



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
SISTEMAS AGROSILVIPASTORIS NO SEMIÁRIDO**

**DEGRADABILIDADE E PRODUÇÃO DE GASES “IN VITRO” DE
COPRODUTOS DA CADEIA DE BIODIESEL**

SIMONE VIEIRA ALVES

PATOS – PB

2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
SISTEMAS AGROSILVIPASTORIS NO SEMIÁRIDO**

**DEGRADABILIDADE E PRODUÇÃO DE GASES “IN VITRO” DE
COPRODUTOS DA CADEIA DE BIODIESEL**

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.

Simone Vieira Alves

Orientador: Prof. Dr. Aderbal Marcos de Azevêdo Silva

PATOS – PB

2013

A474d Alves, Simone Vieira.

Degradabilidade e produção de gases "in vitro" de coprodutos da cadeia de biodiesel. / Milenna Nunes Moreira. - Patos - PB: [s.n], 2013.

58 f.

Orientador: Professor Dr. Aderbal Marcos de Azevêdo Silva.

Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Zootecnia) - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Saúde e Tecnologia Rural.

1. Alimentação de bovinos. 2. Biodiesel - resíduos. 3. Gases de efeito estufa - avaliação. 4. Bovinos - alimentação alternativa. 5. Ruminantes - nutrição. 6. Gases in vitro - degradabilidade e produção. 7. Soja - degradabilidade. 8. Girassol preto - Degradabilidade. 9. Alimentação experimental de ruminantes. 10. Coprodutos do biodiesel I. Silva, Aderbal Marcos de Azevêdo. II. Título.

CDU:636.085.8(043)

Elaboração da Ficha Catalográfica:

Johnny Rodrigues Barbosa
Bibliotecário-Documentalista
CRB-15/626



**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: “Degradabilidade e produção de gases *in vitro* de coprodutos da cadeia de biodiesel”

AUTORA: SIMONE VIEIRA ALVES

ORIENTADOR: Prof. Dr. ADERBAL MARCOS DE AZEVÊDO SILVA

JULGAMENTO

CONCEITO: APROVADO


Prof. Aderbal Marcos de Azevêdo Silva
Presidente


Prof. Leilson Rocha Bezeira
1º Examinador


Prof. José Morais Pereira Filho
2º Examinador

Patos - PB, 30 de agosto de 2013


Profª. Ana Célia Rodrigues Athayde
Coordenadora

Dedico:

À Deus, pela vida e por ter me proporcionado chegar até aqui conquistando esse sonho e por me fazer acreditar que posso chegar mais longe. Aos meus pais Josefa e Severino por serem exemplos de caráter e honestidade, pessoas essas que sempre acreditaram no meu esforço e sucesso. Tudo que fiz até aqui e faço são dedicados a vocês que tanto fizeram e fazem por mim.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pelo dom da vida e por ter me dado a oportunidade de conseguir mais essa conquista.

A **minha família** pelo apoio incondicional em todas as etapas da minha vida.

Ao meu orientador **Dr. Aderbal Marcos de Azevedo Silva**, pela orientação, atenção e carinho durante todo o mestrado, sempre repassando conhecimentos e pela confiança no meu trabalho que serviram para o meu crescimento acadêmico.

Ao professor **Dr. Leilson Rocha Bezerra** por sua importante contribuição na fase de escrita dos artigos e por ser esse professor tão generoso repassando muitos conhecimentos que enriqueceram essa dissertação.

A pesquisadora da EMBRAPA-CNPG. **Dr^a. Heloisa Carneiro** pelo apoio, confiança e repasse dos dados que conduziram esta pesquisa.

Ao professor **Dr. José Morais Pereira Filho** por ter contribuído intelectualmente para engrandecer esse trabalho e pelos conhecimentos repassados durante todo o mestrado.

Ao secretário do mestrado de Zootecnia **Ari cruz** pela amizade, carinho e dedicação com todos os alunos e com o corpo docente do mestrando sendo exemplo de ser humano, valeu por tudo meu amigo.

A todos os **colegas de mestrado**, que fizeram parte da minha vida e que conseguimos alcançar nossos objetivos e que agora fazem parte do meu grupo seleto de amigos.

A **Fabíola Franklin** colega de mestrado que me transmitiu seus conhecimentos e me ajudou na finalização dos meus artigos, gostaria de ti dizer muito obrigado!

A meu amigo **Franklin Eudes** por ter me ajudado na formatação dos dados.

Enfim a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização desse sonho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	05
CAPÍTULO I Degradabilidade potencial e produção de gás <i>in vitro</i> de coprodutos da cadeia do biodiesel.....	07
Resumo.....	08
Abstract.....	09
Introdução.	10
Material e Métodos.....	11
Resultados.....	14
Discussão.....	16
Conclusões.....	18
Referências.....	19
CAPÍTULO II Fermentação ruminal e produção de AGVs e metano <i>in vitro</i> do capim elefante e coprodutos da indústria do biodiesel.....	22
Resumo.....	23
Abstract.....	24
Introdução.	25
Material e Métodos.....	26
Resultados.....	29
Discussão.....	37
Conclusões.....	40
Referências.....	40
2 CONCLUSÃO GERAL.....	42
ANEXOS.....	43

1 INTRODUÇÃO GERAL

O biodiesel é um combustível produzido a partir de óleos vegetais ou de gorduras de animais. Dezenas de espécies vegetais presentes no Brasil podem ser usadas na produção do biodiesel, entre elas soja, dendê, girassol, babaçu, amendoim, mamona e pinhão manso. O Brasil está entre os maiores produtores e consumidores de biodiesel do mundo, com uma produção anual, em 2010, de 2,4 bilhões de litros e uma capacidade instalada, no mesmo ano, para cerca de 5,8 bilhões de litros, segundo a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Bicompostíveis (ANP, 2010). A agência estimou ainda que a mistura de 5% de biodiesel ao óleo diesel consumido no país, trará uma economia na ordem de US\$ 1,4 bilhão por ano devido a queda das importações de diesel e reduzirá em 3% a emissão de dióxido de carbono (CO₂) em decorrência da queima do combustível no Brasil. A alimentação animal é uma das maiores fontes de despesa para o produtor, independente do tipo de criação, mesmo que os animais sejam submetidos ao sistema extensivo. Assim, os coprodutos gerados pela diversidade de materiais graxos utilizados na cadeia do biodiesel, como é o caso dos farelos de algodão, crambe, mamona, e as tortas de soja e girassol podem apresentar características desejáveis a um concentrado proteico de boa qualidade para a alimentação de ruminantes.

O domínio da tecnologia de utilização dos diversos tipos de coprodutos do biodiesel na alimentação animal ainda é escasso, dependendo do coproduto, bem como, o conhecimento do mesmo pode maximizar a produtividade pecuária e agregar valores ao processo produtivo do biodiesel (MIZUBUTI et al., 2011).

No sistema de produção animal, a alimentação representa o item de maior custo, sendo que está diretamente relacionado com a oferta de alimento de determinada região, tornando-se portanto, fator determinante para a viabilização do sistema produtivo. Assim, faz-se necessário para o setor, a minimização de custos por meio da busca de alternativas a substituição de itens da dieta que possam melhorar as margens de lucro da atividade, apresentando desempenho pelo menos semelhante aqueles obtidos com itens de uso já consagrado (CNA, 2010).

Além disso, outro fator é a questão da preservação ambiental, que envolve o uso racional de pastagens, o que limita a produção de ruminantes, visto que esses animais são considerados grandes produtores de gases do efeito estufa.

Dessa forma, pesquisas são realizadas buscando novas alternativas de alimentação que possam reduzir o custo e tornar a atividade sustentável, sendo uma atividade econômica eficiente, que promove um menor impacto possível no meio ambiente.

O Brasil apresenta grande potencial na produção de biodiesel, sendo atualmente utilizados frutos e sementes oleaginosas como soja (*Glycine Max*), canola (*Brassicinapus L.*), girassol preto (*Helianthusannus*), e nabo forrageiro (*Raphanussativus L.*), dentre outras, que tem produzido resíduos passíveis de serem utilizados como alimentos alternativos na nutrição de ruminantes como também na agricultura. A pecuária pode estabelecer um elo com a produção de biodiesel, pois no processo de industrialização do biodiesel são gerados muitos resíduos que podem ser empregados na alimentação de ruminantes visando proporcionar aumento na produtividade e mitigar a emissão de gases poluentes, diminuindo o aquecimento global. Para tanto, estudo e técnicas que utilizem o conhecimento da composição bromatológica das forrageiras tropicais e de coprodutos oriundos da cadeia do biodiesel, bem como o metabolismo ruminal destes, como a técnica de produção de gases *in vitro*, são necessários para a identificação de potenciais coprodutos passíveis de serem utilizados com eficiência na dieta de ruminantes em substituição a ingredientes convencionais.

Diante do exposto, esta pesquisa teve como objetivo avaliar a degradabilidade e produção de gás *in vitro* de coprodutos da cadeia de biodiesel.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AGENCIA NACIONAL DO PETROLEO, GAS NATURAL E BIOCMBUSTÍVEIS - ANP. **Boletim Mensal do Biodiesel**, Brasília, DF, outubro, 2010.

CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA AGRICULTURA - CNA. Composição da alimentação de confinamentos em Goiás, Mato Grosso e São Paulo. **Ativos da Pecuária de Corte**, ano 2 , ed.17. Brasília, 2010.

MIZUBUTI, I. Y. et al. Cinética de fermentação ruminal *in vitro* de alguns coprodutos gerados na cadeia do biodiesel pela técnica de produção de gás. **Semina: Ciências Agrárias**, v.32 (suplemento1), p2021-2028, Londrina,2011.

CAPÍTULO I

Degradabilidade potencial e produção de gás *in vitro* de coprodutos da cadeia do biodiesel

Degradabilidade potencial e produção de gás *in vitro* de coprodutos da cadeia do biodiesel

**Simone Vieira Alves^{*}, Aderbal Marcos de Azevedo Silva², Heloisa Carneiro³,
Leilson Rocha Bezerra⁴, Fabíola Franklin de Medeiros¹, José Morais Pereira
Filho², Milena Nunes Moreira¹**

* Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia- UFCG, Patos/PB, Brasil. Rua José Guedes-72, Catolé do Rocha/PB. E-mail: simonne_catole@hotmail.com.

¹ Mestranda do programa de Pós-Graduação em Zootecnia- UFCG, Patos-PB, Brasilemail: biulinhafranklin@hotmail.com

¹ Mestranda do programa de Pós-Graduação em Zootecnia- UFCG, Patos-PB, Brasil,email: millenna_veterinaria@hotmail.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.

² Prof. Dr.da Universidade Federal de Campina Grande , Centro de Saúde e Tecnologia Rural , Patos , Paraíba UFCG, Brasil, e-mail: jmorais@cstr.ufcg.edu.br

³ Pesquisadora Dra. EMBRAPA Gado de Leite, e-mail: heloisa@cnpqgl.embrapa.br.

⁴ Prof. Dr. da Universidade Federal do Piauí, Campus Professora Cinobelina Elvas, Bom Jesus, Piauí, UFPI, Brasil, e-mail: leilsonl@ufpi.edu.br.

