



Universidade Federal
de Campina Grande

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

LÍVIA SOARES SILVA

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E CARACTERÍSTICAS FERMENTATIVAS IN VITRO
DA GLICERINA EM SUBSTITUIÇÃO À DIFERENTES FORRAGENS

PATOS - PB

2014

LÍVIA SOARES SILVA

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E CARACTERÍSTICAS FERMENTATIVAS IN VITRO
DA GLICERINA EM SUBSTITUIÇÃO À DIFERENTES FORRAGENS

PATOS - PB

2014

LÍVIA SOARES SILVA

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E CARACTERÍSTICAS FERMENTATIVAS IN VITRO
DA GLICERINA EM SUBSTITUIÇÃO À DIFERENTES FORRAGENS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, como uma das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de concentração Sistemas Agrosilvipastoris no Semiárido, para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr, Leilson Rocha Bezerra

Coorientadora: Dr^a Heloisa Carneiro

PATOS – PB

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSRT DA UFCG

S586c Silva, Lívia Soares
Composição química e características da fermentação *in vitro* da glicerina em substituição à diferentes forragens / Lívia Soares Silva. – Patos, 2016.
44f.: il.

Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2016.

“Orientação: Prof. Dr. Leilson Rocha Bezerra”

“Coorientação: Prof^a. Dr^a. Heloisa Carneiro”

Referências.

1. Glicerol. 2. Degradabilidade. 3. Ruminantes. I. Título.

CDU 636.033



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

PROVA DE DEFESA DO TRABALHO DE DISSERTAÇÃO

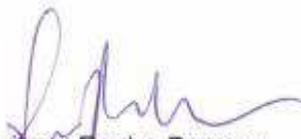
TÍTULO: Composição química e características da fermentação *in vitro* da glicerina em substituição a diferentes forrageiras

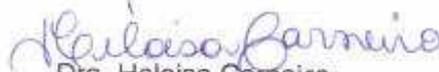
AUTORA: LÍVIA SOARES SILVA

ORIENTADOR: Prof. Dr. LEILSON ROCHA BEZERRA

JULGAMENTO

CONCEITO: APROVADO


Prof. Leilson Rocha Bezerra
Presidente


Dra. Heloisa Carneiro
1º Examinador


Prof. José Moraes Pereira Filho
2º Examinador

Patos - PB, 26 de fevereiro de 2014


Prof. Onaldo Guedes Rodrigues
Coordenador

A Helton e Miguel
Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por seu eterno amor, pelos seus ensinamentos aplicados ao meu coração, e por sua promessa cumprida, de que estaria comigo todos os dias. Obrigada!

Aos meus pais, Anazildo e Maria da Luz, que por muito me amarem, pelo amor, apoio, confiança e carinho em todos os momentos.

Ao meu marido, Helton Rodrigues, você é uma benção em minha vida, obrigada pela compreensão, pelo apoio e incentivo em todos os momentos. Te Amo!

Ao meu filho lindo, Miguel, que mesmo sem saber foi o maior estímulo para que eu fizesse e concluísse este mestrado, você é a minha herança, benção de DEUS! Amo Você!

Ao professor, Olaf que apoio o meu trabalho. Obrigada por me ajudar a expandir meus horizontes e a aprender cada vez mais. Obrigada por tudo.

Quero agradecer aos meus amigos que sempre apoiaram, até aqueles que estavam longe. E agradecer especialmente, a Rafaela, Kledine, Jessica, Maísa, Márcia, Flaviana, Fabíola, Maíza, Raissa, dentre tantos outros colegas de mestrado. Que Deus derrame infinitas bênçãos sobre vocês.

Ao Professor Aderbal Marcos, meu orientador, que acreditando no meu trabalho deu-me a liberdade e autonomia necessária dividindo comigo as expectativas e conduzindo-me a refletir nas ideias que se transformaram em palavras. Minha especial admiração e gratidão. Que Deus a abençoe sempre!

Ao Professor Leilson, agradeço pela orientação e dedicação da qual fui agraciada, admiração é a palavra que tenho pelas suas aulas, o senhor serve de espelho para aqueles que almejam ser Professor. Parabéns pelo profissional brilhante que és, obrigada.

A Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) e ao Programa de PósGraduação em Zootecnia na pessoa do Prof^a. Dr^a. Ana Célia, muito obrigada por tudo!

A todos os professores que participaram desta jornada, sempre solícitos, até mesmo fora do horário do curso, porque sem eles não haveria enriquecedoras ideias. Meus sinceros agradecimentos. Aos funcionários, Ari, Otavio, Kaline, que muito contribuíram para realização deste trabalho. Obrigada.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), a FAPEMIG (Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de Minas Gerais) e a EMBRAPA Gado de Leite pelo auxílio ao projeto de pesquisa. E a todos que, direta ou indiretamente contribuíram na execução deste trabalho.

SUMARIO

RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	II
LISTA DE TABELAS.....	III
INTRODUÇÃO.....	IV
CAPITULO 1. DEGRADAÇÃO E PH RUMINAL IN VITRO E PRODUÇÃO DE GÁS TOTAL DA GLICERINA EM SUBSTITUIÇÃO DE DIFERENTES FORRAGENS PARA USO NA ALIMENTAÇÃO DE BOVINOS	
RESUMO.....	2
ABSTRACT.....	2
INTRODUÇÃO.....	3
MATERIAL E MÉTODOS.....	4
RESULTADOS.....	6
DISCURSSÃO.....	9
CONCLUSÕES.....	11
AGRADECIMENTOS.....	11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	11
CAPITULO 2. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DOS GASES METANO, DIÓXIDO DE CARBONO, AGVS E NNH3 DA GLICERINA EM SUBSTITUIÇÃO DE DIFERENTES FORRAGENS PARA USO NA ALIMENTAÇÃO DE BOVINOS	
ABSTRACT.....	15
INTRODUÇÃO.....	16
MATERIAL E MÉTODOS.....	17
RESULTADOS.....	19
DISCURSSÃO.....	23
CONCLUSÕES.....	26
AGRADECIMENTOS.....	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da glicerina em substituição a fontes forrageiras usuais na dieta de ruminantes. Através dos parâmetros de produção de gás, com a degradabilidade ruminal, teor de pH, produção de gás total, produção dos ácidos graxos voláteis, teor de nitrogênio amoniacal de quatro espécies forrageiras sobre o efeito de substituição com o subproduto do biodiesel, a glicerina, mediante o uso da técnica semi automática da produção de gases in vitro, usando um delineamento estatístico com 4 tratamentos e 4 repetições. Os tratamentos foram à substituição da glicerina pelos níveis crescentes 0%, 30%, 50% e 70% das forragens: capim elefante, cana-de-açúcar, silagem de milho e capim Brachiaria. Dentro dos níveis de glicerina, quanto maior foi a sua substituição maior foi a Degradabilidade da matéria seca. As médias da produção de gás total para a cana-de-açúcar e capim elefante oscilaram entre os níveis, que obteve valores maiores para o nível de 50%. A mitigação de metano neste estudo sobre o efeito da glicerina com o capim Brachiaria proporcionou um efeito positivo ao ambiente. O capim Brachiaria e o capim elefante desempenharam para as variáveis de produção do metano, dióxido de carbono e Nitrogênio Amoniacal um efeito positivo sobre a qualidade da forragem com a glicerina. A produção de acetato, com a adição da glicerina os valores decresceram, com exceção do capim elefante, que aumentou seus percentuais até o nível de 50%. O aumento das quantidades de ácido butírico e propiônico pode ocorrer quando a dieta é rica em cereais. A glicerina pode ser recomendada á 30%, com base na matéria seca e o capim Brachiaria e o capim elefante desempenharam, respectivamente, um grande aproveitamento sobre o efeito da glicerina. E o capim elefante desempenhou um efeito positivo sobre a qualidade da forragem com a glicerina, para a produção dos Ácidos Graxos Voláteis.

Palavras-chave: glicerol, degradabilidade, AGVs, CH₄, NNH₃, ruminantes.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of glycerin instead to usual fodder sources in the diet of ruminants. Through the parameters of gas production with rumen degradability, pH value, the total gas production, production of volatile fatty acids, ammonia nitrogen content of four forage species on the effect of substitution with the byproduct of biodiesel, glycerin, through the use of semi-automated technique of gas production in vitro is using a statistical design with 4 treatments and 4 replicates. The treatments were the replacement of glycerin by increasing levels 0%, 30% 50% and 70% of the forage: Elephant Grass, cane sugar, corn silage and Brachiaria grass. Within the levels of glycerin, the higher the higher its replacement was dry matter degradability. The means of the total gas production for the sugar cane and elephant grass fluctuated between levels, which showed higher values for the 50% level. The methane mitigation this study the effect of glycerin Brachiaria provided with a positive effect to the environment. The Brachiaria and Elephant grass played for the variables of production of methane, carbon dioxide and ammonia nitrogen a positive effect on the quality of the forage with glycerin. The production of acetate, with the addition of glycerin values decreased, with the exception of Elephant grass, which increased their percentage to the level of 50%. Increasing amounts of butyric and propionic acid can occur when the diet is rich in cereals. Glycerin can be recommended to 30%, based on dry matter of Elephant and Brachiaria grass and played, respectively, great use of the effect of glycerin. And the elephant grass has had a positive effect on forage quality with glycerin, for the production of volatile fatty acids.

Keywords: glycerol, degradability, VFA, CH₄, NH₃, ruminants.

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 1

Tabela 1 – Composição química das forragens e da glicerina utilizadas no experimento para avaliação no uso na dieta de ruminantes.....	6
Tabela 2 – Teores médios da degradabilidade da matéria seca (DMS) e equações de regressão da interação das diferentes forragens em substituição a níveis de glicerina após 48 horas de incubação <i>in vitro</i> em meio de cultura.....	7
Tabela 3 – Teor médio da produção de Gás Total das forragens com diferentes níveis de substituição de glicerina após 48 horas de incubação <i>in vitro</i> em meio de cultura.....	8
Tabela 4 – Teor médio da produção de pH das forragens com diferentes níveis de substituição de glicerina após 48 horas de incubação <i>in vitro</i> em meio de cultura.....	8

CAPITULO 2

Tabela 1 – Composição química das forragens e da glicerina utilizadas no experimento para avaliação no uso na dieta de ruminantes.....	30
Tabela 2 – Teores médios da produção de CH ₄ , CO ₂ e N-NH ₃ de diferentes níveis de glicerina em substituição à forragens com após 48 horas de incubação <i>in vitro</i> em meio de cultura.....	31
Tabela 3 - Teores médios da produção de ácidos graxos voláteis (AGVs) da glicerina em diferentes níveis de substituição de forragens com após 48 horas de incubação <i>in vitro</i> em meio de cultura.....	32

INTRODUÇÃO

A produção de biodiesel é caracterizada pela produção de diversos coprodutos, dentre estes a glicerina. No Brasil atualmente é consumido 55,9 bilhões de litros de óleo diesel anualmente (ANP, 2013), e junto a isso com adição de 5%, o setor deverá produzir 2,25 bilhões de litros de biodiesel e colocará no mercado aproximadamente 225 milhões de litros de glicerina (Moreira et al., 2003). Estima-se que somente no ano de 2011 tenham sido geradas mais de 264.000 toneladas de glicerina no Brasil (ANP 2012).

