

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

PATRICIA PIMENTEL DOS SANTOS

Uso de glicerina bruta e farelo de algodão na alimentação de ovinos

Piracicaba

2013

PATRICIA PIMENTEL DOS SANTOS

Uso de glicerina bruta e farelo de algodão na alimentação de ovinos

**Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear
na Agricultura da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências**

**Área de Concentração: Energia Nuclear na
Agricultura**

Orientador: Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla

Piracicaba

2013

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Santos, Patricia Pimentel dos

Uso de glicerina bruta e farelo de algodão na alimentação de ovinos / Patricia Pimentel dos Santos; orientador Adibe Luiz Abdalla. - - Piracicaba, 2013.

66 f.: il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Biodiesel 2. Digestibilidade 3. Efeito estufa 4. Gases 5. Ruminantes
6. Subprodutos para animais I. Título

CDU 636.087.2 : 636.3

*Primeiro ao Grande Pai, que sem ele
nada seria possível,*

*À minha amada mãe, que pela sua
força e seu inabalável amor me
permitiu chegar até aqui,*

*Ao meu amado noivo Marcos
Righeto, que sempre acreditou, até
nos momentos em que eu duvidei,*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA/USP e ao Laboratório de Nutrição Animal, pela oportunidade de realização deste trabalho;

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior - (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos;

Ao Prof. Adibe Luiz Abdalla, pelos ensinamentos, confiança, dedicação e paciência interminável;

Ao Prof. Helder Louvandini, pelos inúmeros ensinamentos e ajuda;

Aos meus irmãos de coração Bernardo Berenchtein e Ana Luísa, pela eterna amizade, pelas conversas no café e pela grande apoio na realização deste trabalho;

À amiga Patrícia Barbosa Godoy Schiavinatto, pelos cafezinhos no Pão de Açúcar, pelas produções de gases de madrugada e pela ajuda no desenvolvimento deste estudo;

Aos Amigos Amr Morsy e Yosra Soltan, pela ajuda na execução dos experimentos e conversas e brincadeiras inesquecíveis;

À amiga Aline Campeche, pelos dias em que ficamos no Biotério cantando e “encantando” os animais do meu experimento, e pelo companheirismo durante a realização deste trabalho;

Aos amigos do LANA, Ronaldo, Adibinho, Luiz Henrique, Alessandra, Edvânia, Fernanda, Juliano, Ana Cláudia, Lília, Erika, Samy, Andressa, Gisele e tantos outros vem e vão, e que sempre deixam suas marcas em nossas vidas;

Aos funcionários e amigos do LANA Maria Regina Peçanha, Lécio Aparecido Castilho e Joaquim Everaldo dos Santos, pela colaboração na realização dos experimentos;

À minha família, principalmente à minha mãe Leoníderse, minha avó Maria, e minhas tias Idalina e Eunice, pelo grande amor, incentivo e compreensão, e por estarem sempre ao meu lado nesta caminhada;

Aos meus avós Rosa (in memoriam) e Fernando (in memoriam), que, infelizmente não puderam acompanhar essa conquista, e aos meus tios e padrinhos Lourdes e Manoel, pelo incentivo e apoio;

Aos meus sogros Maria do Carmo e Marcos, e aos meus cunhados Marina e Bruno, por ter me recebido com braços abertos em sua família;

Ao meu noivo Marcos Vinícius, que com seu ímenso amor, sempre acreditou no meu potencial, tendo sempre uma palavra de incentivo, um gesto de carinho e muita, mas muita compreensão e paciência;

E a todos, que direta ou indiretamente estiveram presente e colaboraram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

MUITO OBRIGADA A TODOS!!

"Ando devagar
Porque já tive pressa
E levo esse sorriso
Porque já chorei demais

Hoje me sinto mais forte,
Mais feliz, quem sabe
Só levo a certeza
De que muito pouco sei,
Ou nada sei

Conhecer as manhas
E as manhãs
O sabor das massas
E das maçãs

É preciso amor
Pra poder pulsar
É preciso paz pra poder sorrir
É preciso a chuva para florir

Penso que cumprir a vida
Seja simplesmente
Compreender a marcha
E ir tocando em frente

Como um velho boiadeiro
Levando a boiada
Eu vou tocando os dias
Pela longa estrada, eu vou
Estrada eu sou

Todo mundo ama um dia,
Todo mundo chora
Um dia a gente chega
E no outro vai embora

Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si
Carrega o dom de ser capaz
E ser feliz"

(Almir Sater e Renato Teixeira)

RESUMO

SANTOS, P. P. dos. **Uso de glicerina bruta e farelo de algodão na alimentação de ovinos.** 2013. 66 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

Os ovinos apresentam grande potencial de aproveitamento de produtos que não seriam empregados na alimentação de animais monogástricos. Dentre esses produtos estão os coprodutos da cadeia do biodiesel. Porém os ruminantes produzem metano durante o processo digestivo, um dos gases de efeito estufa. O objetivo deste trabalho foi avaliar o farelo de algodão e a glicerina bruta na alimentação de ovinos em substituição ao farelo de soja e do milho. Neste trabalho foram realizados três experimentos. O primeiro foi realizado ensaio *in vitro* de produção de gases e de degradabilidade da matéria orgânica para avaliar dietas com feno de Tifton (70%) e concentrado (30%) com milho e farelo de soja. As dietas experimentais foram elaboradas substituindo-se o farelo de soja pelo farelo de algodão e o milho por glicerina bruta nos níveis de 25, 50, 75 e 100%, totalizando 25 dietas. Como resultado, foi encontrada redução na produção de gases com o aumento na proporção de farelo de algodão, além do aumento na produção de gases até 75% de glicerina bruta, sendo que acima deste nível houve redução na produção de gases. Para a degradabilidade das dietas, houve aumento com a substituição de até 50% de farelo de algodão. Quanto à produção de metano, houve aumento de acordo com o aumento nos níveis de glicerina, não sendo influenciada pela presença de farelo de algodão. Com os resultados deste primeiro experimento, foram selecionadas dez dietas que apresentaram maiores valores de degradabilidade e menor produção de metano, as quais foram utilizadas nos ensaios *in vitro* de degradabilidade e digestibilidade pós ruminal da proteína; bem como a quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) produzidos no ensaio de produção de gases. Para os resultados de degradabilidade da proteína foi observado que a adição de glicerina bruta promoveu redução, enquanto que para a digestibilidade da proteína pós-rúmen, a presença de glicerina bruta não teve efeito. Para os AGCC se observou aumento na produção de propionato e redução na de acetato, em relação à adição de glicerina bruta. Após os dois ensaios, foram selecionadas cinco dietas que apresentaram os melhores resultados de degradabilidade *in vitro* para estimar a síntese microbiana *in vitro*. Não foram observadas diferenças entre as dietas testadas para síntese microbiana. De acordo com os resultados dos ensaios *in vitro*, foram selecionadas duas dietas que apresentaram os melhores resultados para a digestibilidade da proteína e da matéria orgânica, bem como para a produção de metano. Foram realizados dois ensaios, o primeiro com 15 animais e o segundo com 6 animais. Como resultados foram observados redução na digestibilidade da fibra em detergente neutro e da proteína bruta para as dietas testadas. Quanto à concentração de AGCC *in vivo*, houve redução na concentração de acetato e aumento na de propionato. A produção de metano *in vivo* foi menor nos animais que receberam as dietas testadas. Como conclusão pode-se afirmar que tanto o farelo de algodão como a glicerina bruta podem substituir os ingredientes tradicionais farelo de soja e milho na dieta para ruminantes.

Palavras-chave: Biodiesel. Co-produto. Digestibilidade. Metano.

ABSTRACT

SANTOS, P. P. dos. **Use of crude glycerin and cottonseed meal in diets for sheep**. 2013. 66 p. Thesis (Doctoral) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

Sheep have great potential for using products that usually would not be used in feeding of monogastric animals. Among these products are the byproducts of the biodiesel chain. However ruminants produce methane during the digestive process, one of the greenhouse gases. The aim of this study was to evaluate the cottonseed meal and crude glycerin in diets for sheep to replace soybean meal and corn respectively. This work was carried out in three experiments. The first trial was an *in vitro* gas production and organic matter degradability assay for evaluating diets with 70% Tifton hay and 30% concentrate (soybean meal and corn). The experimental diets were formulated by replacing soybean meal by cottonseed meal and corn by crude glycerin at levels of 25, 50, 75 and 100%, totaling 25 diets. As results, it was observed a decreased in the gas production with the increase in the proportion of cottonseed meal, and it was also observed an increase when crude glycerin was increased up to 75%, and above this level, there was a reduction in the gases production. For degradability, it was increased with the replacement of up to 50% of cottonseed meal. Methane production was increased in accordance with increasing levels of glycerin, and it was not influenced by the presence of cottonseed meal. After this experiment, it was selected ten diets which showed higher degradability and lower methane production, and then they were used for *in vitro* degradability and post ruminal digestibility of protein tests, as well as the quantification of short-chain fatty acids (SCFA) produced during the gas test. The result of degradability of the protein was observed that the addition of crude glycerin caused a reduction in degradability of the diets; as for the digestibility of protein post-rumen, the presence of crude glycerin did not affect digestibility, whereas the highest values were observed in the diets which had lower degradability. SCFA quantification showed an increase in propionate production and decreased in acetate production as reflecting the addition of crude glycerin. After the two tests, it was selected five diets in order to evaluate its potential for *in vitro* microbial synthesis; with no differences observed among the tested diets. According to the results from the *in vitro* assays, it was selected two diets which showed best results for digestibility of protein and organic matter as well as methane production. These two diets were used to conduct an *in vivo* digestibility trial and quantification of enteric methane production. Two experiments were conducted, the first with 15 animals and the second with 6 animals. As results, it was observed reduction in neutral detergent fiber and crude protein digestibility for the tested diets. As for the concentration of SCFA *in vivo*, reduction in the acetate concentration with increase in propionate concentrations was observed. For methane production *in vivo*, there was a reduction in methane production by animals fed the tested diets. As a conclusion, it can be stated that both the cottonseed meal and crude glycerin can replace the traditional ingredients soybean meal and corn in diets for ruminants

Keywords: Biodiesel. By-product. Digestibility. Methane.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Produções de Metano.....	19
2.2 Subprodutos do Biodiesel.....	20
2.2.1 Farelo de algodão.....	21
2.2.2 Glicerina Bruta	23
3 DEGRADABILIDADE <i>IN VITRO</i> E PRODUÇÃO DE GASES DE FARELO DE ALGODÃO E GLICERINA BRUTA	35
Resumo	35
Abstract.....	36
3.1 Introdução.....	37
3.2 Material e Métodos.....	37
3.3 Resultados e Discussão.....	40
3.4 Conclusões.....	43
Referências	44
4 DEGRADABILIDADE <i>IN VITRO</i> DA PROTEÍNA, SINTESE MICROBIANA UTILIZANDO ³²P COMO MARCADOR E CONCENTRAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE AGCC EM DIETAS UTILIZANDO FARELO DE ALGODÃO E GLICERINA BRUTA.....	46
Resumo	46
Abstract.....	47
4.1 Introdução.....	48
4.2 Material e Métodos.....	48
4.3 Resultados e Discussão.....	51
4.4 Conclusões.....	54
Referências	55
5 DIGESTIBILIDADE E PRODUÇÃO DE METANO ENTÉRICO <i>IN VIVO</i> DE DIETA UTILIZANDO FARELO DE ALGODÃO E GLICERINA BRUTA.....	56
Resumo	56
Abstract.....	57
5.1 Introdução.....	58
5.2 Material e Métodos.....	58
5.3 Resultados e Discussão.....	60
5.4 Conclusões.....	64
Referências	64
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66

1. INTRODUÇÃO GERAL

A instabilidade nos preços do petróleo, aliada às políticas globais para controlar a concentração dos gases causadores do efeito estufa na atmosfera, vêm desencadeando uma série de mudanças em diversas atividades, como agropecuária e transporte. A produção de combustível, por exemplo, volta-se hoje para a substituição progressiva de matérias-primas fósseis por renováveis, principalmente a biomassa (ABDALLA et al., 2008).

A bioenergia tem desempenhado papel importante na busca por fontes viáveis de combustíveis para substituir os derivados de petróleo, e na redução, em longo prazo, de emissões de dióxido de carbono para a atmosfera. A denominação bioenergia se refere à energia renovável proveniente de fontes biológicas que podem ser usadas para gerar calor, eletricidade e combustível. Em termos da moderna bioenergia, etanol, biodiesel e biogás são os três produtos majoritários (YUAN et al., 2008). Especialistas apontam a presente década como a da biomassa/bioenergia, criando-se um novo modelo de agricultura, não alimentar, responsável pela produção de matérias-primas energéticas renováveis, com potencial para substituir gradativamente o uso do petróleo (PEREIRA et al., 2008).

Com o crescimento no uso de biodiesel nos últimos anos, a produção de coprodutos desta agroindústria vem aumentando, podendo a maioria ser utilizada na alimentação de ruminantes, visando reduzir os custos de produção. Essa alternativa tende a viabilizar o sistema de produção para pequenos e médios produtores, além de reduzir os problemas causados pela deposição desses resíduos no ambiente (MELLO et al., 2008).

Os ruminantes possuem o maior potencial para o aproveitamento de coprodutos agroindustriais devido às características peculiares de seu aparelho digestório e a simbiose com microrganismos do rúmen, fazendo com que estes alimentos sejam transformados em nutrientes que podem ser aproveitados pelo animal (VAN CLEEF, 2008).

Entretanto, ruminantes produzem metano durante o processo de degradação do alimento no rúmen, sendo este um dos gases responsáveis pelo efeito estufa. A fermentação entérica de ruminantes (bovinos, ovinos, caprinos e bubalinos) produz em média 80 milhões de toneladas de metano por ano, que equivale à 22% da emissão antropogênica global (USEPA, 2000). As principais fontes de emissão de gases de efeito estufa (GEE) do Brasil, estão concentradas em dois setores: o primeiro, uso do solo, mudança desse uso e das florestas, que contribuem com 55%; o segundo é a agropecuária, responsável por outros 25%

da emissão total (BRASIL, 2004). Grande parte dessa remessa é creditada à pecuária, por expelir CH₄, e por emitir N₂O, decorrente da deposição de dejetos dos animais, que compreendem 68% e 43% das emissões totais desses gases no país (BERCHIELLI et al., 2012).

Os ruminantes representam uma das poucas fontes produtoras de CH₄ que podem ser manipuladas, pois a produção de metano por bovinos é proveniente da fermentação ruminal, que está relacionada ao tipo de animal, ao consumo e à digestibilidade do alimento (RIVERA et al., 2010). Assim é possível reduzir a produção desse gás pela modificação da fermentação ruminal, obtida por alteração do volumoso, do tipo e da quantidade de carboidrato suplementado à dieta, pela adição de lipídeos e pela manipulação da microbiota ruminal com aditivos alimentares (MOHAMMED et al., 2004; SHIBATA; TERADA, 2010). Para Abdalla et al. (2008), a utilização dos coprodutos da produção de biodiesel na alimentação animal tem o potencial de aumentar a produtividade e reduzir a emissão de metano pelos animais, devido principalmente à presença de compostos bioativos nestes coprodutos, promovendo assim a manipulação da microbiota ruminal.

Portanto, este trabalho tem como objetivo inicial avaliar o farelo de algodão proveniente da extração de óleo em substituição ao farelo de soja como fonte proteica e glicerina bruta em substituição ao milho em grão como fonte energética na alimentação de ovinos, visando redução da produção de metano entérico e redução de custos de produção.