Resumo: Objetivou-se avaliar a degradabilidade e a produção de gás pela técnica *in vitro* de diferentes coprodutos gerados pela indústria nacional do biodiesel (soja, canola, nabo forrageiro e girassol preto) sobre a produção de gases em quatro níveis (0, 30, 50 e 70%) de substituição ao capim elefante pelos coprodutos. O inóculo para incubação *in vitro* foi obtido de três vacas da raça Holandesa com fistulas ruminais. A produção de gás foi medida as 3, 6, 12, 24 e 48 horas após a incubação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em um arranjo fatorial 4x4, com os fatores representados pelos coprodutos e os níveis. Todos os coprodutos estudados apresentaram efeito significativo ($P < 0,05$) pelos níveis das dietas. A soja em 48 horas de incubação foi o coproduto que apresentou maior degradação, quando comparada aos demais, porém apresentou baixa produção de gás, conseqüentemente sendo o coproduto

mais eficiente e a menor degradabilidade foi obtida com o girassol preto. Todos os coprodutos estudados podem ser utilizados na dieta de ruminantes, sendo potenciais fornecedores de proteína.

Palavras-chave: Canola, Girassol Preto, Nutrição, Ruminantes.

Potential degradability and gas production in vitro of co-products of the biodiesel chain

Abstract:The objective of this research was to evaluate the degradability and gas production by the in vitro technique of different co-products generated by the domestic industry of biodiesel (soybean, canola, forragen a board black girasol) on the production of gas at four levels (0, 30 , 50 and 70%) of replacing the elephant grass by co-products. The inoculum for in vitro incubation was obtained from three Holstein cows with rumen fistulas. The gas production was measured 3, 6, 12, 24 and 48 hours after incubation. The experimental design was completely randomized in a 4 x 4 factorial arrangement, with the factors represented by the co-products and levels. According to the results all co-products studied showed significant effect ($P < 0.05$) by the diets. Soybeans in 48 hours of incubation was the byproduct that showed higher degradation compared to the others, but had low gas production, thus being the co-product more efficient and lower degradability was obtained with sunflower black. All studied byproducts may be used in the diet of ruminants, with potential suppliers of protein.

Keywords: Canola, **Black sunflower**, Nutrition, Ruminants.

1 Introdução

A pecuária brasileira possui papel de destaque no cenário mundial, uma vez que está presente na maior parte do território nacional, apresentando grande número de rebanhos. Os ruminantes representam aproximadamente 84% do efetivo rebanho total, tendo a maior participação os rebanhos bovinos e bubalinos, que juntos representam aproximadamente 214 milhões de cabeças, seguidos dos rebanhos ovinos e caprinos que representam o equivalente a 27 milhões de cabeças (IBGE, 2011). Esse expressivo rebanho de ruminantes apresentado e a área ocupada para sua criação, demonstram que a pecuária utiliza as pastagens como base da alimentação desses animais, e que o país apresenta grande potencial para produção de ruminantes.

No sistema de produção animal, o maior custo com a produção é representado pela alimentação, a qual está diretamente relacionada à oferta de alimento, a época do ano, constituindo-se em fator determinante para a viabilização do sistema produtivo. Dessa forma, o setor pecuário busca a minimização de custos por meio da introdução de alternativas à substituição de alimentos convencionais da dieta que resultem em melhores margens de lucro sem comprometer o desempenho (CNA, 2010).

Além do aspecto econômico, 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 (VIANA et al., 2013).

O Brasil tem se destacado no panorama mundial do biodiesel por sua grande diversidade em grãos, fontes de extração de óleo vegetal, e por sua extensa criação de ovinos, que fornecem gordura animal e sebo. Neste cenário, os coprodutos oriundos da cadeia produtiva do biodiesel no Brasil têm sido estudados como possíveis ingredientes de dietas para ruminantes, já que a utilização de fontes alternativas de energia é uma das grandes prioridades atuais, que vem contribuir significativamente para contornar os graves problemas ocasionados pelo desenvolvimento tecnológico e tem gerado diversos resíduos normalmente subutilizados em outras cadeias (RODRIGUES; RONDINA, 2013). Para isso, estudos e técnicas que caracterizem o metabolismo ruminal destes coprodutos, como a técnica de produção de gases *in vitro*, são indispensáveis para identificação de potenciais coprodutos passíveis de serem utilizados com eficiência na dieta de ruminantes em substituição a alimentos convencionais.

Assim, a determinação da quantidade de gases produzidos *in vitro* é um indicador da fermentação dos alimentos pela digestão microbiana, do qual o princípio básico está na relação entre a fermentação e a degradabilidade do alimento e entre estes resíduos da fermentação estão os gases dióxido de carbono (CO₂) e metano (CH₄). O uso da técnica de produção de gases apresenta muitas vantagens, no que diz respeito ao bem-estar animal, tamanho de amostra e custo. O fato mais importante é que descreve as cinéticas da atividade dos microrganismos em resposta a um substrato determinado (WILLIAMS, 2000).

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos dos níveis de coprodutos da cadeia do biodiesel sobre a degradabilidade e produção total de gás *in vitro* em substituição ao capim elefante na dieta de bovinos.

2. Material e Métodos

2.1 Local do experimento

Este trabalho foi desenvolvido no Campo Experimental de Coronel Pacheco, MG, de propriedade da Embrapa Gado de Leite - CNPGL, localizado na Zona da Mata de Minas Gerais.

2.2 Alimentos utilizados

Amostras de, aproximadamente, 300g de cada coproduto foram coletadas e enviadas ao Laboratório de Análise de Alimentos da Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora MG. Para as análises químicas, degradabilidade e de produção *in vitro* de gás. Foram utilizados como substratos para incubações *in vitro*, o capim elefante (*Pennisetum purpureum*) como controle e coprodutos resultantes da industrialização do biodiesel: soja (*Glycine Max*), canola (*Brassicinapus L.*), girassol preto (*Helianthusannus*), e nabo forrageiro (*Raphanussativus L.*).

Os coprodutos foram utilizados na forma de misturas simulando dietas, substituindo capim elefante (controle), nas seguintes proporções: 30/70, 50/50 e 70/30% (volumoso/coproduto). Os ingredientes das dietas após serem pré-secos a 55°C durante 48 horas, foram moídos a 1mm. Em seguida pesados 0,5g de matéria seca (MS) da amostra para um saco de ANKOM® (F57) com seis repetições/tratamento, selados e

colocados dentro de frascos de vidro de soro do tipo cor-âmbar de 50mL, previamente lavados com água destilada, secos em estufa e identificados.

2.3 Análises químicas dos alimentos

Os substratos compostos pelos coprodutos e pela forragem foram pré-secos em estufas de ventilação forçada a 60°C por 48 horas. Depois moídos em moinho do tipo Willey dotado de peneira com perfurações de 1,0mm para determinação da matéria seca (MS) em estufa a 105°C de acordo com os procedimentos gerais descritos por Silva e Queiroz (2002), proteína bruta (PB) pelo método Kjeldahl (AOC, 1995); fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) pelo método Van Soest (2006); e de extrato etéreo EE (SILVA; QUEIROZ, 2002).

Os carboidratos totais (CHOT) foram obtidos por intermédio da equação $100 - (\% \text{ PB} + \% \text{ EE} + \% \text{ Cinzas})$ descrita por Sniffen et al. (1992) (Tabela 1).

Tabela 1- Composição química (g/kg) do capim elefante e dos quatro substratos resultantes da industrialização do biodiesel com base na matéria seca.

Substrato	MS (g/kg)	PB (g/kg)	FDN (g/kg)	FDA (g/kg)	LIG (g/kg)	EE (g/kg)	CZ (g/kg)	CHOT	DIVMS (g/kg)
C. elefante	882,3	126,1	555,0	351,1	144,4	14,2	25,4	83,43	591,4
Coproductos									
Nabo Forrageiro	935,6	393,7	380,5	154,2	69,6	284,1	50,6	27,16	644,8
Soja	869,9	528,4	184,5	106,7	15,9	18,3	66,0	38,73	808,9
Girassol Preto	901,1	342,6	390,1	243,6	34,3	32,1	54,9	57,04	582,3
Canola	922,1	375,1	410,3	378,3	120,5	24,3	57,7	54,29	689,0

Onde: **MS**- matéria seca; **PB**- proteína bruta; **FDN**- fibra em detergente neutro; **FDA**- fibra em detergente ácido; **LIG**- lignina; **EE**- extrato etéreo; **CZ**- cinzas; **DIVMS**- digestibilidade *in vitro* da matéria seca.

2.4 Preparação para o meio de cultura

Para a coleta do líquido ruminal, utilizaram-se três vacas da raça Holandesa com peso médio de 600kg fístuladas no rúmen, sendo o líquido então transferido para garrafas térmicas previamente aquecidas a 39°C e levados imediatamente ao laboratório. No laboratório, o conteúdo ruminal foi homogenizado e filtrado em duas camadas de tecido de algodão, sendo mantido em banho-maria a 39°C sob saturação de CO₂, até serem adicionadas as demais soluções (tampão, macro e micro minerais solução de resazurina e meio B) para o meio de cultura.

Para preparação do meio de cultura foi utilizado o líquido ruminal e solução tampão (Vitti et al., 1999) em uma proporção de 5:1. O inóculo (30 mL) foi então transferido para os frascos de incubação, posteriormente lacrados e colocados em um agitador orbital cremalheira fixado em 120 oscilações por minuto em uma incubadora a 39°C.

2.5 Determinação da produção de gás

Foram incubados 126 frascos, seis destes contendo apenas o líquido ruminal e o meio de cultura tamponante como controle (brancos), utilizados para determinar a produção de gás proveniente do conteúdo ruminal para posterior correção da produção líquida de gases, os demais frascos corresponderam a seis repetições de cada tratamento.

Os perfis 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.

2.6 Determinação da degradabilidade da matéria seca

Após as 48 horas da incubação os sacos de ANKOM® com os resíduos foram removidos e colocados em gelo, para interromper a fermentação, em seguida lavados com água abundante e secos em estufa a 55°C durante 48 horas. A degradabilidade aparente da matéria seca (DAMS) foi obtida pela diferença de peso entre a matéria seca da amostra antes e após a incubação.

2.7 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado para avaliar a produção cumulativa de gases e a degradabilidade da matéria seca foi inteiramente ao acaso num arranjo fatorial 4 x 4 (coprodutos e níveis de substituição).

A produção de gás total e a degradabilidade da matéria seca (MS) foram submetidos a uma análise de variância (PROC ANOVA) onde nos efeitos de interação aplicou-se o teste Tukey ($P < 0,05$) para comparação das médias entre os coprodutos dentro de cada nível de substituição e dos níveis de substituição dentro de cada coproduto. Os resultados dos níveis crescentes foram interpretados estatisticamente através dos modelos de regressão pelo PROC REG do SAS (2003).

3. Resultados

Houve efeito de interação dos tipos de coprodutos e dos níveis de substituição nos valores de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) ($P < 0,05$). Ao analisarmos os coprodutos dentro dos níveis de substituição, verifica-se que ao nível de 30% de substituição ao capim elefante, o nabo forrageiro foi o coproduto que apresentou melhor digestibilidade ($P < 0,05$), não diferindo da soja ($P > 0,05$).

A DIVMS da soja foi 11% superior à do coproduto canola, e 15% maior que a DIVMS do girassol preto. Em relação ao nível de 50% de substituição, o coproduto do girassol preto apresentou a menor digestibilidade ($P < 0,05$), tendo sido 15% inferior quando comparada à digestibilidade da soja, e não diferindo entre si ($P < 0,05$).

Já no nível de 70%, o coproduto do girassol preto não diferiu do coproduto da canola e de nabo forrageiro ($P > 0,05$), mas todos os coprodutos aqui testados apresentaram valores inferiores ao da digestibilidade da soja ($P < 0,05$).