Comercialmente a glicerina possui vários níveis e designações disponíveis no mercado, que diferem quanto ao conteúdo de glicerol, álcool, catalisadores, ácidos graxos, sabões, cor e odor (Mota et al., 2009). No meio ambiente o glicerol ou glicerina pode ser encontrado nas formas de triglicérides em óleos vegetais e gorduras animais. No Brasil, a utilização da glicerina como aditivo na alimentação humana e animal é assegurada pela resolução nº 386 de 5 de Agosto de 1999 (Costenaro, 2009).

A glicerina na alimentação de ruminantes obteve um crescente aumento nos últimos anos, vista a expansão das plantas industriais do biodiesel e o excedente deste coproduto no mercado (Ajanovic, 2011; Fapri, 2011). Na dieta de ruminantes, é classificada como uma fonte energética assimilável pelos microrganismos da flora ruminal e metabolizada no fígado, que ao ser disponibilizado para o ruminante, a glicerina é rapidamente utilizada pelos microrganismos ruminais na formação de ácidos graxos de cadeia curta – AGCC (Defrain et al., 2004; Abo El-Nor et al., 2010).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2010) autorizou o uso da glicerina como insumo para alimentação animal e estabeleceu um padrão mínimo de qualidade, como: glicerol (mínimo de 800g/kg); umidade (máximo 130g/kg); metanol (máximo 159 mg/kg) e sódio e matéria mineral (valores garantidos pelo fabricante g/kg, podendo variar pelo processo produtivo). E o Food and Drug Administration (FDA, 2010) recomenda que os níveis adequados de metanol na glicerina bruta sejam inferiores a 0,5%. O nível adequado de glicerina na dieta deve ser ainda estudado, pois o seu crescente uso é impulsionado, apresentado pelas qualidades nutricionais implícitas que a glicerina, subproduto do biodiesel, introduz a alimentação.

Verificaram-se em estudos, os níveis de glicerina integrados a dietas sofreram variações e desempenharam uma característica semelhante a outras fontes alimentares, de acordo com Mach et al. (2009), trabalhando com 4 níveis de glicerina (0, 4, 8 e 12%) em dietas para touros holandeses, observaram que a inclusão de até 12% de glicerina na dieta não apresentou efeitos negativos sobre o desempenho dos animais. Segundo Gunn

et al. (2010) a adição de até 15% de glicerina bruta nas dietas de cordeiros machos não influenciou de forma negativa o desempenho animal. Ilse et al., (2009), a inclusão de 0, 6, 12, e 18% de glicerina na dieta de bovinos confinados não influenciou o peso vivo final, ganho médio diário e a eficiência alimentar. Entretanto, o consumo de matéria seca diminuiu linearmente com dias de confinamento.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da glicerina em substituição a fontes forrageiras usuais na dieta de ruminantes.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABO EL-NOR, S.; ABUGHAZALEH, A.A.; POTU, R.B. et al. Effects of differing levels of glycerol on rumen fermentation and bacteria. **Animal feed Science and Technology**, v.162, n.3, p.99-105, 2010.

AJANOVIC, A. Biofuels versus food production: Does biofuels production increase food prices? **Energy**, v.36, n.4, p.2070-2076, 2011.

ANP – Agência Nacional de Petróleo. [2011] **Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis**. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=57890>> Acesso em: 19 de janeiro 2014.

ANP – Agência Nacional do Petróleo. [2013] **Consumo aparente de combustíveis no Brasil cresceu 6,1% na comparação entre 2011 e 2012**. Disponível em <<http://www.anp.gov.br/?id=472>> Acesso em 20 de janeiro de 2014.

COSTENARO, H.S. **Hidrólise ácida e retirada de sais da glicerina bruta proveniente da produção de biodiesel**. 2009. 135f. Dissertação. (Mestrado em Engenharia Química).

Universidade de São Paulo, São Paulo.

FAPRI - Food and Agricultural Policy Research Institute. **World Biofuels: FAPRI-ISU 2011 Agricultural Outlook**. Ames, Iowa: FAPRI, 2011. Disponível em: <http://www.fapri.iastate.edu/outlook/2011/tables/5_biofuels.pdf> Acesso em: 19 de janeiro de 2014.

FDA US - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. [2010] **Food additives permitted in feed and drinking water of animals**. Methyl esters of higher fatty acids. Disponível em:

<<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=172.225&SearchTerm=fatty%20acids>> Acesso em: 04 de Dezembro de 2013.

GUNN, P.J.; NEARY, M.K.; LEMENAGER, R.P. et al. Effects of crude glycerin on performance and carcass characteristics of finishing wether lambs. **Journal Animal Science**, v.88, p.1771-1776, 2010.

ILSE, B.R.; ANSERSON, V.L.; JESKE et al. Effect of Glycerol Level in Feedlot Diets on Animal Performance and Carcass Traits. Beef Feedlot Research Report – **North Dakota State University**, v.33, p.24-29, 2009.

MACH, N.; BACH, A.; DEVANT, M. Effects of crude glycerin supplementation on performance and meat quality of Holstein bulls fed high-concentrate diets. **Journal of Animal Science**, v.87, p.632-638, 2009.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. GENPA 80 GRANOL. **Ingrediente vegetal**, Código SIF: RS-15127. Porto Alegre-RS, 2010.

MOREIRA, F.B.; PRADO, I.N.; CECATO, U. et al. Suplementação com Sal Mineral Proteinado para Bovinos de Corte, em Crescimento e Terminação, Mantidos em Pastagem de Grama Estrela Roxa (*Cynodon plectostachyus* Pilger), no Inverno. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.2, p.449-455, 2003.

MOTA, C.J.A., da SILVA C.X.A., GONÇASLVES, V.L.L. Gliceroquímica: Novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, v.32, p.639-648, 2009.

CAPÍTULO 1

Degradabilidade, pH ruminal in vitro e produção de gás total da glicerina em substituição de diferentes forragens para uso na alimentação de ruminantes

CAPÍTULO 1

Degradabilidade, pH ruminal in vitro e produção de gás total da glicerina em substituição de diferentes forragens para uso na alimentação de ruminantes

Rumen degradability and pH in vitro and gas production total of glycerin instead of different fodder for use in cattle feed

Lívia Soares Silva¹; Aderbal Marcos Azevedo Silva²; Leilson Rocha Bezerra³; Heloisa Carneiro⁴

Resumo

Objetivou-se avaliar a qualidade nutricional através dos parâmetros de produção de gás com a degradabilidade ruminal, teor de pH e a produção de gás total de quatro espécies forrageiras sobre o efeito de substituição com o coproduto do biodiesel, a glicerina, mediante o uso da técnica semi automática da produção de gases in vitro, usando um delineamento estatístico com 4 tratamentos e 4 repetições. Os tratamentos foram à substituição da glicerina pelos níveis crescentes 0%, 30%, 50% e 70% das forragens: capim elefante, cana-de-açúcar, silagem de milho e capim brachiaria. Dentro dos níveis de glicerina, quanto maior foi a sua substituição maior foi a degradabilidade da matéria seca, observando que no nível de 30% os valores variaram de 64,34 a 67,71 %, quanto ao nível de 50% os valores apresentados variaram de 71,78 a 77,28, e no nível de 70% os valores foram de 82,93 e 86,00%. As médias da produção de gás total para a cana-de-açúcar e capim elefante oscilaram entre os níveis, que obteve valores maiores para o nível de 50%, com 85,54 e 169,13 mL, respectivamente, e o menor valor ao nível de 70% para a cana-de-açúcar 67,940 mL. A silagem de milho e o capim brachiaria apresentaram em aumento crescente a cada nível de ingestão do substrato, aos níveis de 30%, 50% e 70% da glicerina. A glicerina pode ser recomendada á 30%, com base na matéria seca e o capim brachiaria e o capim elefante desempenharam, respectivamente, um grande aproveitamento sobre o efeito da glicerina. **Palavras-chave:** glicerol, suplemento energético, alimentação animal, ruminantes.

Abstract

This study aimed to evaluate the nutritional quality through the parameters of gas production with rumen degradability, pH value and the total gas production from four forages on the effect of substitution with the byproduct of biodiesel, glycerin, by using semi automatic technique of in vitro gas production, using a statistical design with 4 treatments and 4 replications. The treatments have been the replacement of glycerin by levels increasing of 0%, 30%, 50% and 70% of the forage: elephant grass, sugar cane, corn silage and grass Brachiaria. Within levels of glycerin, the greater was their biggest substitution was the degradability of dry matter, noting that the level of 30% values ranged from 64.34 to 67.71%, the level of 50% the values presented ranged from 71.78 to 77.28, and the level of 70% values were 82.93% and 86.00%. The averages of the total gas production for the sugar cane and elephant grass fluctuated between levels, which showed higher values for the level of 50%, with 85.54 and 169.13 mL, respectively, and lowest level of 70 % for the cane sugar 67.940 mL. Corn silage and grass Brachiaria presented in rising every level of intake of the substrate, the levels of 30%, 50% and

¹ Mestranda do programa de pós-graduação em zootecnia – UFCG, Patos/PB, Brasil, Rua Luzia Ferreira Leitão -108, Patos/PB. E-mail: livia.gba18@gmail.com.

² Prof. Dr. da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Patos, Paraíba UFCG, Brasil, e-mail: aderbal@pq.cnpq.br.

³ Prof. Dr. da Universidade Federal do Piauí, Campus Professora Cinobelina Elvas, Bom Jesus, Piauí, UFPI, Brasil, email: leilsonl@ufpi.edu.br.

⁴ Dr^a da Embrapa Gado de Leite, Minas Gerais, e-mail:

70% glycerin increased. Glycerin can be recommended to 30%, based on dry matter and Brachiaria grass and elephant grass played, respectively, great use of the effect of glycerin.

Keywords: glycerol, energy supplement, animal feeding, ruminants.

Introdução

A investigação da qualidade dos alimentos fornecidos aos animais de produção tem evoluído consideravelmente nos últimos anos, uma vez que disso depende a produtividade e lucratividade do negócio. A introdução de novos alimentos como os coprodutos da agroindústria do biodiesel, tem contribuído para uma maior disponibilidade de matéria seca para os animais, principalmente nas épocas de estiagem quando há escassez de alimento.

Na cadeia produtiva para obtenção do biodiesel, a partir da reação de transesterificação, obtém-se a glicerina, que é considerada um subproduto do biodiesel. Para produção do biodiesel dentre as matérias prima utilizadas estão às fontes oleaginosas, como baga de mamona (*Ricinus communis*), nabo forrageiro (*Raphanus sativus*), girassol (*Helianthus annuus*), caroço de algodão (*Gossypium SSP. L.*), sementes de canola (*Brassica napus*), girassol Preto (*Helianthus annus L.*), moringa (*Moringa oleifera*), pinhão manso (*Jatropha curcas*) e soja (*Glycine max*).

Com o avanço do programa nacional do biodiesel, em 2011 foram fabricados 2,6 bilhões de litros do biocombustível, e o volume gerado de glicerina é enorme e muito acima da demanda, que atingiu cerca de 260 mil toneladas apenas como subproduto do biodiesel, volume quase oito vezes superior à demanda, estimada em cerca de 40 mil toneladas (VASCONCELOS, 2012).