Os resultados são apresentados na forma de capítulos. No primeiro capítulo é apresentada uma revisão de literatura sobre biodiesel e seus coprodutos farelo de algodão e glicerina bruta. No segundo capítulo refere-se à avaliação dos melhores níveis de farelo de algodão e de glicerina bruta a ser empregado na alimentação de ruminantes através de ensaio de produção de gases *in vitro*. No capítulo três estão descritos os ensaios de determinação de digestibilidade de proteína pós ruminal, síntese microbiana *in vitro* utilizando o ³²P como marcador e a quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta realizado com as dietas que apresentaram os melhores resultados no ensaio *in vitro*. No quarto capítulo refere-se ao ensaio de digestibilidade da substituição do farelo de soja por farelo de algodão e do milho por glicerina bruta para ovinos, bem como a produção de metano entérico. Finalizando, são apresentadas as considerações finais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Produções de Metano

A agricultura e a pecuária contribuem para as emissões antrópicas de metano (CH_4), dióxido de carbono (CO_2) e óxido nitroso (N_2O) à atmosfera. A agricultura é responsável por aproximadamente 15% das emissões antropogênicas de CO_2 , 49% de CH_4 e 66% de N_2O (PRIMAVESI et al., 2007). As maiores fontes de emissão de CH_4 considerando as atividades agrícolas são representadas pela fermentação entérica em ruminantes, produção de arroz em terrenos alagados e fermentação de dejetos da pecuária. O metano é o segundo contribuinte para o aquecimento da Terra, logo após do CO_2 (IPCC, 2001).

Os países mais desenvolvidos têm sido apontados como os principais responsáveis pela situação atual da atmosfera do planeta. No entanto, as estimativas realizadas nos países em desenvolvimento, localizados na região tropical, também os classificam como importantes emissores de gases de efeito estufa, uma vez que as condições climáticas dessa região aumentam em muito o potencial de emissão de gases como o CH_4 (COTTON; PIELKE, 1995).

Segundo Cotton e Pielke (1995), o CH_4 , além de ser caracterizado como importante gás de efeito estufa, tem relação direta com a eficiência da fermentação ruminal em virtude da perda de carbono e, conseqüentemente, perda de energia, determinando menor desempenho animal. A produção de CH_4 ocorre durante a fermentação dos carboidratos do material vegetal ingerido, processo anaeróbico efetuado pela população microbiana ruminal, que converte os carboidratos em ácidos graxos de cadeia curta, principalmente os ácidos acético, butírico e propiônico. Nesse processo digestivo, parte do carbono é concomitantemente transformada em CH_4 e em CO_2 (PRIMAVESI et al., 2004).

Estudos revelaram que a emissão de CH_4 proveniente da fermentação ruminal depende principalmente do tipo de animal, nível de consumo de alimentos, tipo de carboidratos presentes na dieta, sendo que carboidratos fibrosos aumentam a produção de H^+ , e conseqüentemente a produção de CH_4 ; processamento da forragem; adição de lipídeos à dieta; suprimento de minerais; manipulação dos microrganismos ruminais, e da digestibilidade dos alimentos (PEDREIRA et al., 2005).

Baseado em aspectos de proteção mercadológica, o Brasil, por ser detentor do maior rebanho comercial de bovinos do mundo e por utilizar forrageiras tropicais como base da alimentação destes animais, tem sido apontado como importante produtor de CH₄, fato que pode ser utilizado como embargo aos produtos da pecuária destinados à exportação (PEDREIRA et al., 2005).

2.2 Subprodutos do biodiesel

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 dos custos por meio da busca de alternativas à substituição de itens da dieta que possam melhorar as margens de lucro da atividade, apresentando desempenho pelo menos semelhantes àqueles obtidos com itens de uso já consagrado (CNA, 2010).

No âmbito da produção de oleaginosas, a utilização dos grãos como fonte de lipídeos para a produção do biodiesel tem apresentado aumento significativo. Todavia, as transformações relacionadas à produção dessa fonte agroenergética são responsáveis pela geração de coprodutos (LIMA JUNIOR et al., 2011). Os principais coprodutos são obtidos após a extração do óleo de sementes oleaginosas (tortas e farelos) e após o processo de conversão de triglicerídeos em biodiesel por meio de transesterificação (glicerina bruta), os quais em conjunto, representam mais de 50% da massa inicial de sementes utilizada na cadeia agroindustrial (OLIVEIRA et al., 2010).

O biodiesel pode ser produzido a partir de diversas fontes, das quais se destacam a soja, o algodão, a mamona, já bastante cultivadas, e outras como o pinhão-mansão, ainda pouco conhecido, o dendê, o babaçu, a macaúba, dentre outras, caracterizando-se assim, juntamente com o etanol produzido a partir da cana-de-açúcar, como promissora fonte de combustível limpo e renovável (CÂMARA; CHIAVEGATO, 2001).

Abdalla et al. (2008) concluem que, muitas tortas e farelos oriundos da produção de biodiesel podem apresentar características nutricionais adequadas para inclusão na dieta de ruminantes, entretanto cuidados devem ser observados quanto a possíveis efeitos deletérios devido à presença de metabólitos bioativos em alguns materiais, recomendando estudo criterioso para a introdução segura destes subprodutos na cadeia produtiva.

2.2.1 Farelo de algodão

A torta ou farelo é o resíduo proveniente do processo de extração do óleo vegetal dos grãos de oleaginosas, que em geral pode ser por prensagem e/ou extração com solvente.

O algodoeiro (*Gossypium* spp) é cultivado para produção de fibra e óleo. Como coproduto do algodão, o farelo representa mundialmente a segunda mais importante fonte ou suplemento proteico disponível para a alimentação animal, ultrapassada apenas pela soja (GADELHA et al., 2011).

O farelo de algodão é o produto resultante da extração do óleo do caroço pela conjugação de métodos físicos e químicos (LIMA JUNIOR et al., 2011). Em função do tipo da extração, podem-se obter a torta gorda (5% de óleo residual), mais energética, proveniente apenas da prensagem mecânica, porém com menor teor de proteína; e a torta magra ou farelo (menos de 1% de óleo residual) oriundo da extração por solvente, principalmente hexano, após prensagem, a qual apresenta maior concentração de proteína. Segundo NRC (2001) este coproduto tem sido utilizado com o objetivo de reduzir o uso do farelo de soja visando à obtenção de condições econômicas mais vantajosas, muito embora apresente menores teores de energia e proteína, é caracterizado por apresentar maior teor de proteína não degradável no rúmen.

A utilização do farelo de algodão na alimentação animal pode ser limitada devida à presença de um composto presente nas sementes denominado gossipol. O gossipol é um pigmento fenólico de coloração amarelada, produzido por glândulas encontradas nas raízes, partes aéreas e sementes do algodão (FORMAN et al., 1991; CHEEKE, 1998; SOTO-BLANCO, 2008). A função do gossipol para a planta é limitar a predação por insetos, incrementando a sobrevivência do vegetal (ABDURAKHIMOV et al., 2009; KONG et al., 2010; EVANGELISTA et al., 2011).

Os efeitos tóxicos do gossipol são maiores para os monogástricos, como suínos e aves, que são bastante suscetíveis à toxicidade de gossipol, assim como os pré-ruminantes, podendo reduzir a capacidade carreadora de oxigênio no sangue, resultando em respirações curtas e edemas pulmonares (MORGAN et al., 1988; RISCO et al., 1992; RANDEL et al., 1992; WILLARD et al., 1995; ZHANG et al., 2007). Portanto, os sinais de intoxicação aguda pelo gossipol em não ruminantes e pré-ruminantes são semelhantes e incluem dificuldade na respiração, dispnéia, diminuição da taxa de crescimento, anorexia, fraqueza, apatia e morte depois de vários dias (ROGERS et al., 1975; MORGAN et al., 1988; KERR, 1989; VELASQUEZ-PEREIRA et al., 1999; FOMBAND; BRYANT, 2004; ZHANG et al., 2007). Além disto, a ocorrência de morte súbita promovida pelo gossipol foi relatada em bezerros (HOLMBERG et al., 1988; HUDSON et al., 1988). Achados post-mortem incluem derrames pleural e abdominal, necrose centrolobular do fígado (RISCO et al., 1992), edema generalizado, congestão dos pulmões e do fígado e degeneração das fibras cardíacas (RANDEL et al., 1992; ALFORD et al., 1996; ROBINSON et al., 2001).

Os ruminantes adultos apresentam menor sensibilidade ao gossipol por haver ligação desta substância a proteínas do fluido ruminal (WILLARD et al., 1995). A ingestão de gossipol em quantidades superiores à capacidade de detoxificação ruminal permite a absorção de gossipol livre. Até recentemente considerava-se que os ruminantes poderiam inativar mais gossipol do que seriam capazes de consumir. Como o gossipol altera a coloração e a qualidade do óleo de sementes de algodão, os processamentos para a obtenção do óleo procuram manter esta toxina nas sementes. Uma forma de se obter isto é através do processamento térmico, que faz o gossipol se ligar a aminoácidos constituintes de proteínas do algodão, especialmente ao aminoácido lisina, reduzindo sua disponibilidade (KERR, 1989; CHEEKE, 1998; SOTO-BLANCO, 2008).

No entanto, métodos modernos de extração do óleo têm aumentado a concentração deste composto fenólico nos subprodutos, ao mesmo tempo em que as vacas de alta produção tendem a aumentar a ingestão de alimentos, e conseqüentemente a de gossipol. Vacas intoxicadas apresentam taquipnéia e anemia caracterizada por redução na concentração de hemoglobina, aumento na concentração de proteínas plasmáticas totais e na fragilidade eritrocitária; ocasionalmente ocorrem mortes. Os achados patológicos incluem edema pulmonar e abomasal, presença de líquido amarelado nas cavidades torácica e peritoneal, fígado com aspecto denominado “noz-moscada” e fibras cardíacas degeneradas e

hipertróficas. Vacas da raça Jersey, que são as mais sensíveis à intoxicação pelo cobre, apresentam significativo aumento nesta sensibilidade quando são alimentadas com farelo de algodão, provavelmente por causa da lesão hepática (KERR, 1989; CHEEKE, 1998; SOTO-BLANCO, 2008).

O conteúdo de gossipol livre nas sementes íntegras de algodão é de cerca de 0,5%. Estes níveis variam de 0,1 a 0,5% quando é feita a extração do óleo por solventes. Já nos processos mecânicos de extração envolvendo pressão e tratamento térmico, esta redução é para cerca de 0,05%. Ainda, a extração por solventes podem produzir farelos com menor concentração de gossipol livre (0,05%) quando se realiza extrusão ou expansão antes da extração (CHEEKE, 1998).

O farelo de algodão pode ser utilizado em dietas para ruminantes, em substituição ao farelo de soja, parcial ou totalmente. Ribeiro et al. (2007) mostraram que bovinos alimentados com farelo de algodão apresentaram redução no ganho de peso, entretanto a fonte proteica (farelo de soja ou farelo de algodão) não afetou a qualidade da carcaça. Para Pina et al. (2006), vacas leiteiras de alta produção (25 Kg de leite/d) podem ser alimentadas com farelo de algodão, quando utilizada a silagem de milho como volumoso, na proporção de 60% da dieta.

Alguns autores observaram a redução na digestibilidade da matéria seca e da matéria orgânica ao se substituir o farelo de soja pelo farelo de algodão, sendo que Abou Donia (1989) sugeriu que essa depressão na digestibilidade, evidenciada principalmente na digestibilidade da proteína está relacionada a toxidez promovida pelo gossipol. O gossipol é combinado com grupamentos amino no trato digestivo e então é excretado, eliminando assim o gossipol absorvido. Por outro lado, a redução na digestibilidade dos nutrientes em cordeiros alimentados com o farelo de algodão pode ser devido ao efeito do gossipol nas enzimas digestivas.

2.2.2 Glicerina Bruta

O coproduto líquido da produção de biodiesel é a glicerina bruta (GB) que consiste da mistura de glicerina, ácidos, ésteres, álcalis e álcoois, que era antigamente denominada genericamente como “glicerina” ou “glicerol”. Seu grau de pureza é muito baixo, tendo a

formulação típica de 40 a 90% de glicerina, 8 a 50% de água, menos de 2% de metanol e 0 a 10% de sais (QUINTELLA et al., 2009).

A glicerina bruta é o subproduto da conversão de triglicérides para metil ésteres durante o processo de transesterificação, tendo como sinônimos glicerina; 1,2,3- propanotriol; 1,2,3- trihidroxipropano e gliceritol. A reação de transesterificação entre óleo e o álcool produz aproximadamente 10% de glicerina bruta e 90% de biodiesel. A glicerina bruta é destilada para ser utilizada em 1500 usos industriais, como na produção de polímeros sintéticos, cosméticos, produtos de cuidados pessoais, alimentos, plásticos e resinas, e na indústria farmacêutica. Porém, o uso da glicerina como alimento para animais ainda não está estabelecido. A rápida expansão da indústria de biodiesel tem criado um excesso no fornecimento de glicerina bruta, sendo que esta glicerina poderia ser utilizada na dieta de ruminantes, reduzindo os custos de alimentação. Em 2011, foram gerados 273,4 mil m³ de glicerina bruta como subproduto da produção de biodiesel (B100), 6,4% a mais que em 2010.

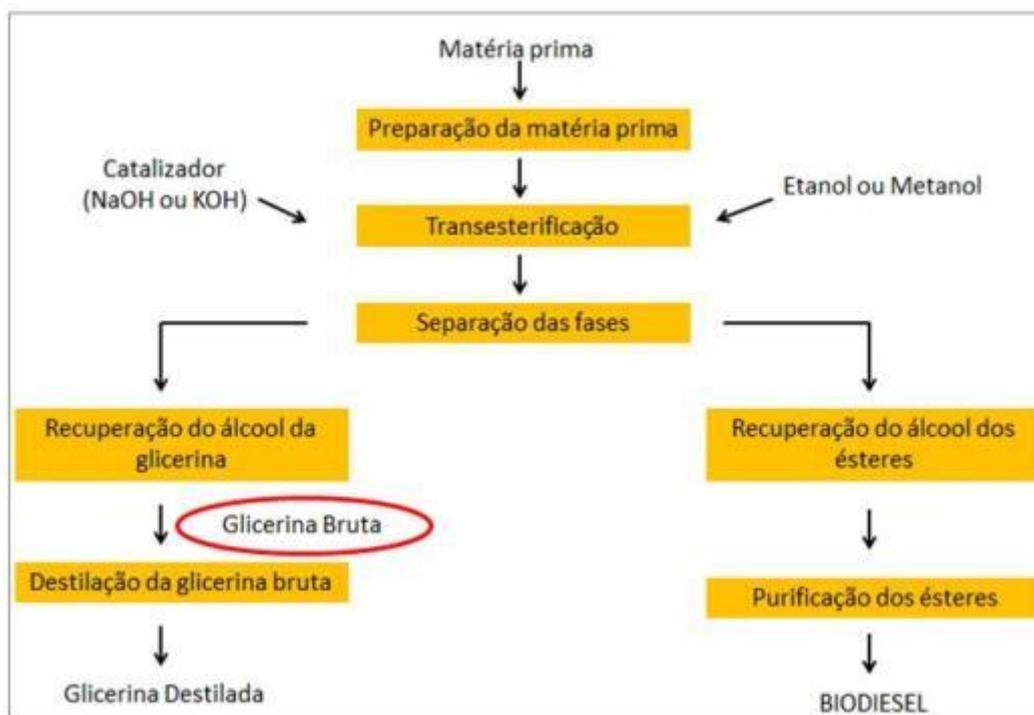


Figura 1 - Descrição do processo de produção do biodiesel e obtenção da glicerina bruta

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL) autorizou, no ano de 2010, o uso da glicerina (bruta e loira) como insumo para alimentação animal e estabeleceu um padrão mínimo de qualidade, como: glicerol (mínimo de 800 g/kg); umidade (máximo 130 g/kg); metanol (máximo 150 ppm) e sódio e matéria mineral (valores garantidos pelo fabricante g/kg, podendo variar pelo processo produtivo).