Os níveis de substituição do capim elefante dentro de cada coproduto influenciaram na DIVMS ($P < 0,05$). Os coprodutos da soja e do girassol preto apresentaram comportamento linear de forma diferente, sendo que à medida que se aumentava a porcentagem de coproduto da soja, aumentava 0,27% a degradabilidade da MS, enquanto que, no girassol preto à medida que aumentava sua participação por unidade percentual, reduzia 0,04% a degradabilidade.

Os coprodutos da canola e de nabo forrageiro descreveram um comportamento quadrático, sendo a máxima digestibilidade (61,62%) encontrada ao nível de 67,5% de substituição ao capim elefante pela canola, e 52,45% o ponto de mínima digestibilidade no nível de 55% para o nabo forrageiro.

Tabela 2- Percentual médio, probabilidade (P-value) e equações de regressão dos efeitos dependentes da digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS%) de coprodutos da produção de biodiesel em diferentes níveis de substituição do capim elefante, após 48 horas de incubação “*in vitro*” em meio de cultura.

Coproduto	Níveis de substituição				Equações de regressão	R ²	P-value
	0%	30%	50%	70%			
Soja	52,935	63,413 ^A	65,880 ^A	72,810 ^A	$\hat{Y}=53,53+0,27x$	0,82	0,0001*
Canola	52,935	56,477 ^B	62,015 ^A	57,892 ^B	$\hat{Y}=52,48+0,27x-0,002x^2$	0,44	0,04*

Nabo forrageiro	52,935	57,785 ^{AB}	62,658 ^A	58,075 ^B	$\hat{Y}=52,54+0,33x-0,003 x^2$	0,39	0,03*
Girassol preto	52,935	54,058 ^B	55,217 ^B	56,128 ^B	$\hat{Y}=52,84-0,04x$	0,24	0,01*

*Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey e R^2 coeficiente de regressão e p probabilidade

Verificou-se que houve efeito de interação ($P<0,05$) de coprodutos e dos níveis para a produção total de gás com o intervalo de tempo de 48 h.

Avaliando os coprodutos dentro dos níveis de substituição, verifica-se que, ao nível de 30% de substituição ao capim elefante, o coproduto da canola foi o que apresentou maior produção de gás ($P<0,05$), que semelhantemente ao coproduto do girassol preto ($P>0,05$) produziram em torno de 50% mais gás total que o coproduto da soja e de nabo forrageiro, sendo os dois últimos semelhantes entre si ($P>0,05$).

Em relação ao nível de 50% de substituição, o comportamento foi semelhante ao nível 30%, em que a menor produção foi verificada para o coproduto de nabo forrageiro que apresentou resultado semelhante ao da soja ($P>0,05$). O coproduto de nabo forrageiro produziu 55% menos gás total ($P<0,05$), quando comparado com o coproduto da canola, onde houve a maior produção.

Para o nível de 70% de substituição, o coproduto de nabo forrageiro apresentou menor produção de gás ($P<0,05$), diferindo dos demais coprodutos. Ao nível de 70% o coproduto da soja apresentou produção de gás total semelhante ($P>0,05$) à dos coprodutos do girassol preto e canola.

Quanto aos níveis de substituição do capim elefante dentro de cada coproduto, observar-se que o coproduto de nabo forrageiro descreveu um comportamento linear decrescente, ou seja, à medida que se aumentava uma unidade percentual desse coproduto, reduzia 0,15mL/g na produção total desse gás.

Os coprodutos da soja, canola e do girassol preto descreveram um comportamento quadrático para a produção de gás. Para o coproduto da soja, observou-se que 20,25% foi o nível que promoveu o ponto de mínima de 71,70% na produção de gases, já para o coproduto da canola o nível de 76% promoveu ponto máximo de 63,40%, e coproduto do girassol preto no nível de 61,5% promoveu ponto de máximo de 67% na produção total de gás.

Tabela 3- Teores médios, probabilidade (P-value) e equações de regressão dos efeitos dependentes da produção de gás total (mL/g) de coprodutos da produção de biodiesel em diferentes níveis de substituição do capim elefante após 48 horas de incubação “*in vitro*” em meio de cultura.

Coproducto	Níveis de substituição				Equações de regressão	R ²	P
	0%	30%	50%	70%			
Soja	72,167	68,3 ^B	96,1 ^B	137,3 ^A	$\hat{Y}=71,76+0,81x-0,02x^2$	0,67	0,002
Canola	72,167	140,1 ^A	150,1 ^A	145,0 ^A	$\hat{Y}=72,64+3,04x-0,02x^2$	0,96	0,0001
Nabo forrageiro	72,167	66,3 ^B	67,2 ^B	59,72 ^B	$\hat{Y}=72,25-0,15x$	0,29	0,005
Girassol preto	72,167	129,6 ^A	132,5 ^A	131,4 ^A	$\hat{Y}=73,05+2,46x-0,02x^2$	0,96	0,0001

*Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey R² coeficiente de regressão e p probabilidade

4. Discussão

A composição química dos coprodutos em análise (Tabela 1) difere das concentrações dos farelos convencionais desses mesmos ingredientes utilizados nas rações, principalmente no que se refere ao material fibroso (VALADARES, 2006).

Assumindo-se que o tempo médio de retenção do alimento no rúmen seja de 48 horas, quanto maior for à degradação até este tempo, melhor é a qualidade fermentativa do alimento (FACIOLA; BRODERICK, 2013). É possível visualizar na Tabela 2, que o coproduto da soja foi o que apresentou maior digestibilidade, sendo o nível de 70% de substituição do capim elefante pelo resíduo da soja o que promoveu melhor valor, isso pode ser atribuído por apresentar menor teor de FDN de 184,5g/Kg e EE de 18,3g/Kg e maior concentração de proteína (Tabela 1). A digestibilidade desse coproduto sugere que o coproduto da soja provoca melhor fermentação ruminal, em relação aos demais coprodutos estudados. O coproduto do girassol preto apresentou a menor taxa de digestibilidade, à medida que aumentou a unidade percentual desse coproduto, diminuiu a digestibilidade, fato que pode ser explicado devido ao elevado teor de fibra (390,1 g/Kg) e lignina (34,3 g/Kg). A presença de grande quantidade de compostos fenólicos, como é o caso da lignina, proporciona um aumento na fração indigerível do alimento e reduz a fração potencialmente digerível, o que reduz consideravelmente o desempenho dos animais (MIZUBUTI et al., 2011; BELACHEW et al., 2013).

Sabendo-se que a produção de gás está diretamente associada ao processo de fermentação microbiana no rúmen e conseqüentemente à degradabilidade do alimento

ingerido, após 48 horas de incubação, diferente do que ocorreu com coproduto da canola que em todos os níveis de substituição ao capim elefante promoveu maior produção cumulativa de gás, não diferindo entre si, o que pode ser explicado por apresentar maior teor de FDN. As bactérias celulolíticas e hemicelulolíticas, ativas fermentadoras de carboidratos estruturais, degradam celulose e hemicelulose através da enzima celulase, produzindo celobiose, que sofre a ação novamente destes microrganismos, gerando maltose. A degradação da maltose, via succinato, resulta principalmente na produção de acetato, CO₂ e hidrogênio, no processo fermentativo, contribuindo para uma maior produção de gás. Este processo gera muita perda de energia, onde para cada 4000Kcal de energia produzida, são produzidos em torno de 300 litros de CO₂ e 300 de CH₄. Porém este processo é de fundamental importância, pois a maior concentração de fibra gera um maior tempo de retenção do alimento no rúmen e aumento da taxa de salivacão, o que irá auxiliar no processo de manutenção de pH do rúmen e manutenção da microflora ruminal (BELANCHE et al., 2012).

Entre os coprodutos, aquele que mais se assemelhou ao da soja na digestibilidade e na produção de gás total, em todos os níveis de substituição, foi o coproduto de nabo forrageiro. O menor volume de gás total do coproduto de nabo forrageiro no nível 70% de substituição ao capim elefante pode ter ocorrido devido à alta concentração de EE deste coproduto. O alto valor energético das gorduras, fornecendo 2,25 vezes mais energia que os carboidratos e as proteínas, constituem o principal atrativo para seu uso nas rações, pois irá aumentar a eficiência alimentar de maneira notável (IVAN et al., 2013). Entretanto, a conveniência de adicionar gordura como fonte de energia metabolizável, contrasta com seu efeito deletério nos microrganismos ruminais, tornando-se um fator limitante.

Quando o nível de gordura excede de 5 a 7% da dieta, ou a dieta é rica em ácidos graxos insaturados, podem ocorrer distúrbios digestivos e redução no consumo. Além disso, os altos níveis de gordura no rúmen, onde há falta de agente emulsificante (bile) e enzimas comolipase, provocam interferências no processo digestivo por revestir o conteúdo do rúmen, particularmente na digestão da fibra. Além disso, poderá ocorrer redução linear do ganho de peso e do peso corporal dos animais, ou seja, produção de animais mais leves ao abate e, conseqüentemente, com carcaças menores. (SILVA et al., 2013; XIN; YU, 2013).

A maior produção de gás do coproduto do girassol preto e da canola, bem como da soja no nível de 70% , é resultado da degradação dos carboidratos fibrosos, podendo-

se deduzir que esta fração apresenta boa fermentação ruminal em função do equilíbrio encontrado entre energia e compostos nitrogenados fornecidos a microfauna ruminal, melhorando-se a degradação da fração fibrosa do alimento. Segundo Getachew et al. (2004), o volume de gases produzidos de um alimento em incubação reflete na produção de ácidos graxos de cadeia curta, que são a principal fonte de energia dos ruminantes.

Na presença destes compostos, 3 a 5% da biomassa microbiana no rúmen produzem CH₄. A reação é simples e se dá pela eliminação de hidrogênio a partir da combinação de H₂ e CO₂ de acordo com a seguinte equação: $CO_2 + 4H_2 = CH_4 + 2H_2O$ (MORGAVI et al., 2010; MORGAVI et al., 2012). O metano também pode vir de outras reações, incluindo a redução do ácido fórmico, metanol, metilamina, dietilamina, trietilamina, porém em escala modesta (WOLIN et al., 1997). O processo de metanogênese e a quantidade de gás CH₄ no rúmen estão diretamente correlacionados com a população de microrganismos e a saúde desta população, em que a adição de subprodutos contendo altas quantidades de gordura, pode se não acrescidos em quantidades adequadas, prejudicar a flora microbiana e reduzir os efeitos benéficos destas reações (CIESLAK et al, 2013).

O coproduto da canola foi o que demonstrou melhor disponibilidade de nutrientes para o crescimento dos microrganismos ruminais *in vitro*, e que o nível 76% foi o nível máximo, promovendo uma produção de 63,40mL de gás total (XIN; YU, 2013).

4 Conclusões

Todos os coprodutos analisados podem ser utilizados em substituição ao capim elefante, pois demonstraram serem alimentos alternativos que podem substituir alimentos convencionais, sem comprometer o desempenho e bem estar animal. Destacando o coproduto da soja no nível de 70% e o coproduto da canola no nível de 76% de substituição, por apresentarem um bom perfil de cinética de fermentação ruminal, promovendo maior degradabilidade com maior produção de gás total em relação aos outros coprodutos estudados. Sendo potenciais fornecedores de proteína na alimentação de bovinos, porém é necessário mais estudos em relação à ação da concentração de EE, presentes nesses coprodutos.

6 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.

7. Referências

BELANCHE, A. et al. Bacterial protein degradation by different rumen protozoal groups. **Journal Animal Science**, vol. 90, n. 12, p.4495-4504, 2012.