A utilização da glicerina bruta na alimentação animal é viabilizada pelo seu valor energético, que quando metabolizada desempenha um papel vital e importante no componente estrutural dos triglicerídeos e fosfolipídios. O uso da glicerina na alimentação de bovinos vem sendo estudado há algum tempo, demonstrando com sua utilização efeitos benéficos a saúde do animal, através da prevenção de doenças, como a Cetose, onde no rúmen a glicerina se transforma em um precursor de glicose (CLEEF et al., 2014). Aliado a isso, o aspecto econômico, em que a introdução de alimentos não convencionais com características que favoreçam a mitigação do CH₄ e conseqüentemente menos impactos ambientais são atualmente pré-requisitos em projetos financiados que beneficiam a estruturação do sistema produtivo desses animais e contribuem com o desenvolvimento das diversas cadeias produtivas (XIN e YU, 2013).

Na inclusão da glicerina, recomenda-se inicialmente o uso de 5 a 8% na matéria seca da dieta, objetivando prevenir distúrbios metabólicos referentes ao período de transição da dieta. Quando inseridos 10% ou mais de glicerina na matéria seca da dieta em substituição aos grãos em vacas leiteiras, verificou-se que não houve efeito sobre a produção e qualidade do leite, pois a glicerina apresentou o mesmo teor de energia na matéria seca do milho, funcionando como um ingrediente em potencial (FÁVARO, 2010).

Dessa forma, objetivou-se avaliar o efeito da inclusão da glicerina em substituição a fontes forrageiras usuais na dieta de ruminantes sobre a degradabilidade e o pH ruminal e a produção total de gases.

Material e Métodos

2.1. Local, amostragem das forragens e do coproduto

A pesquisa foi desenvolvida no Campo Experimental de Coronel Pacheco, Minas Gerais, de propriedade da Embrapa Gado de Leite – CNPGL, na região da Zona da Mata.

No experimento foram utilizadas quatro fontes de espécies forrageiras, sendo elas o capim elefante, a silagem de milho, o capim brachiaria e cana de açúcar, proveniente da produção no campo experimental da Embrapa em Coronel Pacheco em Minas Gerais. Além destes, o coproduto glicerina oriundo das indústrias de processamento ou/e da extração de óleo vegetal para a produção de biodiesel, onde foram coletadas aproximadamente, 300g de amostra. Posteriormente, as amostras foram levadas para o laboratório de apoio, onde foram embaladas e armazenadas, permanecendo refrigeradas a 10°C aguardando o início das análises.

Posteriormente as amostras foram descongeladas, pré-secas em estufa de ventilação forçada a 55°C, durante 72 horas, moídas em moinho do tipo Wiley dotado de peneira de 5 mm, acondicionadas em sacos plásticos, previamente identificados e seguidas para Laboratório de Análise de Alimentos da Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora, MG.

No laboratório, as amostras referentes a cada uma das forragens e as do coproduto estudado, foram misturadas e homogeneizadas para constituírem uma única amostra. Desta amostra, uma porção (100g) foi destinada às análises químicas e o restante do material amostrado foi conduzido para formulação das dietas.

Foi adotada uma formulação discriminada para avaliação do nível de glicerina na dieta, em substituição das forragens pelo coproduto, com uma relação 100/0, 70/30, 50/50 e 30/70% entre volumoso e glicerina, respectivamente.

2.2. Determinações da composição química

As análises laboratoriais para determinação da composição química, digestibilidade e técnica de produção de gás foram realizadas no laboratório de análise de alimentos da Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora, MG.

As determinações da composição química iniciaram após a formulação e identificação das amostras, onde foi realizada uma pré-secagem em estufa de ventilação forçada a 55°C, durante 48 horas, seguido pela moagem em moinho do tipo wiley dotado de peneira 1mm para execução das análises.

As amostras foram submetidas às análises química para determinações de: matéria seca (MS) em estufa a 105°C, fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA)

proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), lignina (LIG) e as cinzas (CZ), segundo Silva e Queiroz (2002). Para os cálculos de obtenção dos carboidratos totais (CT), aplicou-se a equação $CT = 100 - (PB\% + EE\% + Cinzas\%)$, descrita por Sniffen et. al. (1992). A amostra da glicerina foi submetida às análises química para determinações de glicerol, umidade, cinzas, óleo, metanol, sódio (Na), fósforo (P), potássio (Ca).

2.3. Ensaio *in vitro* de digestibilidade

O ensaio de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) foi utilizada a metodologia de Tilley e Terry (1963). Para obtenção da digestibilidade *in vitro* foram utilizados 3 bovinos fistulados. O conteúdo ruminal foi coletado pela manhã, sendo transferidos para garrafas térmicas previamente aquecidas a 39°C e levados imediatamente ao laboratório. No laboratório o líquido ruminal foi filtrado, utilizando peneira fina. Posteriormente, foi adicionado ao líquido de rúmen a solução mineral tampão mantendo em banho maria a 39°C com injeção contínua de CO₂. Em seguida as amostras foram encaminhadas ao incubador, permanecendo em estado de rotação por 72 horas. Dentro das 48 horas foi adicionado aos incubadores os peptídeos, agindo como um composto intermediário para a ação dos microrganismos.

2.4. Ensaio *in vitro* de produção de gases

No ensaio para determinar a produção de gás foram pesados 0,5g de matéria seca (MS) da amostra, introduzidos para um saco de ANKOM[®](F57) com 6 repetições por tratamento, selados e colocados dentro de frascos de vidro de soro do tipo cor-âmbar de 50 ml, previamente lavados com água destilada, secos em estufa e identificados.

Em seguida foi feita a coleta do conteúdo ruminal, de três vacas holandesas, com peso médio de 600kg, fistuladas no rumem, transferindo o material para garrafas térmicas previamente aquecidas a 39°C e levados rapidamente ao laboratório onde o conteúdo ruminal foi homogeneizado e filtrado em tecido de algodão, permanecendo em banho-maria a 39°C sob saturação de CO₂, posteriormente, foi adicionada as soluções, tampão, macro e micro minerais, resazurina e o meio B. Para preparação do meio de cultura utilizou-se preparo do conteúdo ruminal e solução tampão, em proporção 5:1 (VITTI et al. 1999).

Foi transferindo o inóculo (30 ml) para frascos de incubação, totalizando 102 frascos sendo seis repetições para cada tratamento, dos quais seis eram do grupo controle (brancos) que tiveram a função de determinar a produção de gás proveniente do conteúdo ruminal para futuras correções da produção líquida de gases. Posteriormente foram lacrados e colocados em uma incubadora de agitador orbital cremalheira, fixado em 120 oscilações por minuto, a 39°C.

Os parâmetros de produção de gases *in vitro* de cada frasco foram medidos as 3, 6, 12, 24, e 48 horas após a incubação utilizando um aparelho semiautomático de deslocamento de água graduado em ml. Ao completar às 48 horas da incubação os sacos de ANKOM[®] com as forragens foram removidas e introduzidas no gelo, para interromper a fermentação, e em seguida

lavados com água abundante e secos em estufa a 55°C durante 48 horas. Após este processo determinouse a degradabilidade aparente da matéria seca (DAMS) obtida pela diferença entre o peso da matéria seca da amostra e o peso após o processo de incubação. Posteriormente os frascos de fermentação foram abertos e feito a aferição do pH do meio de cultura utilizando um medidor de

pH.

2.5. Análise estatística experimental

A análise estatística da produção de gás total, pH e da degradabilidade da MS foi realizada através do delineamento inteiramente ao acaso num arranjo fatorial 4x4 (forragens e níveis de substituição da glicerina), submetidos a uma análise de variância (PROC ANOVA) aplicando o teste de tukey ($p < 0,05$), utilizando também o modelo estatístico para regressão (PROC REG) (SAS, 2003).

Resultados

Na Tabela 1, verificou-se que dentre os alimentos substituídos, o Capim elefante apresentou maiores níveis de matéria seca (MS) 882,3 g/kg e proteína bruta (PB) 126,1g/kg, diferentemente dos seus níveis de fibra detergente ácido (FDA) 351,1g/kg e lignina (LIG) 144,4g/kg que apresentaram os maiores níveis em relação aos demais produtos estudados, influenciando diretamente nos efeitos digestíveis deste capim no rúmen animal.

Tabela 1 – Composição química das forragens e da glicerina utilizadas no experimento para avaliação no uso na dieta de ruminantes.

Alimentos	MS (g/kg)	PB (g/kg)	FDN (g/kg)	FDA (g/kg)	LIG (g/kg)	EE (g/kg)	CZ (g/kg)	DIVMS (g/kg)	CT (g/kg)
Capim Elefante	117,7	126,1	555,0	351,1	144,4	14,2	25,4	591,4	834,3
Cana-de-açúcar	271,4	22,5	518,2	362,3	40,4	11,9	48,5	554,6	917,1
Silagem de milho	157,3	62,5	469,3	314,5	29,7	22,2	51,7	607,0	863,6
Capim Brachiaria	129,2	122,2	556,2	277,7	34,7	32,2	86,1	652,0	759,5
Glicerina	Glicerol (g/kg)	Óleo (g/kg)	pH (g/kg)	CH4 (g/kg)	Umidade (g/kg)	Cinzas (g/kg)	Na (mg/kg)	Ca (mg/kg)	P (mg/kg)
	811,6	4,7	56,5	0,2	124,1	57,1	214,3	60,0	9290,0

***MS** – Matéria Seca; **PB** – Proteína Bruta; **FDN** – Fibra Detergente Neutro; **FDA** – Fibra Detergente Ácido; **LIG** – Lignina; **EE** – Extrato Etéreo; **CZ** – cinzas; **DIVMS** – Digestibilidade *in vitro* da Matéria Seca; **CT** – Carboidratos Totais; **CH4** – Metanol; **Na** – Sódio; **P** – Fósforo; **Ca** – Potássio.

A cana-de-açúcar apresentou menores níveis de matéria seca (MS) 271,4, proteína bruta (PB) 22,5g/kg e extrato etéreo (EE) 11,9g/kg, que caracterizou o menor nível da digestibilidade da matéria seca (DIVMS) 554,6g/kg.

A silagem de milho apresentou menores níveis de fibra detergente neutro (FDN) 469,3g/kg, fibra detergente ácido (FDA) 314,5g/kg, e o capim brachiaria caracterizaram-se pelos maiores níveis de extrato etéreo (EE) 32,2g/kg, cinzas (CZ) 86,1g/kg e (DIVMS) 652,0g/kg, possibilitando a forragem um efeito positivo.

A composição química da glicerina apresentou glicerol 811,6g/kg, umidade 124,1g/kg, cinzas 57,1g/kg e óleo 4,7g/kg, metanol 0,2g/kg. Destacando-se os níveis de minerais, com sódio 21,43 mg/kg , fósforo 929,0 mg/kg , e o potássio 6,0 mg/kg .

