
65 avaliações no ambiente natural de produção (Johnson e Johnson, 1995).

66 Devido à crescente demanda por animais mais eficientes e rentáveis e à  
67 necessidade de mensurar CH<sub>4</sub> para possibilitar o desenvolvimento de estratégias de  
68 mitigação dos gases de efeito estufa, tem-se buscado métodos alternativos de avaliação  
69 que sejam de rápida execução (ex: coleta *spot*, baseado em medições de curta duração),  
70 capazes de estimar as emissões de CH<sub>4</sub> e produção de calor com acurácia, precisão e  
71 baixo custo (Brosh et al., 1998; Hegarty, 2013; Zimmermam et al., 2013; Oss et al.,  
72 2016a).

73 A técnica da máscara facial, baseada em medição de curta duração (coleta *spot*),  
74 foi recentemente avaliada como método alternativo às técnicas convencionais (câmara  
75 respirométrica e gás traçador SF<sub>6</sub>) e foi considerada mais simples e de menor custo de  
76 mensuração da CH<sub>4</sub> (Oss et al., 2016a). O fundamento da técnica da máscara facial é  
77 semelhante ao da câmara respirométrica, uma vez que são avaliadas as concentrações de  
78 O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> no ar que chega e no ar que sai da máscara facial, e o fluxo do ar (L/min)  
79 que passa pela máscara, mas em curto período de mensuração (30 minutos), fazendo-se  
80 uma extrapolação para o período de 24hs.

81 Na literatura as informações sobre a utilização da máscara facial para mensurar a  
82 emissão de metano e produção de calor em vacas leiteiras são escassas. Assim, o objetivo  
83 desse estudo foi comparar a técnica de máscara facial com a técnica da câmara  
84 respirométrica para avaliação da emissão de CH<sub>4</sub> entérico e produção de calor em vacas  
85 leiteiras Girolando (¾ Holandês × ¼ Gir) no terço final da lactação, alimentadas com  
86 dois níveis de alimentação (*ad libitum* e restrito).

87

## 88 MATERIAL E MÉTODOS

89

90 O estudo foi realizado entre os meses de maio a novembro de 2015 no Complexo  
91 Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade da Pecuária da Empresa Brasileira de  
92 Pesquisa Agropecuária (Embrapa), em Coronel Pacheco-MG. Todos os procedimentos  
93 com animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa  
94 Gado de Leite (Protocolo CEUA – EGL n° 23/2014).

95



96 *Animais e Dietas*

97  
98 Foram utilizadas 28 vacas mestiças ( $\frac{3}{4}$  Holandês  $\times$   $\frac{1}{4}$  Gir) no terço final da  
99 lactação (200 dias em lactação em média no início do experimento), com peso vivo  
100 inicial (PVI =  $557 \pm 82,5$  kg), sendo 14 multíparas (PVI =  $575 \pm 40,1$  Kg) e 14  
101 primíparas (PVI =  $538 \pm 112$  kg). As vacas de diferentes ordens de parição foram divididas  
102 em dois grupos que consistiram em dois níveis de alimentação: *ad libitum* (6 primíparas e  
103 8 multíparas) com ajuste para 10% sobras e restrito (8 primíparas e 6 multíparas) com  
104 dieta limitada para atender a 80% e 85% das energias líquidas totais para multíparas e  
105 primíparas, respectivamente. O ajuste do fornecimento da dieta para as vacas em  
106 consumo *ad libitum* foi regulada de acordo com o incremento de consumo individual de  
107 cada animal, de forma a manter as sobras com no mínimo 10% do alimento oferecido, já  
108 para as vacas em restrição alimentar foi realizado semanalmente o ajuste tendo como  
109 base a matéria seca da silagem.

110 As vacas foram alojadas em galpão tipo *free-stall* equipados com cochos  
111 automáticos e sistemas de coletas de dados da Intergado para o monitoramento do  
112 consumo (Intergado Ltd., Contagem, Minas Gerais, Brazil), camas de borracha  
113 individuais (Kraiburg /modelo *WINGFLEX*) e bebedouros coletivos, permitindo livre  
114 acesso à água. As vacas foram ordenhadas duas vezes ao dia (7:30 h e 13:30 h) em  
115 ordenhadeira mecanizada tipo espinha de peixe (4x4) de circuito fechado com linha  
116 centralizada e os dados de produção de leite foram obtidos pelo software Alpro (DeLaval,  
117 Tumba, Suécia). Durante o período de avaliações com a máscara e câmara  
118 respirométrica, as vacas foram transferidas para galpão de metabolismo em sistema do  
119 tipo *tie stall* com cochos e bebedouros individuais, localizado próximo ao galpão em que  
120 seriam avaliadas as referidas técnicas.

121 A dieta foi formulada conforme as recomendações do NRC (2001) para vacas com  
122 produção de 20 kg/dia de leite e constituída por silagem de milho e concentrado (744:  
123 256 g/Kg de MS), fornecida em forma de dieta total duas vezes ao dia (08:00 h e 14:00  
124 h). A composição do concentrado e da dieta encontra-se na tabela 1. Amostras  
125 representativas de concentrado, silagem, dieta total oferecida e sobras (individualmente  
126 para cada animal) foram recolhidas em três dias consecutivos, e armazenadas em freezer

127 a -20°C para, ao final do período, formarem uma amostra composta para a realização da  
128 análise química bromatológica (Tabela 2).

129 As amostras foram analisadas quanto ao teor de matéria seca (MS) (INCT-CA G-  
130 003/1); matéria mineral (MM) (INCT-CA M-001/1); proteína bruta (PB) (INCT-CA N-  
131 001/1); extrato etéreo (EE) (INCT-CA G-004/1); fibra em detergente neutro (FDN)  
132 (INCT-CA F-002/1) corrigido para cinzas (INCT-CA M-002/1) e proteína (INCT-CA  
133 N-004/1), obtendo-se a FDN<sub>cp</sub>, conforme Detmann et al. (2012).

134 A dieta fornecida e as sobras foram pesadas diariamente para determinação do  
135 consumo de matéria seca (CMS). A produção de leite total foi mensurada diariamente  
136 (manhã e tarde), e corrigida para gordura e energia.

137 A determinação da produção de leite corrigida para energia (*energy-corrected*  
138 *milk*, ECM) foi realizada de acordo a equação de Tyrrell e Reid (1965):

139

$$\text{ECM} \left( \frac{\text{kg}}{\text{dia}} \right) = \frac{\text{PL} \times (376 \times \text{gordura} + 209 \times \text{proteína} + 948)}{3138}$$

140

141 Já a produção de leite corrigida para 4% de gordura (PLCG4%) foi calculada  
142 utilizando a fórmula de Sklan et al. (1992):

143

$$\text{PLCG 4\%} = [(0,432 + 0,163 \times \% \text{ gordura no leite}) \times \text{produção de leite}]$$

144

145 Anteriormente às mensurações de CH<sub>4</sub> e produção de calor, foi realizado o ensaio  
146 de digestibilidade por coleta total de fezes (5 dias) e urina por 48 h utilizando-se sondas  
147 do tipo Folley n° 24 de duas vias, com balão de 30 a 50 ml, adaptadas na sua extremidade  
148 livre por mangueiras de polietileno pela qual a urina era conduzida até recipientes  
149 plásticos vedados com capacidade para 20L, imersos em caixas de poliestileno expandido  
150 (EPS) contendo gelo.

151 As coletas das amostras de urina foram realizadas duas vezes ao dia (às 11:00 h e  
152 às 18:00 h) para cálculo do volume e amostragem. Posteriormente, alíquotas de 50 ml *in*  
153 *natura*, armazenadas em potes plásticos, foram utilizadas para a determinação dos teores  
154 de nitrogênio.

155 As avaliações das emissões de CH<sub>4</sub> e a produção de calor pelos dois métodos  
156 foram realizadas quando os animais apresentavam aproximadamente 250 dias de  
157 lactação, primeiramente utilizando a máscara facial e, subsequentemente, as câmaras  
158 respirométricas em intervalos máximos de 3 dias.

159 As variáveis analisadas foram: peso vivo (PV), CMS (g/kg dia), produção de leite  
160 (kg/dia), produção de leite corrigido para 4% de gordura (PLc4%) e produção de leite  
161 corrigido para energia (PLce), emissões de metano em g/dia (CH<sub>4</sub> g/dia), emissões de  
162 metano expressas em g/kg de CMS consumida (CH<sub>4</sub>/CMS), emissões de metano  
163 expressas em g/kg de leite produzido (CH<sub>4</sub>/PL), emissões de metano expressas em g/kg  
164 de leite corrigido para 4% de gordura (CH<sub>4</sub>/PLc4%) e para energia (CH<sub>4</sub>/Plce) e produção  
165 de calor (kcal/PV<sup>0.75</sup>).