BELACHEW, Z. et al. Chemical composition and in sacco ruminal degradation of tropical trees rich in condensed tannins. **Czech Journal Animal Science**, vol.58, n. 4, p. 176–192, 2013.

CIESLAK, A. et al. Plant components with specific activities against rumen methanogens. **The Animal Consortium 2013**, vol.7, s 2, p 253–265,2013.

CNA - CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA AGRICULTURA. Composição da alimentação de confinamentos em Goiás, Mato Grosso e São Paulo. **Ativos da Pecuária de Corte**, ano 2, ed. 17.Brasília, 2010.

FACIOLA, A.P.; BRODERICK, G.A. Effects of feeding lauric acid on ruminal protozoa numbers, fermentation, and digestion and on milk production in dairy cows. **Journal Animal Science**, vol. 91, n. 5, p.2243-2253, 2013.

GETACHEW, G. et al. Relationship between chemical composition, dry matter degradation and *in vitro* gas production of several ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 111, n. 1-4, p. 57-71, Amsterdam, 2004.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Pecuária Municipal 2011**. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2011/tabelas_pdf> Acesso em: 20/08/2013.

IVAN, M. et al. Rumen fermentation and microbial population in lactating dairy cows receiving diets containing oilseeds rich in C-18 fatty acids. **British Journal of Nutrition**, vol. 109, n.07, p. 1211-1218, 2013.

MIZUBUTI, I. Y. et al. Cinética de fermentação ruminal *in vitro* de alguns coprodutos gerados na cadeia do biodiesel pela técnica de produção de gás. **Ciências Agrárias**, suplemento 1, v.32, p.2021-2028, Londrina, 2011.

MORGAVI, D. P. et al. Rumen protozoa and methanogenesis: not a simple cause-effect relationship. **British Journal of Nutrition**, vol. 107, p. 388-397, 2012.

_____. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. **Animal**, vol. 4, p.1024-1036, 2010.

RODRIGUES, F.V., RONDINA, D. An alternative use of bio-diesel sub-products as feed ingredients for ruminants: the crude glycerin. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.7, n.2, p.91-99, 2013.

SILVA, E. C. et al. Replacement of corn meal by corn germ meal in lamb diets. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, n.4, p.442-449, 2013.

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. et al. 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.

VALADARES-FILHO, S. C. et al. **Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos**. 2.ed. Viçosa, MG: UFV; DZO; DPI, 329 p., 2006.

VITTI, D. M. S. et al. Misleading relationships between in situ rumen dry matter disappearance, chemical analyzed and in vitro gas production and digestibility, of sugarcane baggase treated with varying levels of electron irradiation and ammonia. **Animal Feed Science and Technology**, p.145-153, 1999.

WILLIAMS, B.A. Cumulative gas production techniques for forage evaluation. In: GIVENS, D. I.; OWEN, E.; AXFORD, R. F. E.; OMED, H. M. (Ed). **Forage evaluation in ruminant nutrition**. Wallingford: CAB International Publishing, p. 189-214, 2000.

WOLIN, M.J.; MILLER C.; STEWART, C.J. Microbe-microbe interactions. In: The rumen microbial ecosystem (ed. PN Hobson and CS Stewart), p. 467-491. London Blackie Academic and Professional, UK, 1997.

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**, vol.61, n.16, p. 3926–3933, 2013.

CAPÍTULO II

Fermentação ruminal, produção *in vitro* de AGVs e metano de co-produtos da indústria do biodiesel

Fermentação ruminal, produção *in vitro* de AGVs e metano de coprodutos da indústria do biodiesel

**Simone Vieira Alves^{*}, Aderbal Marcos de Azevedo Silva², Heloisa Carneiro³,
Leilson Rocha Bezerra⁴, Fabíola Franklin de Medeiros¹, José Morais Pereira
Filho², Milena Nunes Moreira¹**

^{*} Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia- UFCG, Patos/PB, Brasil. Rua José Guedes-72, Catolé do Rocha/PB. E-mail: simonne_catole@hotmail.com.

¹ Mestranda do programa de Pós-Graduação em Zootecnia- UFCG, Patos-PB, Brasilemail: biulinhafranklin@hotmail.com

¹ Mestranda do programa de Pós-Graduação em Zootecnia- UFCG, Patos-PB, Brasil,email: millenna_veterinaria@hotmail.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.

² Prof. Dr.da Universidade Federal de Campina Grande , Centro de Saúde e Tecnologia Rural , Patos , Paraíba UFCG, Brasil, e-mail: jmorais@cstr.ufcg.edu.br

³ Pesquisadora Dra. EMBRAPA Gado de Leite, e-mail: heloisa@cnpqgl.embrapa.br.

⁴ Prof. Dr. da Universidade Federal do Piauí, Campus Professora Cinobelina Elvas, Bom Jesus, Piauí, UFPI, Brasil, e-mail: leilsonl@ufpi.edu.br.

RESUMO - Objetivou-se avaliar os parâmetros de fermentação ruminal de dietas a base de capim elefante (*Pennisetum purpureum*) e dos seguintes coprodutos: soja (*Glycine Max*), canola (*Brassicinapus L*), girassol preto (*Helianthusannus*), e nabo forrageiro (*Raphanussativus L*) por meio da técnica *in vitro* semiautomática de produção de gases em quatro diferentes níveis (0, 30, 50 e 70%) de substituição do capim elefante pelos coprodutos. O inóculo para a incubação *in vitro* foi obtido de três vacas da raça Holandesa com fistulas ruminais. A produção de gás foi medida as 3, 6, 12, 24 e 48 horas após a incubação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em um arranjo fatorial 4x4, com os fatores representados pelos coprodutos e os níveis. Foram realizadas a determinação da produção de CH₄, CO₂ e N-NH₃, bem como as determinações de ácidos graxos voláteis e pH ruminal, por meio da incubação de 0,3g de amostra em meio de cultura tamponado. Foi verificado aumento na produção de

gases à medida que se aumentava os níveis de substituição nas dietas. A inclusão dos diferentes níveis dos coprodutos influenciaram na concentração de CH₄, CO₂ e N-NH₃, de AGVs, e na proporção molar de ácido acético, propiônico e butírico. A relação acetato:propionato e o pH foram influenciados pela inclusão dos coprodutos estudados. Destacando-se os coprodutos da soja com maior produção e do girassol preto com menor. A inclusão dos coprodutos gerados pela industrialização do biodiesel apresentaram características nutricionais que são passíveis de inclusão na alimentação de ruminantes em substituição parcial ao capim elefante.

Palavras chave: Alimento alternativo, Butirato, Gás, Coproduto, Nutrição animal.

ABSTRACT - This study aimed to evaluate the parameters of ruminal fermentation of diets based on elephant grass (*Pennisetum purpureum*) and the following coproducts: soybean (*Glycine max*), canola (*Brassica napus* L), black sunflower (*Helianthus annuus*), and turnip (*Raphanistrum sativum* L) by means of in vitro technique semiautomatic gas production on four different levels (0.30, 50 and 70%) of replacement of the elephant grass byproducts. The inoculum for the in vitro incubation was obtained from three Holstein cows with rumen fistulas. The gas production was measured 3, 6, 12, 24 and 48 hours after incubation. The experimental design was completely randomized in a 4x4 factorial arrangement, with the factors represented by the co-products and levels. Were carried out to determine the yield of CH₄, CO₂ and NH₃-N, and the determination of pH and volatile fatty acids, ruminal incubation using a 0.3 g sample in buffered culture medium. There was an increase in the production of the gas as it increased the levels of substitution in the diet. The addition of different levels of byproducts influence the concentration of CH₄, CO₂ and NH₃-N of VFAs, and the molar ratio of acetic, propionic and butyric acids. The acetate: propionate ratio and pH were affected by the inclusion of co-products studied. Highlighting the byproducts of soy and sunflower higher production with less black. The inclusion of co-products generated by the industrialization of biodiesel showed nutritional characteristics that are liable to inclusion in ruminant feeding in substitution elephant grass.

Keywords: alternative food, butyrate, Gas, coproduct, Animal Nutrition.

1 Introdução

O mercado consumidor tem passado por grandes transformações, de forma que, tenta encontrar um sistema de produção animal em que ocorra uma preocupação em produzir produtos que ofereçam tanto benefícios diretos, tais como alimento palatável, adequado valor nutritiva e segurança alimentar, quanto benefícios indiretos, como promover o bem-estar animal, dirigindo os sistemas de maneira a promover a sustentabilidade ambiental (ZOTTI; PAULINO, 2009). Além do conhecimento dos obstáculos sanitários, outro aspecto que pode ser utilizado como alternativa viável ao embargo à exportação dos produtos oriundos da pecuária brasileira é a produção de CH₄ (metano). O Brasil é um país em que a base da alimentação para ruminantes são as pastagens, o que faz com que seja apontado no cenário mundial como um importante produtor desse gás, que tanto contribui para o efeito estufa.

Assim, a atividade pecuária tem sido apontada como uma importante fonte produtora de GEE (gases do efeito estufa), em função do dióxido de carbono (CO₂) e CH₄ emitido. Esse processo está associado ao grande número de ruminantes, especialmente bovinos, existentes no mundo, que possuem como característica típica a grande produção de CH₄ em seu processo de digestão do alimento. Contudo, as emissões de GEE impostas à pecuária podem ser resultantes tanto dos processos produtivos que envolvem, quanto da atividade propriamente dita. Com relação à atividade em si, destacam-se as emissões de CO₂ e CH₄ procedentes da fermentação entérica (ALMEIDA, 2010).

O biodiesel, por ser biodegradável não tóxico e praticamente livre de enxofre e compostos aromáticos, é considerado combustível ecológico, podendo promover uma redução substancial na emissão de monóxido de carbono e de hidrocarbonetos quando em substituição ao diesel convencional no motor (STORCK BIODIESEL, 2008). Há importantes aspectos envolvendo a cadeia do biodiesel no Brasil, destacando-se as questões relacionadas às matérias-primas e ao processo de produção industrial (ABDALLA et al., 2008).

Neste cenário, os coprodutos originados na cadeia produtiva do biodiesel no Brasil têm sido estudados como possíveis ingredientes de dietas para ruminantes. 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).

Dessa forma, esta pesquisa foi realizada como objetivo de avaliar a produção de AGVs, CH₄, CO₂, pH ruminal e N-NH₃ (amônia) de coprodutos resultantes da produção industrial da cadeia de biodiesel em substituição ao capim elefante na alimentação de bovinos.

2. Material e métodos

2.1 Local do experimento

Esta pesquisa foi desenvolvida no Campo Experimental de Coronel Pacheco, MG, de propriedade da Embrapa Gado de Leite - CNPGL, localizado na Zona da Mata de Minas Gerais.

2.2 Alimentos utilizados

Amostras de, aproximadamente, 300g de cada coproduto foram coletadas e enviadas ao Laboratório de Análise de Alimentos da Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora, MG. Para as análises químicas, degradabilidade e de produção *in vitro* de gás.

Foram utilizados como substratos para incubações *in vitro* o capim elefante (*Pennisetum purpureum*), como controle e coprodutos resultantes da industrialização do biodiesel: soja (*Glycine Max*), canola (*Brassicanapus L*), girassol preto (*Helianthusannus*), e nabo forrageiro (*Raphanussativus L*).