Dentro dos níveis de glicerina, quanto maior foi a sua substituição, maior foi a degradabilidade da matéria seca ($p < 0,05$), observando que no nível de 30% os valores variaram de 64,34 a 67,71%. Quanto ao nível de 50%, os valores apresentados variaram de 71,78 a 77,28, e no nível de 70% os valores foram de 82,93 e 86,00% (Tabela 2).

Tabela 2 – Teores médios da degradabilidade da matéria seca (DMS) e equações de regressão da interação das diferentes forragens em substituição a níveis de glicerina após 48 horas de incubação *in vitro* em meio de cultura.

Forragens	Níveis de Glicerina				Equações	R ²	P
	0	30	50	70			
C. elefante	54,143 ^a	67,713 ^a	77,287 ^a	86,003 ^a	$\hat{Y}=54,142-0,457x$	0,9982	<,0001
Cana-de-açúcar	48,450 ^a	65,610 ^a	75,170 ^a	85,467 ^a	$\hat{Y}=48,532-0,581x$	0,9978	<,0001
Silagem de milho	50,400 ^a	64,340 ^a	71,780 ^a	83,157 ^a	$\hat{Y} = 50,214 - 0,458x$	0,9754	<,0001
C. brachiaria	52,767 ^a	65,933 ^a	74,733 ^a	82,933 ^a	$\hat{Y} = 52,882 - 0,432x$	0,9916	<,0001

*Médias seguidas da mesma letra nas colunas diferem significativamente a nível de 5% no teste de tukey.

Os resultados apresentados para a produção de gás total *in vitro* apresentaram em todas as forragens analisadas, comportamento linear. Ao analisar cada nível individualmente, observase diferença significativa dentro das diferentes forragens ($p < 0,05$). O nível 0% (controle) estatisticamente entre o capim brachiaria e a silagem de milho, com 121,63% e 130,23%, foram semelhantes, respectivamente, quanto ao capim elefante e a cana-de-açúcar, com 71,96% e 85,44%, foram inferiores aos resultados das outras forragens (Tabela 3).

Tabela 3 – Teor médio da produção de Gás Total das forragens com diferentes níveis de substituição de glicerina após 48 horas de incubação *in vitro* em meio de cultura.

Forragens	Níveis de Glicerina				Equações	R ²	P
	0	30	50	70			
C. elefante	71,963 ^c	168,033 ^a	169,133 ^a	166,267 ^b	$\hat{Y} = 93,957 - 1,330x$	0,6782	0,0010
Cana-deaçúcar	85,440 ^b	76,453 ^c	85,547 ^d	67,940 ^d	$\hat{Y} = 85,854 + 0,186x$	0,1763	0,1742
Silagem de milho	130,237 ^a	106,643 ^b	116,130 ^c	117,453 ^c	$\hat{Y} = 123,431 + -0,155x$	0,1662	0,1884
C. brachiaria	121,633 ^a	145,700 ^a	143,800 ^b	237,267 ^a	$\hat{Y} = 108,062 - 1,441x$	0,6912	0,0008

*Médias seguidas da mesma letra nas colunas diferem significativamente a nível de 5% no teste de tukey.

Analisando os níveis de substituição das forragens pela glicerina individualmente, observa-se que no nível de 30% e 50% de substituição, o capim elefante produziu o maior volume final da produção de gás 168,03 e 169,11 mL g⁻¹ de MS incubada ($p < 0,05$), enquanto a cana-deaçúcar apresentou o menor volume com 76,45 e 85,54 mL, respectivamente. Para o nível de 70% de glicerina o capim brachiaria apresentou o maior volume final da produção de gás 237,26 mL g⁻¹ de MS incubada, enquanto a cana-de-açúcar apresentou o menor volume com 67,94 mL ($p < 0,05$). As médias da produção de gás total para o capim elefante e brachiaria, demonstrado na tabela 3, obteve os valores maiores para o nível de 50% e 70%, com 169,13 mL e 237,26 mL, respectivamente.

Tabela 4 – Teor médio da produção de pH das forragens com diferentes níveis de substituição de glicerina após 48 horas de incubação *in vitro* em meio de cultura.

Forragens	Níveis de Glicerina				Equações	R ²	P
	0	30	50	70			
C. elefante	6,643 ^a	6,086 ^b	5,970 ^b	5,920 ^b	$\hat{Y} = 6,544 + 0,010x$	0,7385	0,0003

Cana-de-açúcar	4,760 ^c	4,926 ^d	4,923 ^d	5,003 ^d	$\hat{Y} = 4,781 - 0,003x$	0,3812	0,0324
Silagem de milho	5,580 ^b	5,526 ^c	5,270 ^c	5,183 ^c	$\hat{Y} = 5,619 + 0,006x$	0,5953	0,0033
C. brachiaria	7,257 ^a	6,935 ^a	7,040 ^a	12,978 ^a	$\hat{Y} = 5,950 - 0,069x$	0,4758	0,0131

*Médias seguidas da mesma letra nas colunas diferem significativamente a nível de 5% no teste de tukey.

Os níveis apresentados de pH variaram entre as forragens e entre os diferentes níveis de glicerina ($p < 0,05$). No nível de 0% dos capins elefante e brachiaria os teores de pH foram 6,64; 7,25, respectivamente. A cana-de-açúcar e silagem de milho os teores foram de 4,76; 5,58, respectivamente (Tabela 4).

Quando a glicerina foi introduzida nos níveis de 30 e 50% apresentaram modificações, de 6,08; 5,97, de 5,52; 5,27 e de 4,92; 4,92, para as forragens de capim elefante, silagem de milho e cana-de-açúcar, respectivamente, diminuiu ($p < 0,05$). Já o capim brachiaria elevou o pH para 6,93; 7,04, respectivamente. O menor teor de pH apresentado foi pela cana-de-açúcar a nível de 0%, com 4,76, diferentemente do capim brachiaria que apresentou o maior teor de pH, a nível de 70%, com 12,97 ($p < 0,05$).

Discussão

Na composição química para os teores de fibra detergente neutro, fibra detergente ácido e lignina, o capim elefante e brachiaria apresentaram os maiores valores, o que influenciou diretamente nos efeitos da degradabilidade, pois quando as forragens apresentam maior teor proteico e menor teor de FDN permite uma ação mais eficiente dos microrganismos ruminais sobre o alimento. A redução do tempo de permanência do alimento no trato gastrointestinal com o aumento da taxa de passagem proporciona menor ação dos microrganismos ruminais e, com isso, maior escape de carboidratos e das proteínas da fermentação ruminal como aumento do fluxo desses nutrientes para o intestino delgado (PEREIRA et al., 2005).

Na composição química da glicerina, observa-se que os componentes com maior participação na glicerina são glicerol, água e lipídios. Os resultados para a degradabilidade *in vitro* da matéria seca apresentaram um comportamento linear, onde analisando cada nível, não apresentaram diferença significativa dentro das diferentes forragens, com exceção da cana-de-açúcar a nível 0% de glicerina apresentou 48,45%, o menor índice de degradabilidade (Tabela 2).

A degradabilidade *in vitro* da matéria seca apresentou um aumento, que está diretamente relacionado à quantidade de glicerol, apresentado pela glicerina, que afeta diretamente na fermentação, e na degradação do alimento no rúmen. Também o fato de não apresentar em seus constituintes as frações fibrosas, como FDN, FDA e lignina, que segundo Kozloski (2009) pode

influenciar diretamente na diminuição dos níveis de degradabilidade da matéria seca, pois quando há a presença desses constituintes fibrosos, principalmente a lignina, tende a aumentar a fração indigerível, conseqüentemente reduzindo a porção digerível, o que não ocorre com a glicerina.

O crescente aumento da produção de gás total referente ao acréscimo no nível de 0 a 30% substituição da glicerina, com o capim elefante e capim brachiaria, pode está relacionado a uma das formas de utilização do glicerol, que é através da sua fermentação pelas bactérias no rúmen (CIESLAK et al., 2013).

Observou-se redução de produção de gás no nível 0% em relação ao nível 30% de substituição por glicerina, verificando-se para silagem de milho valores de 130,24 e 106,65 e para cana-de-açúcar os valores de 85,44 e 76,45, para os níveis 0 e 30% de substituição da glicerina, respectivamente. Percebe-se uma redução na quantidade de gás produzido, isso pode ter relação efetiva com as altas quantidades de carboidratos na dieta, e a baixa quantidade fibrosa do alimento, desempenhando um papel fundamental no gasto energético do animal (IVAN et al., 2013). Como também a fermentação de tais substratos, pois a adição da glicerina a cana-de-açúcar e a silagem de milho acarretou numa maior ação das bactérias amilolíticas e a produção de ácido propiônico, afetando diretamente no pH ruminal, provocando uma redução e diminuição nos níveis da produção de gás total.

Observou-se que quando a glicerina foi substituída pelo capim elefante e capim brachiaria em apenas 30%, os seus respectivos valores aumentaram de 71,96% para 168,03% e 121,63 para 145,80, respectivamente, referentes às frações fibrosas encontradas nas forragens, aumentando a capacidade de fermentação, produzindo uma maior quantidade de gás total e obtendo um maior gasto energético.

O pH é um fator químico que influencia o crescimento microbiano e pode ser afetado pela dieta e por outros fatores correlacionados, como o nível de consumo, a proporção volumoso:concentrado e o manejo alimentar. O pH ruminal pode variar de 5,5 a 7,2, mas quando os valores estão abaixo de 6,0 pode inibir as bactérias fermentadoras de celulose e diminuir significativamente a eficiência de síntese de proteína microbiana, podendo ser encontrado em dietas ricas em concentrado, tendo em vista neste estudo a cana-de-açúcar e a silagem de milho em substituição com a glicerina, dentro de todos os níveis, apresentaram valores abaixo de 6,0, onde a glicerina no rumem proporcionou um efeito redução do pH, quanto ao capim elefante, no nível de 30% ocorreu também uma redução, de 6,64 para 6,08, se obtendo dentro dos limites exigidos. Já para o capim brachiaria apresentou um teor de pH adequado quando introduzido ao efeito da glicerina, no nível de 0% estava 7,25, caminhando para alcalinidade e no nível de 30% estava 6,93, teor de pH ideal. (PEGORARO, 2012).

Conclusão

Recomenda-se a inclusão de glicerina na dieta de ruminantes no valor aproximado de 30%, com base na matéria seca, pois a inclusão de glicerina em torno deste nível proporcionou maior digestibilidade da matéria seca, pH e produção de gás total. O capim brachiaria e o capim elefante desempenharam, um grande aproveitamento sobre o efeito da glicerina.

Agradecimentos

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), a FAPEMIG (Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de Minas Gerais) e a EMBRAPA Gado de Leite pelo auxílio ao projeto de pesquisa.

Referência Bibliográfica

CIESLAK, A., SZUMACHER-STRABEL, M., STOCHMAL, A., OLESZEK, W. Plant components with specific activities against rumen methano-gens. **The Animal Consortium** **2013**, v.7, n 2, p 253–265,2013.

CLEEF, E.H.C.B.V., EZEQUIEL, J.M.B., D'AUREA, A.P. FÁVARO, V.R., SANCANAR, J.B.D. Crude glycerin in diets for feedlot Nellore cattle. **R. Bras. Zootec.**, v.43, n.2, p.86-91, 2014.