166

167 *Mensuração de CH<sub>4</sub> entérico e produção de calor utilizando a técnica da câmara*  
168 *respirométrica*

169

170 Foram utilizadas quatro câmaras respirométricas de circuito aberto conforme as  
171 especificações e procedimentos descritos por Machado et al. (2016). As vacas foram  
172 alojadas individualmente dentro das câmaras após a primeira ordenha do dia. Após 20  
173 min do fechamento das portas das câmaras, os cochos eletrônicos (Intergado Ltda.,  
174 Contagem, Brasil) foram automaticamente liberados (portas de acesso destravadas) para  
175 que as vacas iniciassem o consumo e então deu-se início as medições que foram  
176 interrompidas durante aproximadamente 30 min para a ordenha e fornecimento da dieta  
177 da tarde. A mensuração foi realizada por 2 períodos consecutivos de ~22 h. Extrapolou-se  
178 a produção no período em questão para 24 h. O consumo de matéria seca foi mensurado  
179 durante as avaliações nas câmaras respirométricas conforme procedimento descrito para  
180 os animais mantidos no *free stall*.

181 A emissão de CH<sub>4</sub> entérico pelas vacas foi calculada pelas diferenças das  
182 concentrações gasosas (VCH<sub>4</sub>) no ar de entrada (ar externo) e saída das câmaras e pelo  
183 fluxo de ar utilizado, conforme descrito por Machado et al. (2016) usando a equação  
184 proposta por Lighton (2008):

185

$$VCH_4 = FR \times \frac{[(FeCH_4 - FiCH_4) + FiCH_4 \times (FiO_2) + FiCH_4 \times (FeCO_2)]}{(1 + FiCH_4)}$$

186 Em que: FR = taxa de fluxo; Fe = concentração de saída; Fi = concentração de  
187 entrada.

188 Os volumes (L/dia) de O<sub>2</sub> consumido, CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> produzidos e o nitrogênio  
189 urinário excretado (Nu, g/dia) foram utilizados para calcular a produção de calor diária  
190 (PC, Kcal/dia) conforme Brouwer (1965):

191

$$PC \text{ (Kcal/dia)} = (3,866 \times O_2) + (1,200 \times CO_2) - (0,518 \times CH_4) - (1,431 \times Nu)$$

192

### 193 *Mensurações com a técnica da máscara facial*

194

195 As produções de metano com a máscara facial foram obtidas em períodos de 30  
196 minutos de mensuração por dia, realizadas quatro horas após a alimentação, durante 2  
197 dias consecutivos. Foram avaliados três animais ao dia, seguindo a sequencia do horário  
198 de fornecimento da dieta, iniciado às 9:00 h para o primeiro animal e, intervalado em 30  
199 min entre um animal e outro, para permitir intervalos semelhantes entre o arraçoamento e  
200 as mensurações individuais dos animais.

201

202 A máscara era constituída de um galão de polietileno com volume interno de 10L,  
203 dotado de uma abertura com 30 cm de diâmetro acoplado a uma câmara de ar, a qual era  
204 inflada para permitir o ajuste ao focinho do animal e impedir a entrada ou saída de ar do  
205 interior da máscara por essa abertura. O galão de polietileno era dotado de quatro  
206 válvulas respirométricas (Non-Rebreathing Valve; Era® Mask; Melbourne; Austrália)  
207 que permitia a entrada de ar, mas não a saída, e uma mangueira plástica de PVC  
208 espiralada flexível que conduzia o ar expirado até os equipamentos analisadores de O<sub>2</sub>,  
CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>.

209

210 Um fluxômetro de massa (Flow Kit 500H; Sable Systems, Henderson, NV, USA)  
211 foi acoplado à tubulação da máscara facial e o fluxo de ar foi ajustado para 0,3 L/min/Kg  
212 de peso vivo, a fim de para manter a concentração de CO<sub>2</sub> do ar proveniente da máscara  
213 inferior a 2%. As concentrações de O<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> foram determinadas pelo sistema Sable  
214 (Sable Systems International, Las Vegas, NV, USA). O cálculo das taxas de consumo  
(L/min) de O<sub>2</sub> (VO<sub>2</sub>) e de produção de CO<sub>2</sub> (VCO<sub>2</sub>) e CH<sub>4</sub> (VCH<sub>4</sub>) foi realizado como

215 descrito por Machado et al. (2016) e os volumes diários (L/dia) foram calculados  
216 multiplicando-se  $VO_2$ ,  $VCO_2$  e  $VCH_4$  por 1440. A produção de calor foi calculada pela  
217 equação de Brouwer (1965) usando os valores de trocas gasosas obtidos pela máscara  
218 facial e Nu do ensaio de metabolismo.

### 219 *Procedimentos Estatísticos*

220

221 Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial  $2 \times 2 \times 2$   
222 (ordens de lactação  $\times$  níveis de alimentação  $\times$  técnicas) e utilizou-se o programa  
223 MINITAB 17 (Minitab Software, 2010) para realizar a análise de variância (ANOVA). O  
224 nível de alimentação, ordem de lactação e técnica foram considerados efeitos fixos e  
225 animais como efeito aleatório. O nível de significância determinado foi  $P \leq 0,05$ .  
226 Variáveis que não apresentaram normalidade sofreram transformação de Box-Cox ( $\lambda =$   
227  $0,5$  ou  $\lambda = 0$ ). Quando houve efeito significativo ( $P \leq 0,05$ ) para os fatores ou interações  
228 utilizou-se o teste de Tukey para comparação das médias.

229 Os valores observados nas técnicas (máscara facial e câmara respirométrica) foram  
230 analisados quanto à precisão e acurácia utilizando análise de regressão linear dos valores  
231 observados (câmara respirométrica) e preditos (máscara facial), testes t para identificar a  
232 significância dos parâmetros ( $H_0$ : intercepto = 0 e coeficiente de angular = 1; Neter et al.,  
233 1996), coeficientes de determinação ( $r^2$ ), coeficientes de correlação de concordância  
234 (CCC; Lin, 1989), fator de correção do viés (Cb, Liao, 2003), o erro quadrático médio da  
235 predição (MSEP) e sua decomposição em erro associado à média, erro sistemático e erro  
236 aleatório foram obtidos por intermédio do programa *Model Evaluation System* (MES;  
237 Tedeschi, 2006).

238 Com base nos valores do desvio padrão da média foi realizada análise de poder  
239 para determinar o tamanho da amostra necessária para detectar diferenças ( $P < 0,05$ ) entre  
240 tratamentos em experimentos com máscara facial e câmaras respirométricas para  
241 avaliação da emissão de metano entérico ( $CH_4$ /kg de CMS) com máximas diferenças  
242 entre médias de 1, 1,5, 2,0 ou 2,5  $CH_4$ /CMS, e produção de calor com máximas  
243 diferenças entre médias de 10, 15, 20 ou 25 Kcal/PV<sup>0,75</sup>, considerando apenas animais do  
244 tratamento *ad libitum*

245

## RESULTADOS

246

247

248 *Emissão de CH<sub>4</sub> e produção de calor obtidas pelas técnicas da máscara facial e da*  
249 *câmara respirométrica*

250

251

252

253

254

255

256

257

Entre as técnicas, o PV dos animais e o CMS diferiram ( $P < 0,05$ ), porém não foram observadas diferenças para produção de leite (kg/d, PLc4% e PLce) (Tabela 3). Para essas variáveis, houve diferenças entre os níveis de alimentação (NA) com vacas produzindo menor quantidade de leite quando alimentadas de forma restrita. Não houve efeito ( $P > 0,05$ ) de ordem de lactação para nenhuma das variáveis avaliadas. Foi observada interação entre técnicas e nível de alimentação (NA) para CMS, emissão de CH<sub>4</sub> e produção de calor.

258

259

260

261

262

263

264

265

266

267

268

269

270

Houve interação entre técnicas e NA para as variáveis CMS, emissões de CH<sub>4</sub> (g/dia; g/kg CMS; g/kg PL, g/kg PLc4%, g/kg PLce) e produção de calor (Tabela 4). O efeito do NA para as emissões de CH<sub>4</sub> (g/dia e g/kg CMS), com vacas alimentadas *ad libitum* apresentaram maiores emissões de CH<sub>4</sub> (g/dia), porém menores emissões foram verificadas quando esses valores foram expressos em g/kg de CMS. Quando expressas em relação à produção de leite (PL, PLc4%, PLce), as emissões foram maiores para a máscara facial em relação à câmara respirométrica nos dois níveis de alimentação (*ad libitum* e restrito) e os maiores valores foram obtidos para os animais submetidos a dieta em restrição. A produção de calor diferiu entre as técnicas e foi menor (restritas: 168; *ad libitum*: 204) quando mensurada utilizando a câmara respirométrica. Também foi observada diferenças para produção de calor entre NA, com vacas alimentadas *ad libitum* produzindo mais calor (206 kcal/PV<sup>0,75</sup>) do que as de consumo em restrição (183 kcal/PV<sup>0,75</sup>) na técnica da máscara facial.