Foram utilizadas misturas simulando dietas, substituindo capim elefante (controle) pelos coprodutos nas seguintes proporções 70/30, 50/50 e 70/30% (volumoso/coproduto). Os ingredientes das dietas após serem pré-secos a 55°C durante 48 horas, foram moídos a 1mm. Em seguida pesados 0,5g de matéria seca (MS) da amostra para um saco de ANKOM® (F57) com seis repetições/tratamento, selados e colocados dentro de frascos de vidro de soro do tipo cor-âmbar de 50mL, previamente lavados com água destilada, secos em estufa e identificados.

2.3 Análises químicas

Os substratos compostos pelos coprodutos e pela forragem foram pré-secos em estufas de ventilação forçada a 60°C por 48h. Depois moídos em moinho do tipo Willey

dotado de peneira com perfurações de 1,0mm para determinação da matéria seca (MS) em estufa a 105°C de acordo com os procedimentos gerais descritos por Silva e Queiroz (2002), proteína bruta (PB) pelo Método Kjeldahl (AOC, 1995); fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) pelo método Van Soest (2006); e de extrato etéreo (EE) onde a forragem e os coprodutos foram acondicionados em sacos XT4 (ANKON)® e submetidos à extração pelo método oficial de alta temperatura da AOCS (2009), utilizando-se extrator XT10 (ANKON)®. A DIVMS foi avaliada seguindo a metodologia proposta por Tilley e Terry (1963). Os carboidratos totais (CHOT) foram obtidos por intermédio da equação $100 - (\% \text{ PB} + \% \text{ EE} + \% \text{ Cinzas})$ descrita por Sniffen et al. (1992).

Tabela 1- Composição química (g/kg) do capim elefante e dos quatro substratos resultantes da industrialização do biodiesel com base na matéria seca.

Ingrediente	MS (g/kg)	PB (g/kg)	FDN (g/kg)	FDA (g/kg)	LIG (g/kg)	EE (g/kg)	CZ (g/kg)	CHOT	DIVMS (g/kg)
C. Elefante	882,3	126,1	555,0	351,1	144,4	14,2	25,4	83,43	591,4
Coprodutos									
Nabo Forrageiro	935,6	393,7	380,5	154,2	69,6	284,1	50,6	27,16	644,8
Soja	869,9	528,4	184,5	106,7	15,9	18,3	66,0	38,73	808,9
Girassol Preto	901,1	342,6	390,1	243,6	34,3	32,1	54,9	57,04	582,3
Canola	922,1	375,1	410,3	378,3	120,5	24,3	57,7	54,29	689,0

Onde: **MS**- matéria seca; **PB**- proteína bruta; **FDN**- fibra em detergente neutro; **FDA**- fibra em detergente ácido; **LIG**- lignina; **EE**- extrato etéreo; **CZ**- cinzas; **DIVMS**- digestibilidade *in vitro* da matéria seca.

2.4 Preparação para o meio de cultura

Para a coleta do líquido ruminal, utilizaram-se três vacas da raça Holandesa com peso médio de 600kg providas de fístulas no rúmen, sendo então transferidos para garrafas térmicas previamente aquecidas a 39°C e levados imediatamente ao laboratório. No laboratório, o conteúdo ruminal foi homogenizado e filtrado em duas camadas de tecido de algodão, sendo mantido em banho-maria a 39°C sob saturação de CO₂, até serem adicionadas as demais soluções (tampão, macro e micro minerais solução de resazurina e meio B) para o meio de cultura.

Para preparação do meio de cultura foi utilizado o líquido ruminal e solução tampão (VITTI et al., 1999) em uma proporção de 5:1. O inóculo (30mL) foi então transferido para os frascos de incubação, posteriormente lacrados e colocados em um

agitador orbital cremalheira fixado em 120 oscilações por minuto em uma incubadora a 39°C.

2.5 Amostragem para determinação de metano (CH₄) e dióxido de carbono (CO₂)

Após a última medição do gás nos tempos de 48 horas pós-incubação, procedeu a coleta e armazenamento do gás proveniente de cada frasco, para determinação da concentração de CH₄ e CO₂. O conteúdo de cada frasco foi removido por meio de seringas plásticas de 30 cc e transferido imediatamente para frascos de cor-âmbar de 20cc a vácuo, para conservação das amostras. Posteriormente os frascos de fermentação foram abertos e feito a aferição do pH do meio de cultura utilizando um medidor de pH (Orion modelo 260 A, Fisher Scientific, Toronto, ON, Canadá).

O percentual de CH₄ e CO₂ foi determinado no Laboratório de Cromatografia gasosa da EMBRAPA - Gado de Leite, localizada na cidade de Juiz de Fora – MG, utilizando um aparelho de cromatografia gasosa (FEDORAK; HRUDEY, 1983).

A partir do percentual da produção de gases, foi calculado o seu volume correspondente à produção acumulada de gás em 48 horas do processo fermentativo, corrigido para cada 1g de matéria seca degradada. Os resultados de CH₄ e CO₂ foram expressos em g/MS.

2.6 Amostragem para determinação ácidos graxos voláteis (AGV_S)

Para identificação e quantificação dos ácidos graxos voláteis (AGVs), foi coletada uma fração líquida do meio de cultura (10 mL) após a digestibilidade (48 horas) e adicionada ao meio 2 mL de ácido metafosfórico (20%) para conservação da amostra, em seguida armazenado em freezer até posteriores análises (Holtshausen et al. 2009).

2.7 Amostragem para determinação de nitrogênio amoniacal (N-NH₃)

Para identificação e quantificação do nitrogênio amoniacal (N-NH₃), foi coletado uma fração líquida do meio de cultura (10mL) após a digestibilidade (48 horas) e adicionado ao meio 0,4mL de ácido sulfúrico, H₂SO₄ a 50% para conservação da amostra, em seguida armazenado em freezer até posteriores análises (HOLTSHAUSEN et al. 2009).

2.8 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento estatístico utilizado para avaliar a produção cumulativa de gases e a degradabilidade da matéria seca foi inteiramente ao acaso num arranjo fatorial 4 x 4 (coprodutos e níveis de substituição).

A produção de gás total e a degradabilidade da MS foram submetidos a uma análise de variância (PROC ANOVA) onde nos efeitos de interação aplicou-se o teste Tukey ($P < 0,05$) entre os coprodutos dentro de cada nível de substituição e dos níveis de substituição dentro de cada coproduto. Os resultados dos níveis crescentes foram interpretados estatisticamente através dos modelos de regressão pelo PROC REG do SAS (2003).

3. Resultados

Verificou-se que os coprodutos analisados são passíveis de utilização na alimentação de ruminantes, sendo o coproduto de nabo forrageiro o que apresentou melhor qualidade nutricional, visto que apresentou a melhor DIVMS concentração de proteína bruta (PB), menores teores de FDN, FDA e EE (Tabela 1). A menor qualidade nutricional foi observada para o coproduto do girassol preto que apresentou à menor DIVMS.

A sustentabilidade da pecuária tem sido prejudicada em virtude da produção de metano entérico pelos ruminantes. Nesse trabalho observou-se efeito de interação dos tipos de coprodutos e dos níveis de substituição nos valores da produção de metano *in vitro* com intervalo de tempo de 48h (Tabela 2).

Tabela 2 - Teores médios, probabilidade (P-value) e equações de regressão dos efeitos dependentes de CH_4 (mL/g) de coprodutos da produção de biodiesel em diferentes níveis de substituição do capim elefante após 48 horas de incubação “*in vitro*” em meio de cultura.

Coproducto	Níveis de substituição				Equações de regressão	R ²	P
	0%	30%	50%	70%			
Soja	0,865	8,043 ^B	11,863 ^A	17,865 ^A	$\hat{Y} = 0,74 + 0,23x$	0,82	0,0001
Canola	0,865	13,158 ^A	15,248 ^A	16,538 ^A	$\hat{Y} = 1,01 + 0,50x - 0,004x^2$	0,96	0,0001
Nabo forrageiro	0,865	5,523 ^B	7,328 ^B	7,407 ^B	$\hat{Y} = 0,83 + 0,20x - 0,001x^2$	0,88	0,0004

Girassol preto	0,865	13,553 ^A	13,952 ^A	14,368 ^A	$\hat{Y}=1,10 +0,52x-0,004x^2$	0,94	0,0001
-----------------------	-------	---------------------	---------------------	---------------------	--------------------------------	------	--------

*Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Avaliando os coprodutos dentro dos níveis de substituição, ao nível de 30% pelo capim elefante, o coproduto do girassol preto e da canola apresentaram maior produção de metano, sendo semelhantes na produção do gás ($P<0,05$), superando o coproduto de nabo forrageiro e da soja que produziram menos CH_4 . Os níveis 50% e 70% de substituição apresentaram o mesmo comportamento dos dados, em que o coproduto de nabo forrageiro apresentou a menor produção de metano ($P<0,05$), diferindo dos demais coprodutos, que apresentaram maiores produções e não diferiram entre si ($P>0,05$).

A substituição do capim elefante pelo o coproduto da soja causou um efeito linear crescente. Para cada unidade percentual de substituição de capim elefante por esse coproduto, ocorreu aumento de 0,23 mL/g na produção de CH_4 pelos microrganismos ruminais.

Os coprodutos da canola, nabo forrageiro e do girassol preto foram afetados ($P<0,05$) pelos níveis de substituição, apresentando resposta quadrática em relação à produção de metano sendo 62,5% o ponto de mínima que promoveu (31,25mL) de produção de metano do coproduto da canola. Para o coproduto de nabo forrageiro foi verificado que 100% ponto de mínima que promoveria (20mL) de produção de CH_4 e por último o coproduto do girassol preto que apresentou 6,5 como ponto de mínima equivalente a 3,38mL de produção de CH_4 .

Em relação à produção cumulativa de CO_2 , verificou-se efeito de interação dos tipos de coprodutos e dos níveis de substituição para a produção desse gás com o intervalo de tempo de 48 h.

Tabela 3- Teores médios, probabilidade (P-value) e equações de regressão dos efeitos dependentes de CO_2 (mL/g) de coprodutos da produção de biodiesel em diferentes níveis de substituição do capim elefante após 48 horas de incubação “*in vitro*” em meio de cultura.

Coproduto	Níveis de substituição				Equações de regressão	R ²	P-value
	0%	30%	50%	70%			
Soja	10,47	36,68 ^B	56,49 ^B	89,79 ^A	$\hat{Y}= 6,90+1,1x$	0,76	0,0001
Canola	10,47	91,41 ^A	100,78 ^A	93,32 ^A	$\hat{Y}=11,15+3,63 x -0,03x^2$	0,97	0,0001
Nabo forrageiro	10,47	34,87 ^B	36,75 ^B	32,88 ^B	$\hat{Y}=10,67+1,12 x-0,01x^2$	0,90	0,0001

Girassol preto	10,47	81,23 ^A	82,75 ^A	77,13 ^A	$\bar{Y}=11,54 +3,10 x-0,03x^2$	0,97	0,0001
-----------------------	-------	--------------------	--------------------	--------------------	---------------------------------	------	--------

*Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Ao analisarmos os coprodutos dentro dos níveis de substituição ao capim elefante, observou-se que aos níveis de 30% e 50%, os coprodutos da canola e do girassol preto apresentaram maior produção de CO₂ e os coprodutos de nabo forrageiro e da soja produziram menos (P<0,05). No nível de 70% de substituição o coproduto da soja, canola e do girassol preto produziram mais CO₂ (P<0,05) e não diferiram estatisticamente entre si (P>0,05), enquanto que o coproduto de nabo forrageiro produziu a menor quantidade desse gás.