FÁVARO, V. R. **Utilização de glicerina, subproduto do Biodiesel, na alimentação de bovinos**. 2010. 59 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal, 2010.

IVAN, M., PETITA H. V., CHIQUETTEA J., WRIGHT A. D. G. Rumen fermentation and microbial population in lactating dairy cows receiving diets containing oilseeds rich in C-18 fatty acids. **British Journal of Nutrition**, v. 109, n.07, p. 1211-1218, 2013.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos ruminantes**. Editora da UFSM, 2.ed. 216 p., Santa Maria, 2009.

OLIVEIRA, J.S., ANTONIASSI,R., FREITAS, S.C. MÜLLER, M.D. Chemical composition of glycerin produced by biodiesel plants in Brazil and potential utilization in animal feeding. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.43, n.3, p.509-512, 2013.

PEGORARO, J.; SALEM, N. F. M.; ANDREAZZI, M. A.; SANTOS, J. M. G. Uso de Glicerina na Alimentação Animal. VI Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica, **Anais**, 2012.

PEREIRA, E.S.; ARRUDA, A.M.V.; MIRANDA, L.F. et al. Importância da inter-relação carboidrato e proteína em dietas de ruminantes. **Semina**, v.26, n.1, p.125-134, 2005.

SAS - STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **Institute Inc. User's Guide**, Cary, USA, 2003.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Editora UFV, Viçosa, 2002.

SNIFFEN, C. J., O'CONNOR J. D., VAN SOEST P. J., FOX D. G., RUSSELL J. B. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. II - Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 11, p. 3562-3577, 1992.

TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two stage technique for the in vitro digestibility of forage crops. **Journal of the British Grassland Society**, Cambridge, v. 18, n.2, p. 104-111, 1963.

VALADARES FILHO, S.C., SILVA, F.F., ROCHA JÚNIOR, V.R., CAPPELLE, E.R. Tabelas de composição de alimentos e exigências nutricionais para bovinos no Brasil. In: BITTENCOURT et al. (Eds.) Simpósio de produção de gado de corte, 2, Viçosa, 2001. **Anais...** Viçosa: UFV, p.291-358, 2001.

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

VASCONCELOS, Y. Glicerina, resíduo bem-vindo do biodiesel e as pesquisas em destaque. **Revista Fapesp**, Ed 196, 2012.

VITTI, D. M. S., ABDALLA, A. L., SILVA FILHO, J. C., MASTRO, N. L. D., MAURICIO, R., OWEN, E., MOULD, F. Misleading relationships between in situ rumen dry matter disappearance, chemical analyzed and in vitro gas production and digestibility, of sugarcane baggage treated with varying levels of electron irradiation and ammonia. **Animal Feed Science and Technology**, p.145-153, 1999.

XIN, H; YU, P. Chemical Profile, Energy Values, and Protein Molecular Structure Characteristics of Biofuel/Bio-oil Co-products (*Carinata Meal*) in Comparison with Canola Meal. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.61, n.16, p. 3926–3933, 2013.

CAPÍTULO 2

In vitro production of volatile fatty acids, ammonia, methane and carbon dioxide glycerin instead of different fodder for feeding cattle

(Manuscrito a ser enviado ao periódico Asian Australian Journal Animal Science)

CAPÍTULO 2

In vitro production of volatile fatty acids, ammonia, methane and carbon dioxide glycerin instead of different fodder for feeding cattle

Lívia Soares Silva¹; Aderbal Marcos Azevedo Silva²; Leilson Rocha Bezerra³; Heloisa Carneiro⁴

RESUMO: Objetivou-se avaliar a produção de gases, e ácidos graxos voláteis da glicerina em substituição a quatro espécies forrageiras mediante o uso da técnica semi automática in vitro, usando um delineamento estatístico com 4 tratamentos e 4 repetições. Os tratamentos consistiram na substituição da glicerina pelos níveis crescentes 0%, 30%, 50% e 70% das forragens: capim elefante, cana-de-açúcar, silagem de milho e capim brachiaria. O capim brachiaria e o capim elefante desempenharam para as variáveis de produção do metano, dióxido de carbono e Nitrogênio Amoniacal um efeito positivo sobre a qualidade da forragem com a glicerina. A produção de acetato, com a adição da glicerina os valores decresceram, com exceção do capim elefante, que aumentou seus percentuais até o nível de 50%, que foi de 26,51 para 26,62 e 28,60, respectivamente. E o capim elefante desempenhou um efeito positivo sobre a qualidade da forragem com a glicerina, para a produção dos Ácidos Graxos Voláteis.

[**Keywords:** Acetate, [Butyrate](#), N-NH₃, Propionate, VFAs]

¹ Mestranda do programa de pós-graduação em zootecnia – UFCG, Patos/PB, Brasil, Rua Luzia Ferreira Leitão -108, Patos/PB. E-mail: livia.gba18@gmail.com

² Prof. Dr. da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Patos, Paraíba UFCG, Brasil, CEP: 58708-110., e-mail: aderbal@pq.cnpq.br

³ Prof. Dr. da Universidade Federal do Piauí, Campus Professora Cinobelina Elvas, Bom Jesus, Piauí, UFPI, Brasil, e-mail: leilsonl@ufpi.edu.br

⁴ Dr^a da Embrapa Gado de Leite, Minas Geras, Brasil

INTRODUÇÃO

O consumidor de produtos cárneos e lácteos têm sentido no bolso as alterações do varejo nos preços dos produtos, seja *in natura* ou seus derivados, principalmente os referentes aos pequenos produtores. A explicação a essas mudanças se dá devido as alterações climáticas, influenciando diretamente nas culturas, de forragens e grãos, das quais atendem mais de 90% da dieta de bovinos.

Neste sentido, os coprodutos originados na cadeia produtiva do biodiesel no Brasil têm sido estudados como possíveis ingredientes de dietas para ruminantes, reduzindo os custos de produção. Estudos e técnicas que caracterizem o metabolismo ruminal destes coprodutos, como a técnica de produção de gases *in vitro*, são necessários para identificação de potenciais coprodutos passíveis de serem utilizados com eficiência na dieta de ruminantes em substituição a ingredientes convencionais (Mizubuti et al., 2011).

Dentre estes coprodutos, a glicerina obtida do processo de transesterificação do óleo para biodiesel, apresenta da na forma bruta surge como alternativa. Entretanto devido a presença de impurezas de metais pesados, e excesso de lipídeos e metanol, quando não bem utilizado pode causar impactos no consumo, na digestibilidade dos componentes da dieta e no desempenho animal. (Pegoraro, 2012).

O principal componente da glicerina é o glicerol, altamente energético, estando presente em alimentos e no metabolismo animal e tem potencial de uso como substituto parcial dos grãos de cereais ou outros ingredientes ricos em amido na alimentação animal. O metabolismo do glicerol pode ocorrer por duas vias, através da absorção direta pelo epitélio da parede ruminal ou pela transformação em ácidos graxos voláteis (AGVs) pelas bactérias ruminais, principalmente, o ácido propiônico. E no fígado, tanto o glicerol como o propionato são transformados em glicose por gliconeogênese (Cleef et al., 2014).

No rúmen, o glicerol sofre fermentação e tem como principal produto o ácido propiônico, que é um precursor de ácidos graxos e da glicose metabólica em ruminantes; com a utilização da glicerina, a inclusão de altas quantidades de concentrado na dieta, que poderiam prejudicar o desempenho do animal, poderá ser reduzida (Fávaro, 2010). Durante este processo ruminal, ocorre a produção de gases (CO₂ e CH₄). A produção de dióxido de carbono e metano pelas bactérias ruminais e intestinais (*Methanobrevibacter* spp. e *Methanomicrobiummobile*) pode variar de 2% a 12% da energia bruta do alimento ingerido, com uma perda média de 6%, o que tem levado a atividade pecuária a ser apontada como uma importante fonte produtora de GEE (gases do efeito estufa), em função do dióxido de carbono

e metano emitido. Além disso, a manutenção e o desenvolvimento da população microbiana ruminal ativa, depende da manutenção do ambiente ruminal em condições adequadas e do aporte de ácidos graxos voláteis para a produção de proteína microbiana (Oliveira et al., 2013).

Assim, objetivou-se a produção de gases, com a determinação da quantidade produzida de metano, dióxido de carbono, NNH_3 e ácidos graxos voláteis de glicerina em de substituição a quatro a espécies forrageiras.

MATERIAL E MÉTODOS

Local, amostragem das forragens e do coproduto

A pesquisa foi desenvolvida no Campo Experimental de Coronel Pacheco, Minas Gerais, de propriedade da Embrapa Gado de Leite – CNPGL, na região da Zona da Mata.

No experimento foram utilizadas quatro fontes de espécies forrageiras, sendo elas o capim elefante, a silagem de milho, o capim brachiaria e cana de açúcar, proveniente da produção no campo experimental da Embrapa em Coronel Pacheco em Minas Gerais. Além destes, o coproduto glicerina oriundo das indústrias de processamento ou/e da extração de óleo vegetal para a produção de biodiesel, onde foram coletadas aproximadamente, 300g de amostra. Posteriormente, as amostras foram levadas para o laboratório de apoio, onde foram embaladas e armazenadas, permanecendo refrigeradas a 10°C aguardando o início das análises.

Posteriormente as amostras foram descongeladas, pré-secas em estufa de ventilação forçada a 55°C, durante 72 horas, moídas em moinho do tipo Wiley dotado de peneira de 5 mm, acondicionadas em sacos plásticos, previamente identificados e seguidas para Laboratório de Análise de Alimentos da Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora, MG.

No laboratório, as amostras referentes a cada uma das forragens e as do coproduto estudado, foram misturadas e homogeneizadas para constituírem uma única amostra. Desta amostra, uma porção (100g) foi destinada às análises químicas e o restante do material amostrado foi conduzido para formulação das dietas.

Foi adotada uma formulação discriminada para avaliação do nível de glicerina na dieta, em substituição das forragens pelo coproduto, com uma relação 100/0, 70/30, 50/50 e 30/70% entre volumoso e glicerina, respectivamente.

Determinações da composição química

As análises laboratoriais para determinação da composição química, digestibilidade e técnica de produção de gás foram realizadas no laboratório de análise de alimentos da Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora, MG.

As determinações da composição química iniciaram após a formulação e identificação das amostras, onde foi realizada uma pré-secagem em estufa de ventilação forçada a 55°C, durante 48 horas, seguido pela moagem em moinho do tipo wiley dotado de peneira 1mm para execução das análises.

As amostras foram submetidas às análises química para determinações de: matéria seca (MS) em estufa a 105°C, fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), lignina (LIG) e as cinzas (CZ), segundo Silva e Queiroz (2002). Para os cálculos de obtenção dos carboidratos totais (CT), aplicou-se a equação $CT = 100 - (PB\% + EE\% + Cinzas\%)$, descrita por Sniffen et. al. (1992). A amostra da glicerina foi submetida às análises química para determinações de glicerol, umidade, cinzas, óleo, metanol, sódio (Na), fósforo (P), potássio (Ca).