271

272

273

274

275

276

277

Somente para a produção de calor houve interação entre técnica e OL ( $P = 0,017$ ). O CMS foi 8,3% maior quando as vacas alimentadas *ad libitum* foram avaliadas utilizando a máscara facial comparado à câmara respirométrica (16,8 vs. 15,51 kg/dia). A emissão de CH<sub>4</sub> (g/dia) não diferiu entre as técnicas para animais em consumo *ad libitum*, entretanto, para animais em restrição, observou-se maior valor para mensuração utilizando a máscara facial quando comparado à câmara respirométrica (239 vs. 218 g/dia). Quando o CH<sub>4</sub> foi expresso em g/kg MS os valores para a máscara foram maiores

278 em relação ao da câmara para o grupo restrito (25,87 vs. 23,50 g/kg MS) e menores para  
279 animais que receberam dieta *ad libitum* (19,93 vs. 22,66 g/kg CMS).

280 Para as emissões de CH<sub>4</sub> ajustadas para produção de leite, diferenças entre técnicas  
281 foram observadas para o NA restrito (tabela 4). A produção de calor obtida pelas duas  
282 técnicas diferiu apenas para o grupo que recebeu dieta restrita e foi maior quando  
283 utilizada a máscara facial (183,0 vs. 168,0 kcal/PV<sup>0,75</sup>).

284

#### 285 *Variabilidade e análise de poder da técnica da máscara facial e câmara respirométrica*

286

287 O desvio padrão observado para a técnica da máscara facial ( $\sigma = 2,39$  g/kg MS)  
288 para a variável CH<sub>4</sub>, foi inferior ao encontrado para a câmara respirométrica ( $\sigma = 2,67$   
289 g/kg MS). Consequentemente, o n amostral requerido pela técnica câmara respirométrica  
290 para se detectar diferenças entre dois tratamentos na emissão de metano da ordem de 1 a  
291 3 g/kg de MS foram maiores em relação a máscara facial (Tabela 5). Contrariamente aos  
292 resultados obtidos para emissão de metano, a máscara facial apresentou um maior desvio  
293 padrão ( $\sigma = 16,74$ ) para a variável produção de calor (kcal/PV<sup>0,75</sup>), necessitando de maior  
294 quantidade de animais experimentais para se detectar diferenças entre dois tratamentos  
295 distintos (Tabela 6).

296

#### 297 *Análise de regressão*

298

299 A análise de regressão realizada indicou que o intercepto não diferiu de zero (H<sub>0</sub>:  
300 intercepto = 0) para as variáveis: CH<sub>4</sub>/CMS (P = 0,520), CH<sub>4</sub>/PL (P = 0,855), CH<sub>4</sub>/PLc4%  
301 (P = 0,208) e CH<sub>4</sub>/PLce (P = 0,155). O intercepto diferiu de zero apenas para emissões de  
302 CH<sub>4</sub>, (g/dia; P = 0,0013). Os interceptos das regressões apresentaram os respectivos  
303 valores e desvios padrão:  $80,65 \pm 22,453$ ,  $3,37 \pm 5,18$ ,  $-0,542 \pm 2,936$ ,  $-3,714 \pm 2,875$  e -  
304  $3,894 \pm 2,655$  (média  $\pm$  EP) para CH<sub>4</sub> (g/dia), CH<sub>4</sub>/CMS, CH<sub>4</sub>/PL, CH<sub>4</sub>/PLc4% e  
305 CH<sub>4</sub>/PLce (Tabela 7).

306 Para as variáveis emissões de CH<sub>4</sub> (g/dia; P = 0,002), CH<sub>4</sub>/PL (P = 0,027),  
307 CH<sub>4</sub>/PLc4% (P = 0,033) e CH<sub>4</sub>/PLce (P = 0,026), o coeficiente angular não diferiu de 1  
308 (H<sub>0</sub>: coeficiente angular = 1). Os valores dos coeficientes angulares obtidos da regressão

309 linear foram  $0,729 \pm 0,077$  para emissões de  $\text{CH}_4$ , g/dia,  $0,84 \pm 0,22$  para  $\text{CH}_4/\text{CMS}$   $1,39$   
 310  $\pm 0,136$  para  $\text{CH}_4/\text{PL}$ ,  $1,31 \pm 0,136$  para  $\text{CH}_4/\text{PLc4\%}$  e  $1,32 \pm 0,135$  para  $\text{CH}_4/\text{PLce}$ .

311 Os  $r^2$  para as emissões de  $\text{CH}_4$  expressas em g/dia, g/kg CMS ( $\text{CH}_4/\text{CMS}$ ), g/kg PL  
 312 ( $\text{CH}_4/\text{PL}$ ), g/kg PLc4% ( $\text{CH}_4/\text{PLc4\%}$ ) e g/kg PLce ( $\text{CH}_4/\text{PLce}$ ) foram de 0,77, 0,36, 0,74,  
 313 0,79 e 0,79 respectivamente. Os valores de CCC observados no presente estudo foram de  
 314 0,86, 0,57, 0,51, 0,79 e 0,79 para  $\text{CH}_4$ , g/dia,  $\text{CH}_4/\text{CMS}$ ,  $\text{CH}_4/\text{PL}$ ,  $\text{CH}_4/\text{PLc4\%}$  e  
 315  $\text{CH}_4/\text{PLce}$ , respectivamente. Os valores de Cb foram de 0,97, 0,92, 0,57, 0,84 e 0,84 para  
 316 as emissões de  $\text{CH}_4$ , g/dia,  $\text{CH}_4/\text{CMS}$ ,  $\text{CH}_4/\text{PL}$ ,  $\text{CH}_4/\text{PLc4\%}$  e  $\text{CH}_4/\text{PLce}$ ,  
 317 respectivamente. As decomposições do erro quadrático médio da predição (MSEP)  
 318 indicaram que a maior parte do erro associado às análises foi decorrente de erros  
 319 aleatórios: 66,8% para  $\text{CH}_4$ (g/dia), 96,9% para  $\text{CH}_4$  (g/kg CMS), 25,5% para  $\text{CH}_4/\text{PL}$   
 320 (g/kg Leite), 65,8% para  $\text{CH}_4/\text{PLc4\%}$  e 65,1 % para  $\text{CH}_4/\text{PLce}$ .

321 Para produção de calor o intercepto diferiu de zero ( $P = 0,049$ ) e foi de  $56,89 \pm$   
 322  $27,6$  enquanto o coeficiente angular observado foi de  $0,749 \pm 0,148$  e não diferiu de 1.  
 323 Para a produção de calor, o valor de Cb foi 0,92, enquanto o CCC foi de 0,64. A  
 324 porcentagem do MSEP devido ao erro aleatório foi de 65,25%.

325

326

327

## DISCUSSÃO

328

329 *Emissão de  $\text{CH}_4$  e produção de calor obtidos pelas técnicas da máscara facial e da*  
 330 *câmara respirométrica*

331

332 As diferenças entre as técnicas no PV dos animais de 1,62% ( $P < 0,05$ ) ocorreram  
 333 provavelmente por alterações fisiológicas durante o intervalo entre as avaliações da  
 334 máscara e câmara respirométrica, já que não é possível realizar as avaliações  
 335 simultaneamente. O NA *ad libitum* conferiu peso 13,17% superior ( $P < 0,05$ ) ao das vacas  
 336 sob restrição alimentar. O CMS distinto observado entre as técnicas para os animais do  
 337 tratamento *ad libitum* pode ser explicado pelas modificações na rotina de manejo durante  
 338 a avaliação pelas duas técnicas, uma vez que alguns animais alocados nas câmaras  
 339 deixaram maiores quantidades de sobras comparado quando situados no *tie stall*. Para os  
 340 animais em restrição alimentar, por consumirem rapidamente toda a ração e esta ser



341 fornecida em quantidade determinada, não houve influencia da técnica no consumo  
342 ( $P > 0,05$ ).

343 Considerando a câmara respirométrica como padrão, quando a emissão de  $\text{CH}_4$  é  
344 expressa em unidades de intensidade de emissão (g/kg CMS, g/kg PL, g/Kg PLc4% e  
345 g/PLce), evidenciou-se que o método da máscara gera resultados diferentes,  
346 principalmente para animais submetidos à alimentação restrita. Além disso, a  
347 diferenciação entre os NA foi distinta, uma vez que a emissão em g/kg CMS foi  
348 semelhante entre animais em alimentação restrita e *ad libitum* para a câmara  
349 respirométrica (22,66 vs. 23,50), mas diferente para a máscara facial (25,87 vs. 19,93).  
350 Os parâmetros de intensidade de emissão que envolvem produção de leite, além de  
351 computarem as variações inerentes aos distintos CMS entre dias de avaliação,  
352 contemplam as variações na produção de leite aumentando ainda mais a diferença entre  
353 os resultados obtidos pelas duas técnicas para os animais sob restrição alimentar. A  
354 variação na composição do leite entre os dias de avaliação pode ter contribuído para gerar  
355 valores distintos entre os métodos, já que os teores de gordura e sólidos influenciam os  
356 valores de leite corrigido para gordura e energia, e consequentemente as emissões de  $\text{CH}_4$   
357 por kg de leite produzido.

