

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

CARINA NAZATO

**Validação de metodologia para a quantificação de metanol em glicerina
bruta utilizada na alimentação animal**

Piracicaba

2015

CARINA NAZATO

**Validação de metodologia para a quantificação de metanol em glicerina
bruta utilizada na alimentação animal**

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

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

**Área de Concentração: Química na Agricultura e
no Ambiente**

Orientador: Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla

Piracicaba

2015

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

Nazato, Carina

Validação de metodologia para a quantificação de metanol em glicerina bruta utilizada na alimentação animal / Carina Nazato; orientador Adibe Luiz Abdalla. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.

84 p.: il.

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

1 Análise de alimentos para animal 2. Biodiesel 3. Cromatografia a gás 4. Ração 5. Ruminantes 6. Subprodutos para animais I. Título

CDU 547.261 : 547.426.1 (543.544.3)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à ciência. Espero que possa contribuir no desenvolvimento de outros estudos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por me permitir realizar esta pesquisa e por todo sustento não somente neste período mas, sempre;

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/ USP) pela oportunidade e infraestrutura concedida para o desenvolvimento desta pesquisa;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla por acreditar neste projeto e em mim;

À minha família por todo o amor e incentivo: Clarice Nazato; Norberto A. Nazato; Rafael A. Nazato; Francine L. Perim e à nossa linda, Laika;

Ao meu amor, Gustavo Mastrângelo pelo amor, compreensão e apoio, principalmente nos momentos mais “críticos” desta fase;

Aos professores que contribuíram, e muito, na minha formação: Adibe Luiz Abdalla; Fabio A. Rocha; Valdemar L. Tornisielo; Helder Louvandini; Fernando M. Lanças e Renata B. Arnandes. Agradeço!

Aos secretários da Pós-Graduação: Daiane, Fábio, Neuda e Sonia por toda boa vontade e prontidão em ajudar;

Aos técnicos do Laboratório de Nutrição Animal: Maria Regina S. R. Peçanha, Lécio A. Castilho e Joaquim Everaldo M. Santos, obrigada por todos os esforços e ajuda!

À secretária do Departamento, Carla Cadeodato por todo auxílio;

À Alessandra de Cássia Romero. Alê, muito obrigada pelo muito que você me ensinou desde cheguei e toda atenção nos momentos finais do preparo deste trabalho; por todos os momentos de reflexão cromatográfica e dancinhas da vitória;

Andressa Natel e Patricia Righeto, meninas, agradeço muitíssimo de coração todo auxílio fundamental na finalização deste trabalho;

À Ana Claudia K. Sampaio, Aninha, agradeço por todos os valiosos conselhos e ajuda em elaborar as longas prestações de conta;

À Suellen C. U. Ferraz pela amizade, por todas as horas de nossas conversas que, no mínimo terminavam engraçadas, e pronta ajuda sempre que precisei;

Aos colegas de trabalho e às amigadas que tive a oportunidade de fazer: Adibe L. Abdalla Filho, Alessandra de Cássia Romero, Alline M. Schumann, Aline Campeche, Ana C. K. S. Issakowicz, Andressa Natel, Erika B. Canova, Fernanda C. Campos, Dinesh Dhanasekaran, Juliano Issakowicz, Linander Campos, Paulo T. Lima, Patricia P. Righeto, Ronaldo Lucas, Sammy Cavalcante, Suzana Coimbra e Tairon Pannunzio.

Aos estagiários do Laboratório de Nutrição Animal: André Joaquim de Souza, Caroline Carrara, Egon Hion, Felipe Xadão, João Lopes, Laura Mesquista, Larissa Vieira, Matheus Coa, Natasha Mantuan, Nathália Maciel, Rafaella Toniollo e Tatiane Lissoni.

Aos amigos Nádia H. Torres e Franz Z. Vilca, além da amizade, agradeço muito por tudo que aprendi com vocês;

À Faculdade de Tecnologia (FATEC – Piracicaba) e à Marcia N. C. Harder por me acolherem prontamente;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa inicial concedida;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pela bolsa e condição para a realização desta pesquisa.

À todos que fizeram parte desse momento, muitíssimo obrigada!