Ensaio in vitro de digestibilidade

O ensaio de digestibilidade in vitro da matéria seca (DIVMS) foi utilizada a metodologia de Tilley e Terry (1963). Para obtenção da digestibilidade in vitro foram utilizados 3 bovinos fistulados. O conteúdo ruminal foi coletado pela manhã, sendo transferidos para garrafas térmicas previamente aquecidas a 39°C e levados imediatamente ao laboratório. No laboratório o líquido ruminal foi filtrado, utilizando peneira fina. Posteriormente, foi adicionado ao líquido de rúmen a solução mineral tampão mantendo em banho maria a 39°C com injeção contínua de CO₂. Em seguida as amostras foram encaminhadas ao incubador, permanecendo em estado de rotação por 72 horas. Dentro das 48 horas foi adicionado aos incubadores os peptídeos, agindo como um composto intermediário para a ação dos microrganismos.

Ensaio in vitro de produção de gases

No ensaio para determinar a produção de gás foram pesados 0,5g de matéria seca (MS) da amostra, introduzidos para um saco de ANKOM®(F57) com 6 repetições por tratamento, selados e colocados dentro de frascos de vidro de soro do tipo cor-âmbar de 50 ml, previamente lavados com água destilada, secos em estufa e identificados.

Em seguida foi feita a coleta do conteúdo ruminal, de três vacas holandesas, com peso médio de 600kg, fistuladas no rumem, transferindo o material para garrafas térmicas previamente aquecidas a 39°C e levados rapidamente ao laboratório onde o conteúdo ruminal foi homogeneizado e filtrado em tecido de

algodão, permanecendo em banho-maria a 39°C sob saturação de CO₂, posteriormente, foi adicionada as soluções, tampão, macro e micro minerais, resazurina e o meio B. Para preparação do meio de cultura utilizou-se preparo do conteúdo ruminal e solução tampão, em proporção 5:1 (VITTI et al. 1999).

Foi transferindo o inoculo (30 ml) para frascos de incubação, totalizando 102 frascos sendo seis repetições para cada tratamento, dos quais seis eram do grupo controle (brancos) que tiveram a função de determinar a produção de gás proveniente do conteúdo ruminal para futuras correções da produção líquida de gases. Posteriormente foram lacrados e colocados em uma incubadora de agitador orbital cremalheira, fixado em 120 oscilações por minuto, a 39°C.

Os parâmetros de produção de gases in vitro de cada frasco foram medidos as 3, 6, 12, 24, e 48 horas após a incubação utilizando um aparelho semiautomático de deslocamento de água graduado em ml. Ao completar às 48 horas da incubação os sacos de ANKOM ® com as forragens foram removidas e introduzidas no gelo, para interromper a fermentação, e em seguida lavados com água abundante e secos em estufa a 55°C durante 48 horas. Após este processo determinou-se a degradabilidade aparente da matéria seca (DAMS) obtida pela diferença entre o peso da matéria seca da amostra e o peso após o processo de incubação. Após a última medição do gás (48h), foi coletado uma fração do mesmo utilizando uma seringa de 30 cc e transferido imediatamente para frascos de cor âmbar de 20 cc a vácuo, para conservação das amostras, a qual foi analisada a concentração de CH₄ e CO₂ por cromatografia gasosa (Fedorak e Hrudey, 1983).

O metano foi expressa em mg de CH₄ g⁻¹ de MS desaparecido da produção total de gás mL g⁻¹ de MS incubada.

Para determinação, que identificava e quantificava os tipos e níveis dos ácidos graxos voláteis (AGVs), foi coletado uma porção (10 mL) líquida do meio de cultura após a degradabilidade (48 h) e adicionado ao meio de 2 mL de ácido metafosfórico (20%) para conservação da amostra, em seguida armazenado em freezer até posteriores análises (Holtshausen et al., 2009). Para identificação e quantificação do nitrogênio amoniacal (N-NH₃), foi coletado uma fração líquida do meio de cultura (10 mL) após a digestibilidade (48 h) e adicionado ao meio 0,4 mL O ácido sulfúrico, H₂SO₄ a 50% para conservação da amostra, em seguida armazenado em freezer até posteriores análises (Holtshausen et al., 2009).

Análise estatística experimental

A análise estatística da produção dos gases de metano, dióxido de carbono, ácidos acético, propiônico, butílico e NNH_3 da MS foi através de um delineamento inteiramente ao acaso num arranjo fatorial 4x4 (forragens e níveis de substituição da glicerina), submetidos a uma análise de variância (PROC ANOVA) aplicando o teste de tukey ($p < 0,05$), utilizando também o modelo estatístico para regressão (PROC REG) (SAS, 2003).

RESULTADOS

Analisando os resultados da composição química (Tabela 1), verificou-se que o Capim elefante apresentou maiores níveis de matéria seca (MS) 882,3g/kg e proteína bruta (PB) 126,1g/kg, acrescentando a forragem uma qualidade positiva, diferentemente dos seus níveis de fibra detergente ácido (FDA) 351,1g/kg e lignina (LIG) 144,4g/kg que apresentaram os maiores níveis em relação aos demais produtos estudados, influenciando diretamente nos efeitos digestíveis deste capim no rúmen animal.

A composição química apresentou em suas forragens características diferentes, o cana-de-açúcar apresentou os menores níveis de matéria seca (MS) 271,4g/kg, proteína bruta (PB) 22,5g/kg e extrato etéreo (EE) 11,9g/kg, afetando diretamente na exigência do bovino, que caracterizou o menor nível da digestibilidade da matéria seca (DIVMS) 554,6g/kg. Já a silagem de milho apresentou menores níveis de fibra detergente neutro (FDN) 469,3g/kg, fibra detergente ácido (FDA) 314,5g/kg, caracterizado dentro das forragens o menos fibroso e o capim brachiaria caracterizou-se pelos maiores níveis de extrato etéreo (EE) 32,2g/kg, cinzas (CZ) 86,1g/kg e digestibilidade da matéria seca (DIVMS) 652,0g/kg, possibilitando a forragem um efeito positivo.

Apresentando a composição química da glicerina podem-se avaliar seus constituintes que são formados em sua maioria de glicerol 811,6g/kg. A glicerina é formada também de umidade 124,1g/kg, cinzas 57,1g/kg e óleo 4,7g/kg, metanol 0,2g/kg. Destacando-se os níveis de minerais, com sódio 21,43 mg/kg, fósforo 929,0 mg/kg, e o potássio 6,00 mg/kg.

Os resultados encontrados na (Tabela 2) apresentaram os valores médios para a produção de metano (CH_4), referentes às forragens com diferentes níveis de glicerina. Dentre os resultados verificou-se que todas as forragens e níveis diferiram estatisticamente entre si, e apresentou dentro das forragens, a cana-de-açúcar e a silagem de milho, um efeito quadrático de regressão.

E o capim elefante (0,77%) no nível de 0% apresentou o menor teor de metano ($p < 0,05$), enquanto que o capim Brachiaria (25,20%) no nível de 30% apresentou o maior teor de metano. O capim brachiaria foi o único que mitigou metano, diminuindo, em escala decrescente, os valores a cada nível, apesar de que no nível de 0% o teor de metano encontrava-se consideravelmente elevado, com 25,20%.

O capim elefante e a cana-de-açúcar apresentaram uma maior produção de metano a cada nível de substituição inserido, onde no capim elefante os valores passaram de 0,77% no nível 0%, para 15,93 no nível de 30% e na cana-de-açúcar os valores atingiram de 2,18% no nível 0%, para 8,44 no nível de 30%. A silagem de milho obteve um crescente aumento, porém não significativo ($p > 0,05$), mas apresentou valores diferentes, com 9,04% no nível 0%, para 11,913 no nível de 30%.

Os resultados apresentados para a produção de dióxido de carbono in vitro apresentaram em quase todas as forragens analisadas, comportamento linear ($p < 0,05$), com exceção da cana-de-açúcar e silagem de milho que apresentou com comportamento quadrático, que ao analisar cada nível individualmente, apresentaram diferença significativa dentro das diferentes forragens. O nível 0% (controle) diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) do capim brachiaria e da silagem de milho, variando de 4,86% á 39,55%.

Analisando os níveis de substituição das forragens pela glicerina individualmente, observa-se que no nível de 30%, 50% e 70% de substituição, o capim elefante produziu o maior ($p < 0,05$) volume final da produção de gás 103,94%, 120,42% e 120,92% mL g⁻¹ de MS incubada, enquanto o capim brachiaria apresentou o menor volume com 5,23%, 5,23% e 7,36% mL, respectivamente.

As médias da produção de CO₂ do capim elefante oscilaram entre os níveis iniciais, demonstrado na que obteve valores elevados, com 9,97% á 0% e 103,94% á 30%, respectivamente. A cana-de-açúcar e a silagem de milho apresentaram um aumento crescente entre o nível de 0% (controle) e no nível de 30% de ingestão do substrato, variando na silagem de milho de 32,240% á 65,610% mL e na cana-de-açúcar de 39,557% á 46,833% mL, respectivamente.

Os valores médios para a produção de nitrogênio amoniacal (NNH₃), referentes às forragens com diferentes níveis de glicerina diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) entre si e demonstrou um comportamento linear de regressão.

O capim elefante (21,46%) no nível de 0% apresentou o maior teor de nitrogênio amoniacal, enquanto a cana-de-açúcar (0,06%) no nível de 0% apresentou o menor teor de nitrogênio amoniacal ($p < 0,05$). A silagem de milho e o capim elefante foram os que diminuiram, em escala decrescente, os

valores a cada nível, apesar de que no nível de 0% do capim elefante o teor de NNH_3 encontrava-se consideravelmente elevado em relação ao outras forragens, com 21,46%.

A forragem da cana-de-açúcar apresentou, relativamente, uma crescente produção de N-NH_3 a cada nível de substituição inserido, onde os valores atingiram de 0,06% no nível 0%, para 2,56 no nível de 30%. A silagem de milho obteve uma decrescente diminuição dos seus níveis de glicerina, apresentou valores diferentes, com 6,53% no nível 0%, para 2,63 no nível de 30%.

Os resultados apresentados para a produção de ácido acético *in vitro* apresentaram em quase todas as forragens analisadas, comportamento linear, com exceção da capim brachiaria que apresentou com comportamento quadrático, que ao analisar cada nível, apresentaram diferença significativa dentro das diferentes forragens. O nível 0% (controle) diferiu estatisticamente do capim brachiaria e da silagem de milho, variando de 12,60% á 37,72%, respectivamente (Tabela 3).

Analisando os níveis de substituição das forragens pela glicerina individualmente, observa-se que no nível de 30%, de substituição, a silagem de milho e o capim elefante produziu o maior volume final ($p < 0,05$) da produção de ácido acético 30,27% e 26,62% mL g^{-1} de MS incubada, enquanto a cana-de-açúcar e o capim Brachiaria apresentou o menor volume ($p < 0,05$) com 22,26% e 10,26% mL , respectivamente. O capim elefante não apresentou diferença estatística ($p > 0,05$) entre os níveis de substituição estudados.