358 A produção de calor mensurada utilizando a técnica da máscara facial apresentou  
359 um valor superior (4,84%) aos resultados obtidos pela técnica da câmara respirométrica.  
360 Para o tratamento *ad libitum* não houve diferença entre as técnicas, já para o tratamento  
361 restrito, a máscara facial apresentou um valor superior (8,19%) à câmara respirométrica.  
362 Durante a avaliação dos animais com a máscara facial, o horário de mensuração foi  
363 padronizado para 4h após a alimentação, horário em que os animais apresentavam valores  
364 de consumo de  $\text{O}_2$  mais elevados que a média do valor obtido em 24 hs na câmara  
365 respirométrica. A técnica da máscara facial permitiu a detecção de diferença na produção  
366 de calor entre os tratamentos *ad libitum* e restrito (23 kcal/PV<sup>0,75</sup> entre os NA) de forma  
367 semelhante a câmara respirométrica (183 vs 216 e 168 vs 204 kcal/PV<sup>0,75</sup>).

368

369 *Variabilidade e análise de poder da técnica da máscara facial e câmara respirométrica*

370

371 O menor valor do desvio padrão encontrado para a técnica da máscara facial pode  
372 ser explicado pelo fato de que os animais submetidos à máscara eram mantidos no *tie*

373 *stall*, seguindo o manejo de rotina, com menor variação no CMS e conseqüentemente, na  
374 emissão de CH<sub>4</sub>. Em contrapartida, nas câmaras respirométricas ocorre modificação da  
375 rotina de manejo e alteração do comportamento alimentar na câmara de forma distinta  
376 entre os animais, implicando em variações no CMS e produção de CH<sub>4</sub>. Assim pode ser  
377 explicado a demanda de maior número de animais para a detecção de diferenças  
378 estatísticas quando se utiliza a câmara respirométrica em relação a máscara facial para  
379 mensurar a emissão de CH<sub>4</sub>.

380 Para produção de calor, o maior valor do desvio padrão encontrado para a técnica  
381 da máscara facial pode ser explicado pelo fato das câmaras respirométricas serem  
382 climatizadas, permitindo o condicionamento de temperatura e umidade em condições  
383 termoneutras. Contrário a essas condições, os animais submetidos à técnica da máscara  
384 facial ficaram expostos a influencia das variações ambientais, uma vez que as  
385 mensurações foram realizadas em galpão não climatizado, podendo esses fatores terem  
386 interferido na produção de calor, visto que a temperatura e umidade relativa do ar  
387 elevadas dificultam a dissipação de calor por evaporação, além de interferirem na  
388 frequência cardíaca e respiratória, que estão diretamente relacionadas as trocas gasosas.  
389 Assim quando se utiliza o método da máscara facial, são necessários mais animais  
390 (repetições) para detectar diferenças na produção de calor do que quando as avaliações  
391 são realizadas com câmaras respirométricas.

392

### 393 *Análise de regressão*

394

395 Como o intercepto não diferiu de zero (H<sub>0</sub>: intercepto = 0) e o coeficiente angular  
396 não diferiu de um (H<sub>0</sub>: coeficiente angular = 1) para as variáveis CH<sub>4</sub>/PL, CH<sub>4</sub>/PLc4% e  
397 CH<sub>4</sub>/PLce a técnica da máscara facial apresenta precisão para mensuração. Já para as  
398 emissões de CH<sub>4</sub> em g/dia e a produção de calor o intercepto foi diferente de zero, e para  
399 o CH<sub>4</sub> em g/kg CMS o coeficiente angular foi diferente de um (P = 0,477) indicando  
400 baixa precisão da máscara para avaliar essas variáveis. Os valores gerados pela técnica da  
401 máscara facial foram subestimados em relação às variáveis: emissão de CH<sub>4</sub> g/dia,  
402 CH<sub>4</sub>/PL, /PLc4%, /PLce e produção de calor, exceto para as emissões de CH<sub>4</sub> expressas  
403 em g/Kg CMS.

404 As técnicas de mensurações das emissões de CH<sub>4</sub> com base em medidas de curta  
405 duração, ainda estão mal definidas quanto à precisão e acurácia (Cottle et al., 2015). A  
406 precisão é uma medida de dispersão entre os valores preditos e observados, ou  
407 seja, indica como a técnica da máscara facial se comporta em termos da ocorrência de  
408 erros aleatórios (RE) produzindo resultados homogêneos. Já a acurácia é a diferença entre  
409 o valor predito pelo indicador e o valor observado, ou seja, à capacidade de um método  
410 produzir resultados o mais próximo possível do valor real.

411 Com objetivo de avaliar a precisão e acurácia simultaneamente foi utilizado o  
412 CCC (Lin, 1989). Para as emissões de CH<sub>4</sub> expressas em g/dia, foi observado elevado  
413 CCC (0.86), indicando alta acurácia e precisão da técnica da máscara facial. Esse  
414 resultado concordante pode sugerir a possibilidade de utilizar a máscara facial, com base  
415 em mensurações de curta duração, para estimar a emissão de CH<sub>4</sub> para vacas. Para  
416 demais variáveis o CCC foi baixo (CH<sub>4</sub> g/kg CMS, CH<sub>4</sub> g/kg PL) ou moderado (CH<sub>4</sub>  
417 g/kg PLc4%, g/kg PLce e produção de calor). Oss et al. (2016a) também observaram  
418 CCC elevado (0,82) para emissões de CH<sub>4</sub> (g/dia) obtidos pela técnica da máscara facial  
419 comparada à câmara respirométrica. Em trabalho anterior, o CCC entre as técnicas SF<sub>6</sub> vs  
420 câmara respirométrica para estimativa de CH<sub>4</sub> (g/dia) foi de 0,79 e o método do gás  
421 traçador é um dos métodos mais utilizados para mensurar CH<sub>4</sub>, principalmente de  
422 animais em pastejo (McGINN et al., 2006).

423 A acuarácia também foi avaliada pelo viés médio (MB) que quanto mais próximo  
424 de zero, mais acurado é o método (Kohn et al., 1998). A técnica da máscara facial  
425 apresentou uma alta acuracia para as emissões de CH<sub>4</sub> (g/CMS) e uma baixa acurácia  
426 para avaliação da produção de calor.

427 O r<sup>2</sup> também é um indicador de precisão, e quanto maior, maior a precisão  
428 (Tedeschi, 2006). As estimativas encontradas nesse estudo foram consideradas  
429 moderadas para as emissões de CH<sub>4</sub> em g/dia e CH<sub>4</sub> por produção de leite (kg/dia,  
430 PLc4%, PLce) e baixas para emissão de CH<sub>4</sub> (g/kg CMS) e produção de calor.

431 O erro quadrático médio de predição (MSEP) é provavelmente o indicador mais  
432 comum e confiável para medir a precisão preditiva de um modelo. Quanto menor o  
433 MSEP melhor a técnica avaliada. A técnica da máscara facial fez uma melhor predição

434 para as emissões de CH<sub>4</sub> expresso em g/CMS, já para as variáveis CH<sub>4</sub> (g/dia) e produção  
435 de calor os valores de MSEP foram mais elevados, indicando menor precisão preditiva.

436 O viés médio (MB) indica superestimativa da falta de precisão, ou seja, super-  
437 estimativa da raiz quadrada média do erro de predição, uma vez que a distância média  
438 entre o valor predito e o observado leva também ao aumento da variabilidade entre o  
439 predito e o observado. Com base no MB, a técnica da máscara facial apresentou baixa  
440 precisão para a produção de calor, e alta precisão para as emissões de CH<sub>4</sub> (g/CMS).