Durante o processo de transesterificação do biodiesel, o metanol quando utilizado em níveis altos não é eficientemente reciclado durante o processo, tornando-se resíduo do processo produtivo do biodiesel. Considerando que a fase aquosa deste processo é composta pela glicerina, a água e o metanol, a indústria preconiza 0,5% de metanol como sendo o valor máximo permitido na glicerina bruta produzida (MENTEN et al., 2009).

De acordo com Dasari (2007) o resíduo de metanol tende a ser maior na produção de biodiesel em pequena escala, desta forma para que a glicerina bruta possa ser utilizada como componente na alimentação animal, deve-se atentar aos níveis de metanol, pois níveis altos podem ocasionar intoxicação por ácido fórmico nos animais, o qual é uma substância tóxica metabolizada no fígado dos animais a partir do metanol consumido.

O glicerol é caracterizado como líquido de baixa viscosidade, com pH próximo da neutralidade, aroma suave e agradável, e sabor adocicado. Além disso, é higroscópico, aumentando a capacidade de retenção de água em dietas com baixa umidade ambiental, por esse motivo é considerado um álcool açúcar (DONKIN, 2008). O glicerol é um produto rico em energia, cerca de 4320 Kcal/kg de glicerol puro.

Componente do metabolismo normal dos animais, o glicerol é encontrado na circulação sanguínea e nas células. Este apresenta três origens distintas, podendo ser a partir da lipólise do tecido adiposo, a partir da hidrólise dos triglicerídeos das lipoproteínas do sangue e através da gordura dietética (LIN, 1977).

O glicerol também pode ser absorvido diretamente pelo epitélio ruminal, sendo convertido em glicose no fígado. A enzima glicerol quinase converte glicerol e ATP a glicerol-3-fosfato e ADP ao nível de triose fosfato, direcionando o glicerol para a gliconeogênese (KREHBIEL, 2008). Assim, a glicerina apresenta potencial para aplicação como substrato gliconeogênico para ruminantes. Trabue et al. (2007) sugeriram que 80% do

glicerol é metabolizado no rúmen após 24 horas, e por ser fermentado principalmente a propionato, resulta no decréscimo da relação acetato:propionato no rúmen. Segundo Krehbiel (2008) além do aumento na produção de propionato há também produção de butirato no rúmen devido à inclusão de glicerol na dieta dos ruminantes.

Segundo Lage et al. (2010), o aumento nos teores de glicerina bruta na dieta de cordeiros terminados em confinamento ocasionou um decréscimo linear no consumo de matéria seca, expresso em grama por dia e grama por quilograma de peso corporal, este resultado pode ser atribuído à produção de propionato a partir do metabolismo do glicerol incorporado na dieta.

De acordo com Wang et al. (2009) os animais suplementados com níveis de 100, 200 e 300 g/dia de glicerol apresentaram padrão melhor de fermentação ruminal, aumentando a relação propionato: acetato. O estudo de Donkin et al. (2009) cita ser possível realizar a substituição do milho por glicerol em dietas para vacas leiteiras até o nível de 15% em relação a matéria seca.

Diversos estudos têm sido realizados para verificar o efeito do uso do glicerol na alimentação de ruminantes. Em meados de 1950, autores citados por Donkin (2008), evidenciaram o uso de glicerol na alimentação de vacas leiteiras para o tratamento de cetose. Para Donkin (2008), inexistem dados precisos quanto às taxas de fermentação do glicerol no rúmen, mesmo com evidências positivas em relação ao uso de glicerol em dietas para vacas leiteiras de alta produção. O autor conclui sobre a necessidade de informação precisa para permitir uma avaliação completa sobre o uso do glicerol na alimentação de ruminantes e o impacto resultante na saúde e produtividade da vaca.

Remond et al. (1993) observaram aumento significativo na concentração de ácido propiônico e butírico e decréscimo significativo na concentração de ácido acético em vacas consumindo silagem de milho e suplementadas de glicerina.

Shröder e Südekum (1999) adicionaram 10% de glicerol na dieta de bovinos, substituindo mais da metade do amido presente na dieta, e não observaram efeitos negativos sobre o consumo, digestibilidade ruminal, síntese microbiana e digestibilidade no trato digestivo total.

Trabue et al. (2007) sugere que o metabolismo ruminal de glicerol é de aproximadamente 80% após 24 hs do início da alimentação, resultando no decréscimo da relação acetato: propionato. Estudos indicam que todo o glicerol ingerido é convertido em propionato, o que levaria a redução desta proporção.

A glicerina bruta pode afetar negativamente a atividade celulolítica no rúmen, diminuindo a digestão da fibra. Reduções na degradação de celulose pelas bactérias celulolíticas e fungos celulolíticos foram observados *in vitro* quando os meios continham 0,5% e 5% de glicerina, respectivamente (ROGER et al., 1992), conseqüentemente, a glicerina reduz a digestibilidade *in vitro* de matéria seca, quando se utilizou feno de aveia e carboximetilcelulose, que é um substrato solúvel menos complexo que as forragens (PAGGI et al., 2004). Da mesma forma, Parsons et al. (2009) observaram a tendência (linear, $P=0,12$) para redução na digestão aparente de FDN no trato total quando novilhos canulados foram alimentados com 2 e 4% de glicerina bruta na dieta. De acordo com Krehbiel (2008), as diferenças na digestibilidade da fibra pode ser atribuída à habilidade dos microorganismos se adaptarem a glicerina ao longo do tempo, como a absorção de glicerina aumenta ao longo do tempo. Quando se utiliza a glicerina bruta nos níveis de 0, 2 e 4% e rações de novilhos canulados, observou-se o decréscimo das concentrações de acetato, butirato e valerato com o aumento no nível de glicerina, porém a concentração de propionato não foi alterada nos diferentes níveis (PARSONS et al., 2009). Além disso, alguns autores observaram que não houve alteração na produção de AGCC quando a glicerina foi adicionada a dietas com alto teor de concentrado para bovinos (PARSONS et al., 2009; MACH et al, 2009).

Em ruminantes o glicerol pode ser rapidamente convertido em ácido propiônico e absorvido pela parede ruminal. De Frain et al. (2004) observaram a substituição do milho pelo glicerol resultou em concentrações de glicose plasmática similares, sugerindo que glicerol é um substituto energético em potencial.

O glicerol é absorvido diretamente pelo epitélio ruminal, metabolizado no fígado e direcionado para a gliconeogênese pela ação da enzima glicerol quinase, que o converte em glicose. Parte do glicerol pode ser fermentado a propionato, no rúmen, que por sua vez é metabolizado a oxaloacetato, por meio do ciclo de Krebs, no fígado, e pode ser utilizado para formar glicose pela via gliconeogênica. Assim, a glicerina bruta apresenta potencial de aplicação como substrato gliconeogênico para ruminantes (KREHBIEL, 2008).

Thompson e He (2006) analisaram a glicerina de média pureza, de óleos vegetais de duas variedades de mostarda, nabo forrageiro, canola, soja, crambe e de óleos vegetais usados (WVO – waste vegetables oils) e observaram que a glicerina de óleos de primeiro uso poderia ser aproveitada como energético, misturado a um produto com alta proteína, em suplementos alimentares para animais.

Pethick et al.(1999) observaram que a suplementação dietética de ovinos com 3,5% de glicerol e 1,5% de propilenoglicol melhorou a qualidade da carne e dobrou o consumo de água dos cordeiros.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, A. L.; SILVA FILHO, J. C.; GODOI, A. R.; CARMO, C. A.; EDUARDO, J. L. P. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, p. 260-268, 2008.

ABDURAKHIMOV, R. S.; VESHKUROVA, O. N.; UZBEKOV, V. V.; ARZANOVA, I. A.; SULTANOVA, E. M.; SALIKHOV, S. I. Effect of cotton-seed biocidal peptides and gossypol on resistance to biotic factors. **Chemistry of Natural Compounds**, New York, v. 45, p. 213-216, 2009.

ABOU-DONIA, M. B. Gossypol. In: CHEEKE, P. R. (Ed.). **Toxicants of plant origin**. v. 4: Phenolics. Boca Raton, FL: CRC Press, 1989. p. 1-22.

ALFORD, B. B.; LIEPA, G. U.; VANBEBER, A. D. Cottonseed protein, what does the future hold. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 49, p.1-11, 1996.

BERCHIELLI, T. T.; MESSANA, J. D.; CANESIN, R. C. Produção de metano entérico em pastagens tropicais. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 13, p. 954-968, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Ministério da agricultura autoriza novo uso da glicerina**. Brasília, DF, 2010. Disponível em: http://www.sindiracoes.org.br/index.php?option=com_content&task=view&id=972Itemid=1.

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

CÂMARA, G. M. S.; CHIAVEGATO, E. J. **O agronegócio das plantas oleaginosas: algodão, amendoim, girassol e mamona**. Piracicaba: ESALQ/LPV, 2001. 204 p.

CHEEKE, P. R. **Natural toxicans in feeds, forages, and poisonous plants**. 2. ed. Danville: Interstate Publishers, 1998. 479 p.

CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA AGRICULTURA - CNA. O potencial brasileiro de oferta de carne bovina. **Ativos da Pecuária de Corte**, Brasília, DF, v. 2, n. 17, 4 p., jun. 2010.

COTTON, W. R.; PIELKE, R. A. **Human impacts on weather and climate**. Cambridge: Cambridge University, 1995. 288 p.

DASARI, M. Crude glycerol potential described. **Feedstuffs**, Minneapolis, v. 79, n. 43, p. 16-19, 2007.

DEFRAIN, J. M.; HIPPEN, A. R.; KALSCHEUR, K. F.; JARDON, P. W. Feeding glycerol to transition dairy cows: effects on blood metabolites and lactation performance. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.87, n.12, p.4195-4206, 2004.

DONKIN, S. S. Glycerol from biodiesel production: the new corn for dairy cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, p. 280-286, 2008. Suplemento.

DONKIN, S. S.; KOSER, S. L.; WHITE, H. M.; DOANE, P. H.; CECAVA, M. J. Feeding value of glycerol as a replacement for corn grain in rations fed to lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 92, n. 1, p. 5111-5119, 2009.

EVANGELISTA, W. S.; SANTOS, R. L.; TORRES, J. B.; ZANUNCIO, J. C. Effect of gossypol on survival and reproduction of the zoophytophagous stinkbug *Podisus nigrispinus* (Dallas). **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v. 55, p. 267-271. 2011.

GADELHA, I. C. N.; RANGEL, A. H. N.; SILVA, A. R.; SOTO-BLANCO, B. Efeito do gossypol na reprodução animal. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 5, n. 2, p. 129-135. 2011

FOMBAND, R. B.; BRYANT, M. J. An evaluation of the use of cottonseed cake in the diet of growing pigs. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 36, p. 295-305, 2004.

FORMAN, L.; MATHEWS, S.; KING, C. C. New food, feed uses for glandless cottonseed. **Inform**, Champaign, v. 2, p. 737-739, 1991.

HOLMBERG, C. A.; WEAVER, L. D.; GUTERBOCK, W. M.; GENES, J.; MONTGOMERY, P. Pathological and toxicological studies of calves fed a high concentration cottonseed meal diet. **Veterinary Pathology**, Lawrence, v. 25, p. 147-153, 1988.

HUDSON, L. M.; KERR, L. A.; MASLIN, W. R. Gossypol toxicosis in a herd of beef calves. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 192, p. 1303-1305, 1988.

IPCC. **Climate Change 2001: The scientific basis**. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. [Houghton, J.T.; Ding, Y.; Griggs, D.J.; Noguer, M.; van der Linden, P.J.; Dai, X.; Maskell, K.; Johnson, C.A. (Ed.)]. Cambridge: Cambridge University Press, 2001. 881 p.

KERR, L. A. Gossypol toxicosis in cattle. Compendium on continuing education for the practicing. **Veterinarian**, New York, v. 11, p. 1139-1146, 1989.

KONG, G.; DAUD, M. K.; ZHU, S. Effects of pigment glands and gossypol on growth, development and insecticide-resistance of cotton bollworm (*Heliothis armigera* (Hübner)). **Crop Protection**, Guildford, v. 29, p. 813-819, 2010.

KREHBIEL, C. R. Ruminal and physiological metabolism of glycerin. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 86, n. 1, p. 392, 2008. Supplement 1.

LAGE, J. F.; PAULINO, P. V. R.; PEREIRA, L. G. R.; VALADARES FILHO, S. C.; OLIVEIRA, A. S.; DETMANN, E.; SOUZA, N. K. P.; LIMA, J. C. M. Glicerina bruta na dieta de cordeiros terminados em confinamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 45, n. 9, p. 1012-1020, 2010.

LIMA JUNIOR, D. M.; BRAGA, A. P.; RANGEL, A. H. N.; BRAGA, Z. C. A. C.; BARRETO, H. F. M.; MACIEL, M. V. Farelo de algodão (*Gossypium* spp.) extrusado na dieta de ruminantes: consumo e digestibilidade. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 5, n. 1, p. 68-75, 2011.

LIN, E. C. C. Glycerol utilization and its regulation in mammals. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 46, p. 765-795, 1977.

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

MELLO, D. F.; FRANZOLIN, R.; FERNANDES, L. B.; FRANCO, V. M.; ALVES, T. C. Avaliação do resíduo de nabo forrageiro extraído da produção de biodiesel como suplemento para bovinos de corte em pastagens. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 9, n. 1, p. 45-56, 2008.

MENTEN, J. F.; MIYADA, V. S.; BERENCHTEIN, B. **Glicerol na alimentação animal**. Piracicaba, SP: ESALQ/USP, 2009.

MOHAMMED, N.; ONODERA, R.; ITABASHI, H.; LILA, Z. A. Effects of ionophores, vitamin B6 and distiller's grains on *in vitro* tryptophan biosynthesis from indolepyruvic acid, and production of other related compounds by ruminal bacteria and protozoa. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 116, p. 301-311, 2004.

MORGAN, S. E.; STAIR, E. L.; MARTIN, T. M.; EDWARDS, W. C.; MORGAN, G. L. Clinical, clinicopathologic, pathologic, and toxicology alterations associated with gossypol toxicoses in feeder lambs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 49, p. 493-499, 1988.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrients requirements of dairy cattle**. 7. ed. Washington, DC: National Academies Press, 2001.

OLIVEIRA, A. S.; PINA, D. S.; CAMPOS, J. M. S. Co-produtos do biodiesel na alimentação de ruminantes. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO ESTRATÉGICO DA PASTAGEM, 5.; SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO ANIMAL EM PASTEJO, 3., 2010, Viçosa. **Anais...** Viçosa: UFV, 2010. v. 1, p. 419-462.

PAGGI, R. A.; FAY, J. P.; FAVERIN, C. *In vitro* ruminal digestibility of oat hay and cellulolytic activity in the presence of increasing concentrations of short chain acids and glycerol. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 142, p. 89-96, 2004.

PARSONS, G. L.; SHELOR, M. K.; DROUILLARD, J. S. Performance and carcass traits of finishing heifers fed crude glycerin. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 87, p. 653-657, 2009.

PEDREIRA, M. S.; OLIVEIRA, S. G.; BERCHIAELLI, T. T.; PRIMAVESI, O. Aspectos relacionados com a emissão de metano de origem ruminal em sistemas de produção de bovinos. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 10, n. 3, p. 24-32, 2005.

PEREIRA, L. G. R.; MORAES, S. A.; GUIMARÃES JÚNIOR, R.; ARAÚJO, G. G. L.; VOLTOLINI, T. V. Uso de co-produtos da agroenergia na alimentação animal. In: MUNIZ, E. N. (Org.). **Alternativas alimentares para ruminantes**. 2. ed. Aracajú: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2008. p. 139-171.