Os resultados apresentados para a produção de ácido propiônico *in vitro* apresentaram em quase todas as forragens analisadas ($p < 0,05$), comportamento linear, com exceção do capim Brachiaria que não apresentou diferença ($p < 0,05$) entre as substituições. Ao analisar cada nível, observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre as diferentes forragens. Com exceção do capim elefante, que demonstrou em seus dados um comportamento quadrático. O nível 0% (controle) diferiu estatisticamente do capim elefante e do capim brachiaria, variando de 11,76% á 35,37%, respectivamente (Tabela 6).

As médias da produção de ácido propiônico para a cana-de-açúcar e capim elefante e silagem de milho oscilaram entre os níveis, que obteve valores maiores para cada nível inserido, onde de 0% a 30% cresceram de 22,27 á 25,62, 11,76 á 22,13 e de 19,63 á 24,22 mL , respectivamente.

Os resultados apresentados para a produção de ácido Butírico *in vitro* apresentaram em quase todas as forragens analisadas, comportamento linear, com exceção do capim elefante que apresentou com comportamento quadrático, que ao analisar cada nível, apresentaram diferença significativa dentro das

diferentes forragens. O nível 0% (controle) diferiu estatisticamente do capim brachiaria e do capim elefante, variando de 16,61 á 3,34 mL, respectivamente.

Analisando os níveis de substituição das forragens pela glicerina, não foi observa da diferença entre os níveis para a silagem de milho e a cana-de-açúcar ($p>0,05$), apenas para os capins ($p<0,05$). Os níveis de 30%, 50% e 70% de substituição, o capim elefante produziu o menor volume final da produção de ácido butílico 5,42%, 5,80% e 4,16% mL g⁻¹ de MS incubada, enquanto o capim brachiaria apresentou o maior volume com 22,24%, 28,10% e 32,83% mL, respectivamente.

A cana-de-açúcar e a silagem de milho apresentaram uma oscilação entre o nível de 0% (controle) e no nível de 30% de ingestão do substrato, variando na silagem de milho de 12,41% á 9,95% mL e na cana-de-açúcar de 10,07% á 11,61% mL, respectivamente.

DISCUSSÃO

Os ruminantes evoluíram uma estrutura de fermentação pré-gástrica espaçosa, com quatro compartimentos, onde existe uma relação simbiótica com os microorganismos que têm uma capacidade de quebrar polissacarídeos estruturais complexos (celulose e hemicelulose) em compostos que podem ser absorvidos pelo animal. Essa adaptação permite a utilização de diferentes forragens produzidas e utilizadas como fontes alimentares. Porém este processo fermentativo, que ocorre principalmente na porção de rúmenretículo do trato gastrointestinal dos ruminantes, apresentam produtos finais, na sua maioria gases, que reduzem a eficiência deste processo e prejudicam o ambiente.

De acordo com os resultados encontrados a quantidade de gás metano produzido neste experimento diferiu muito entre as diferentes espécies de forragens, sobre o efeito da glicerina o capim elefante, a cana-de-açúcar e a silagem de milho elevaram seu percentual.

Este crescimento ocorreu pelo aumento da glicerina que proporcionou um maior efeito na produção de metano, que permiti manter a concentração de hidrogênio baixo, facilitando o crescimento de outras espécies de bactérias e uma fermentação mais eficiente (Cunningham, 1999).

Diferentemente das outras forragens, o capim Brachiaria diminuiu seus níveis de metano a cada nível de glicerina, que a 0% se apresentava relativamente alto em relação às demais espécies, com 25,20. A mitigação de metano neste estudo sobre o efeito da glicerina com o capim Brachiaria proporcionou um efeito diminuição nos níveis de gás metano ao ambiente. Segundo a Organização das Nações Unidas para

Agricultura e Alimentação (FAO, 2013), 18% dos gases de efeito estufa são emitidos por bovinos.

A proporção dos gases é dependente da ecologia do rúmen e do balanço fermentativo. Normalmente a quantidade de CO₂ produzida no retículo rúmen é cerca de 2 a 3 vezes superior à quantidade de metano, dados semelhantes foi demonstrado na pesquisa. Dentro do estudo pesquisado, a glicerina, nas forragens, com o capim elefante, a cana-de-açúcar e a silagem de milho trouxe um grande efeito na produção de dióxido de carbono, com 9,97 á 103,84; 32,24 á 65,61; 39,55 á 46,83, respectivamente. Entretanto, o capim Brachiaria apresentou um aumento não significativo entre os níveis de glicerina, com 4,86 á 5,23.

As produções de metano e de dióxido de carbono estão diretamente ligadas visto que a produção de metano é modulada principalmente pela presença de dióxido de carbono e de hidrogênio livres no ambiente ruminal, onde, a partir do hidrogênio livre, ocorre a redução do dióxido de carbono por microrganismos metanogênicos, com conseqüente formação de metano (Cieslak et al., 2013). Neste estudo a glicerina proporcionou ao capim brachiaria um efeito de diminuição dos seus percentuais de metano e aumento, mesmo que pequeno, para os de dióxido de carbono, caracterizando um efeito positivo ao substrato utilizado.

O nitrogênio amoniacal demonstrado neste experimento diferiu em todas as forragens, que de acordo com Ribeiro et al. (2001) a determinação da concentração de amônia permite avaliar o balanceamento da energia com a proteína da dieta, pois as altas concentrações de amônia estão relacionadas ao excesso de proteína degradada no rúmen e/ ou às baixas concentrações de carboidratos degradados no rúmen.

A glicerina utilizada, por ser um carboidrato, incrementou características diversas as forragens, onde o capim Elefante, que se encontrava com os níveis de nitrogênio amoniacal relativamente elevado em relação às demais forragens, com 21,46, que com a introdução da glicerina proporcionou um redução para 17,73, já a cana-de-açúcar encontrava-se baixo, com 0,06, onde com a glicerina aumentou seus níveis para 2,56.

A silagem de milho e o capim Brachiaria encontravam-se com valores semelhantes, para os valores de nitrogênio amoniacal, com 6,53 e 6,36, respectivamente, e quando inserido a glicerina obtiveram resultados diferentes, onde a silagem de milho reduziu seu nível consideravelmente para 2,63, onde a redução na concentração de Nitrogênio amoniacal, com níveis crescentes de glicerina, pode ser justificada pelo aumento na disponibilidade de energia ruminal, que possibilita maior utilização da amônia

para crescimento microbiano (Carvalho et al., 1997). Enquanto o capim brachiaria manteve-se relativamente estável, com uma pequena redução para 6,033.

De acordo com Ítavo et al. (2002), 5 mg de N/ 100 mL seriam o mínimo ideal e 19-23 mg N/ 100 mL o máximo ideal de fluido ruminal durante a atividade fermentativa. Baseando-se em tais percentuais a cana-de-açúcar foi à única que mesmo com a introdução da glicerina não atingiu o teor mínimo para ocorrência de máxima fermentação microbiana no rúmen. A silagem de milho quando introduzida à glicerina diminuiu seus percentuais para um nível fora do mínimo ideal, reduzindo a qualidade da forragem. Os capins elefante e brachiaria foram aqueles que com a introdução da glicerina desempenharam um efeito positivo quanto a produção de nitrogênio amoniacal, mantendo-se dentro nos níveis ideais para uma qualidade fermentativa.

A produção de acetato, com a adição da glicerina, os valores decresceram, com exceção do capim elefante, que aumentou seus percentuais até o nível de 50%, que foi de 26,51 para 26,62 e 28,60, respectivamente. Analisando os dados, observou-se que o capim brachiaria estava inicialmente com a produção de acetato baixa e quando se introduziu a glicerina a partir dos níveis houve um decréscimo até 50%, com 12,60, para 10,26 e 5,10, respectivamente, e no nível de 70% houve um crescimento maior que o inicial, com 35,93. Esta redução dos níveis de acetato no estudo da glicerina com as forragens pode está baseada na glicerina, pois em sua composição química não há compostos fibrosos, aqueles quais as bactérias celulolíticas utilizam o substrato da celulose para produção efetiva de ácidos graxos voláteis e principalmente os ácidos acéticos.

A produção do ácido propiônico *in vitro* houve um crescente aumento entre as forragens analisadas com exceção do capim brachiaria que reduziu seus valores até o nível de 50% de glicerina, com 35,37 para 25,44 e 23,34, respectivamente, e a partir de 70% seus níveis cresceram para 39,24. A glicerina proporcionou um aumento nos níveis de propionato, pois o glicerol quando sofre a fermentação e tem como principal produto o ácido propiônico, que é um precursor de ácidos graxos e da glicose metabólica em ruminantes (Fávaro, 2010).

A produção do ácido butírico *in vitro* houve um crescente aumento entre as forragens analisadas com exceção da silagem de milho que reduziu seus valores até o nível de 30% de glicerina, com 12,41 para 9,95, e a partir de 50% seus níveis cresceram para 12,72 e 13,521, respectivamente.

O capim brachiaria no nível de 0% estava relativamente alto e quando introduzida à glicerina os seus níveis se elevaram ainda mais, com 16,61 para 22,24. Este aumento das quantidades de ácido butírico

e propiônico pode ocorrer quando a dieta é rica em cereais, havendo um aumento do fluxo sanguíneo no epitélio ruminal, que por sua vez estimula o crescimento das papilas, ou também se a dieta dos ruminantes for significativamente alterada, esta transição tem que ser feita gradualmente para permitir que as papilas ruminais aumentem de dimensão, bem como, seja possível uma adaptação microbiana aos níveis crescentes de concentrado, podendo acontecer durante um período de adaptação entre 3 e 4 semanas necessários ao crescimento eficaz das papilas a fim de reduzir os riscos de acidose ruminal (Dirksen et al., 1985).

No entanto, os níveis de glicerina na ração de ruminantes dependem de diversos fatores entre eles: tolerância e adaptação do animal, manipulação da glicerina (alta densidade e viscoso). Sendo viabilizado uma avaliação *in vivo* para melhor aperfeiçoamento dos dados integrados neste estudo.

CONCLUSÃO

A glicerina pode ser adicionada às dietas de ruminantes em substituição ao milho ou outra fonte de energia, com o objetivo de reduzir o custo de produção.

Recomenda-se a inclusão de glicerina na dieta de ruminantes no valor aproximado de 30%, com base na matéria seca, pois a inclusão de glicerina em torno deste nível proporcionou um efeito qualitativo aos níveis metano, dióxido de carbono, Ácidos Graxos Voláteis e Nitrogênio Amônia.

O capim *brachiaria* desempenharam para as variáveis de produção do metano, dióxido de carbono e Nitrogênio Amônia um efeito positivo sobre a qualidade da forragem com a glicerina. E o capim elefante desempenhou um efeito positivo sobre a qualidade da forragem com a glicerina, para a produção dos Ácidos Graxos Voláteis.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), a FAPEMIG (Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de Minas Gerais) e a EMBRAPA Gado de Leite pelo auxílio ao projeto de pesquisa.

REFERÊNCIAS

37

Carvalho, A.U.; Valadares Filho, S.C.; Coelho da Silva, J.F. et al. Níveis de concentrado em dietas de zebuínos. 3. Eficiência microbiana e população de protozoários ruminais. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v.26, n.5, p.1007-1015, 1997.

Cieslak, A., Szumacher-Strabel, M., Stochmal, A., Oleszek, W. Plant components with specific activities against rumen methano-gens. *The Animal Consortium* 2013, v.7, n 2, p 253–265, 2013.