441 A precisão é mais bem avaliada quando o MSEP é corrigido para falta de acurácia,  
442 gerando assim o erro sistemático (SB), que é definido como o erro restante no modelo de  
443 predição, excluindo-se o erro devido ao MB (Kohn et al., 1998). Para as emissões de  
444 CH<sub>4</sub> (g/dia) foram observados valores elevados de SB e do RE, mostrando que os erros  
445 nas mensurações podem ter ocorridos por influências diversas (ambiente, técnica,  
446 animal), ou de forma imprevisível. Para as variáveis de emissão de CH<sub>4</sub> em relação à  
447 produção de leite, a máscara facial pode ser considerada uma técnica de moderada  
448 precisão. Para a produção de calor, a maioria dos erros foram aleatórios, ou seja, de  
449 variações inexplicadas, tornando a máscara facial pouco precisa para essa estimativa,  
450 exigindo ajustes para melhor controle e padronização das condições de manejo dos  
451 animais, adaptação e padronização da temperatura e umidade do ar durante as avaliações.  
452 Oss et al. (2016b) conseguiram melhores estimativas de produção de calor com a máscara  
453 facial quando levaram em consideração a frequência cardíaca para o cálculo do pulso de  
454 oxigênio, mesmo sem controlar as condições de temperatura e umidade do ambiente em  
455 que os animais foram avaliados. Os animais manifestam diferentes reações fisiológicas  
456 ao estresse de avaliação pela máscara, assim o pulso de O<sub>2</sub> (consumo de O<sub>2</sub>/BPM) pode  
457 minimizar essa variação, pois varia menos que o consumo de O<sub>2</sub>.

458 A técnica da máscara facial é simples, rápida, menos onerosa e apresenta potencial  
459 para estimar as emissões de CH<sub>4</sub> (g/dia) e em relação à produção de leite, podendo ser  
460 útil para a geração de dados em massa que possam ser utilizados para selecionar  
461 fenótipos qualificados para programas de melhoramento e também para a avaliação de  
462 estratégias de mitigação. Porém para estudos de metabolismo, ainda é necessário ajuste  
463 da técnica para a melhoria da acurácia e precisão para estimar a produção de calor com  
464 base em avaliações de curta duração. O controle da temperatura e umidade do ambiente

465 em que os animais estão sendo avaliados e o uso da frequência cardíaca para o cálculo do  
466 pulso de oxigênio podem ser fatores de melhoria para técnica da máscara facial.

467

468

469

470

## CONCLUSÃO

471

472

473

474

A técnica da máscara facial com base em menurações de curta duração permite a  
detecção de diferenças na emissão de CH<sub>4</sub> e produção de calor ocasionadas pela alteração  
do plano nutricional.

475

476

477

A técnica da máscara facial é precisa e acurada para estimar as emissões de CH<sub>4</sub>  
g/dia e em relação à produção de leite, mas apresenta limitações para estimativas de  
CH<sub>4</sub>/CMS e produção de calor em vacas Girolando no terço final da lactação.

478

479

480

Pesquisas relacionadas a ajustes e melhorias na metodologia podem contribuir  
para estimativas mais acuradas e precisas, minimizando erros relacionados a técnica da  
máscara facial para avaliações de curta duração.

481

482

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

483

484

485

486

487

Brosh, A., Aharoni, Y., Degen, A., Wright, D., Young, B.A. 1998. Estimation of energy  
expenditure from heart rate measurements in cattle maintained under different conditions.  
**J. Anim. Sci**, 76, 3054–3064.

488

489

490

Brouwer, E. 1965. Report of sub-committee on constants and factors. **Energy  
Metabolism of Farm Animals**, Academic Press, London, 11, 441–443

491

492

493

494

Cottle, D.J., Velazco, J., Hegarty, R.S. and Mayer, D.G. 2015. Estimating daily methane  
production in individual cattle with irregular feed intake patterns from short-term  
methane emission measurements. **Animal**, 9: 1949-1957.

495

496

497

498

499

Chaves, A.S., Nascimento, M.L., Tullio, R.R., Rosa, A.N., Alencar, M. M., & Lanna, D.  
P. 2015. Relationship of efficiency indices with performance, heart rate, oxygen  
consumption, blood parameters, and estimated heat production in Nellore steers. **J.  
Anim. Sci**, 93, 5036-5046.

500

501

502

503

Detmann, E., Souza, M., Valadares Filho, S.C., Queiroz, A., Berchielli, T., Saliba, E.,  
Azevedo, J. 2012. **Métodos para análise de alimentos-Instituto Nacional de Ciência e  
Tecnologia de Ciência Animal**. Visconde do Rio Branco. Suprema: Brazil.

504

- 505 Hegarty, R.S. 2013. Applicability of short-term emission measurements for on-farm  
506 quantification of enteric methane. **Animal**, 7, 401-408.
- 507
- 508 IPCC. 2006. Revised IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories. Chapter  
509 10, Vol. 4: **Agriculture, Forestry and Other Land Use**. Accessed Dez. 15, 2016.  
510 <http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/2006gl/vol4.htm>.
- 511
- 512 Johnson, K.A., Johnson, D.E. 1995. Methane emissions from cattle. **J. Anim. Sci**, 73,  
513 2483- 2492.
- 514
- 515 Liao, J.J.Z. 2003. An improved concordance correlation coefficient **Pharm Stat**, 2, 253-  
516 261.
- 517
- 518 Lighton, J. R. B. 2008. **Measuring Metabolic Rates: A Manual for Scientists**.  
519 Oxford University Press, Oxford, UK
- 520
- 521 Lin, L.I.-K. 1989. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility.  
522 **Biometrics**, 45, 255–268.
- 523
- 524 Kohn, R.A.; Kalscheur, K.F.; Hanigan, M. 1998. Evaluation of models for balancing the  
525 protein requirements of dairy cows. **J. Dairy Sci**, 81, 12, 3401-3414.
- 526
- 527 Machado, F.S., Tomich, T.R., Ferreira, A.L., Cavalcanti, L.F.L., Campos, M.M., Paiva,  
528 C.A.V., Ribas, M.N., e Pereira, L.G.R. 2016. Technical note: A facility for respiration  
529 measurements in cattle. **J. Dairy Sci**, 99, 4899-4906.
- 530
- 531 Martin, C., Morgavi, D.P. and Doreau, M. 2010. Methane mitigation in ruminants: from  
532 microbe to the farm scale. **Animal**, 4, 351-365.
- 533
- 534 McGinn, S.M., Beauchemin, K.A., Iwaasa, A.D., and McAllister, T.A. 2006. Assessment  
535 of the Sulfur Hexafluoride (SF<sub>6</sub>) Tracer Technique for Measuring Enteric Methane  
536 Emissions from Cattle. **J. Environ. Qual**, v.35, 1686-1691.
- 537
- 538 NRC. 2001. **Nutrients requirements of dairy cattle**. 7.ed. Washington, DC: National  
539 Academy Press. 381.
- 540
- 541 Neter, J., Kutner, M.H., Nachtsheim, C.J., Wasserman, W. 1996. **Applied linear**  
542 **statistical models**, 5th ed. McGraw-Hill, Boston.
- 543
- 544 Oss, D.B., Marcondes, M.I., Machado, F.S., Pereira, L.G.R., Tomich, T.R., Ribeiro Jr, G.  
545 O., Chizzotti, M.L., Ferreira, A.L., Campos, M.M., Mauricio, R.M., Chaves, A.V. e  
546 McAllister, T.A. 2016a. An evaluation of the face mask system based on short-term  
547 measurements compared with the sulfur hexafluoride (SF<sub>6</sub>) tracer, and respiration  
548 chamber techniques for measuring CH<sub>4</sub> emissions. **Anim. Feed Sci. Technol**, 216, 49-57.
- 549

- 550 Oss, D.B.; Marcondes, M.I. ; Machado, F.S. ; Tomich, T.R.; Chizzotti, M.L.; Campos,  
551 M. M. ; Pereira, L.G.R. 2016b. Technical note: Assessment of the oxygen pulse and heart  
552 rate method using respiration chambers and comparative slaughter for measuring heat  
553 production of cattle. **J. of Dairy Sci**, 99, 8885-8890.
- 554
- 555 Patra, A.K. 2012. Enteric methane mitigation technologies for ruminant livestock: a  
556 synthesis of current research and future directions. **Environ. Monit. Assess**, 184, 1929-  
557 1952.
- 558
- 559 Sklan, D.; Ashkenazi, R.; Braun, A.; Devorin, A.; Tabori, K. 1992. Fatty acids, calcium  
560 soaps of fatty acids, and cottonseeds fed to high yielding cows. **J. Dairy Sci**, 75, 2463-  
561 2472.
- 562
- 563 Tedeschi, L.O. 2006. Assessment of the adequacy of mathematical models. **Agric. Sys**,  
564 89, 225-247.
- 565
- 566 Tyrrell, H.F., Reid, J.T. 1965. Prediction of the Energy Value of Cow's Milk 1, 2. . **J.**  
567 **Dairy Sci**, 48, 1215-1223.
- 568
- 569 Zimmerman, S., Brito, A., Huhtanen, P., Johnson, K., Michal, J., Pereira, A., Pineras, C.,  
570 Utsumi, S., Waghorn, G., Zimmerman P. 2013. Measurement and evaluation of enteric  
571 CH<sub>4</sub> emissions and variability in production systems. **Adv. Anim. Biosci**, 4, 518.