A substituição do capim elefante pelo coproduto da soja causou efeito linear crescente (P<0,05), para cada 1% do nível de substituição desse coproduto houve acréscimo de 1,1mL/g na produção de CO₂ entérico.

Para os coprodutos da canola, nabo forrageiro e do girassol preto em substituição ao capim elefante, observou-se efeito quadrático em relação à produção de CO₂ quando se aumentava suas quantidades nos níveis. Sendo 60,5% o ponto de máxima (219,62mL/g) de produção de CO₂ do coproduto da canola. Para o coproduto de nabo forrageiro foi verificado 56% o ponto de máxima produção de (62,75 mL/g) de CO₂ e o coproduto do girassol preto que apresentou no nível 62,75% um ponto de máxima equivalente a (160,18 mL/g) de CO₂.

Observou-se para a produção de amônia efeito de interação na substituição ao capim elefante pelos coprodutos do biodiesel. Analisando os coprodutos dentro dos níveis de substituição, ao nível de 30% o coproduto da soja, girassol preto e nabo forrageiro foram os que mais produziram N-NH₃, enquanto que a menor produção foi verificada para o coproduto de nabo forrageiro, que foi diferente ao da canola (P>0,05). Já no nível de 70% o coproduto do girassol preto, soja e da canola apresentaram as maiores produções de N-NH₃.

Tabela 4- Teores médios, probabilidade (P-value) e equações de regressão dos efeitos dependentes de N-NH₃ (mL/g) de coprodutos da produção de biodiesel em diferentes níveis de substituição do capim elefante após 48 horas de incubação “*in vitro*” em meio de cultura.

Coproduto	Níveis de substituição	Equações de regressão	R ²	P-value
-----------	------------------------	-----------------------	----------------	---------

	0%	30%	50%	70%			
Soja	21,467	41,767 ^A	54,833 ^A	58,800 ^A	$\hat{Y} = 21,14 + 0,87x - 0,004x^2$	0,95	0,03
Canola	21,467	36,633 ^A	44,100 ^{BC}	56,467 ^A	$\hat{Y} = 21,34 + 0,48x$	0,97	0,001
Nabo forrageiro	21,467	35,467 ^A	41,067 ^C	47,133 ^B	$\hat{Y} = 22,62 + 0,36x$	0,97	0,001
Girassol preto	21,467	39,200 ^A	50,633 ^{AB}	59,733 ^A	$\hat{Y} = 11,81 - 0,27x + 0,003x^2$	0,98	0,001

*Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para a produção de N-NH₃, o coproduto da canola apresentou modelo linear crescente, ou seja, à medida que se aumentava a unidade percentual desse coproduto, aumentava 0,48mL/g na produção de N-NH₃.

O coproduto de nabo forrageiro foi afetado (P<0,05) pelos níveis de substituição ao capim elefante, apresentando resposta linear crescente, visto que a cada unidade percentual do nível de substituição desse coproduto ocorreu um aumento de 0,36 mL/g na produção de N-NH₃.

Os coprodutos da soja e do girassol preto foram afetados (P<0,05) pelos níveis de substituição, apresentando resposta quadrática em relação à produção de N-NH₃, pelos níveis de substituição ao capim elefante. Sendo 10,87 o nível que promoveu o ponto de mínima (9,45mL/g) da produção de N-NH₃ para o coproduto da soja. Para o coproduto do girassol preto no nível 45 % apresentou um ponto de mínima equivalente a (12,15mL/g) de produção de N-NH₃.

Foi observado efeito (P<0,05) dos níveis de substituição ao capim elefante pelos coprodutos, para produção dos AGVs com o intervalo de tempo de 48 horas (Tabela 5).

Tabela 5 - Produção de Acetato, Propionato e Butirato (μmol/mL) dos coprodutos do biodiesel em diferentes níveis de substituição ao capim elefante.

Produção de acetato							
Coprodutos	Níveis de substituição				Equação de regressão	R ²	P
	0%	30%	50%	70%			
Soja	26,517 ^A	36,097 ^A	43,555 ^A	42,136 ^A	$\hat{Y} = 27,98 + 0,24x$	0,61	0,002
Canola	26,517 ^A	20,821 ^B	23,510 ^B	22,540 ^C	$\hat{Y} = 25,08$	---	---
Nabo forrageiro	26,517 ^A	32,792 ^A	41,822 ^A	34,455 ^{AB}	$\hat{Y} = 28,25 + 0,15x$	0,40	0,09
Girassol Preto	37,729 ^A	16,692 ^B	17,344 ^B	26,291 ^{BC}	$\hat{Y} = 26,61 - 0,59x + 0,008x^2$	0,90	0,01
Produção de Propionato							
	Níveis de substituição				Equação de regressão	R ²	P
	0%	30%	50%	70%			

Soja	11,764 ^A	14,282 ^A	18,202 ^A	19,122 ^A	$\hat{Y}=11,62+-0,11x$	0,76	0,0002
Canola	11,764 ^A	9,348 ^{AB}	10,935 ^B	10,839 ^B	$\hat{Y}=11,03$	---	---
Nabo forrageiro	11,764 ^A	13,587 ^A	17,852 ^A	15,107 ^{AB}	$\hat{Y}=12,17+0,06x$	0,42	0,02
Girassol Preto	11,764 ^A	7,329 ^B	7,603 ^B	11,723 ^B	$\hat{Y}=11,81-0,27+0,003x^2$	0,92	0,001
Produção de Butirato							
	Níveis de substituição				Equação de regressão	R²	P
	0%	30%	50%	70%			
Soja	3,343 ^A	5,651 ^A	7,131 ^A	6,937 ^A	$\hat{Y}=3,28+0,11x+0,0008x^2$	0,85	0,04
Canola	3,343 ^A	3,052 ^B	3,531 ^B	3,334 ^C	$\hat{Y}=3,25$	---	---
Nabo forrageiro	3,343 ^A	4,804 ^A	6,025 ^A	5,299 ^B	$\hat{Y}=3,26+0,08x-0,0007x^2$	0,79	0,009
Girassol Preto	3,343 ^A	2,510 ^B	2,825 ^B	3,557 ^C	$\hat{Y}=3,33-0,04x+0,0007x^2$	0,69	0,001

Avaliando os coprodutos dentro dos níveis de substituição ao capim elefante, aos níveis de 30% e 50% de substituição, os coprodutos da soja e de nabo forrageiro apresentaram a maior produção de ácido acético. As menores produções foram obtidas com o coproduto do girassol preto da canola. Já o coproduto do girassol preto apresentou menor produção, não diferindo estatisticamente do coproduto da canola ($P>0,05$).

No nível de 70% de substituição os coprodutos da soja e de nabo forrageiro apresentaram maiores produções de ácido acético, o menor valor foi encontrado para o coproduto da canola ($P<0,05$).

O coproduto da soja foi afetado ($P<0,05$) pelos níveis de substituição, descrevendo um comportamento linear crescente, à medida que se aumentava a unidade percentual desse coproduto, aumentava 0,24mL/g na produção de ácido acético pelo processo de fermentação ruminal. Não foi observado efeito ($P>0,05$) pelos níveis de substituição para o coproduto da canola. O coproduto de nabo forrageiro apresentou resposta linear crescente estimada, em 0,15mL/g para cada unidade percentual na produção de ácido acético.

O coproduto do girassol preto descreveu um modelo quadrático em relação à produção de ácido acético, estimando-se em 36,87% o ponto de mínima para o nível de substituição ao capim elefante que promoveu (21,75mL/g) de produção de ácido acético.

Para a produção de ácido propiônico também foi obtido efeito significativo ($P<0,05$) pelos níveis de substituição ao capim elefante no intervalo de tempo de 48 horas (Tabela 5).

Avaliando os coprodutos dentro dos níveis, no nível de 30% de substituição ao capim elefante os coprodutos da soja e de nabo forrageiro também produziram mais ácido propiônico ($P < 0,05$), sendo o coproduto de nabo forrageiro semelhante ao da canola e da soja ($P > 0,05$). O coproduto do girassol preto também obteve menor produção, não diferindo estatisticamente do coproduto da canola ($P > 0,05$).

Ao nível de 50% de substituição ao capim elefante o coproduto da soja também apresentou maior produção desse ácido ($P < 0,05$), não diferindo do coproduto de nabo forrageiro ($P > 0,05$), e a menor produção foi verificada para o coproduto de girassol preto, sendo equivalente ao coproduto da canola. No nível de 70% de substituição o coproduto da soja novamente apresentou maior produção de ácido propiônico, sendo semelhante ao coproduto de nabo forrageiro, a menor produção foi verificada para os coprodutos da canola e do girassol preto ($P < 0,05$).

A substituição do capim elefante pelo coproduto da soja na produção de ácido propiônico causou efeito linear crescente ($P < 0,05$) ocorrendo um aumento de 0,11mL/g para cada unidade percentual na produção desse ácido. O coproduto da canola não foi afetado ($P > 0,05$), pelos níveis de substituição ao capim elefante. Já o coproduto de nabo forrageiro foi influenciado de forma linear crescente, aumentando 0,06mL/g desse ácido para cada 1% do nível de substituição. Por sua vez, o coproduto do girassol preto apresentou um comportamento quadrático, sendo o nível de 45% o ponto de mínima que promoveu (12,15mL/g) na produção desse ácido.

Analisando a produção do ácido butírico, é possível observar que houve efeito de interação ($P < 0,05$) dos níveis de substituição ao capim elefante pelos coprodutos para intervalo de tempo de 48 horas (Tabela 5).

Avaliando os coprodutos dentro dos níveis de substituição, aos níveis de 30% e 50%, os coprodutos da canola e do girassol preto produziram mais ácido butírico ($P < 0,05$), sendo semelhantes entre si ($P > 0,05$). Os coprodutos de nabo forrageiro e da soja apresentaram as menores produções desse Ácido Graxo Volátil (AGV) ($P < 0,05$). Ao nível 50% de substituição o coproduto da canola e do girassol preto também apresentaram maiores produções desse ácido, as menores produções foram verificadas para o coproduto de nabo forrageiro e da soja. No nível de 70% de substituição o coproduto da soja apresentou maior produção de ácido butírico quando comparados aos demais coprodutos ($P < 0,05$).

Para a produção de ácido butírico, o coproduto da soja descreveu um comportamento linear crescente, ou seja, à medida que se aumentava a porcentagem

desse coproduto, aumentava 1,1mL/g/48h na produção desse ácido pelo processo de fermentação microbiana.

Os coprodutos da canola, nabo forrageiro e do girassol preto descreveram um modelo quadrático em relação à produção de ácido butírico quando se aumentava suas quantidades nos níveis, sendo 60,5% o nível que promoveu o ponto de máxima (219,62mL/g) de produção de ácido butírico para o coproduto da canola, para o coproduto de nabo forrageiro foi verificado no nível 56% ponto de máxima de (62,75 mL/g) e por último o coproduto do girassol preto que apresentou no nível 62,75 um ponto de máxima equivalente a 160,18mL/g.

Na análise da variável pH ruminal, verificou-se que ocorreu interação dos níveis de substituição pelos coprodutos com o intervalo de tempo de 48 horas (Tabela 6).

Tabela 6 -Teores médios, probabilidade (P- value) e equações de regressão dos efeitos dependentes do pH de coprodutos da produção de biodiesel em diferentes níveis de substituição do capim elefante após 48 horas de incubação “*in vitro*” em meio de cultura.