Cleef, E.H.C.B.V., Ezequiel, J.M.B., D`aurea, A.P. Fávoro, V.R., Sancanar, J.B.D. Crude glycerin in diets for feedlot Nelore cattle. *R. Bras. Zootec.*, v.43, n.2, p.86-91, 2014.

Cunningham, J.G. *Tratado de Fisiologia Veterinária*. (2ª edição), RJ: editora Guanabara. Koogan S.A, 1999.

Dirksen, G.U., Liebich H.G., Mayer E. 1985. Adaptive Changes of the ruminal mucosa and their function and clinical significance. *Bovine Pract.* V. 20, p. 116-120.

FAO. Food and Agriculture Organization. <http://www.fao.org> (12 de Janeiro de 2014).

Fávoro, V. R. Utilização de glicerina, subproduto do Biodiesel, na alimentação de bovinos. 2010. 59 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal, 2010.

Fedorak, P.M.; Hrudey, S.E. A simple apparatus for measuring gas-production by methanogenic cultures in serum bottles. *Environ. Technology Letters*. p.425-432, 1983.

Holtshausen, L., Chaves, A. V., Beauchemin, K. A., McGinn, S. M., Mcallister, T. A., Odongo, N. E., Cheeke, P. R., Benchaar, c. Feeding saponincontaining *Yucca shidigera* and *Quillajasa-ponaria* to

decrease enteric methane production in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.92, n.7, p.2809-2821, 2009.

Ítavo, L. C. V.; Valadares filho, S. C.; Silva, F. F., Valadares, R. F. D., , Leão, M. I., , Cecon, P. R., , Ítavo,

C. C. B. F, Moraes, E. H. B. K., Rennó, L. N., Paulino, P. V. R., Produção microbiana e parâmetros ruminais de novilhos alimentados com dietas contendo vários níveis de concentrado. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v.31, n.3, p.1553-1561, 2002 (supl.).

Lassey, K. R., Ulyatt, M. J., Martin, R. J., Walker, C. F., Shelton, I. D. Methane emissions measured directly from grazing livestock in New Zealand. *Atmospheric Environment*, v. 31, p. 2905-2914, 1997.

Mizubuti, I. Y., Ribeiro, E. L. A., Pereira, E. S., Pinto, A. P., Franco, A. L. C., Syperreck, M. A., Dórea, J. R. R., Muniz, E. B. In vitro rumen fermentation kinetics of some co-products generated in the biodiesel production chain by gas production technique. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 32, p.2021-2028, 2011(supl.1).

Rémond, B. Soudaya, E. Jouanyb, J. P. In vitro and in vivo fermentation of glycerol by rumen microbes. *Animal Feed Science and Technology*, v.41, p.121-132, 1993.

Ribeiro, K.G.; Garcia, R.; Valadares filho, S.C., Pereira, O. G., Cecon, P. R. Eficiência microbiana, fluxo de compostos nitrogenados no abomaso, amônia, pH ruminais em bovinos recebendo dietas contendo feno de capim-tifton 85 de diferentes idades de rebrota. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v.30, n.2, p.581-588, 2001.

SAS - Statistical Analysis System. Institute Inc. User's Guide, Cary, USA, 2003.

Silva, D. J., Queiroz, A. C. *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. Editora UFV, Viçosa, 2002.

Sniffen, C. J., O'connor J. D., Van soest P. J., Fox D. G., Russel, L J. B. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. II - Carbohydrate and protein availability. Journal of Animal Science, Champaign, v. 70, n. 11, p. 3562-3577, 1992.

Tilley, J.M.A.; Terry, R.A. A two stage technique for the in vitro digestibility of forage crops. Journal of the British Grassland Society, Cambridge, v. 18, n.2, p. 104-111, 1963.

Oliveira, J.S., Antonia, S.S.I.R., Freitas, S.C. Müller, M.D. Chemical composition of glycerin produced by biodiesel plants in Brazil and potential utilization in animal feeding. Ciência Rural, Santa Maria, v.43, n.3, p.509-512, 2013.

Van Soest, P.J. Nutritional ecology of the ruminant. 2 ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.

Vitti, D. M. S., Abdalla, A. L., Silva filho, J. C., Mastro, N. L. D., Mauricio, R., Owen, E., Mould, F. Misleading relationships between in situ rumen dry mater disappearance, chemical analyzed and in vitro gas production and digestibility, of sugarcane baggage treated with varying levels of electron irradiation and ammonia. Animal Feed Science and Technology, p.145-153, 1999.

Tabela 1 – Composição química das forragens e da glicerina utilizadas no experimento para avaliação no uso na dieta de ruminantes.

Alimentos	MS (g/kg)	PB (g/kg)	FDN (g/kg)	FDA (g/kg)	LIG (g/kg)	EE (g/kg)	CZ (g/kg)	DIVMS (g/kg)	CT (g/kg)
Capim Elefante	117,7	126,1	555,0	351,1	144,4	14,2	25,4	591,4	834,3
Cana-de-açúcar	271,4	22,5	518,2	362,3	40,4	11,9	48,5	554,6	917,1
Silagem de milho	157,3	62,5	469,3	314,5	29,7	22,2	51,7	607,0	863,6
Capim Brachiaria	129,2	122,2	556,2	277,7	34,7	32,2	86,1	652,0	759,5
Glicerina	Glicerol (g/kg)	Óleo (g/kg)	pH (g/kg)	CH4 (g/kg)	Umidade (g/kg)	Cinzas (g/kg)	Na (mg/kg)	Ca (mg/kg)	P (mg/kg)
	811,6	4,7	56,5	0,2	124,1	57,1	214,3	60,0	9290,0

*MS – Matéria Seca; PB – Proteína Bruta; FDN – Fibra Detergente Neutro; FDA – Fibra Detergente Ácido;

LIG – Lignina; EE – Extrato Etéreo; CZ – cinzas; DIVMS – Digestibilidade *in vitro* da Matéria Seca; CT

– Carboidratos Totais; CH4 – Metanol; Na – Sódio; P – Fósforo; Ca – Potássio.

Tabela 2. Teores médios da produção de CH₄, CO₂ e N-NH₃ de diferentes níveis de glicerina em substituição à forragens com após 48 horas de incubação *in vitro* em meio de cultura

Forragens	Níveis de Glicerina				Equações	R ²	P
	0	30	50	70			
1) Gás Metano (CH ₄)							
Capim Elefante	0,77 ^c	15,93 ^b	19,27 ^b	19,92	$\hat{Y} = 3,604 - 0,276x$	0,84	<0001
Cana-de-açúcar	2,18 ^c	8,44 ^d	9,28 ^c	8,94 ^c	$\hat{Y} = 2,241 - 0,277x - 0,002x^2$	0,71	0,0452
Silagem de milho	9,04 ^b	11,91 ^c	19,42 ^b	13,27 ^b	$\hat{Y} = 8,375 - 0,310x - 0,003x^2$	0,58	0,0662
Capim Brachiaria	25,20 ^a	23,70 ^a	20,53 ^a	20,10 ^a	$\hat{Y} = 25,366 + 0,079x$	0,74	0,0003
2) Dióxido de Carbono (CO ₂)							
Capim Elefante	9,97 ^c	103,94 ^a	120,42 ^a	120,92 ^a	$\hat{Y} = 23,790 - 1,600x$	0,80	<,0001
Cana-de-açúcar	32,24 ^b	65,61 ^b	71,25 ^b	56,04 ^b	$\hat{Y} = 31,963 - 1,769x - 0,020x^2$	0,61	0,0193
Silagem de milho	39,55 ^a	46,83 ^c	72,25 ^b	58,92 ^b	$\hat{Y} = 40,596 - 0,367x$	0,54	0,0064
Capim Brachiaria	4,86 ^d	5,23 ^d	5,23 ^c	7,36 ^c	$\hat{Y} = 4,510 - 0,031x$	0,64	0,0018
3) Nitrogênio Amoniacal (N-NH ₃)							
Capim Elefante	21,46 ^a	17,73 ^a	11,90 ^a	8,40 ^a	$\hat{Y} = 22,112 + 0,192x$	0,92	<,0001
Cana-de-açúcar	0,06 ^c	2,56 ^c	3,50 ^c	3,26 ^c	$\hat{Y} = 0,553 - 0,047x$	0,80	<,0001
Silagem de milho	6,53 ^b	2,63 ^c	1,40 ^d	0,70 ^d	$\hat{Y} = 5,963 + 0,083x$	0,88	<,0001
Capim Brachiaria	6,36 ^b	6,03 ^b	6,73 ^b	5,50 ^b	$\hat{Y} = 6,453 + 0,007x$	0,06	0,4587

Tabela 3. Teores médios da produção de ácidos graxos voláteis (AGVs) da glicerina em diferentes níveis de substituição de forragens com após 48 horas de incubação *in vitro* em meio de cultura

Forragens	Níveis de Glicerina				Equações	R ²	P
	0	30	50	70			

Ácido Acético							
Capim Elefante	26,51 ^b	26,6 ^b	28,60 ^a	24,69 ^b	$\hat{Y} = 27,084 + 0,012x$	0,01	0,8073
Cana-de-açúcar	24,89 ^b	22,26 ^b	23,00 ^b	21,37 ^b	$\hat{Y} = 24,543 + 0,044x$	0,43	0,0206
Silagem de milho	37,72 ^a	30,27 ^a	25,76 ^b	22,11 ^b	$\hat{Y} = 37,399 + 0,224x$	0,90	<,0001
Capim Brachiaria	12,60 ^c	10,26 ^c	5,10 ^c	35,93 ^a	$\hat{Y} = 14,023 + 0,788x - 0,015x^2$	0,79	0,0013
Ácido Propiônico							
Capim Elefante	11,76 ^d	22,13 ^b	27,79 ^a	18,56 ^b	$\hat{Y} = 11,255 - 0,675x - 0,007x^2$	0,48	0,0474
Cana-de-açúcar	22,27 ^b	25,62 ^a	25,14 ^b	27,77 ^a	$\hat{Y} = 22,546 - 0,070x$	0,45	0,0175
Silagem de milho	19,63 ^c	24,22 ^a	33,17 ^a	36,42 ^a	$\hat{Y} = 18,825 - 0,254x$	0,79	0,0001
Capim Brachiaria	35,37 ^a	25,44 ^a	23,34 ^c	39,24 ^a	$\hat{Y} = 30,149 - 0,018x$	0,01	0,8279
Ácido Butírico							
Capim Elefante	3,343 ^a	5,42 ^a	5,80 ^a	4,16 ^a	$\hat{Y} = 3,298 - 0,125x - 0,001x^2$	0,52	0,0198
Cana-de-açúcar	10,07 ^b	11,61 ^b	11,27 ^c	10,95 ^c	$\hat{Y} = 10,535 - 0,011x$	0,05	0,4869
Silagem de milho	12,41 ^a	9,95 ^b	12,72 ^b	13,52 ^b	$\hat{Y} = 11,335 - 0,021x$	0,11	0,2914
Capim Brachiaria	16,61 ^c	22,24 ^c	28,10 ^d	32,83 ^d	$\hat{Y} = 16,139 - 0,234x$	0,94	<,0001