572 Tabela 1. Composição do concentrado e da dieta experimental (g/kg MS)

| Ingrediente                 | Concentrado | Dieta |
|-----------------------------|-------------|-------|
| Silagem de milho            | -           | 743,7 |
| Farelo de soja              | 722,2       | 185,1 |
| Milho moído                 | 147,8       | 37,9  |
| Núcleo mineral <sup>a</sup> | 48,1        | 12,3  |
| Bicarbonato de sódio        | 39,5        | 10,1  |
| Ureia                       | 28,9        | 7,4   |
| Calcário                    | 9,2         | 2,4   |
| Fosfato bicálcio            | 4,3         | 1,1   |

573 <sup>a</sup> Lactage Gold. Composição: Ca: 150 g/kg; P: 60 g/kg; Mg: 15 g/kg; S: 17 g/kg; Na: 57 g/kg;  
 574 Fe: 1,5 g/kg; Cu: 1,3 g/kg; Zn 3,0 g/kg; Mn 1,3 g/kg; I: 0,1 g/kg; Co: 0,1 g/kg; Se: 0,03 g/kg; F:  
 575 0,6 g/kg; Vit. A 220.000 U.I. Vit. D3 60.000 U.I. Vit. E 1.000 U.I.

576

577 Tabela 2. Composição química dos ingredientes e da dieta experimental

| Item | Silagem      | Concentrado  | Dieta        |
|------|--------------|--------------|--------------|
| MS   | 27,62 ± 2,40 | 89,90 ± 1,32 | 43,58 ± 1,82 |
| MO   | 94,48 ± 0,55 | 85,38 ± 1,68 | 93,14 ± 0,62 |
| PB   | 8,35 ± 1,22  | 47,60 ± 1,61 | 18,41 ± 0,95 |
| EE   | 3,02 ± 0,56  | 1,78 ± 0,58  | 2,70 ± 0,48  |
| FDN  | 48,08 ± 4,38 | 16,41 ± 2,23 | 39,96 ± 3,07 |
| CNF  | 36,35 ± 4,55 | 34,67 ± 2,78 | 36,92 ± 3,20 |

578 MS= matéria seca, MO= matéria orgânica, PB= proteína bruta, EE= extrato etéreo, FDN= fibra  
 579 em detergente neutro e CNF= carboidratos não fibrosos.



580 Tabela 3. Comparação das emissões de metano (CH<sub>4</sub>) quanto aos níveis de alimentação, ordem de lactação e técnica em vacas  
 581 Girolando no terço final da lactação

| Item                                | Técnica        |                       | Níveis de alimentação |                   | Ordem de lactação |           | EPM  | P-valor |       |       |          |          |
|-------------------------------------|----------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|-----------|------|---------|-------|-------|----------|----------|
|                                     | Máscara facial | Câmara respirométrica | Restrito              | <i>Ad libitum</i> | Primípara         | Múltipara |      | Téc.    | NA    | OL    | Téc x NA | Téc x OL |
| PV <sup>1</sup>                     | 564,0          | 555,0                 | 521,0                 | 600,0             | 564,0             | 555,0     | 17,0 | 0,014   | <.001 | 0,362 | 0,076    | 0,352    |
| CMS <sup>2</sup>                    | 12,75          | 12,27                 | 9,34                  | 16,13             | 12,34             | 12,68     | 0,74 | 0,001   | <.001 | 0,436 | <.001    | 0,415    |
| PL <sup>3</sup>                     | 12,95          | 13,42                 | 10,22                 | 16,53             | 13,19             | 13,18     | 1,69 | 0,147   | <.001 | 0,998 | 0,668    | 0,300    |
| PLc4% <sup>4</sup>                  | 14,05          | 14,86                 | 10,99                 | 17,92             | 13,75             | 15,16     | 2,37 | 0,091   | <.001 | 0,362 | 0,311    | 0,133    |
| PLce <sup>5</sup>                   | 15,13          | 15,92                 | 11,68                 | 19,38             | 14,97             | 16,08     | 2,46 | 0,111   | <.001 | 0,485 | 0,313    | 0,178    |
| CH <sub>4</sub> , g/dia             | 283,0          | 279,0                 | 229,0                 | 340,0             | 283,0             | 280,0     | 22,1 | 0,374   | <.001 | 0,854 | <.001    | 0,097    |
| CH <sub>4</sub> /CMS <sup>6</sup>   | 22,90          | 23,08                 | 24,68                 | 21,30             | 23,35             | 22,63     | 1,95 | 0,633   | 0,001 | 0,570 | <.001    | 0,286    |
| CH <sub>4</sub> /PL <sup>7</sup>    | 22,77          | 20,92                 | 22,98                 | 20,73             | 21,84             | 21,84     | 3,13 | 0,003   | 0,293 | 0,997 | 0,001    | 0,790    |
| CH <sub>4</sub> /PLc4% <sup>8</sup> | 22,12          | 19,92                 | 22,77                 | 19,32             | 21,43             | 20,59     | 3,50 | 0,001   | 0,167 | 0,692 | 0,001    | 0,438    |
| CH <sub>4</sub> /PLce <sup>9</sup>  | 20,51          | 18,56                 | 21,26                 | 17,85             | 19,80             | 19,24     | 3,07 | 0,001   | 0,127 | 0,766 | <.001    | 0,524    |
| Produção de calor                   | 195,0          | 186,0                 | 175,0                 | 205,0             | 185,0             | 195,0     | 11,2 | <.001   | <.001 | 0,155 | 0,003    | 0,017    |

582 <sup>1</sup>Peso vivo (kg);

583 <sup>2</sup> Consumo de matéria seca por unidade de (kg/dia CMS);

584 <sup>3</sup> Produção de leite (g/kg PL);

585 <sup>4</sup> Produção de leite corrigido para 4% de gordura;

586 <sup>5</sup> Produção de leite corrigido para energia;

587 <sup>6</sup> Emissão diária de CH<sub>4</sub> (g/dia) por unidade de CMS (g/kg CMS);

588 <sup>7</sup> Emissão diária de CH<sub>4</sub> (g/dia) por unidade de produção de leite (g/kg PL);

589 <sup>8</sup> Emissão diária de CH<sub>4</sub> (g/dia) por unidade de produção de leite corrigido para 4% de gordura;

590 <sup>9</sup> Emissão diária de CH<sub>4</sub> (g/dia) por unidade de produção de leite corrigido para energia.

591

592 Tabela 4. Desdobramento das emissões de metano (CH<sub>4</sub>) e produção de calor mensuradas utilizando as técnicas da  
 593 máscara facial e da câmara respirométrica em vacas Girolando (¾ Holandês x ¼ Gir) no terço final da lactação  
 594 submetidas a diferentes níveis de alimentação

| Item                                | Restrito           |                       | <i>Ad libitum</i>  |                       | EPM  |
|-------------------------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|------|
|                                     | Máscara facial     | Câmara respirométrica | Máscara facial     | Câmara respirométrica |      |
| CMS <sup>1</sup>                    | 9,29c              | 9,40c                 | 16,76 <sup>a</sup> | 15,51b                | 0,74 |
| CH <sub>4</sub> , g/dia             | 239,0b             | 218,0c                | 332,0a             | 348,0a                | 22,1 |
| CH <sub>4</sub> /CMS <sup>2</sup>   | 25,87 <sup>a</sup> | 23,50b                | 19,93c             | 22,66b                | 1,95 |
| CH <sub>4</sub> /PL <sup>3</sup>    | 20,99b             | 25,06 <sup>a</sup>    | 20,60b             | 20,86b                | 3,13 |
| CH <sub>4</sub> /PLc4% <sup>4</sup> | 25,20 <sup>a</sup> | 20,46b                | 19,25b             | 19,39b                | 3,50 |
| CH <sub>4</sub> /Plce <sup>5</sup>  | 23,48 <sup>a</sup> | 19,16b                | 17,73b             | 17,97b                | 3,07 |
| Produção de calor                   | 183,0b             | 168,0c                | 206,0a             | 204,0a                | 11,2 |

595

596 <sup>1</sup>Consumo de matéria seca por unidade de (kg/dia CMS);

597 <sup>2</sup>Emissão diária de CH<sub>4</sub> (g/dia) por unidade de CMS (g/kg CMS); g/dia, CH<sub>4</sub>/PL, CH<sub>4</sub>/PLc4% e CH<sub>4</sub>/Plce<sup>5</sup>

598 <sup>3</sup>Emissão diária de CH<sub>4</sub> (g/dia) por unidade de produção de leite (g/kg PL);

599 <sup>4</sup>Emissão diária de CH<sub>4</sub> (g/dia) por unidade de produção de leite corrigido para 4% de gordura;

600 <sup>5</sup>Emissão diária de CH<sub>4</sub> (g/dia) por unidade de produção de leite corrigido para energia.