Continue a nadar
Continue a nadar
Continue a nadar
(Dory – Procurando Nemo)

RESUMO

NAZATO, C. **Validação de metodologia para a quantificação de metanol em glicerina bruta utilizada na alimentação animal**. 2015. 84 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Estudos com a inclusão de glicerina bruta (GB) na alimentação animal vêm demonstrando benefícios quanto ao aporte energético conseguido, entretanto, existe uma variabilidade quanto aos teores de metanol encontrados na GB, nem sempre mensuradas, podendo apresentar riscos. Objetivou-se com este estudo: adaptar, otimizar e validar a metodologia oficial de determinação de metanol (MeOH) em biodiesel “EN 14110” para a matriz GB; aplicar o método para análise em amostras de glicerina bruta e avaliar o efeito do metanol na dieta de ruminantes por meio da técnica *in vitro* de produção de gases (PG). Foi utilizado um cromatógrafo gasoso Shimadzu modelo GC 2014 equipado com um detector de ionização de chamas (FID). Os parâmetros de validação foram linearidade, limite de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão, exatidão e efeito matriz. Foram analisadas duas amostras industriais de GB e uma obtida em laboratório por meio da reação de transesterificação do óleo de pinhão-manso (*Jatropha curcas*). A técnica semi automática de produção de gases foi utilizada para avaliar níveis crescentes de inclusão de MeOH na dieta via GB em substituição ao milho em grão a 0, 25, 50, 75 e 100%; correspondendo a doses de MeOH de 0, 0,018, 0,035, 0,053 e 0,071 mg, respectivamente. Como controle positivo foi adicionado um tratamento com inclusão de 8,3 mg MeOH puro na dieta controle sem inclusão de GB. As variáveis avaliadas foram produção de gases total (PGT), degradabilidade da matéria orgânica (DMO), eficiência na conversão de metano (CH₄ effc) e o fator de partição (FP). As garrafas contendo as dietas foram incubadas a 39°C por 24h. O método para análise de MeOH apresentou boa linearidade ($r^2 \geq 0,99$), e o LD e LQ foram 0,015 e 0,031%, respectivamente. Não foi observado efeito matriz significativo (4,36%). A precisão nas concentrações testadas, 0,05% e 0,5% foi de 2,09% e 2,39%, respectivamente. As concentrações de 0,05%, 0,2% e 0,5% (m/m) apresentaram recuperações de 88%, 95% e 91%, respectivamente. As amostras da indústria apresentaram teores de 0,047 e <LQ, enquanto que a obtida no laboratório apresentou 7,8% de metanol. A partir dos valores obtidos na produção de gases *in vitro* observou-se que a inclusão de GB contaminada com MeOH aumentou a DMO, PGT e CH₄ e reduziu o FP. Conclui-se que o método é adequado para análise de MeOH em GB, com bom potencial para análise na matriz ração, quando otimizado. A GB contaminada com MeOH influencia a fermentação ruminal, sendo necessário mais estudos para elucidar os mecanismos envolvidos.

Palavras-chave: Cromatografia gasosa. Metanol. Otimização. Ruminante. Subproduto. Validação.

ABSTRACT

NAZATO, C. **Validation of methodology for quantifying methanol in crude glycerine used in animal nutrition.** 2015. 84 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Studies with the inclusion of crude glycerin (CG) in animal feed have demonstrated benefits on the energy intake achieved. However, there is a variation between the levels of methanol found in CG, not always analyzed, but often passed on to producers and may pose risks for using it as animal feed. The objective of this study was to optimize and to validate the official methodology "EN 14110" for determining methanol in biodiesel for CG matrix; to apply the method for analysis in commercial samples and samples produced in the laboratory; and to evaluate the effect of methanol in ruminant feed through the *in vitro* gas production technique (PG). It was used a Shimadzu gas chromatograph model 2014 GC equipped with a flame ionization detector (FID). The validation parameters were linearity, limit of detection (LOD) and quantification (LOQ), precision, accuracy and matrix effect. There were analyzed two industrial's samples and a sample obtained in the laboratory by transesterification of the oil from *Jatropha curcas*. The semi-automatic *in vitro* gas production technique was used to evaluate the use of MeOH inclusion in the ruminant diet via CG replacing corn grain at 0, 25, 50, 75 and 100%, corresponding to MeOH doses of 0, 0.018, 0.035, 0.053 and 0.071 mg respectively. As a positive control treatment was added with the inclusion of 8.3 mg pure MeOH. The variables evaluated were total gas production (GP), degradability of organic matter (DMO), efficiency in methane conversion (CH₄ effc) and the partition factor (PF). The bottles containing the diets were incubated at 39 ° C for 24h. The method showed good linearity ($r^2 \geq 0.99$), the LOD and LOQ were 0.015 and 0.031%, respectively. There was no significant matrix effect (4.36%). The accuracy of the concentration tested, 0.05% e 0.5% was 2.09% and 2.39%, respectively. The concentrations 0.05%, 0,2% and 0.5% (w/w) showed recovery level of 88%, 95% e 91% respectively. The industry samples concentrations were 0.047 and <LOQ, while the laboratory one showed 7.8% of methanol. The *in vitro* gas production showed that the addition of CG increased GP, DMO and CH₄ effc and reduced PF. It was concluded that the method is suitable for analysis in CG MeOH, with good potential for analysis of the feed array after optimization. CG contaminated with MeOH influence ruminal fermentation, requiring further studies to elucidate the mechanisms involved.