PETHICK, D. W.; CUMMINS, L.; GARDNER, G. E.; KNEE, B. W.; MCDOWELL, M.; MCINTYRE, B. L.; TUDOR, G.; WALKER, P. J.; WARNER, R. D. The regulation by nutrition of glycogen in muscle of ruminants. **Recent Advances in Animal Nutrition in Australia**, Armidale, v. 12, p. 145-151, 1999.

PINA, D. S.; VALADARES FILHO, S. C.; VALADARES, R. F. D.; CAMPOS, J. M. S.; DETMANN, E.; MARCONDES, M. I.; OLIVEIRA, A. S.; TEIXEIRA, R. M. A. Consumo e digestibilidade aparente total dos nutrientes, produção e composição do leite de vacas alimentadas com dietas contendo diferentes fontes de proteína. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 4, p. 1543-1551, 2006.

PRIMAVESI, O.; FRIGHETTO, R. T. S.; LIMA, M. A.; BERCHIELLI, T. T.; BARBOSA, P. F. Metano entérico de bovinos leiteiros em condições tropicais brasileiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, p. 277-283, 2004.

PRIMAVESI, O.; PEDREIRA, M. S.; ARZABE, C. **Aquecimento global e mudanças climáticas: uma visão integrada**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007. 213 p.

QUINTELLA, C. M.; TEIXEIRA, L. S. G.; KORN, M. G. A.; COSTA NETO, P. R.; TORRES, E. A.; CASTRO, M. P.; JESUS, C. A. C. Cadeia do biodiesel da bancada à indústria: uma visão geral com prospecção de tarefas e oportunidades para P&D&I. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 793-808, 2009.

RANDEL, R. D.; CHASE, C. C.; WYSE JUNIOR, S. J. Effects of gossypol and cottonseed products on reproduction of mammals. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 70, p. 1628-1638, 1992.

REMOND, B.; SOUDAY, E.; JOUANY, J. P. In vitro and in vivo fermentation of glycerol by rumen microbes. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 41, p. 121-132, 1993.

RIBEIRO, G. M.; SAMPAIO, A. A. M.; FERNANDES, A. R. M.; HENRIQUE, W.; SUGOHARA, A.; AMORIM, A. C. Efeito da fonte protéica e do processamento físico do concentrado sobre a terminação de bovinos jovens confinados e o impacto ambiental dos dejetos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 6, p. 2082-2091, 2007. Suplemento.

RISCO, C. A.; HOLMBERG, C. A.; KUTCHES, A. Effect of graded concentrations of gossypol on calf performance: toxicological and pathological considerations. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 75, p. 2787-2798, 1992.

RIVERA, A. R.; BERCHIELLI, T. T.; MESSANA, J. D.; VELASQUEZ, P. T.; FRANCO, A. V. M.; FERNANDES, L. B. Fermentação ruminal e produção de metano em bovinos alimentados com feno de capim-tifton 85 e concentrado com aditivos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, p. 617-624, 2010.

ROBINSON, P. H.; GETACHEW, G.; PETERS, E. J.; CALHOUN, M. C. Influence of variety and storage for up to 22 days on nutrient composition and gossypol. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 91, n. 3-4, p. 149-156, 2001.

ROGERS, P. A. M.; HENAGHAN, T. P.; WHEELER, B. Gossypol poisoning in young calves. **Irish Veterinary Journal**, Dublin, v. 29, p. 9-13, 1975.

ROGER, V.; FONTY, G.; ANDRE, C.; GOUET, P. Effects of glycerol on the growth, adhesion, and cellulolytic activity of rumen cellulolytic bacteria and anaerobic fungi. **Current Microbiology**, New York, v. 25, p. 197-201, 1992.

SCHRÖDER, A.; SÜDEKUM, K. H. Glycerol as a by-product of biodiesel production in diets for ruminants. In: INTERNATIONAL RAPESEED CONGRESS, 10., 1999, Canberra, Australia. **Proceedings...** Gosford: The Regional Institute, 1999. p. 241.

SHIBATA, M.; TERADA, F. Factors affecting methane production and mitigation in ruminants. **Animal Science Journal**, Taikoku, v. 81, p. 2-10, 2010.

SOTO-BLANCO, B. Gossipol e fatores anti-nutricionais da soja. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; PALERMO NETO, J. (Ed.). **Toxicologia aplicada à veterinária**. São Paulo: Manole, 2008. p. 531-545.

THOMPSON, J. C.; HE, B. B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Applied Engineering in Agriculture**, St. Joseph, v. 22, n. 2, p. 261-265, 2006.

TRABUE, S.; KENWOOD, S.; TJANDRAKUSUMA, S.; RASMUSSEN, M. A.; REILLY, P. J. Ruminal fermentation of propylene glycol and glycerol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, p. 7043-7051, 2007.

USEPA. **Global mitigation of Non-CO2 greenhouse gases**. Section 5. Agriculture – Emissions characterization, baselines, and mitigation scenarios. Washington, DC, 2000.

VAN CLEEF, E. H. C. B. **Tortas de nabo forrageiro (*Raphanus sativus*) e de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.)**: Caracterização e utilização como aditivos na ensilagem de capim elefante. 2008. 77 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

VELASQUEZ-PEREIRA, J.; RISCO, C. A.; MCDOWELL, L. R.; STAPLES, C. R.; PRICHARD, D.; CHENOWETH, P. J.; MARIN, F. G.; WILLIAMS, S. N.; ROJAS, L. X.; CALHOUN, M. C.; WILKINSON, N. S. Long-term effects of feeding gossypol and vitamin E to dairy calves. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 82, p. 1240-1251, 1999.

WANG, C.; LIU, Q.; HUO, W. J.; YANG, W. Z.; DONG, K. H.; HUANG, Y. X.; GUO, G. Effects of glycerol on rumen fermentation, urinary excretion of purine derivatives and feed digestibility in steers. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 121, p. 15-20, 2009.

WILLARD, S. T.; NEUENDORFF, D. A.; LEWIS, A. W.; RANDEL, R. D. Effects of free gossypol in the diet of pregnant and postpartum Brahman cows on calf development and cow performance. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 73, p. 496-507, 1995.

YUAN, J.; TYLER, K.; AL-AHMAD, H.; STEWART, N.; STEWART JUNIOR, C. Plants to power: bioenergy to fuel the future. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v.v13, p. 421-429, 2008.

ZHANG, W. J.; XU, Z. R.; PAN, X. L.; YAN, X. H.; ZHANG, Y. B. W. J.; XU, Z. R.; PAN, X. L.; YAN, X. H.; WANG, Y. B. Advances in gossypol toxicity and processing effects of whole cottonseed in dairy cows feeding. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 111, p. 1-9, 2007.

3. DEGRADABILIDADE *IN VITRO* E PRODUÇÃO DE GASES DE FARELO DE ALGODÃO E GLICERINA BRUTA

Resumo: Os ruminantes são considerados importantes emissores de metano (CH₄), um dos principais gases de efeito estufa. A produção de metano está diretamente relacionada com a eficiência da fermentação ruminal em virtude da perda de carbono e, conseqüentemente, perda de energia, o que determina o desempenho animal. O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* a produção de metano e a degradabilidade da matéria orgânica (MOVD) a partir da substituição do farelo de soja pelo farelo de algodão como fonte protéica e do milho pela glicerina bruta como fonte energética para ruminantes. As dietas experimentais foram preparadas com a substituição do farelo de soja pelo farelo de algodão nos níveis de 25, 50, 75 e 100% e o milho substituído pela glicerina bruta nos níveis de 25, 50, 75 e 100% da dieta basal constituída de feno de Tifton (70%) e concentrado a base de milho (18%), farelo de soja (10%) e mistura mineral (2%). As dietas foram avaliadas quanto à produção total de gases, degradabilidade da matéria orgânica (MOVD) e produção de metano em ensaio *in vitro* de produção de gases, com os substratos (500 mg de cada dieta) sendo incubados em garrafas de vidro (160 mL) na presença de solução tampão e inóculo ruminal de ovinos. Como resultados observou-se redução na produção de gases com o aumento na proporção de farelo de algodão e também foi observado aumento na produção de gases quando houve a substituição de até 75% do milho por glicerina bruta e acima deste nível houve redução na produção de gases. Para a MOVD, houve aumento com a substituição de até 50% do farelo de soja por farelo de algodão. Quanto à produção de metano, houve aumento com a introdução de níveis crescentes de glicerina, não tendo sido influenciado pela presença de farelo de algodão. É concluído que a utilização destes coprodutos da cadeia do biodiesel na dieta de ruminantes pode ser realizada sem prejuízos na fermentação *in vitro* e aproveitamento destes alimentos pelos animais.

Palavras-chave: Ruminantes. Metano. Glicerina.

Abstract: Ruminants are considered major emitters of methane (CH₄), a major greenhouse gas. Methane production is directly related to the efficiency of rumen fermentation due to the loss of carbon and, consequently, loss of energy, which determines the performance animal. The aim of this study was to evaluate the methane production and *in vitro* organic matter degradability (MOVD) from diets with the replacement of soybean meal by cottonseed meal as protein source and corn by crude glycerin as an energy source for ruminants. The experimental diets were prepared with the substitution of soybean meal by cottonseed meal at levels of 25, 50, 75 and 100% and corn substituted for crude glycerin levels of 25, 50, 75 and 100% of the basal diet consisted of Tifton hay (70%) and concentrate based on corn (18%), soybean meal (10%), and minerals (2%). The diets were evaluated for total gas production, organic matter degradability and methane production in an *in vitro* gas production assay, with the substrates (500 mg of each diet) being incubated in glass bottles (160 mL) in the presence of buffer solution and ruminal inoculum from sheep. As a result there was a reduction in gas production with the increase in the proportion of cottonseed meal and also it was observed increase in gas production when a replacement of up to 75% for corn by crude glycerin; above this level, there was a reduction in the production of gases. For the degradability of organic matter, there was an increase according to replacing 50% of soybean meal by cottonseed meal. As for methane production, there was an increase with the increasing levels of glycerin, and it was not influenced by the presence of cottonseed meal. It is concluded that the use of these coproducts from the biodiesel chain in the diet of ruminants can be experienced without affecting the *in vitro* fermentation, as well the use by the animals.

Keywords: Ruminants. Methane. Glycerine.

3.1 Introdução

Os coprodutos originados na cadeia produtiva do biodiesel no Brasil têm sido estudados como possíveis ingredientes de dietas para ruminantes. Estudos e técnicas que caracterizam o metabolismo ruminal destes coprodutos, como a técnica de produção de gases *in vitro* é necessária para a identificação de potenciais coprodutos passíveis de serem utilizados com eficiência na dieta de ruminantes em substituição a ingredientes convencionais.

Os ruminantes são considerados importantes emissores de metano (CH₄), um dos principais gases de efeito estufa. A produção de metano está diretamente relacionada com a eficiência da fermentação ruminal em virtude da perda de carbono e, conseqüentemente, perda de energia, o que determina o desempenho animal.

Objetivou-se com este trabalho avaliar *in vitro* a produção de metano e a digestibilidade da matéria orgânica (MOVD) a partir da substituição do farelo de soja pelo farelo de algodão como fonte protéica e do milho pela glicerina bruta como fonte energética para ruminantes.

3.2 Material e Métodos

Este estudo foi conduzido no Laboratório de Nutrição Animal, pertencente ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, Brasil.

As amostras de farelo de soja, farelo de algodão e glicerina bruta oriundos de usinas de extração de óleos foram coletadas e armazenadas sob refrigeração e livres de umidade.

As amostras foram secas em estufa (60°C) e moídas em moinho tipo Wiley providos de peneiras com crivo de 2 mm. Posteriormente as amostras foram analisadas quimicamente para quantificação dos teores de matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta e extrato etéreo de acordo com AOAC (1995) e fibra em detergente ácido e em detergente neutro, segundo Van Soest et al. (1991), conforme apresentado na tabela 3.1..

As dietas experimentais foram preparadas com a substituição do farelo de soja pelo farelo de algodão e do milho pela glicerina bruta nos níveis de 25, 50, 75 e 100% da dieta

basal constituída de feno de Tifton (70%) e concentrado a base de milho (18%), farelo de soja (10%) e mistura mineral (2%), sendo que a composição bromatológica das dietas apresentadas na tabela 3.2.

Tabela 3.1 - Análise Bromatológica dos ingredientes da Dieta

	Ingredientes (% MS)				
	Farelo de Soja	Farelo de Algodão	Milho	Glicerina Bruta	Feno Tifton
Matéria Seca	88,87	92,65	91,15	89,99	91,82
Matéria Mineral	6,76	5,97	1,34	6,02	6,81
Proteína Bruta	46,52	39,86	9,46	2,73	9,36
Fibra em Detergente Neutro	22,30	60,92	69,64	-	81,31
Fibra em Detergente Ácido	8,26	32,05	4,25	-	43,03
Extrato Etéreo	2,63	1,09	4,90	2,12	2,75

Tabela 3.2 - Composição bromatológica das dietas utilizadas no experimento *in vitro*

Dietas	Composição (%MS)					
	Matéria Seca	Matéria Mineral	Extrato Etéreo	Fibra em Detergente Neutro	Fibra em Detergente Ácido	Proteína Bruta
0 FA/0 GLI	90,9	6,3	3,1	43,3	15,4	12,7
0 FA/25 GLI	89,7	6,5	3,0	43,2	15,4	11,8
0 FA/50 GLI	88,2	7,2	2,7	45,1	16,3	12,0
0 FA/75 GLI	88,7	6,7	3,4	42,3	16,5	11,2
0 FA/100 GLI	88,2	6,4	4,2	39,3	14,5	11,5
25 FA/0 GLI	91,5	6,6	2,2	71,1	32,6	12,1
25 FA/25 GLI	90,1	7,2	2,4	67,9	32,6	11,8
25 FA/50 GLI	90,1	5,9	4,7	65,5	32,6	12,0
25 FA/75 GLI	90,0	5,8	3,0	63,4	33,5	10,9
25 FA/100 GLI	90,5	6,3	6,8	61,1	32,0	10,4
50 FA/0 GLI	92,0	5,9	2,5	71,0	34,7	12,5
50 FA/25 GLI	90,7	5,9	3,4	67,6	33,6	11,2
50 FA/50 GLI	90,2	6,7	2,7	65,3	34,4	10,6
50 FA/75 GLI	91,3	6,7	2,3	62,2	33,8	10,8
50 FA/100 GLI	90,3	7,1	2,6	61,8	32,4	10,0
75 FA/0 GLI	91,8	6,7	2,7	73,1	32,2	11,4
75 FA/25 GLI	90,5	6,9	2,9	68,4	31,5	12,0
75 FA/50 GLI	89,9	6,8	3,5	67,0	31,0	11,4
75 FA/75 GLI	90,5	7,4	2,9	64,6	31,2	10,9
75 FA/100 GLI	91,1	7,4	3,3	61,1	30,6	10,3
100 FA/0 GLI	92,3	6,5	2,5	72,7	32,0	11,4
100 FA/25 GLI	92,2	5,9	3,4	71,9	32,4	12,2
100 FA/50 GLI	91,2	5,8	2,9	66,6	31,4	9,9
100 FA/75 GLI	90,6	6,2	2,2	68,2	32,1	10,4
100 FA/100 GLI	90,1	6,1	2,3	62,6	31,2	10,7

Para a determinação do melhor nível de glicerina bruta e de farelo de algodão acrescido à dieta foi realizado ensaio *in vitro* de produção de gases, de acordo com Bueno et al. (2005). Foi utilizado como inóculo líquido ruminal de ovinos machos castrados da raça Santa Inês providos de cânula permanente no rúmen. O inóculo foi preparado usando as frações líquida e sólida em proporções iguais (50:50) do conteúdo ruminal. Aproximadamente 0,5 g de amostra de cada substrato (dietas experimentais); 50 mL de solução nutritiva contendo macronutrientes, micronutrientes e tamponantes, mantida sob saturação de CO₂; e 25 mL de inóculo foram colocados em garrafas de vidro de 160 mL, sendo estas vedadas com rolhas de borracha, agitadas e mantidas em incubadora a 39°C, por 24 horas.