Coproducto	Níveis de substituição				Equações de regressão	R ²	P-value
	0%	30%	50%	70%			
Soja	6,66	6,50 ^{AB}	6,42 ^B	6,41 ^B	$\hat{Y}=6,65-0,007x+0,00005x$	0,76	0,02
Canola	6,66	6,41 ^B	6,42 ^B	6,46 ^B	$\hat{Y}=6,65-0,01x+0,0001x^2$	0,75	0,0001
Nabo forrageiro	6,66	6,45 ^{AB}	6,47 ^{AB}	6,53 ^{AB}	$\hat{Y}=6,65+0,009x-0,0001x^2$	0,68	0,0001
Girassol preto	6,66	6,57 ^A	6,56 ^A	6,62 ^A	$\hat{Y}=6,65-0,007x+0,00005x^2$	0,76	0,02

*Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

Ao o nível de 30%, os coprodutos do girassol preto, soja e de nabo forrageiro foram os que apresentaram o maior pH ruminal ($P<0,05$), sendo o coproduto da canola, soja e de nabo forrageiro os que apresentaram o menor pH.

No nível de 50% de substituição ao capim elefante o coproduto do girassol preto e de nabo forrageiro também apresentaram maior pH ruminal ($P<0,05$), os menores valores de pH foram verificados para os coprodutos da soja e da canola ($P<0,05$).

Já no nível de 70% de substituição ao capim elefante os coprodutos do girassol preto e de nabo forrageiro apresentaram o maior pH ruminal, sendo o coproduto de nabo forrageiro semelhante ao coproduto da canola e da soja, o menor pH ruminal foi verificado para o coproduto da soja ($P<0,05$).

Todos os coprodutos estudados apresentaram modelos quadráticos em relação ao pH, sendo que quando se aumentava suas quantidades nos níveis, o coproduto da soja no nível de 70% promoveu uma redução no pH de 0,49. O coproduto da canola apresentou no nível de 50% de substituição uma redução de 0,5 no pH.

O coproduto de nabo forrageiro promoveu um aumento de 0,40 no pH e para o coproduto do girassol preto no nível 70% foi verificado uma redução no pH equivalente a 0,44.

4. Discussão

No processo de fermentação ruminal, quando há redução nos teores de FDN e aumento de EE, não há diminuição na produção de CH_4 . Já que, de acordo com a estequiometria da produção dos gases, a quantidade de fibras presente na dieta promove aumento na produção de acetato, o que ocasiona aumento na produção de metano, dessa forma se houve redução da fibra, esperava-se uma menor produção de CH_4 , com a inclusão dos coprodutos. Além disso, o aumento de extrato etéreo na dieta auxilia na remoção de H_2^+ livre no ambiente ruminal, pelo processo de biohidrogenação que, ao transformar ácidos graxos insaturados em saturados, sequestram duas moléculas de H_2^+ para cada molécula de ácido graxo saturado formada, esse H_2^+ , quando livre é utilizado pelas bactérias metanogênicas para a produção de CH_4 (KOZLOSKI, 2009).

O aumento dos níveis de coproduto em substituição ao capim elefante na dieta experimental de zero para 70% promoveu aumento na produção de CH_4 . Esperava-se que, ocorresse uma redução na relação acetato/propionato e conseqüentemente na produção de CH_4 , o que não ocorreu em relação à substituição pelo capim elefante, isso pode estar relacionado ao teor de carboidratos solúveis, visto que o capim elefante apresenta maior quantidade em relação aos coprodutos. Pode ainda ter relação ao tempo de incubação, pois a baixa produção de metano nos tempos iniciais decorre do fato deste período englobar a fase *lag* (L), ou seja, não há metanogênese até que estejam saturados os locais disponíveis para fixação microbiana e estas sintetizem suas estruturas e enzimas (FRANCO et al., 2011). Lee et al. (2011) conduziram incubações até 72 horas para diversos tipos de dietas, e sugerem que a fração lentamente digestível da dieta (ou seja, fibras estruturais) está associada à maior produção de CH_4 e relataram que a

metanogênese é inibida após 24 horas de incubação, sendo em média 81% da produção de CH₄ verificada até este tempo.

Segundo Abdalla et al. (2008), a utilização de tortas oriundas da industrialização do biodiesel pode afetar a produção de CH₄. O coproduto da canola apresentou maior produção de metano entérico, devido esse alimento apresentar maior quantidade de fibra entre os coprodutos avaliados. Já o coproduto de nabo forrageiro apresentou menor quantidade de CH₄, visto que é um alimento rico em ácidos graxos poliinsaturados, promovendo aumento no processo de biohidrogenação ruminal, porém esses coprodutos aumentaram a produção de CH₄, em comparação ao capim elefante.

Assim como para a produção de CH₄, o coproduto de nabo forrageiro apresentou uma redução de CO₂ no rúmen, desempenhando importante função, visto que age na remoção contínua de H₂, que é resultante da fermentação de matéria orgânica, promovendo a redução da metanogênese (GOES et al., 2010).

O coproduto da soja no nível de 10,87% descreveu como ponto de mínima de (9,45mL/g) de N-NH₃. Essa concentração foi superior a 5mg/100 mL, considerada como ideal para o máximo crescimento microbiano (SATTER; SLYTTER, 1974), o que indica que a disponibilidade de nitrogênio não foi um fator limitante para o desenvolvimento dos microrganismos responsáveis pela degradação de carboidratos estruturais.

O acetato é o principal AGV produzido no rúmen pelas bactérias ruminais, podendo chegar até 75% do total de AGVs, quando a alimentação é constituída de volumoso (SANTANA-NETO, 2012). Sendo responsável pela maior produção de energia e CH₄.

Isto pode ser observado no presente estudo, em que ocorreu uma maior concentração de ácido acético em relação aos AGVs, foi verificado uma maior produção desse ácido no coproduto da soja, a menor produção foi observada para o coproduto do girassol preto. Porém, durante a fermentação observou-se que a adição dos coprodutos na dieta em substituição ao capim elefante proporcionou um aumento na produção de acetato, conseqüentemente também ocorreu aumento na produção de CH₄, esse fato foi descrito em outros estudos (ALEXANDER et al., 2008).

Foi observado um acréscimo de ácido propiônico para os diferentes níveis, tendo destaque o coproduto da soja que também apresentou maior concentração (μmol/mL) e o coproduto do girassol preto obteve menor concentração ao nível de 30% de substituição, este comportamento pode ser justificado, devido à baixa quantidade de

fibras e maior quantidade de carboidratos solúveis (CHO_s) presente no coproduto da soja.

No processo de produção do propionato ocorreu a produção de somente 0,87mol de AGV por meio da produção indireta e nenhum gás diretamente, enquanto que, a produção de acetato gera 2 moles de CO₂ por mol de glicose pela produção direta, e 0,87mol de AGV, indiretamente (KOZLOSKI, 2009), esse fato pode ser verificado com o aumento na produção de CO₂ e de acetato (Tabelas 3 e 5).

Conseqüentemente, a produção de ácido propiônico foi menor para o coproduto do girassol preto, por obter uma alta concentração de CHO_s, esse resultado pode estar correlacionado com a diminuição na produção de CO₂ e CH₄, pois, pela estequiometria da fermentação ruminal, quando há produção de ácido propiônico não ocorrem perdas de energia na forma de CO₂ e CH₄.

A maior produção de ácido butírico foi obtida (μmol/mL) ocorreu para o coproduto da soja no nível de 50% e a menor produção foi encontrada com o girassol preto no nível de 30%. A maior produção de ácido butírico encontrada no coproduto da soja pode está diretamente relacionada à maior produção de gás que se associa a fermentação dos componentes estruturais do coproduto (RIVERA, 2010). O ácido butírico assim como o acetato, o propionato e outros participam do processo de produção da proteína microbiana que é sintetizada no rúmen, sendo a fonte majoritária de aminoácidos absorvíveis no intestino delgado dos ruminantes (LANA, 2007).

O pH ruminal altera a fermentação ruminal, dependendo do tipo de dieta e do tempo após a ingestão do alimento. Sabe-se que a inclusão de altas proporções de carboidratos não fibrosos na dieta, os quais possuem alta taxa de degradação, geralmente resulta em queda do pH e da digestibilidade da fibra a nível de rúmen (KOZLOSKI, 2009).

O pH ruminal também está diretamente relacionado com os produtos finais da fermentação e também com a taxa de crescimento dos microrganismos ruminais. A faixa de pH para que a atividade microbiana ocorra normalmente no rúmen é de 6,7±0,5 (VAN-SOEST, 1994). Segundo Orskov (1988) relatou que, em situações de pH ruminal abaixo de 6,2, ocorre redução na digestão da fibra devido à sensibilidade das bactérias fibrolíticas e o ponto ótimo da digestão da fibra ocorreu em valores de pH entre 6,7 e 7,1.

Neste estudo a média do pH foi de 6,5 (Tabela 6), o que permite deduzir que a redução na digestibilidade dos componentes nutritivos dos coprodutos não ocorreu em

decorrência do pH do meio ruminal e sim por outros fatores. Os mecanismos associados ao efeito do pH ruminal não são bem elucidados, porém incluem efeitos sobre o processo de aderência a fração fibrosa e principalmente, sobre o metabolismo bacteriano (KOZLOSKI, 2009).

5. Conclusão

A substituição de capim elefante pelos coprodutos aumentou a produção de gases de efeito estufa, porém podem ser uma estratégia viável para aumentar a quantidade energética da dieta, sem ocasionar distúrbios metabólicos. Sendo o coproduto da canola o que apresentou maior produção, enquanto que a menor produção foi observada com o coproduto de nabo forrageiro.

6. 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.

7. Revisão bibliográfica

ABDALLA, A. L. et al. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v 37: 260-268, 2008.

ALEXANDER, G. et al. In Vitro screening of plant extracts to enhance the efficiency of utilization of energy and nitrogen in ruminant diets. **Animal Feed Science and Technology**.V.145, p.229-244, 2008.

ALMEIDA, M. H. S. P. **Análise econômico-ambiental da intensificação da pecuária de corte no Centro-Oeste brasileiro**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo, Dissertação (Mestrado em Economia Aplicada) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo, p.86, 2010.

Association of Official Analytical Chemists – A. O. A. C. **Official Methods of Analysis**, 16th ed., Arlington, VA,USA, 1995.

FRANCO, H. C. J. et al. Nitrogen in sugarcane derived from fertilizer under Brazilian field conditions. **Field Crops Research**, v.121, p.29-41, 2011.

GOES, R. et al. Degradabilidade in situ dos grãos de crumbe, girassol e soja, e de seus coprodutos em ovinos. *Acta Scientiarum*. **Animal Sciences**, Maringá, v. 32, n.3, p. 271-277, 2010.

HOLTSHAUSEN, L. et al. Feeding saponin-containing *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* to decrease enteric methane production in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.92, n.7, p.2809-2821, 2009.

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

LANA, R. P. **Nutrição e alimentação animal (Mitos e realidades)**. Editora UFV, Viçosa, 2.ed., 344 p, 2007.

LEE, S. et al. Glycerol as a feed supplement for ruminants: In vitro fermentation characteristics and methane production. **Animal Feed Science and Technology**, Davis, v. 166-167, n. 23, p. 269-274, 2011.

MIZUBUTI, I.Y. et al. 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, suplemento 1, p.2021-2028, 2011.

MOREIRA, P. C. et al. Produção de ácidos graxos voláteis, avaliada pela técnica semiautomática in vitro, na dieta de ruminantes com diferentes fontes de carboidratos na fração volumosa. **Ciência Animal Brasileira**, v.10: 413-424, 2009.

ORSKOV, E .R. **Nutrición proteica de los ruminantes**. Acribia. Zaragoza, 178 pp.1988.