Keywords: By-product. Gas chromatography. Methanol. Optimization. Ruminant. Validation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. - Perfil nacional das matérias primas utilizadas para a produção de biodiesel.....	25
Figura 2.2. - Produção de biodiesel a partir da transesterificação de óleos vegetais.....	26
Figura 3.1. - Cromatograma dos picos de metanol e 2-propanol, saindo a 2,32 e 2,65 minutos, respectivamente	51
Figura 3.2. - Curvas analíticas no solvente e na matriz	54
Figura 4.1. - Cromatograma de amostra de 5g concentrado	65
Figura 5.1 – Degradabilidade da matéria orgânica (DMO) e eficiência na produção de metano (CH ₄) em função dos níveis de glicerina bruta contaminada	77
Figura 5.2 – Efeito de 8,3 mg de metanol sobre a produção de metano (mL.gDMO ⁻¹)	79
Figura 5.3 – Relação ente a Produção de gases total (PGT) e o Fator de partição (FP) em função dos níveis de glicerina contendo metanol (%MS)	80

LISTAS DE TABELAS

Tabela 2.1 - Teor médio de óleo (%) em sementes de amendoim, caroço de algodão, dendê, girassol, mamona, pinhão-manso e soja.....	25
Tabela 3.1 - Fatores de calibração, média e coeficiente de variação (CV) dos fatores de calibração.....	52
Tabela 3.2 - Quantificação de metanol nas subamostras de uma glicerina bruta e média dos valores (%)	53
Tabela 4.1 - Valores de concentrações (%) de metanol em amostras de GB	63
Tabela 5.1 - Composição bromatológica dos tratamentos utilizados no ensaio de produção de gases <i>in vitro</i> (%)	73
Tabela 5.2 - Composição de ácidos graxos em glicerina bruta (%)	74
Tabela 5.3 - Variáveis DMO, PGT, CH ₄ e FP em função dos níveis de glicerina bruta contaminada com metanol.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
AGCC	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
AGNE	Ácidos graxos não esterificados
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina Trifosfato
CH ₄	Metano
Ci	Concentração do 2-propanol
Cm	Concentração do metanol
CH ₄	Metano
CO ₂	Gás carbônico
CV	Coefficiente de variação
DMO	Degradabilidade da Matéria Orgânica
EE	Extrato Etéreo
Fc	Fator de calibração
FAO	Food Agriculture Organization
FDA	Fibra em Detergente Ácido
FDN	Fibra em Detergente Neutro
FID	Flame Detector Ionization
FP	Fator de partição
g	Gramas
GB	Glicerina bruta
GC	Gas Chromatography
GEE	Gases de Efeito Estufa
He	Gás hélio
INS	Sistema Internacional de Numeração
IPCC	Intergovernmental Panel on Climate Change
ISO	International Organization for Standardization
Lig	Lignina
LD	Limite de Detecção