Durante estas 24 horas, a pressão dos gases produzidos foi medida com medidor de pressão (Pressdata 800, LANA/CENA-USP, Piracicaba/SP) a intervalos regulares (1, 2, 4, 6, 12 e 24 horas) e a quantidade de gases produzidos foi estimada através da equação: $V = 0,0112p^2 + 7,3358p$, onde: V é o volume de gases (ml) e p é a pressão medida (psi).

Para análise do gás metano (CH₄), foram amostrados 1,5 ml dos gases produzidos nas garrafas com seringas descartáveis e armazenadas em tubo de ensaio de 10 ml para posterior análise. A concentração de gás metano (CH₄) foi determinada em cromatógrafo a gás (Shimadzu GC2014) com detector a 240 °C e coluna Shincarbon a 60 °C, usando para a determinação da curva padrão o gás metano (50%), diluído a fim de se obter concentrações finais de 3, 6, 9 e 12% de metano. A produção de metano foi determinada de acordo com Longo et al. (2006) pela equação:

$$\text{CH}_4 \text{ (ml)} = (\text{volume total de gases, em ml} + \text{“headspace”, 85 ml}) * \text{concentração de CH}_4, \text{ em ml/ml}$$

Para determinação da degradabilidade verdadeira da matéria orgânica *in vitro* (MOVD), cada garrafa foi tratada com 70 mL de solução de detergente neutro por 3 h e o conteúdo foi filtrado em cadinhos sinterizados. A extensão de desaparecimento da matéria orgânica após a fermentação foi obtida pela queima do resíduo retido nos cadinhos. O fator de partição foi determinado através da relação entre a MOVD e o volume total de gás produzido, sendo utilizado como índice de eficiência de síntese microbiana.

A análise estatística foi realizada através de análise de superfície, utilizando o programa STATISTICA 7.0 visando identificar os melhores níveis de inclusão para cada coproduto em relação à produção total de gases, MOVD e metano.

3.3 Resultados e Discussão

Para a variável produção de gases líquida observa-se na Figura 1 que houve redução na produção de gases ao se aumentar o nível de substituição do farelo de soja pelo farelo de algodão, resultado que pode ser devido à menor degradabilidade do farelo de algodão no rúmen, sendo que este menor valor pode ser compensado pela maior passagem de proteína para o intestino delgado. Outro aspecto que pode ser observado é o efeito quadrático promovido pelos níveis crescentes de glicerina bruta, pois quando houve a substituição do milho pela glicerina bruta até o nível de 50%, esta promoveu aumento na produção de gases, havendo uma redução na produção de gases a partir do nível de 75% de substituição.

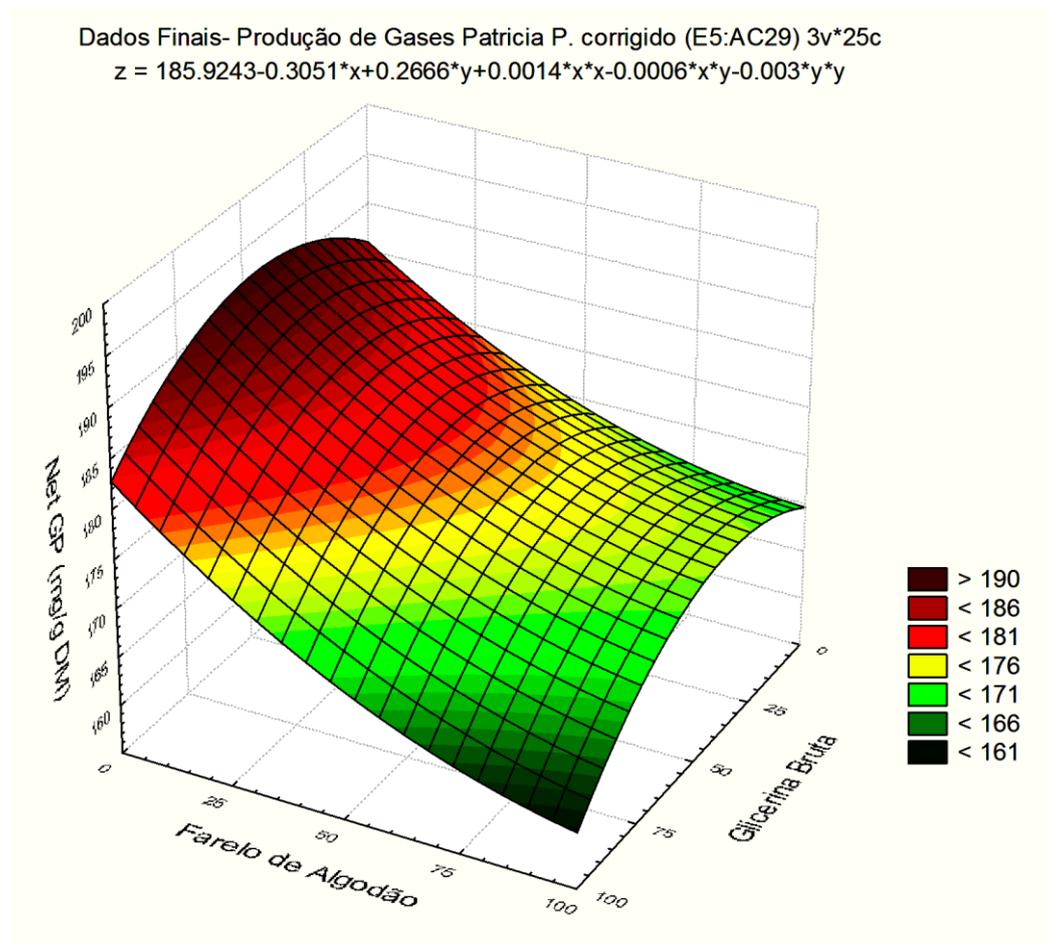


Figura 3.1 - Produção de gases líquida, em mL/g MS, obtida em ensaio *in vitro* de produção de gases e degradabilidade verdadeira da matéria orgânica.

Abdalla et al. (2012) não observaram diferença na produção de gases ao se substituir o farelo de soja por farelo de algodão em ensaios *in vitro* nos mesmos níveis empregados neste experimento.

Pereira et al. (2008), testando a inclusão de glicerina bruta em diversas concentrações, utilizando como substrato feno de capim Marandu, concentrado comercial com 22% de proteína bruta e a combinação de feno de capim Marandu e concentrado comercial, observaram a redução na produção de gases *in vitro* ao se aumentar a inclusão de glicerina bruta a dieta. Pethick et al. (1999), ao realizar um experimento com produção de gases *in vitro*, testando com substrato feno de alfafa e silagem de milho com adição de glicerol, propileno glicol e melão, observou que o tratamento com glicerol apresentou menor taxa de produção de gases e maior lag time em relação aos demais, sendo mais lentamente metabolizado. Estes resultados corroboram com o presente trabalho, já que o aumento nos níveis de glicerina bruta promoveram a redução na produção de gases.

Para a variável degradabilidade verdadeira da matéria orgânica, observa-se na Figura 3.2 que os maiores valores de digestibilidade foram observados ao se ter a substituição entre 25 e 50% do farelo de soja pelo farelo de algodão, sendo que houve pequena variação entre os níveis de glicerina bruta. Esses resultados estão de acordo com os observados para a produção de gases, em que os menores valores de produção de gases foram observados com maiores níveis de substituição. Abdalla et al. (2012) não observaram diferenças na DVMO ao se realizar a substituição do farelo de soja por farelo de algodão em ensaios *in vitro*.

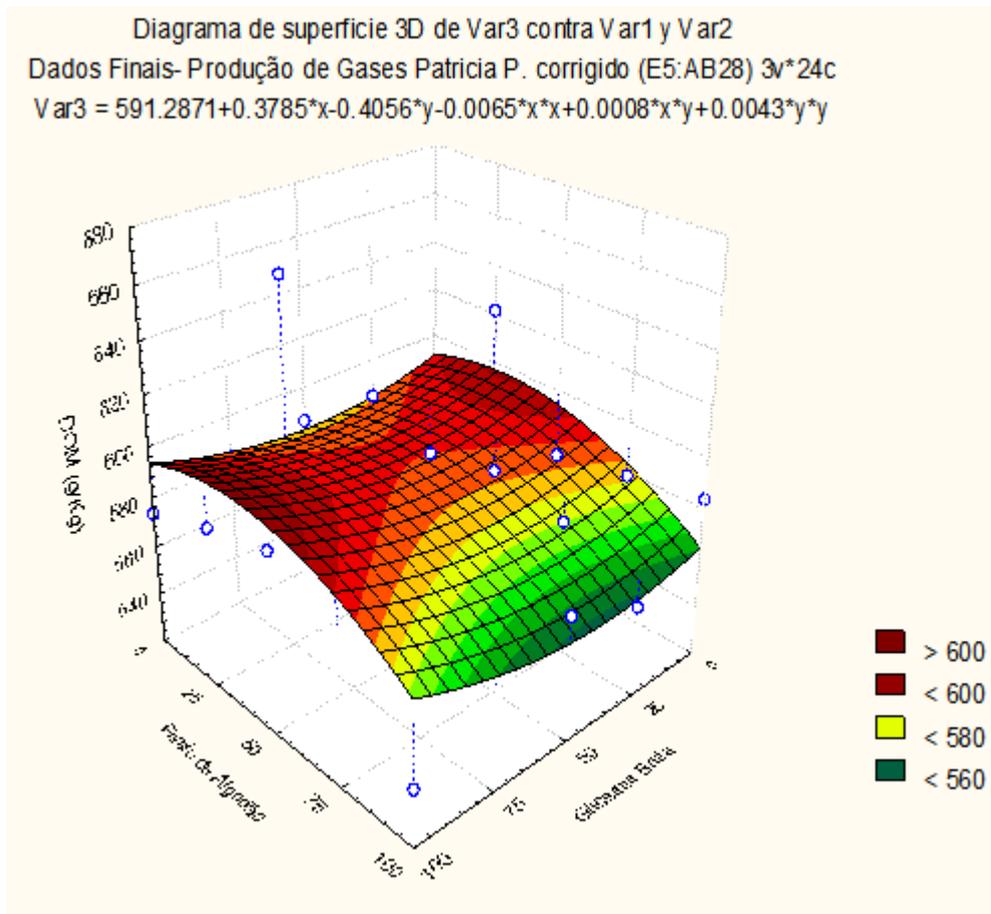


Figura 3.2 - Degradabilidade verdadeira da matéria orgânica, em g/Kg, obtida em ensaio *in vitro* de produção de gases e degradabilidade verdadeira da matéria orgânica.

Além disso, observa-se que a glicerina bruta não influenciou na digestibilidade da dieta, resultado que diverge de diversos trabalhos, que observaram que a presença de glicerina bruta nas dietas promoveu redução na digestibilidade. Ferraro et al. (2009) observaram uma taxa de degradação lenta, ao se utilizar o glicerol em um experimento de produção de gases *in vitro*.

Ao se avaliar a produção líquida de metano, observa-se aumento na produção de metano a medida que se aumenta os níveis de substituição de milho por glicerina bruta, sendo pouco influenciada pelos níveis de substituição por farelo de algodão.

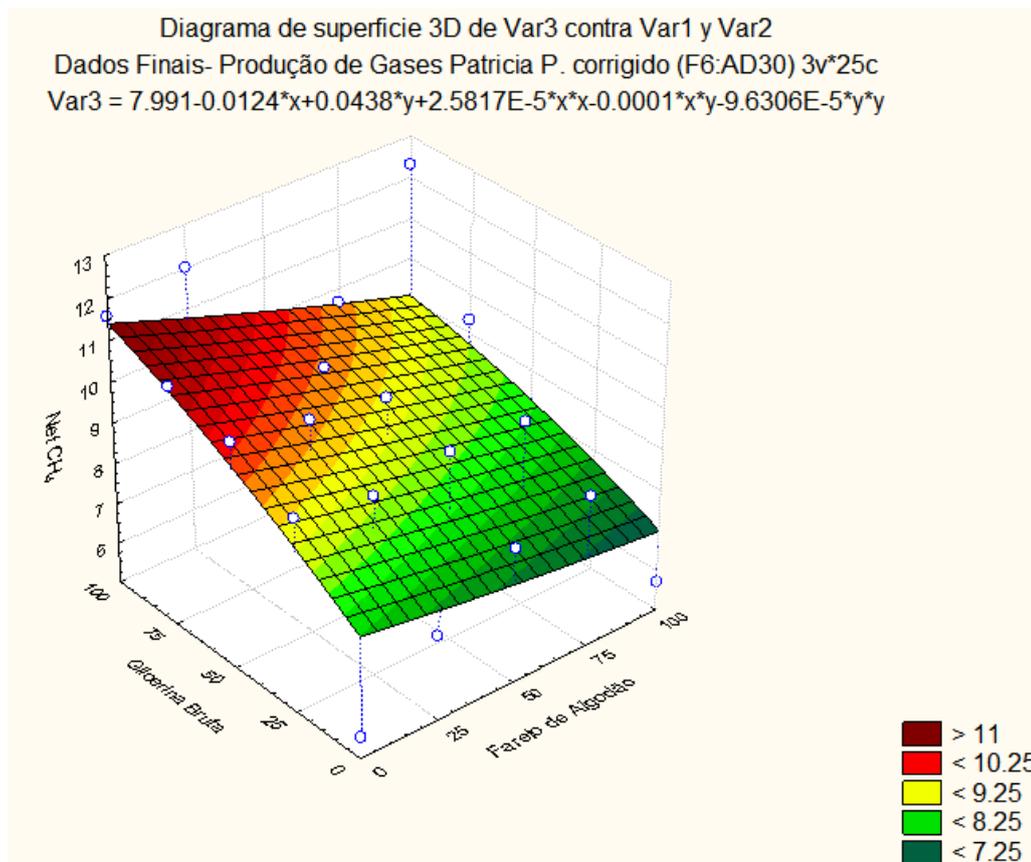


Figura 3.3 Porcentagem de metano (%), obtida em ensaio *in vitro* de produção de gases e degradabilidade verdadeira da matéria orgânica.

Os resultados observados diferem dos observados em literatura, já que diversos autores observaram que a adição de glicerina bruta a dieta promoveram a redução na produção de metano.

Segundo Trabue et al. (2007), o fornecimento de glicerina bruta tende a reduzir a quantidade de carbono e hidrogênio disponível para a produção de metano, pelo aumento da síntese de propionato, com conseqüente melhoria na eficiência de utilização da energia pelo animal.

A produção de metano ruminal é diretamente proporcional a concentração de H_2 dissolvida. Portanto, deve-se buscar impedir o acesso a estes prótons pelos organismos metanogênicos através da otimização de sua utilização (HEGARTY, 1999).

3.4 Conclusões

Ao se analisar os resultados deste experimento, se pode concluir que a substituição do farelo de soja pelo farelo de algodão e do milho pela glicerina pode ser utilizada até os níveis de 75% para os dois ingredientes, afim de que não ocorra redução expressiva na degradabilidade da dieta e grande aumento na produção de metano, fatores estes importantes para a escolha de alimentos para a produção de ruminantes.

Referências

ABDALLA, A. L.; LOUVANDINI, H.; SALLAM, S. M. A. H.; BUENO, I. C. S.; TSAI, S. M.; FIGUEIRA, A. V. O. *In vitro* evaluation, *in vivo* quantification, and microbial diversity studies of nutritional strategies for reducing enteric methane production. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 44, p. 953-964, 2012.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. Arlington: AOAC International, 1995.