601

602

603

604

605

606 Tabela 5. O número de repetições (animais) necessário para detectar diferença  
 607 significativa a 5% de probabilidade entre dois tratamentos, com as máximas diferenças  
 608 entre médias de 1,5, 2, 2,5 ou 3 g CH<sub>4</sub>/CMS no rendimento das emissões de CH<sub>4</sub> (g/Kg  
 609 MS), com uma probabilidade de poder de 80% encontrado para máscara facial e câmara  
 610 respirométrica

| Diferença de tratamentos | Técnicas                    |                                    |
|--------------------------|-----------------------------|------------------------------------|
|                          | Máscara facial <sup>1</sup> | Câmara respirométrica <sup>2</sup> |
| 1,5                      | 41                          | 51                                 |
| 2,0                      | 24                          | 30                                 |
| 2,5                      | 16                          | 19                                 |
| 3,0                      | 12                          | 14                                 |

611 <sup>1</sup>DP entre animal *ad libitum*:  $\sigma = 2,394$

612 <sup>2</sup>DP entre animal *ad libitum*:  $\sigma = 2,673$

613

614

615

616

617

618

619

620

621

622

623

624

625 Tabela 6. O número de repetições (animais) necessário para detectar diferença  
 626 significativa a 5% de probabilidade entre dois tratamentos, com as máximas diferenças  
 627 entre médias de 10, 15, 20 ou 25 kcal/PV<sup>0,75</sup> no rendimento de produção de calor, com  
 628 uma probabilidade de poder de 80% encontrado para máscara facial e câmara  
 629 respirométrica

| Diferença de tratamentos | Técnicas                    |                                    |
|--------------------------|-----------------------------|------------------------------------|
|                          | Máscara facial <sup>1</sup> | Câmara respirométrica <sup>2</sup> |
| 10                       | 45                          | 30                                 |
| 15                       | 21                          | 14                                 |
| 20                       | 13                          | 9                                  |
| 25                       | 9                           | 6                                  |

630 <sup>1</sup>DP entre animal *ad libitum*:  $\sigma = 16,74$

631 <sup>2</sup>DP entre animal *ad libitum*:  $\sigma = 13,38$

632

633

634

635

636

637

638

639

640

641

642 Tabela 7. Parâmetros de regressão das relações entre emissões de metano e produção de calor de vacas Girolando em lactação usando  
 643 a técnica da máscara facial e da câmara respirométrica

| Parâmetros de regressão | Item                    |                                   |                                  |                                     |                                     |                 |
|-------------------------|-------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------|
|                         | CH <sub>4</sub> , g/dia | CH <sub>4</sub> /CMS <sup>1</sup> | CH <sub>4</sub> /PL <sup>2</sup> | CH <sub>4</sub> /PLc4% <sup>3</sup> | CH <sub>4</sub> /PLcer <sup>4</sup> | PC <sup>5</sup> |
| Intercepto              | 80,65                   | 3,37                              | -0,542                           | -3,714                              | -3,894                              | 56,89           |
| EP                      | 22,453                  | 5,174                             | 2,936                            | 2,875                               | 2,655                               | 27,602          |
| P-valor <sup>6</sup>    | 0,0013                  | 0,520                             | 0,855                            | 0,208                               | 0,155                               | 0,049           |
| Coefficiente angular    | 0,729                   | 0,84                              | 1,39                             | 1,31                                | 1,32                                | 0,749           |
| EP                      | 0,077                   | 0,223                             | 0,166                            | 0,136                               | 0,135                               | 0,148           |
| P-valor <sup>7</sup>    | 0,002                   | 0,477                             | 0,027                            | 0,033                               | 0,026                               | 0,101           |
| r <sup>2</sup>          | 0,77                    | 0,36                              | 0,74                             | 0,79                                | 0,79                                | 0,51            |
| CCC <sup>8</sup>        | 0,86                    | 0,57                              | 0,51                             | 0,79                                | 0,79                                | 0,64            |
| Cb <sup>9</sup>         | 0,97                    | 0,92                              | 0,57                             | 0,84                                | 0,84                                | 0,92            |
| MSEP <sup>10</sup>      | 1092,34                 | 10,17                             | 54,37                            | 28,85                               | 22,57                               | 377,33          |
| MB <sup>11</sup>        | 17,81                   | 0,12                              | 37,51                            | 6,04                                | 4,58                                | 102,94          |
| SB <sup>12</sup>        | 344,53                  | 0,21                              | 3,04                             | 3,85                                | 3,31                                | 28,57           |
| RE <sup>13</sup>        | 729,99                  | 9,85                              | 13,82                            | 18,97                               | 14,68                               | 245,82          |

644 <sup>1</sup>Emissão diária de CH<sub>4</sub> (g/dia) por unidade de CMS (g/kg CMS); <sup>2</sup>Emissão diária de CH<sub>4</sub> (g/dia) por unidade de produção de leite (g/kg PL); <sup>3</sup>Emissão diária de CH<sub>4</sub> (g/dia)  
 645 por unidade de produção de leite corrigido para 4% de gordura; <sup>4</sup>Emissão diária de CH<sub>4</sub> (g/dia) por unidade de produção de leite corrigido para energia; <sup>5</sup>Produção de calor por  
 646 unidade de peso metabólico (kcal/PV<sup>0,75</sup>); <sup>6</sup>H0: intercepto = 0; <sup>7</sup>H0: coeficiente angular = 1; <sup>8</sup>Coefficiente de correlação e concordância; <sup>9</sup>Fator de correção do viés; <sup>10</sup>Média de  
 647 erro de predição; <sup>11</sup>Viés médio; <sup>12</sup>Erros sistemáticos; <sup>13</sup>Erros aleatórios.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica da máscara facial é simples, rápida, menos onerosa e apresenta potencial para estimar as emissões de CH<sub>4</sub> g/dia e em relação à produção de leite, podendo ser útil para a geração de dados em massa que possam ser utilizados para selecionar fenótipos qualificados em programas de melhoramento e avaliação de estratégias de mitigação.

Porém para estudos de metabolismo onde o foco é o estudo da partição energética e a produção de calor, ainda é necessário ajuste da técnica para a melhoria da acurácia e precisão. O controle da temperatura e umidade do ambiente em que os animais estão sendo avaliados e o uso da frequência cardíaca para o cálculo do pulso de oxigênio podem ser fatores importantes para a melhoria e estimativa mais acuradas e precisas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BISHOP, M.D. et al. Divergent selection for postweaning feed conversion in Angus beef cattle: II. Genetic and phenotypic correlations and realized heritability estimate. **Journal of animal science**, v. 69, n. 11, p. 4360-4367, 1991.

BROSH, A. et al. Estimation of energy expenditure from heart rate measurements in cattle maintained under different conditions. **Journal of animal science**, v. 76, n. 12, p. 3054-3064, 1998.

BROUWER, E. Report of subcommittee on constants and factors. In: Blaxter, K. L. (Ed.). **Proceedings of the 3 Symposium on energy Metabolism**. London: EAAP Academic, p. 441-443, 1965.

CARSTENS, G.E. et al. Genetic variation in energy expenditures of monozygous twin beef cattle at 9 and 20 months of age. In: **11. Symposium on Energy Metabolism of Farm Animals, Lunteren (Netherlands), 18-24 Sep 1988**. Pudoc, 1989.

CHAVES, A. S. et al. Relationship of efficiency indices with performance, heart rate, oxygen consumption, blood parameters, and estimated heat production in Nelore steers. **Journal of animal science**, v. 93, n. 10, p. 5036-5046, 2015.

COTTLE, D. J. et al. Estimating daily methane production in individual cattle with irregular feed intake patterns from short-term methane emission measurements. **Animal**, v. 9, n. 12, p. 1949-1957, 2015.

DEIGHTON, M. H. et al. A modified sulphur hexafluoride tracer technique enables accurate determination of enteric methane emissions from ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v. 197, p. 47-63, 2014.

DETMANN, E. et al. **Métodos para Análise de Alimentos**. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência Animal. Visconde do Rio Branco: Suprema, p.214. 2012.

FERRELL, C.L., OLTJEN, J.W. ASAS CENTENNIAL PAPER: Net energy systems for beef cattle—Concepts, application, and future models. **Journal of animal science**, v. 86, n. 10, p. 2779-2794, 2008.

FERRELL, C.L., JENKINS, T. G. Energy utilization by mature, nonpregnant, nonlactating cows of different types. **Journal of Animal Science**, v. 58, n. 1, p. 234-243, 1984.

GRAINGER, C. et al. A high dose of monensina does not reduce methane emissions of dairy cows offered pasture supplemented with grain. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 5300-5308, 2010.

HAMMOND, K. J. et al. Methane emissions from cattle: estimates from short-term measurements using a GreenFeed system compared with measurements obtained using respiration chambers or sulphur hexafluoride tracer. **Animal Feed Science and Technology**, v. 203, p. 41-52, 2015.