LQ	Limite de Quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm ² / s	Milímetro quadrado por segundo
MO	Matéria Orgânica
MS	Matéria Seca
°C	Graus Celsius
OTSC	Office of the Texas State Chemist
PB	Proteína Bruta
PGT	Produção de gases total
pH	Potencial hidrogeniônico
PNPB	Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel
ppm	Partes por milhão
r ²	Coefficiente de correlação
R _s	Resolução
RSD	Desvio padrão relativo
Sm	Área do pico de metanol
St	Área do pico do 2-propanol
tR	Tempo de retenção
USEPA	United States Environmental Protection Agency
USDA	United States Department of Agriculture
%	Porcentagem
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1. Gases do efeito estufa.....	23
2.2. Biodiesel.....	24
2.2.1. Processo de produção do biodiesel: Obtenção da glicerina.....	26
2.3. Glicerina vs Glicerol.....	27
2.3.1. Aplicação na alimentação de ruminantes.....	28
2.4. Metabolismo do glicerol em ruminantes.....	29
2.5. Glicerina bruta na alimentação.....	30
2.6. Metanol no organismo de ruminantes.....	31
2.7. Técnica de cromatografia gasosa (CG).....	32
Referências.....	34
3 Otimização de metodologia por GC – FID para análise de metanol em glicerina bruta	43
Resumo.....	43
3.1. Introdução.....	45
3.2. Materiais e Métodos.....	46
3.2.1. Reagentes e Equipamentos.....	46
3.2.2. Condições do GC-FID.....	46
3.3.3. Soluções de calibração.....	46
3.3.4. Preparo das soluções de calibração.....	47
3.3.4.1. Homogeneização.....	47
3.3.4.2. Extração metanol.....	48
3.3.5. Critério para aceitação do método.....	48
3.3.5.1. Quantificação de metanol em amostra industrial.....	49
3.3.6. Validação do método.....	49
3.4. Resultados e Discussão.....	51
3.4.1. Separação cromatográfica.....	51
3.4.2. Otimização da homogeneização.....	51
3.4.3. Quantificação de metanol em amostra industrial.....	53
3.4.4. Validação do método.....	53

3.5. Conclusão	55
Referências	55

4 Aplicabilidade do método na matriz glicerina bruta e potencial para análise em ração animal 58

4.1. Introdução.....	60
4.2 Materiais e Métodos.....	60
4.2.1. Obtenção das amostras de glicerina bruta e do concentrado presente na ração.....	60
4.2.2. Extração do metanol em glicerina bruta.....	61
4.2.3. Extração do metanol em ração.....	62
4.2.4. Condições Cromatográficas.....	62
4.3. Resultados e Discussão	63
4.3.1. Análise das amostras de glicerina bruta	63
4.3.2. Análise de metanol nas amostras de ração	64
4.4. Conclusão.....	66
Referências	66

5 Avaliação *in vitro* de níveis de metanol sobre a fermentação ruminal e produção de gases..... 69

5.1. Introdução.....	71
5.2. Material e Métodos	71
5.3. Delineamento Experimental e Tratamentos.....	72
5.4. Dietas	72
5.5. Animais doadores de inóculo.....	74
5.6. Preparo do inóculo	74
5.7. Ensaio de produção de gases <i>in vitro</i>	75
5.8. Análise estatística.....	76
5.9. Resultados e discussão	76
5.10. Conclusão	80
Referências	81

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 84

1 INTRODUÇÃO

A contínua interferência do homem no ambiente tem provocado efeitos adversos, especialmente sobre o clima, e medidas para amenizá-los tem sido temas de discussão. Entre as importantes fontes de emissão dos gases de efeito estufa (GEE) estão a fermentação entérica com o aporte de metano (CH_4) na atmosfera (ZOTTI; PAULINO, 2009), e a combustão de combustíveis fósseis na emissão do gás carbônico (CO_2) (USEPA, 2014a).

Quanto ao metano produzido durante da fermentação entérica, uma estratégia para mitigá-lo é a manipulação da fermentação ruminal com a utilização de aditivos alimentares (ABDALLA et al., 2008; 2012), como o glicerol (MEALE et al., 2012; CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2013). Já dentre as alternativas para reduzir a dependência das fontes fósseis de energia está a produção do biodiesel (MATA et al., 2011), que tem como principal subproduto a glicerina bruta.