BUENO, I. C. S.; CABRAL FILHO, S. L. S.; GOBBO, S. P.; LOUVANDINI, H.; VITTI, D. M. S. S.; ABDALLA, A. L. Influence of inoculum source in a gas production method. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 123-124, p. 95-105, 2005.

FERRARO, S. M.; MENDOZA, G. D.; MIRANDA, L. A.; GUTIERREZ, C. G. *In vitro* gas production and ruminal fermentation of glycerol, propylene glycol and molasses. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 154, p. 112–118, 2009.

HEGARTY, D. C. Mechanism for competitively reducing ruminal methanogenesis. **Australian Journal of Agriculture Research**, v. 50, n. 8, p. 1299-1305, 1999.

LONGO, C.; BUENO, I. C. S.; NOZELLA, E. F.; GODDOY, P. B.; CABRAL FILHO, S. L. S.; ABDALLA, A. L. The influence of head-space and inoculum dilution on *in vitro* ruminal methane measurements. **International Congress Series**, Amsterdam, v. 1294, p. 62- 65, 2006.

PEREIRA, L. G. R.; MORAES, S. A.; GUIMARÃES JÚNIOR, R.; ARAÚJO, G. G. L.; VOLTOLINI, T. V. Uso de co-produtos da agroenergia na alimentação animal. . In: MUNIZ, E. N. (Org.). **Alternativas alimentares para ruminantes**. 2. ed. Aracajú: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2008. p. 139-171.

PETHICK, D. W.; CUMMINS, L.; GARDNER, G. E.; KNEE, B. W.; MCDOWELL, M.; MCINTYRE, B. L.; TUDOR, G.; WALKER, P. J.; WARNER, R. D. The regulation by nutrition of glycogen in muscle of ruminants. **Recent Advances in Animal Nutrition in Australia**, Armidale, v. 12, p. 145-151, 1999.

REMOND, B.; SOUDAY, E.; JOUANY, J. P. In vitro and in vivo fermentation of glycerol by rumen microbes. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v 41, p. 121-132. 1993.

TRABUE, S.; KENWOOD, S.; TJANDRAKUSUMA, S.; M. A. RASMUSSEN, M. A.; REILLY, P. J. Ruminal fermentation of propylene glycol and glycerol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, p 7043-7051, 2007.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 74, n. 9, p. 1-15, 1991.

4. DEGRADABILIDADE *IN VITRO* DA PROTEÍNA, SÍNTESE MICROBIANA UTILIZANDO ³²P COMO MARCADOR E CONCENTRAÇÃO *IN VITRO* DE AGCC EM DIETAS UTILIZANDO FARELO DE ALGODÃO E GLICERINA BRUTA

Resumo: Os ovinos apresentam grande potencial para aproveitamento de coprodutos na dieta; podendo utiliza-los para síntese microbiana, bem como a proteína da dieta, tanto para degradação no rumem, como para ser degradada no pós-rumem. O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* a degradabilidade da proteína, a síntese microbiana e a concentração de ácidos graxos de cadeia curta a partir da substituição do farelo de soja pelo farelo de algodão como fonte protéica e do milho pela glicerina bruta como fonte energética para ruminantes. De acordo com os resultados obtidos no ensaio *in vitro* de degradabilidade da matéria orgânica, foram selecionadas dez dietas que apresentaram maiores valores de degradabilidade e menores valores de produção de metano. A degradabilidade da proteína foi obtida pela incubação ruminal *in vitro* de amostras das dietas selecionadas por 16 horas. Do resíduo obtido realizou-se nova incubação com as enzimas pepsina e posteriormente pancreatina, para se obter a digestibilidade da proteína pós-rumem. Para a quantificação de AGCC, foi amostrado o conteúdo das garrafas do experimento de produção de gases *in vitro* e posteriormente este conteúdo foi preparado e analisado em cromatógrafo a gás. A síntese microbiana *in vitro* foi determinada pelo uso do marcador radioativo ³²P, em que se empregou inóculo ruminal como fonte dos microrganismos e a amostra a ser testada como substrato para o crescimento microbiano. Como resultados de degradabilidade ruminal *in vitro* da proteína se observou que a adição de glicerina bruta promoveu a redução da degradabilidade da proteína. Já para a digestibilidade da proteína pós-rúmen, não houve efeito da presença de glicerina bruta, sendo que os maiores valores foram observados nas dietas que apresentaram menor degradabilidade ruminal. Para AGCC se observou aumento na produção de propionato e redução na de acetato, resultado devido a adição de glicerina bruta. Não foram observadas diferenças entre as dietas testadas para síntese microbiana. Como conclusão pode se afirmar que a substituição dos ingredientes tradicionais por coprodutos da cadeia de biodiesel pode ser empregada na alimentação de ruminantes, atendendo as exigências nutricionais dos animais.

Palavras-chave: Ruminantes. ³²P. Glicerina. Algodão.

Abstract: The sheep, to be ruminant, have great potential for use of products that usually would not be used in feeding monogastric animals. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* protein degradability, microbial synthesis and concentration of short chain fatty acids from the replacement of soybean meal by cottonseed meal as protein source and corn by crude glycerin as an energy source for ruminants. According to the test results of *in vitro* degradability of organic matter, we selected ten diets showed higher degradability and lower methane production. Degradability of protein was obtained by ruminal incubation samples from selected diets for 16 hours. The residue obtained was carried out a new incubation with the enzymes pepsin and pancreatin later to obtain the digestibility of the protein. For quantification of SCFA were sampled content of the experimental bottles gas production *in vitro* and subsequently this content was prepared and analyzed by gas chromatograph. Microbial protein synthesis *in vitro* was determined using ^{32}P radioactive label, in which employed as a source of ruminal micro-organisms and the sample to be tested as a substrate for microbial growth. As the results of *in vitro* degradability of the protein there was observed that the addition of crude glycerin caused a reduction of protein degradability. As for the digestibility protein post-rumen, there was no effect of the presence of crude glycerin, with the highest values were observed in the diets had lower ruminal degradability. SCFA was observed to increase in propionate production and a reduction in acetate, because the result of addition of crude glycerin. No differences were observed between the diets tested for microbial synthesis. As a conclusion we may state that the replacement of the traditional ingredients for coproducts chain biodiesel can be used in ruminant feeding, meeting the nutritional requirements of animals.

Keywords: Ruminants. ^{32}P . Glycerine. Cottonseed.

4.1 Introdução

Os ruminantes possuem o maior potencial para o aproveitamento de coprodutos agroindustriais devido às características peculiares de seu aparelho digestório e a simbiose com microrganismos do rúmen. Neste cenário, os coprodutos originados na cadeia produtiva do biodiesel no Brasil têm sido estudados como possíveis substitutos aos ingredientes convencionais nas dietas para ruminantes. O uso de técnicas *in vitro* possibilita a avaliação dos efeitos destes coprodutos bem como a eficiência no metabolismo ruminal.

Objetivou-se com este trabalho avaliar *in vitro* a degradabilidade da proteína no rúmen e no pós-rúmen, a síntese microbiana utilizando como marcador ^{32}P e a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) de dietas para ruminantes compostas por farelo de algodão em substituição do farelo de soja e da glicerina bruta em substituição ao milho.

4.2 Material e Métodos

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Nutrição Animal, pertencente ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, Brasil.

Após a realização do ensaio *in vitro* de produção de gases e degradabilidade da matéria orgânica, foram selecionadas 10 dietas completas, as quais apresentaram menor produção de metano, maior degradabilidade da matéria orgânica e/ou maior produção líquida de gases, afim de se realizar estudo *in vitro* mais aprofundados dos efeitos destas dietas na alimentação de ruminantes. As dietas selecionadas continham 70% de feno de Tifton, 2% de mistura mineral e 28% de concentrado, sendo que este último apresentou em sua composição níveis de substituição de farelo de soja por farelo de algodão (FA) como fonte protéica e substituição de milho por glicerina bruta (GLI) como fonte energética, sendo que as dietas selecionadas e as respectivas composições nutricionais estão apresentadas na tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Composição centesimal e nutricional das dietas experimental.

Dieta	Composição (%MS)					
	Matéria Seca	Matéria Mineral	Extrato Etéreo	Fibra em Detergente Neutro	Fibra em Detergente Ácido	Proteína Bruta
0 FA/0 GLI	90,9	6,3	3,1	43,3	15,4	12,7
25 FA/0 GLI	91,5	6,6	2,2	71,1	32,6	12,1
25 FA/25 GLI	90,1	7,2	2,4	67,9	32,6	11,8
25 FA/75 GLI	90,0	5,8	3,0	63,4	33,5	10,9
50 FA/0 GLI	92,2	5,9	2,5	71,0	34,7	12,5
50 FA/100 GLI	90,3	7,1	2,6	61,8	32,4	10,0
75 FA/50 GLI	89,9	6,8	3,5	67,0	31,0	11,4
75 FA/75 GLI	90,5	7,4	2,9	64,6	31,2	10,9
100 FA/25 GLI	92,2	5,9	3,4	71,9	32,4	12,2
100 FA/50 GL	91,2	5,8	2,9	66,6	31,4	9,9

A digestibilidade pós ruminal *in vitro* das dietas foi determinada conforme metodologia de Calsamiglia e Stern (1995). Primeiramente foram preparados 2 sacos de Dacron, semelhantes aos utilizados em ensaios de digestibilidade *in situ*, contendo com 4 g de amostra para cada dieta a ser avaliada. Os sacos foram acondicionados em jarras de vidro de 2500 ml próprias para incubadora, onde foram acrescidos com 1300 ml de solução nutritiva, contendo macronutrientes, micronutrientes e tamponantes, conforme metodologia descrita por Bueno et al. (2005) e 650 ml de inóculo ruminal preparado usando as frações líquida e sólida em proporções iguais (50:50) do conteúdo ruminal de ovinos providos de cânula permanente no rúmen, sendo os inóculos os mesmos utilizados no ensaio *in vitro* de produção de gases.

As jarras foram mantidas em incubadora a 39°C por 16 horas. Após a incubação, os sacos foram lavados em água corrente até esta não conter resíduos de líquido ruminal. Posteriormente os sacos foram secos em estufa com circulação de ar, por 48 horas. O resíduo da incubação ruminal *in vitro* (16 hs) foi incubado por 1 h em 10 mL de HCl (0,1N) contendo 1 g / L de pepsina, à temperatura de 39 °C em frascos de vidro de 30 ml. Posteriormente, foi adicionado 0,5 ml de NaOH 1N e em seguida foi adicionado 13,5 ml de solução tampão de fosfato contendo 37,5 mg de pancreatina e o material foi incubado por 24 h a 39 °C. Após as 24 h de incubação, os frascos foram tratados com 3,0 ml de ácido tri-cloro acético para se precipitar a proteína não digerida, e o teor de nitrogênio no sobrenadante foi quantificado por Kjeldahl. As quantificações de proteína degradada no rúmen e proteína digerida pós-rúmen foram determinadas pelas equações:

Degradação ruminal da PB = PB inicial da amostra - PB resíduo ruminal / PB inicial

Digestão intestinal da PB = PB solúvel em TCA / PB inicial da amostra

Para a determinação de ácidos graxos de cadeia curta foram coletadas amostras do conteúdo das garrafas no ensaio *in vitro* de degradabilidade da matéria orgânica e posteriormente foram preparadas para análise de acordo com Nocek, Hart e Polan (1987) e Conrad e Palmquist (1971), com adaptações para o LANA/CENA/USP.

Para o realização do ensaio de síntese microbiana *in vitro* foram selecionadas as cinco dietas que apresentaram maiores valores *in vitro* de degradabilidade ruminal e de digestibilidade pós-rúmen, sendo 0 FA/0 GLI (controle), 25 FA/0 GLI, 50 FA/100 GLI, 75 FA/75 GLI e 100 FA/50 GLI. A síntese microbiana *in vitro* utilizando ^{32}P foi determinada conforme metodologia de Van Nevel e Demeyer (1977) e adaptada ao LANA/CENA/USP por Bueno (1998), que consiste na preparação de 3 tubos para centrífuga refrigerada Sorvall (mod. RC2-B), contendo 1g de dieta a ser testada. Cada tubo recebeu 4ml de solução tamponante (25g de glucose e 3g de bicarbonato de sódio por litro); 16ml do inóculo ruminal preparado usando as frações líquida do conteúdo ruminal de ovinos providos de cânula permanente no rúmen e, 25 μl de solução de radiofósforo na forma de fosfato, correspondendo a 0,1 μCi de ^{32}P .

Imediatamente após a adição do radiofósforo, a atividade microbiana de um dos três tubos foi interrompida com 1ml de H_2SO_4 18N. Os tubos foram incubados à temperatura constante de 39°C com saturação de gás carbônico por período de 8h. Terminada a incubação, os demais tubos também receberam 1 ml de H_2SO_4 18N a fim de paralisar a síntese microbiana.

Para avaliar a incorporação do ^{32}P , os tubos foram levados à centrífuga refrigerada Sorvall e submetidos à centrifugação por 10 minutos, separando-se o material em precipitado e sobrenadante. Para a determinação da radioatividade no material, 1 ml do sobrenadante foi transferido para frascos de cintilação líquida, completando-se o volume para 20 ml com água destilada, e levados para contagem em cintilador líquido (Packard mod. 1600 TR) por dois minutos cada. O restante das amostras foi armazenado em congelador para análise de fósforo inorgânico (P), de acordo com a metodologia de Fiske e Subbarow (1925).

O precipitado foi lavado quatro vezes com solução salina 0,85% para eliminação do radiofósforo extracelular. Ao final das lavagens o precipitado foi ressuspensionado com água destilada, transferido para cadinho de porcelana e levado para secagem em estufa de 105°C, até peso constante do material, sendo possível a determinação da matéria seca. Após a

pesagem, o material foi incinerado e posteriormente sofreu digestão ácida por 90 minutos. O material digerido foi transferido para frascos de cintilação líquida e levado para contagem conforme descrito anteriormente. As quantificações de nitrogênio incorporado e nitrogênio microbiano foram determinadas pelas seguintes equações:

Atividade específica do ^{32}P extracelular (AE_e) = contagem em dpm do sobrenadante/
teor de ^{32}P extracelular

Teor do ^{32}P incorporado (P_i) = contagem em dpm do precipitado / AE_e

Nitrogênio incorporado (N_i) = $\text{P}_i * 8,37$

Os ensaios foram realizados utilizando delineamento inteiramente casualizado. A comparação entre as dietas experimentais foi analisada por regressão e o teste de médias foi realizado utilizando teste de Duncan. A análise de variância foi realizada utilizando modelo linear (PROC GLM), do SAS (2002).

4.3 Resultados e Discussão

Os resultados referentes à degradabilidade *in vitro* da matéria orgânica e digestibilidade *in vitro* da proteína estão apresentados na Tabela 4.2. Para o parâmetro degradabilidade da matéria orgânica não foi observada diferenças entre os tratamentos, porém para a proteína degradada no rúmen (PDR), o tratamento que apresentou maior degradabilidade foi o que apresentou 100% de substituição do farelo de soja pelo farelo de algodão e 25% de substituição de milho por glicerina bruta (100 FA/ 25% GLI), sendo que este tratamento não diferiu do tratamento 0 FA/ 0 GLI (controle) e do tratamento 50 FA/ 0 GLI, com 51,80%, 50,12% e 50,01% respectivamente. O tratamento que apresentou menor degradabilidade ruminal *in vitro* da proteína foi 50 FA/100 GLI, diferindo estatisticamente dos demais. Já ao se avaliar a digestibilidade pós ruminal da proteína, observa-se que o tratamento que apresentou maior valor de digestibilidade foi aquele que apresentou menor valor de degradabilidade ruminal, indicando maior fluxo de proteína dietética para o intestino e que também esta proteína que escapou para o intestino é passível de digestão e consequente aporte de proteína para o animal.