RIVERA, A. R. et al. Fermentação ruminal e produção de metano em bovinos alimentados com feno de capim-tifton 85 e concentrado com aditivos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.3, p.617-624, 2010.

SANTANA-NETO, J.A et al .Características da fermentação ruminal de ovinos em pastejo. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.19, 2012.

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

SATTER, S. D.; SLYTER, L. L. Effects of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. **British Journal of Nutrition**, 32: 199-210, 1974.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de Alimentos: Métodos Químicos e Biológicos**. Editora UFV, Viçosa- MG, 235p, 2002.

SNIFFEN, C. J. et al. 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.

STORCK BIODIESEL. **O que é o biodiesel?** Curitiba. Disponível em: www.storckbiodiesel.com.br. Acesso em 20/09/2013.

TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A. A two stage technique for *in vitro* digestion off orages crops. **Journal of the British Grassland Society**. Aberystwyth, v. 18,p. 104-111, 1963.

VAN-SOEST, P. J. **Nutricional Ecology of the Ruminant**. Cornell University Press. Ithaca, 1994.

VITTI, D. M. S. et al. 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.

ZOTTI, C. A.; PAULINO, V. T. **Metano na produção animal: Emissão e minimização de seu impacto.** Disponível em: <<http://www.iz.sp.gov.br/pdfs/1259324182.pdf>> Acesso em: 20/08/2013.

Conclusão Geral

Com base nos resultados obtidos nesta pesquisa conclui-se que a técnica *in vitro* de produção de gás é uma excelente alternativa para a avaliação de alimentos que apresentam características que contribuam para o metabolismo animal, promovendo menores perdas energéticas na forma de gases, principalmente daqueles considerados agressores ao meio ambiente, CH₄ e CO₂.

A utilização de coprodutos oriundos da industrialização do biodiesel em substituição ao capim elefante constitui uma alternativa para a alimentação de ruminantes, pois são considerados alimentos proteicos e energéticos, que serão convertidos em produto animal.

Deve-se realizar mais pesquisas na área de nutrição animal, com o intuito de mitigar a produção desses gases, conseqüentemente promover uma eficiente produção sem comprometer o consumo.

A qualidade da dieta pode ser apontada como a principal forma de reduzir a produção de gases, desta forma é necessário a implementação de técnicas de manejo que promovam o bem estar animal reduzindo a agressão ao meio ambiente.

ANEXOS

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Types of article

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles
3. Short Communications
4. Book Reviews

Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review Articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest.

A *Short Communication* is a concise but complete description of a limited investigation, which will not be included in a later paper. Short Communications should be as completely documented, both by reference to the literature and description of the experimental procedures employed, as a regular paper. They should not occupy more than six printed pages (about 12 manuscript pages, including figures, tables and references). *Book Reviews* will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than two years old. Book reviews will be solicited by the Book Review Editor. Unsolicited reviews will not usually be accepted, but suggestions for appropriate books for review may be sent to the Book Review Editor: Professor G. Flachowsky Federal Research Centre of Agriculture Institute of Animal Nutrition Bundesallee 50D-38116 Braunschweig Germany. Manuscripts describing the use of commercial feed products are welcome, but should include the following information: major components, contents of active ingredients (for example enzyme activities). Independent verification, as opposed to a manufacturer's guarantee, is always desirable

and often avoids difficulties in the review process, especially where there are no, or few, treatment impacts. The Editors reserve the right to reject any manuscript employing such products, where this information is not disclosed. Submissions concerning feedstuff composition are welcome when published and/or accepted analytical procedures have been employed. However, unusual feedstuffs and/or a wide range of data are prerequisites. Submissions concerning NIRS may be suitable when more accurate, precise or robust equations are presented. Mathematical, technical and statistical advancement,

may constitute the foundation for acceptance. For more details see the editorial in Vol. 118/3-4.

Contact details for submission

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to AuthorSupport@elsevier.com. Authors can determine the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Human and animal rights

If the work involves the use of animal or human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans

AUTHOR INFORMATION PACK
18 Sep 2013 www.elsevier.com/locate/anifeedsci 5
<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; EU Directive 2010/63/EU for

animal experiments
http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm;

Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals
<http://www.icmje.org>. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts: *Before the accepted manuscript is published in an online issue*: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed. *After the accepted manuscript is published in an online issue*: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open Access and Subscription.

For Subscription articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal

Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For Open Access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights

AUTHOR INFORMATION PACK 18 Sep 2013 www.elsevier.com/locate/anifeedsci 6

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for:

Subscription articles please see

<http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>.

Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open Access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No Open Access publication fee All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for noncommercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for noncommercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article. Elsevier has established agreements with funding bodies, <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. This ensures authors can comply with funding body Open Access requirements, including specific user licenses, such as CC BY. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. If you need to comply with your funding body policy, you can apply for the CC BY license after your manuscript is accepted for publication. To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The publication fee for this journal is **\$2500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

AUTHOR INFORMATION PACK 18 Sep 2013 www.elsevier.com/locate/anifeedsci 7

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop <http://webshop.elsevier.com/languageediting/> or visit our customer support site <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Poorly written and/or presented manuscripts (relative to the journal's guidelines) may be returned to authors for upgrading by the editorial office, prior to a review for scientific merit. Before preparing their manuscript, it is suggested that authors examine the editorial by the Editor-in-Chief in Vol. 134/3-4, which outlines several practices and strategies of manuscript preparation that the Editors-in-Chief have found to be successful. This editorial also outlines practices that can lead to difficulties with reviewers and/or rejection of the manuscript for publication. There is also an example of an Animal Feed Science and Technology manuscript available on the journal website at <http://www.elsevier.com/locate/anifeedsci>.

Submit your article Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/anifee/>

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of three potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Use past tense for current findings, and the present tense for "truths" and hypotheses.

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 titlepage, references, tables, etc., should be numbered continuously.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive use of italics to emphasize part of the text.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

If reference is made to AOAC, ISO or similar analytical procedure(s), the specific procedure identification number(s) must be cited. A number of references for neutral and acid detergent fibre (NDF, ADF) assays exist, and an alternative reference to the now out-of-print USDA Agriculture Handbook 379 must be used. There are many options for NDF and ADF assays (e.g. sodium sulfite, alpha amylase, residual ash), which must be specified in the text. For more details see the editorial in Vol. 118/3-4.

The following definitions should be used, as appropriate:

- a. aNDFom-NDF assayed with a heat stable amylase and expressed exclusive of residual ash.
- b. NDFom-NDF not assayed with a heat stable amylase and expressed exclusive of residual ash.
- c. aNDF-NDF assayed with a heat stable amylase and expressed inclusive of residual ash.
- d. NDF-NDF assayed without a heat stable amylase and expressed inclusive of residual ash.
- e. ADFom-ADF expressed exclusive of residual ash.
- f. ADF-ADF expressed inclusive of residual ash.
- g. Lignin (sa)-Lignin determined by solubilization of cellulose with sulphuric acid.
- h. Lignin (pm)-Lignin determined by oxidation of lignin with permanganate.

While expressions of NDF and ADF inclusive of residual ash will continue to be acceptable (i.e., the terms aNDF, NDF and ADF above), the Editors-in-Chief highly recommend reporting all fibre values, including digestibilities, on an OM basis. Silica is partially soluble in ND, is quantitatively recovered in AD, and so may contribute to the 'fibre' values and to subsequent digestibility coefficients. Reporting 'hemicellulose' values as the difference between NDF and ADF is generally only acceptable if the analyses have been sequential on the same sample. Crude fibre (CF),

nitrogen-free extract(NFE) and total digestible nutrients (TDN) are not acceptable terms for describing feeds and should only be referred to in a historical context.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. Avoid extensive citations and discussion of published literature. Combined 'Results and Discussion' sections are only acceptable for 'Short Communications', except under compelling circumstances.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

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.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case 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 phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**

Contact details must be 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

The abstract should be clear, descriptive and not longer than 400 words. It should contain the following specific information: purpose of study; experimental treatments used; results obtained, preferably with quantitative data; significance of findings; conclusions; implications of results if appropriate.

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.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

AUTHOR INFORMATION PACK 18 Sep 2013 www.elsevier.com/locate/anifeedsci 9

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: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/> 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. SI or SI-derived units should be used throughout (e.g. MJ and not Kcal for energy concentrations). Concentrations should be

expressed on a 'per kg' basis (w/w); however, w/v, v/v, mol/mol or M maybe accepted depending on the circumstances. In addition, 'units' and 'equivalents' are acceptable.

Normality should be avoided, as it may be ambiguous for certain acids. If analytical standards have been used, they should be specified by name (e.g. yeast RNA) and form (e.g. lactose monohydrate). Percents should only be used when describing a relative increase or decrease in a response. Proportions should be maximum 1.0 or ≤ 1.0 . For more details see the editorial in Vol. 118/3-4. Percent is *only* used to indicate relative changes. For composition, both w/w (often solids composition g/kg) and w/v (e.g. g/L), v/v (e.g. mL), mol/mol or M can be accepted depending on the circumstances. Specify units (e.g. g/L) and never as percent. Digestibility/metabolisability and degradability should always be expressed as a coefficient (not %), and the content of, for example, the digestible component should be expressed as g/kg: thus, the coefficient of digestibility of dry matter is 0.8, while the content of digestible dry matter is 800g/kg. A distinction between true and apparent digestibility should be made, as well as between faecal and ileal (e.g. coefficient of total tract apparent digestibility - CTTAD). The terms 'availability' and 'bioavailability' should be avoided without definition in context. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca^{2+} , not as Ca^{++} . Isotope numbers should precede the symbols e.g. ^{18}O . The repeated use 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 P_2O_5).

Math formulae

Present simple formulae in the line of 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). If differences between treatments are statistically significant, this should be indicated by adding the actual 'P' value obtained. If $0.10 > P > 0.05$, then differences can be considered to suggest a trend, or tendency, to a difference, but the actual 'P' value should be stated. Further information on this issue can be found in *Animal Feed Science and Technology* Vol. 129/1-2. Spaces should be used between all values and units, except for the following: Between the value and degrees or percent.

In equations around * and /. In probability expressions ($P < 0.05$). When probability values are given, the 'P' should be a capital letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.

AUTHOR INFORMATION PACK 18 Sep 2013 www.elsevier.com/locate/anifeedsci
10

- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts. TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;

- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

All data in figures should have a measure of variation either on the plot (e.g., error bars), in the figure legend itself, or by reference to a table with measures of variation in the figure legend. Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the figures should be kept to a minimum. If a scale is given, use bar scales (instead of numerical scales) that must be changed with reduction.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'grayscale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list. The accuracy of the references is the responsibility of the author(s). References published in other than the English language should be avoided, but are acceptable if they

include an English language 'Abstract' and the number of non-English language references cited are reasonable (in the view of the handling Editor) relative to the total number of references cited. AUTHOR INFORMATION PACK 18 Sep 2013
www.elsevier.com/locate/anifeedsci 11 In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed - if necessary- by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp. 12-16)". If reference is made in the text to a publication written by more than two authors, the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on authors' names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates - publications of the same author with one co-author - publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 2001a, 2001b, etc.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume

number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;

2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;

3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication. *Examples:* Reference to a journal publication: Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. Reference to a book: Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York. Reference to a chapter in an edited book: Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

AUTHOR INFORMATION PACK 18 Sep 2013
www.elsevier.com/locate/anifeedsci 12 *Journal abbreviations source* Journal names should be abbreviated according to the List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>.