Considerando a crescente geração de glicerina bruta e oscilações no preço do milho, a utilização deste subproduto tem sido pesquisada na alimentação de animais (YANG et al., 2012). Além de outros componentes, a glicerina bruta apresenta quantidades variáveis de glicerol em sua composição, dependendo de sua pureza. O glicerol é um composto de interesse na alimentação animal, pois além de atuar como precursor energético (CHUNG et al., 2007), ele tem sido estudado para modificar a fermentação ruminal visando reduzir a produção de metano (BERNDT, 2010).

A utilização da glicerina bruta na alimentação animal constitui uma alternativa com potencial para agregar valor à cadeia produtiva do biodiesel, sendo também interessante sob o ponto de vista econômico e ambiental. Entretanto, ela contém resíduos de metanol proveniente do processo industrial, que devido à sua toxicidade pode apresentar riscos para a saúde dos animais.

A quantificação de metanol em amostras de glicerina obtidas na produção de biodiesel tem sido realizada a partir de técnicas cromatográficas (GOTT, 2009; HANSEN et al., 2009; GUNN et al., 2010). É possível haver uma variabilidade entre os teores de metanol em amostras de glicerina bruta disponíveis no mercado; entretanto, as concentrações de metanol nem sempre são verificadas antes da glicerina bruta ser utilizada pelos produtores.

A norma oficial da Comunidade Européia EN 14110 apresenta os procedimentos analíticos para a quantificação de metanol em amostras de biodiesel, por meio da cromatografia gasosa (CG) (ANP, 2008). Neste método, a extração é realizada com a técnica *headspace*,

podendo ser reproduzido em CG com sistema de *headspace* automático ou manual, indicado para uma faixa de concentração entre 0,01 a 0,5% (EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION, 2003). Segundo Skoog e Holer (2006) a validação de métodos analíticos é de grande importância, uma vez que assegura a confiabilidade dos resultados obtidos em uma análise.

Considerando que a inclusão da glicerina bruta na alimentação de ruminantes pode agregar valor à indústria do biodiesel, já que o glicerol (presente na glicerina) pode ser utilizado para produzir energia para o animal. Entretanto, a glicerina bruta pode conter resíduos de metanol e favorecer os riscos à saúde do animal. Assim, em razão da conveniência em se utilizar a mesma infraestrutura de análise de metanol em biodiesel para amostras de glicerina bruta, os objetivos deste estudo foram:

- Adaptar e otimizar para a matriz glicerina bruta, o método da Comunidade Europeia “EN 14110”, originalmente utilizado para análise de metanol em biodiesel;
- Validar a metodologia otimizada para análise de metanol em glicerina bruta;
- Testar a aplicação do método em amostras de glicerina bruta;
- Investigar o efeito de níveis de metanol via glicerina contaminada por meio do ensaio de produção de gases *in vitro*.

O presente trabalho está estruturado na forma de capítulos, iniciando com uma revisão de literatura, na qual estão expostos os principais pontos sobre a questão ambiental e sobre o biodiesel como opção de energia, a utilização de glicerina bruta na alimentação de ruminantes, assim como o metanol como contaminante da glicerina e a importância em analisá-lo. Já o segundo capítulo refere-se à otimização e validação do método de análise de metanol em biodiesel “EN 14110” para a matriz glicerina bruta. Este resumo foi apresentado no Congresso Latinoamericano de Cromatografia, COLACRO XV, 2014 e o artigo foi submetido à avaliação para publicação no *Journal of Separation Sciences*. No terceiro capítulo apresenta-se os resultados da utilização prática do método validado em amostras de glicerina bruta. Finalmente, no quarto capítulo é apresentado o ensaio *in vitro* o efeito da glicerina contendo metanol sobre a fermentação ruminal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Gases do efeito estufa

A retenção de energia na atmosfera devido à presença de gases de efeito estufa (GEE) ocasiona o efeito estufa natural, que aquece e permite a vida na Terra. Porém, o acúmulo desses gases tem potencial para modificar o clima e, com isso, impactar tanto a saúde humana, quanto os ecossistemas (USEPA, 2009).

Entre os principais gases de efeito estufa proveniente das atividades antropogênicas estão o gás carbônico (CO₂), metano (CH₄), óxido nitroso (N₂O) e compostos fluorados (HFCs, PFCs e SF₆)¹. Desde 1970 houve aumento de 75% na emissão desses gases, representado principalmente pelo CO₂ e depois pelo CH₄. Em 2010 a participação do CO₂ foi de 76%, o CH₄ correspondeu a 16%, o N₂O a 6% e compostos fluorados contribuíram com 2% desses gases (INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE - IPCC, 2014).