De acordo com os resultados observados, pode se afirmar que a presença de glicerina bruta acima de 75% de substituição influenciou na degradação da proteína no rúmen, não sendo observado efeito na digestibilidade intestinal da proteína. Ao se consultar os resultados em literatura, não foram encontrados trabalhos que avaliaram os efeitos do farelo de algodão e da glicerina bruta sobre a degradabilidade e da digestibilidade da proteína em ensaios *in vitro*.

Tabela 4.2 - Porcentagem de degradabilidade da matéria orgânica (DMO), proteína degradada no rúmen (PDR) e proteína digerida pós rúmen (PDPR), obtido em ensaio *in vitro*

Tratamento	DMO	PDR (%)	PDPR (%)	N-NH ₃
0 FA/0 GLI	59,6	50,1 ^{ab}	11,2 ^b	0,02
25 FA/0 GLI	62,2	45,8 ^{cd}	16,5 ^{ab}	0,03
25 FA/25 GLI	57,2	44,9 ^d	14,5 ^{ab}	0,03
25 FA/75 GLI	60,5	43,0 ^{de}	17,8 ^{ab}	0,02
50 FA/0 GLI	57,3	50,0 ^{ab}	15,0 ^{ab}	0,03
50 FA/100 GLI	59,1	37,5 ^f	21,0 ^a	0,02
75 FA/50 GLI	56,8	48,6 ^{bc}	14,2 ^{ab}	0,03
75 FA/75 GLI	56,9	46,0 ^{cd}	18,8 ^{ab}	0,02
100 FA/25 GLI	54,5	51,8 ^a	12,9 ^b	0,02
100 FA/50 GL	57,0	41,0 ^e	15,9 ^{ab}	0,02
EPM	5,11	10,34	6,66	0,000

Médias com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes (P<0,1).

Os resultados de produção *in vitro* de ácidos graxos de cadeia curta estão apresentados na Tabela 4.3. Para a concentração de ácido acético, a dieta controle diferiu dos tratamentos 25 FA/75 GLI, 50 FA/0 GLI e 50 FA/100 GLI, não diferindo dos demais tratamentos. Já para a concentração de ácido propiônico as dietas que apresentaram maiores concentrações foram 50 FA/100 GLI, 75 FA/75 GLI, 25 FA/75 GLI, sendo que os menores valores de concentração foram observados para as dietas 50 FA/0 GLI, 25 FA/25 GLI, 25 FA/0 GLI, 0 FA/0 GLI, 100 FA/25 GLI e 100 FA/50 GL, resultados estes que corroboram com os encontrados em literatura que indica que a adição de glicerina bruta à dieta promove maior produção de propionato e redução na produção de acetato, como observado para as dietas que havia maior proporção de glicerina bruta (100% de substituição do milho). Ao se fazer a relação entre ácido acético e ácido propiônico, os tratamentos que apresentaram menores valores foram 50 FA/100 GLI, 75 FA/75 GLI e 25 FA/75 GLI.

Tabela 4.3 - Concentração de AGCC, em mMol, determinada em amostras obtidas em ensaio *in vitro* de produção de gases .

Tratamentos	Ác. Acético	Ác. Propiônico	Ác. Butírico	Proporção Ác. Acético: Ác. Propiônico
0 FA/0 GLI	47,8 ^a	10,6 ^{cde}	8,4	4,5 ^a
25 FA/0 GLI	46,0 ^{ab}	10,1 ^{de}	7,9	4,5 ^a
25 FA/25 GLI	44,2 ^{ab}	10,61 ^{cde}	7,6	4,2 ^{ab}
25 FA/75 GLI	42,3 ^b	11,7 ^{abc}	6,3	3,6 ^{cd}
50 FA/0 GLI	43,0 ^b	10,0 ^e	7,7	4,3 ^{ab}
50 FA/100 GLI	42,4 ^b	12,5 ^a	6,2	3,4 ^d
75 FA/50 GLI	44,7 ^{ab}	11,3 ^{bcd}	7,3	3,9 ^{bc}
75 FA/75 GLI	44,0 ^{ab}	11,9 ^{ab}	6,7	3,7 ^{cd}
100 FA/25 GLI	46,3 ^{ab}	10,6 ^{cde}	6,3	4,4 ^a
100 FA/50 GL	46,1 ^{ab}	10,7 ^{cde}	6,8	4,3 ^{ab}
EPM	2,62	1,17	1,10	0,56

Médias com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes (P<0,1).

Como observado, as dietas que apresentaram níveis altos de substituição do milho por glicerina bruta promoveram a redução da concentração de acetato e aumento na produção de propionato, sendo que esses resultados corroboram com resultados encontrados em literatura.

Wang et al. (2009), em estudos com gado Simental alimentados com 60% de palha de milho e 40% de concentrado, observaram que a suplementação com 100, 200 e 300 g/dia de glicerol melhorou o padrão de fermentação ruminal, diminuindo a proporção acetato:propionato.

Remond et al. (1993) observaram aumento significativo na concentração de ácido propiônico e butírico e decréscimo significativo na concentração de ácido acético em vacas consumindo silagem de milho e suplementadas de glicerina.

Trabue et al. (2007) sugere que o metabolismo ruminal de glicerol é de aproximadamente 80% após 24 hs do início da alimentação, resultando no decréscimo da relação acetato: propionato. Estudos indicam que todo o glicerol ingerido é convertido em propionato, o que levaria a redução desta proporção.

Segundo Shröder e Südekum (1999) observaram que a ingestão de glicerol diminuiu a razão acetato: propionato e estimulou o consumo de água.

Quanto aos resultados de síntese microbiana *in vitro* utilizando ³²P como marcador, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos testados, como apresentado na Tabela 4.4, ou seja, a presença de farelo de algodão e de glicerina bruta não influenciou no desenvolvimento microbiano, indicando a ausência de efeito sobre a fermentação ruminal.

Não foram encontrados resultados em literatura que avaliaram a síntese microbiana sobre os alimentos testados.

Tabela 4.4 Porcentagem de nitrogênio incorporado, em mg, e de nitrogênio microbiano, em g MS, obtido em ensaio *in vitro* de síntese microbiana com ^{32}P

Tratamento	N Incorporado (mg)	Nitrogênio Microbiano (g MS)
0 FA/0 GLI	420,3	4,6
25 FA/0 GLI	409,7	4,5
50 FA/100 GLI	373,1	4,1
75 FA/75 GLI	370,5	4,1
100 FA/50 GL	389,0	4,3
EPM	33,14	0,34

Médias com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($P < 0,1$).

4.4 Conclusões

Neste presente trabalho podemos concluir que a glicerina bruta pode influenciar na degradabilidade ruminal da proteína presente na dieta, disponibilizando mais proteína dietética no pós-rumem, porém esta interferência não afeta a disponibilidade de nutrientes para crescimento microbiano. Além disso, a presença de glicerina bruta na dieta propiciou aumento na produção de propionato, disponibilizando mais energia para o animal. Portanto, pelos resultados obtidos, conclui-se que tanto o farelo de algodão e a glicerina bruta, nos níveis estudados neste ensaio, podem ser utilizados como alimentos para os animais.

Referências

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. Arlington: AOAC International, 1995.

BUENO, I. C. S. **Comparação entre técnica *in vitro* e *in situ* de avaliação de braquiária para ruminantes**. 1998. 133 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

BUENO, I. C. S.; CABRAL FILHO, S. L. S.; GOBBO, S. P.; LOUVANDINI, H.; VITTI, D. M. S. S.; ABDALLA, A. L. Influence of inoculum source in a gas production method. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 123-124, p. 95-105, 2005.

CALSAMIGLIA, S.; STERN, M.D. A 3-step *in vitro* procedure for estimating intestinal digestion of protein in ruminants. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 73, p. 1459-1465, 1995.

CONRAD, H.; PALMQUIST, D. Origin of plasma fatty acid in lactating dairy cows fed high fat diets. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 54, p. 1025, 1971.

FISKE, C.H.; SUBBAROW, Y. The calorimetric determination of phosphorus. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 66, p. 1719-1725, 1925.

NOCEK, J. E.; HART, S. P.; POLAN, C. E. Rumen ammonia concentrations as influenced by storage time, freezing and thawing, acid preservative, and method of ammonia determination. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 70, p. 601-607, 1987.

VAN NEVEL, C.; DEMEYER, D. I. Determination of rumen microbial growth *in vitro* from ³²P labelled phosphate incorporation. **British Journal of Nutrition**, London, v. 38, p. 101-114, 1977.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 74, n. 9, p. 1-15, 1991.

5 DIGESTIBILIDADE E PRODUÇÃO DE METANO ENTÉRICO *IN VIVO* DE DIETA UTILIZANDO FARELO DE ALGODÃO E GLICERINA BRUTA

Resumo: Os ruminantes são considerados importantes emissores de metano (CH₄), um dos principais gases de efeito estufa. A produção de metano está diretamente relacionada com a eficiência da fermentação ruminal em virtude da perda de carbono e, conseqüentemente, perda de energia, o que determina o desempenho animal. De acordo com os testes *in vitro* realizados anteriormente, foram selecionadas duas dietas experimentais, além da dieta controle (feno de Tifton, farelo de soja e milho); uma com substituição parcial do farelo de soja pelo farelo de algodão e outra com a substituição parcial tanto do farelo de soja como do milho pela torta de algodão e glicerina bruta respectivamente. Foram realizados dois ensaios *in vivo* de digestibilidade e produção de metano entérico. No primeiro ensaio foram utilizados 15 animais que foram mantidos em baias individuais no período de adaptação à dieta por 21 dias e depois levados à gaiolas individuais onde foram feitas coletas de oferecido, sobras, fezes e urina por 7 dias. Nos dois últimos dias do ensaio de metabolismo, os animais foram mantidos em gaiolas providas de sistema de coleta de gases. O segundo ensaio foi realizado com 6 animais, sendo conduzido da mesma forma que o primeiro. Como resultados foram observadas redução na digestibilidade da fibra em detergente neutro (FDN) e da proteína bruta (PB) para as dietas testes. Quanto à concentração de AGCC *in vivo*, houve redução na concentração de acetato e aumento na concentração de propionato nas dietas teste em comparação com a dieta controle. Quanto à produção de metano *in vivo*, houve redução na produção de metano pelos animais que receberam as dietas testadas. Como conclusão pode-se afirmar que tanto o farelo de algodão como a glicerina bruta possa substituir os ingredientes tradicionais farelo de soja e milho na dieta para ruminantes. .

Palavras-chave: Ruminantes. Metano. Glicerina.

Abstract: Ruminants are considered major emitters of methane (CH₄), the major greenhouse gas. Methane production is directly related to the efficiency of rumen fermentation due to the loss of carbon and, consequently, loss of energy, which determines the performance animal. According to *in vitro* tests performed previously, there was selected two experimental diets, to be compared with the control diet (Tifton hay, soybean meal and corn), in which there was a partial substitution of soybean meal by cottonseed meal and another with partial replacement both soybean meal and corn meal by cottonseed meal and crude glycerin respectively. Two *in vivo* experiments were conducted for accessing the digestibility and enteric methane production of. In the first test there was used 15 animals kept in individual pens in the period of adaptation to the diet for 21 days and then moved to individual cages where they were made collections of diet, feces and urine for 7 days. In the last two days of the metabolism trial, the animals were kept in cages fitted with gas collection system. The second test was performed with 6 animals being conducted in the same manner as the first test. As results, it was observed reduction in digestibility of neutral detergent fiber (NDF) and crude protein (CP) for the test diets. As the concentration of SCFA *in vivo*, a reduction in the concentration of acetate and propionate increased concentration of the test diets compared with the control diet. As for methane production *in vivo*, there was a reduction in methane production by animals fed the tested diets. As a conclusion it can be said that both cottonseed meal and crude glycerin can replace traditional ingredients corn and soybean meal in the diet for ruminants

Key words: Ruminants. Methane. Glycerine.

5.1 Introdução

Os ruminantes são considerados importantes emissores de metano (CH_4), um dos principais gases de efeito estufa. A produção de metano está diretamente relacionada com a eficiência da fermentação ruminal em virtude da perda de carbono e, conseqüentemente, perda de energia, o que determina o desempenho animal (ECKARD et al., 2010). Neste cenário, os coprodutos originados na cadeia produtiva do biodiesel no Brasil têm sido estudados como possíveis ingredientes de dietas para ruminantes (ABDALLA et al., 2008). Estudos e técnicas que caracterizem o metabolismo ruminal destes coprodutos são necessários para a identificação de potenciais coprodutos passíveis de serem utilizados com eficiência na dieta de ruminantes em substituição a ingredientes convencionais.

Objetivou-se com este estudo avaliar a digestibilidade aparente e produção de metano *in vivo* de dietas elaboradas utilizando o farelo de algodão como fonte protéica e a glicerina bruta como fonte energética em substituição ao farelo de soja e ao milho, respectivamente.

5.2 Material e Métodos

Este estudo foi conduzido no Laboratório de Nutrição Animal, pertencente ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, Brasil. A partir de ensaios *in vitro* de produção de gases, degradabilidade da matéria orgânica, síntese microbiana e digestibilidade da proteína pós-rumem descritos nos capítulos anteriores deste trabalho, foram selecionadas duas dietas que incluíam farelo de algodão e glicerina bruta em substituição ao farelo de soja e milho respectivamente.

A dieta controle (0FA/0GLI) foi constituída de 70% de feno de Tifton (*Cynodon* spp), 18% de milho, 10% de farelo de soja e 2% de mistura mineral, enquanto que as dietas teste apresentavam a substituição do farelo de soja por 25% de farelo de algodão sem glicerina bruta (25FA/0GLI) e a substituição do farelo de soja por 75% de farelo de algodão e a substituição do milho por 75% de glicerina bruta. A composição bromatológica é apresentada na Tabela 1.

Tabela 5.1 Composição bromatológica das dietas controle (0FA/0GLI) e dietas testes com 25% de farelo de algodão em substituição ao farelo de soja (25FA/0GLI) e 75% de farelo de algodão, 75% de glicerina bruta em substituição ao farelo de soja e milho respectivamente, utilizadas no experimento *in vivo*

Composição (%MS)						
Dieta	Matéria Seca	Matéria Mineral	Extrato Etéreo	Fibra em Detergente Neutro	Fibra em Detergente Ácido	Proteína Bruta
0 FA/0 GLI	90,00	6,11	1,79	68,13	37,88	9,80
25 FA/0 GLI	90,00	6,27	1,78	67,35	37,63	9,81
75 FA/75 GLI	87,50	6,47	6,34	65,63	41,59	7,60

Foram realizados dois ensaios de metabolismo e quantificação de metano entérico *in vivo*. No ensaio 1 foram utilizados 17 animais inicialmente, em que os animais foram divididos aleatoriamente nos tratamentos, agrupados de acordo com o peso vivo inicial (PV = $22 \pm 3,0$ kg), sendo que o tratamento controle apresentava 5 animais e os demais tratamento 6 animais. Durante a adaptação, perdeu-se 2 animais de um mesmo tratamento. Assim sendo, realizou-se o ensaio 2, com 2 animais por tratamento (PV = $23 \pm 6,0$ kg), totalizando 6 animais.

Os animais foram mantidos na dieta controle em quantidade suficiente para fornecer as exigências nutricionais de ovinos em relação ao peso vivo de cada animal, de acordo com NRC (2007), sendo mantidos em baias individuais, a fim de se realizar um período de adaptação dos animais às baias. Ao término desta adaptação (dia 0), os grupos foram sorteados e alocados para receberem as dietas experimentais (0 FA/ 0 GLI, 25 FA/ 0 GLI e 75 FA/ 75 GLI), conforme descrito anteriormente.

Os animais permaneceram em baias individuais onde receberam as dietas por período de 21 dias para avaliação do consumo voluntário (oferta de no mínimo 4 % do PV) e posteriormente, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais por período de 5 dias para controle e coletas da dieta oferecida, sobras e excreção de fezes e urina. Ao término do ensaio de metabolismo, em ambos os ensaios, os animais foram monitorados para determinar a produção de metano entérico.