HEGARTY, R. S. et al. Cattle selected for lower residual feed intake have reduced daily methane production. **Journal of animal science**, v. 85, n. 6, p. 1479-1486, 2007.

HEGARTY, R. S. Applicability of short-term emission measurements for on-farm quantification of enteric methane. **Animal**, v. 7, n. s2, p. 401-408, 2013.

HUHTANEN, P. et al. Comparison of methods to determine methane emissions from dairy cows in farm conditions. **Journal of dairy science**, v. 98, n. 5, p. 3394-3409, 2015.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário 2015**. Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação. Rio de Janeiro: IBGE, 2009. 777 p. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/default.php> . Acesso em: 16 de outubro de 2016.

IPCC - Intergovernmental Panel on Climate Change. **Revised IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories**. 2006. Chapter 10, Vol. 4: Agriculture, Forestry and Other Land Use. Acesso em 15 de dezembro de 2016. <http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/2006gl/vol4.htm>.

- JOHNSON, K.A. et al. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a SF<sub>6</sub> tracer technique. **Environmental science & technology**, v. 28, n. 2, p. 359-362, 1994.
- JOHNSON, K.A.; JOHNSON, D.E. Methane Emissions from Cattle. **Journal Animal Science**, v. 73, p. 2483-2492, 1995.
- LAWRENCE, T.L.J.; FOWLER, V.R. **Growth of farm animals**. CAB International, p. 321, 1997.
- LIANG, J. B.; F. TERADA I.; HAMAGUCHI. Efficacy of using the face mask technique for the estimation of daily heat production of cattle. In: (Ed. Y. Van Der Honing and W. H. Close). **Energy Metabolism of farm Animals**. Pudoc, Wageningen, the Netherlands, 1989.
- LIN, L.I.-K. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. **Biometrics**, n.45, p. 255–268, 1989.
- LIAO, J.J.Z. An improved concordance correlation coefficient. **Pharmaceutical Statistics**, v. 2, n. 4, p. 253-261, 2003.
- KOHN, R.A.; KALSCHEUR, K. F.; HANIGAN, M. Evaluation of models for balancing the protein requirements of dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 81, n. 12, p. 3402-3414, 1998.
- MACHADO, F.S. et al. Technical note: A facility for respiration measurements in cattle. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 6, p. 4899-4906, 2016.
- MCGINN, S. M. et al. Assessment of the Sulfur Hexafluoride (SF) Tracer Technique for Measuring Enteric Methane Emissions from Cattle. **Journal of environmental quality**, v. 35, n. 5, p. 1686-1691, 2006.
- MAKKAR, H.P., VERCOE, P.E. (Ed.). **Measuring methane production from ruminants**. Dordrecht, The Netherlands:: Springer, 2007.
- MARTIN, C.; MORGAVI, D.P.; DOREAU, M. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. **Animal**, v. 4, n. 03, p. 351-365, 2010.
- 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.
- MCALLISTER, T. A. et al. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 76, n. 2, p. 231-244, 1996.



MCLEAN, J. A., G. TOBIN. **Animal and human calorimetry**. Cambridge university press. New York, 1987.

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

NAVARRO-VILLA, A. et al. Modifications of a gas production technique for assessing in vitro rumen methane production from feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 166-167, p. 163-174, 2011.

NETER, J. et al. **Applied linear statistical models**. Vol. 4. Chicago: Irwin, 1996.

NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrients requirements of dairy cattle**. 7.ed. Washington, DC: National Academy Press. P. 381, 2001.

NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requeriments of beef cattle**. 7ed. Washington, D.C.: National Academic Press, p. 242, 1996.

NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requeriments of beef cattle**. 6ed. Washington, D.C.: National Academic Press, p. 90, 1984.

OSS, D.B. et al. An evaluation of the face mask system based on short-term measurements compared with the sulfur hexafluoride (SF<sub>6</sub>) tracer, and respiration chamber techniques for measuring CH<sub>4</sub> emissions. **Animal Feed Science and Technology**, v. 216, p. 49-57, 2016a.

OSS, D.B. et al. Technical note: Assessment of the oxygen pulse and heart rate method using respiration chambers and comparative slaughter for measuring heat production of cattle. **Journal of Dairy Science**. v. 99, p. 8885-8890. 2016b

PATRA, A.K. Enteric methane mitigation technologies for ruminant livestock: a synthesis of current research and future directions. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 184, n. 4, p. 1929-1952, 2012.

PELLIKAAN, W. F. et al. A novel method to determine simultaneously methane production during in vitro gas production using fully automated equipment. **Animal Feed Science and Technology**, v. 168, 2011, p. 196-205, 2011.

PEREIRA, E. S. et al. Importância da inter-relação carboidrato e proteína em dietas de ruminantes. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 1, p. 125-134, 2005.

PINARES-PATIÑO, C. S. et al. Assessment of the sulphur hexafluoride (SF<sub>6</sub>) tracer technique using respiration chambers for estimation of methane emissions from sheep. **Animal feed science and technology**, v. 166, p. 201-209, 2011.

RESENDE, K.T.; TEIXEIRA, I.A.M.A.; FERNANDES, M.H.M.R. Metabolismo de energia. In: **Nutrição de Ruminantes**, 1, ed, Jaboticabal: Telma Teresinha Berchielli, Alexandere Vaz Pires e Simone Gisele de Oliveira, 2006, cap 11, p. 311- 332, 2006.

RODRIGUEZ, N.M.; CAMPOS, W. E.; LACHICA, M. L. et al. A calorimetry system for metabolism trials. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.2, p.495-500, 2007.

RYMER, C. et al. In vitro cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. **Animal Feed Science and Technology**, v 123, p 9-30, 2005.

SKLAN, D. et al. Fatty acids, calcium soaps of fatty acids, and cottonseeds fed to high yielding cows. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 9, p. 2463-2472, 1992.

STEINFELD, Henning et al. **Livestock's long shadow: environmental issues and options**. Food & Agriculture Org., 2006.

TEDESCHI, L.O. Assessment of the adequacy of mathematical models. **Agricultural systems**, v. 89, n. 2, p. 225-247, 2006.

TYRRELL, H.F.; REID, J.T. Prediction of the Energy Value of Cow's Milk 1, 2. **Journal of Dairy Science**, v. 48, n. 9, p. 1215-1223, 1965.

ZIMMERMAN, S. et al. Measurement and evaluation of enteric CH<sub>4</sub> emissions and variability in production systems. **Advances in Animal Biosciences**, n.4, p. 518, 2013.

WASHBURN, L.E., BRODY, S. Growth and development with special reference to domestic animals. 42. Methane, hydrogen, and carbon dioxide production in the digestive tract of ruminants in relation to the respiratory exchange. **Growth and development with special reference to domestic animals. 42. Methane, hydrogen, and carbon dioxide production in the digestive tract of ruminants in relation to the respiratory exchange.**, 1937.

WUEBBLES, D.J.; HAYHOE, K. Atmospheric methane and global change. **Earth-Science Review**, v. 57, p. 177–210, 2002.

## **ANEXO – NORMAS PARA SUBMISSÃO DE ARTIGO DA REVISTA LIVESTOCK SCIENCE**

### **Article structure**

Manuscripts should have numbered lines, with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasise part of the text.

Manuscripts in general should be organised in the following order:

- Title should be clear, descriptive and not too long
- Abstract
- Keywords (indexing terms)
- Introduction
- Material studied, area descriptions, methods, techniques
- Results
- Discussion
- Conclusion
- Acknowledgment and any additional information concerning research grants, and so on
- References
- Figure captions
- Figures (separate file(s))
- Tables (separate file(s))

Pdf-files for text and tables cannot be used for production purposes. You are kindly requested to upload the text pages and references as a word processor file (Word, Wordperfect, Open Office, rtf). Line numbers are mandatory for the text file. The tables can be part of this file or can be uploaded as one or more separate files. Tables can also

be uploaded as separate spreadsheet files. Line numbers are not needed on pages with tables or figures.

### **Essential title page information**

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### **Abstract**

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should not be longer than 400 words.

### *Graphical abstract*

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of  $531 \times 1328$  pixels (h  $\times$  w) or proportionally more. The image should be readable at a size of  $5 \times 13$  cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

### *Highlights*

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### *Formatting of funding sources*

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

**Funding:** This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

#### *Nomenclature and units*

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents for further information. Authors and Editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

#### *Math formulae*

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any

equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.

The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by exp.

Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ .

In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g.  $\text{Ca}^{2+}$ , not as  $\text{Ca}^{++}$ .

Isotope numbers should precede the symbols, e.g.  $^{18}\text{O}$ .

The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as  $\text{P}_2\text{O}_5$ ).

#### *Footnotes*

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