Para isto, foram utilizadas câmaras desenvolvidas no LANA-CENA/USP como descrito em Abdalla et al. (2012). Os animais foram mantidos nas câmaras durante dois dias consecutivos, a quantidade de gases eliminada e a concentração do metano neste gás foi medida diariamente para cada animal em cada dieta experimental. A concentração de metano

foi determinada por cromatografia gasosa (Shimadzu GC2014) e a produção de metano expressa em L/d e L/kg matéria seca consumida.

As amostras de oferecido, sobras e fezes foram secas em estufa (60°C) e moídas em moinho tipo Wiley providos de peneiras com crivo de 2 mm. Posteriormente as amostras foram analisadas quimicamente para quantificação dos teores de matéria seca, matéria orgânica e proteína bruta de acordo com AOAC (1995) e fibra em detergente ácido e em detergente neutro, segundo Van Soest et al. (1991).

Além disso, no 28º dia foram colhidas amostras de conteúdo ruminal de cada animal, 3 horas após a alimentação da manhã para determinação de ácidos graxos de cadeia curta com Nocek, Hart e Polan (1987) e Conrad e Palmquist (1971), com adaptações para o LANA/CENA/USP.

Os dados foram analisados estatisticamente por análise de variância. Inicialmente procedeu-se a comparação entre os ensaios 1 e 2 e como não houve efeito de ensaio, esta variável foi desconsiderada. O modelo estatístico utilizado foi:

$$Y = \text{tratamento} + \text{bloco} + \text{pv}; \text{ sendo } \text{pv} (\text{peso vivo}) \text{ considerado como covariável}$$

A análise de variância foi realizada utilizando modelo linear (PROC GLM), do SAS (2002).

5.3 Resultados e Discussão

Os resultados de consumo e do ensaio de metabolismo estão apresentados na Tabela 5.2. Quanto às variáveis consumo de matéria seca, de matéria orgânica, de FDN e de proteína bruta, se observa valores maiores na dieta controle em relação às demais dietas, diferindo significativamente das demais. Já para a variável consumo de FDA, se observa que maior consumo nas dietas controle e 75 FA/ 75 GLI, diferindo da dieta 25 FA/ 0 GLI. Já para as variáveis digestibilidade de matéria seca, digestibilidade da matéria orgânica e digestibilidade do FDA, não houve diferença entre os tratamentos. Quanto à digestibilidade de FDN, o tratamento controle diferiu do tratamento 75 FA/ 75 GLI, sendo que o tratamento 25 FA/ 0 GLI não diferiu dos outros tratamentos. O coeficiente de digestibilidade da proteína bruta foi maior para as dietas controle e 25 FA/ 0 GLI, diferindo da dieta 75 FA/ 75 GLI.

Tabela 5.2 - Consumo e coeficiente de digestibilidade dos componentes das dietas experimentais

Itens	Tratamentos			EPM
	Controle	25 FA/ 0 GLI	75 FA/ 75 GLI	
Matéria seca				
Consumo, kg/dia	0,99 ^a	0,92 ^b	0,86 ^b	5,92
DATT, %	54,62	50,24	52,73	7,76
Matéria orgânica				
Consumo, kg/dia	0,92 ^a	0,78 ^b	0,70 ^b	0,19
DATT, %	56,05	51,95	49,25	8,33
Fibra em detergente neutro				
Consumo, kg/dia	0,65 ^a	0,52 ^b	0,52 ^b	0,16
DATT, %	51,05 ^a	41,17 ^{ab}	39,05 ^b	15,45
Fibra em detergente ácido				
Consumo, kg/dia	0,36 ^a	0,29 ^b	0,34 ^a	0,02
DATT, %	43,16	35,63	41,01	11,36
Proteína				
Consumo, kg/dia	0,11 ^a	0,10 ^a	0,08 ^b	0,05
DATT, %	63,86 ^a	58,68 ^a	46,38 ^b	19,11

Médias com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes (P<0,1).

Segundo o NRC (2007), o consumo de MS de cordeiros em terminação deve estar próximo a 1,0 kg por dia. Este valor está próximo ao observado no tratamento controle, sendo menor nos tratamentos empregados neste experimento. Lage et al. (2010) observaram que a inclusão de glicerina bruta na dieta, resultou na redução da ingestão de MS, levando à redução no consumo de matéria orgânica, carboidratos não fibrosos, proteína bruta, fibra em detergente neutro. Estes resultados também foram observados neste estudo.

O fígado de ruminantes tem alta atividade de propionil CoA sintetase (RICKS; COOK, 1981), necessária para ativação e subsequente metabolismo do propionato. Como resultado, o propionato é extensivamente metabolizado pelo fígado de ruminantes durante as refeições, o que aumenta a produção de ATP, em razão de sua utilização para produção de glicose, e sinaliza a saciedade (REYNOLDS, 1995). Com o possível incremento de propionato no rúmen a partir do glicerol, houve maior aporte deste no fígado, o que pode ter contribuído para a saciedade e, conseqüentemente, para a menor ingestão de MS pelos animais.

Schröder e Südekum (1999) indicaram que glicerina bruta com diferentes graus de pureza pode ser incluída em até 10% da matéria seca da dieta de ruminantes, sem afetar negativamente o consumo de alimentos e a digestibilidade dos componentes da dieta. Com o nível de substituição empregado neste experimento, encontra-se 13,5% de glicerina bruta na matéria seca, valor superior ao indicado pelos autores, resultado este que pode justificar a redução no consumo de alimento pelos animais, porém não foi observada diferença na digestibilidade, resultado que diverge com os mesmos autores.

Os resultados de concentração de ácidos graxos de cadeia curta estão presentes na Tabela 5.3. Pode se observar houve redução na concentração de ácido acético e aumento na concentração de ácido propiônico. Este resultado é semelhante ao encontrado em outros trabalhos que testaram o uso de glicerina bruta com fonte energética para ruminantes. Wang et al. (2009), em estudos com gado Simental alimentados com 60% de palha de milho e 40% de concentrado, observaram que a suplementação com 100, 200 e 300 g/dia de glicerol melhorou o padrão de fermentação ruminal, diminuindo a proporção acetato:propionato.

Remond et al. (1993) observaram aumento significativo na concentração de ácido propiônico e butírico e decréscimo significativo na concentração de ácido acético em vacas consumindo silagem de milho e suplementadas de glicerina.

Tabela 5.3 - Concentração de ácidos graxos de cadeia curta, em Mmol, obtido em amostras de líquido ruminal coletadas dos animais alimentados com as dietas experimentais

Tratamentos	Ác. Acético	Ác. Propiônico	Ác. Butírico	Razão Ác. Acético: Ác. Propiônico
0 FA/0 GLI	51,14 ^a	12,37 ^b	6,20	4,29 ^a
25 FA/0 GLI	52,39 ^a	11,64 ^b	6,15	4,61 ^a
75 FA/75 GLI	42,94 ^b	23,97 ^a	8,76	1,97 ^b
EPM	16,47	27,55	5,57	0,20

Médias com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes (P<0,01).

Pethick et al. (1999) observaram que o tratamento que recebeu glicerol resultou na redução da concentração de acetato e aumento na de butirato, enquanto a concentração de propionato apresentou efeito quadrático, aumentando até 12 horas e decrescendo após 26 horas de incubação. De acordo com esses resultados obtidos, os autores concluíram que o glicerol exerce um efeito glicogênico *in vivo*, através de sua absorção na forma intacta ou na forma de propionato.

Em meados de 1950, autores citados por Donkin (2008), evidenciaram o uso de glicerol na alimentação de vacas leiteiras para o tratamento de cetose. Para Donkin (2008), inexistem dados precisos quanto às taxas de fermentação do glicerol no rúmen, mesmo com evidências positivas em relação ao uso de glicerol em dietas para vacas leiteiras de alta produção. O autor conclui sobre a necessidade de informação precisa para permitir uma avaliação completa sobre o uso do glicerol na alimentação de ruminantes e o impacto resultante na saúde e produtividade da vaca.

A produção líquida de metano entérico é apresentada na Figura 5.1. A substituição dos ingredientes tradicionais pelos coprodutos da cadeia do biodiesel promoveu redução significativa na emissão de metano entérico. O resultado encontrado para o tratamento controle corrobora com o observado por Abdalla et al. (2012), ao de testarem dieta com 80% de forragem e 20% de concentrado, semelhante ao empregado neste trabalho, observou produção de metano de 30 l/kg de MS consumida.

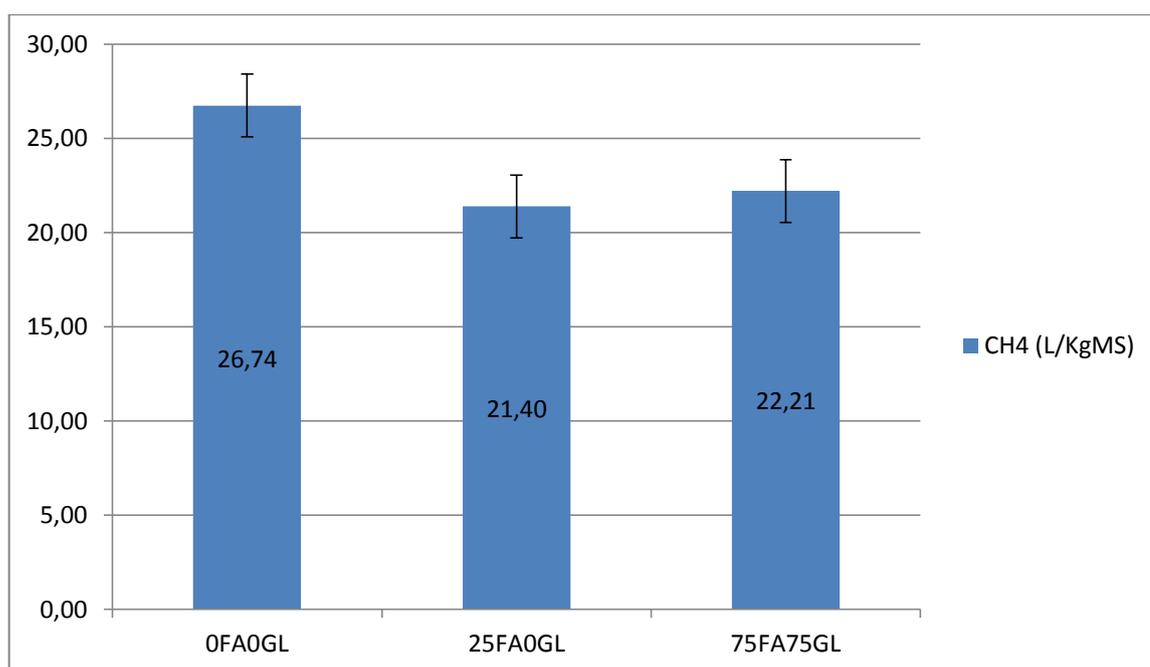


Figura 5.1 – Produção de metano entérico, em l/ kg MS, de animais alimentados com as dietas 0 FA/0 GLI, 25FA/0 GLI e 75 FA/75 GLI.

Abdalla et al. (2008) afirmam que a inclusão de tortas provenientes da cadeia do biodiesel, entre elas a torta de algodão, promoveram redução na produção de metano em ensaio *in vitro*. Em estudo *in vivo* realizado por Abdalla et al. (2012), os autores observaram que animais receberam dieta controle, contendo 69% de feno de Tifton e 31% de concentrado

semelhante ao empregado neste experimento, promoveram a emissão de 31 l/kg de MS digerida, valor este semelhante ao observado neste experimento, que foi de 26,74 l/kg, valor este superior, em ambos os experimentos, ao observado nos demais tratamentos testados.

A emissão ruminal de CH₄ representa uma perda significativa de energia dietética que potencialmente poderia ser direcionada para produção de carne e leite (ECKARD et al., 2010). Normalmente, cerca de 6-10% do total de energia bruta consumida por uma vaca em lactação é convertida em CH₄ e eliminada por eructação. A produção de metano ruminal é diretamente proporcional à concentração de H₂ dissolvida. Se há acúmulo de H₂ a re-oxidação do NADH é inibida, inibindo o crescimento microbiano, a digestão da forragem, e a consequente produção de AGCC (ECKARD et al., 2010). Segundo Trabue et al. (2007), o fornecimento de glicerina bruta tende a reduzir a quantidade de carbono e hidrogênio disponível para a produção de metano, pelo aumento da síntese de propionato, com consequente melhoria na eficiência de utilização da energia pelo animal. Portanto, deve-se buscar impedir o acesso a estes prótons pelos organismos metanogênicos através da otimização de sua utilização (HEGARTY, 1999).

5.4 Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que tanto o farelo de algodão quanto a glicerina bruta podem ser utilizados na alimentação de ruminantes, sem que estes alterem a digestibilidade da dieta, não havendo assim prejuízos para os animais.

Referências

ABDALLA, A. L.; SILVA FILHO, J. C.; GODOI, A. R.; CARMO, C. A.; EDUARDO, J. L. P. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, p. 260-268, 2008.

ABDALLA, A. L.; LOUVANDINI, H.; SALLAM, S. M. A. H.; BUENO, I. C. S.; TSAI, S. M.; FIGUEIRA, A. V. O. In vitro evaluation, in vivo quantification, and microbial diversity studies of nutritional strategies for reducing enteric methane production. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 44, p. 953-964, 2012.

DONKIN, S. S. Glycerol from biodiesel production: the new corn for dairy cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, p. 280-286, 2008. Suplemento.

ECKARD, R. J.; GRAINGER, C.; DE KLEIN, C. A. M. Option for abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: a review. **Livestock Science**, v. 130, p. 47 – 56. 2010.

LAGE, J.F.; PAULINO, P. V. R.; PEREIRA, L. G. R.; VALADARES FILHO, S. C.; OLIVEIRA, A. S.; DETMANN, E.; SOUZA, N. K. P.; LIMA, J. C. M. Glicerina bruta na dieta de cordeiros terminados em confinamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 45, n. 9, p. 1012-1020, 2010.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids and new world camelids**. Washington, DC: The National Academies Press, 2007. 384 p.

PETHICK, D. W.; CUMMINS, L.; GARDNER, G. E.; KNEE, B. W.; MCDOWELL, M.; MCINTYRE, B. L.; TUDOR, G.; WALKER, P. J.; WARNER, R. D. The regulation by nutrition of glycogen in muscle of ruminants. **Recent Advances in Animal Nutrition in Australia**, Armidale, v. 12, p. 145-151, 1999.

REYNOLDS, C. K. Quantitative aspects of liver metabolism in ruminants. In: ENGLEHARDT, W. V.; LEONHARD-MAREK, S.; BREVES, G. (Ed.). **Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth, and reproduction**. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag, 1995. p. 351-372.

RICKS, C. A.; COOK, R. M. Regulation of volatile fatty acid uptake by mitochondrial acyl CoA synthetases of bovine liver. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 64, p. 2324-2335, 1981.

SCHRÖDER, A.; SÜDEKUM, K. H. Glycerol as a by-product of biodiesel production in diets for ruminants. In: INTERNATIONAL RAPESEED CONGRESS, 10., 1999, Canberra, Australia. **Proceedings...** Gosford: The Regional Institute, 1999. p. 241.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nestes estudos indicam que o farelo de algodão, apesar de apresentar menor degradabilidade da proteína no rúmen, quando comparado ao farelo de soja, este pode ser utilizado como fonte de proteína em dietas para ruminantes.

A glicerina bruta pode ser utilizada como fonte energética na alimentação de ruminantes, em substituição ao milho, sem que ocorra prejuízo para os mesmos.

A presença do farelo de algodão e da glicerina bruta na dieta promoveram a redução na emissão de metano entérico pelos animais.