O CO₂ pode ser encontrado naturalmente na atmosfera, mas também é liberado a partir da queima de combustíveis fósseis, sendo um gás incolor, inodoro e não tóxico (DAVIS, 2000). O uso da terra e alguns processos industriais podem emitir o CO₂, porém, a maior fonte de emissão é a combustão de combustíveis não renováveis (USEPA, 2014a).

Considerando que a utilização de combustíveis alternativos pode auxiliar na redução dos gases do efeito estufa (LIPMAN; DELUCCHI, 2002), o biodiesel vem se tornando uma opção de energia interessante do ponto de vista ambiental (HONG, 2012). Comparado ao diesel, o uso do biodiesel deixa de emitir 67% de hidrocarbonetos, 48% de CO₂ e 47% de material particulado (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis - ANP, 2012).

A emissão de CH₄ ocorre durante a queima incompleta da matéria orgânica; nos processos de metanogênese em solos (IPCC, 2006), na decomposição de material residual em aterro sanitário e estação de tratamento de água e na fermentação entérica em ruminantes (USEPA, 2014b).

Na nutrição animal, a produção e eliminação de metano dependem do consumo de alimento, da composição da dieta, adição de lipídeos e da digestibilidade do alimento (ABDALLA et al., 2008; ZOTTI; PAULINO, 2009). Diante de algumas estratégias para a mitigação de metano produzido pelos ruminantes, a manipulação da dieta tem demonstrado ser a mais promissora (MEALE et al., 2012). Desta forma, estudos têm sido realizados utilizando

¹ Hidrofluorcarbono, Perfluorcarbono e Hexafluoreto de enxofre, respectivamente.

de plantas ricas em taninos (ABDALLA et al., 2012; MOREIRA et al., 2013); co-produtos da indústria do biodiesel (ABDALLA et al., 2008; LIMA et al., 2014), óleos essenciais (SALLAM et al., 2011).

Os ruminantes podem utilizar o glicerol contido na glicerina bruta para produzir energia (CHUNG et al., 2007). Com a maior disponibilidade de glicerina em decorrência da crescente produção de biodiesel, sua utilização na forma bruta na alimentação animal tem gerado interesse econômico nos produtores (PELLEGRIN et al., 2013). Porém, sob o estado bruto, são encontrados resíduos do metanol (MeOH) remanescentes da produção do biodiesel (SINGHABHANDHU; TEZUKA, 2010). Uma vez no organismo, o metanol apresenta toxicidade principalmente em decorrência de seus metabólitos formados (BARCELOUX et al., 2002).

2.2. Biodiesel

O biodiesel foi inserido como biocombustível no Brasil em 13 de janeiro de 2005, por meio da Lei nº 11.097 (ANP, 2012). No mesmo ano, o governo lançou o “Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel” (PNPB), visando integrar o desenvolvimento no âmbito energético ao social, com a inclusão dos produtores rurais à cadeia produtiva do biodiesel, considerando a aptidão de diversas oleaginosas regionais para produção de biodiesel (SOUZA; TARGINO; MOREIRA, 2011).

Entretanto, o desenvolvimento e a consolidação do biodiesel na matriz energética e seus benefícios para a sociedade ainda apresentam desafios a serem superados. O maior incentivo das políticas governamentais leva em consideração três vertentes principais (LIN et al., 2010):

- a) Reforço no suprimento energético;
- b) Meio ambiente, uma vez que a biomassa geradora do óleo *in natura* é capaz de capturar da atmosfera o dióxido de carbono (CO₂);
- c) Produção de oleaginosas com potencial para aumentar a renda agrícola líquida.

Existem diferentes matérias-primas que podem ser utilizadas para produzir o biodiesel (KNOTHE et al., 2006), como a soja, milho, canola, girassol, sementes de palma, gorduras

animais e óleo reciclado (CHENG; TIMILSINA, 2011). Na Tabela 2.1. são apresentados o teor médio de óleo em algumas espécies oleaginosas.

Tabela 2.1 - Teor médio de óleo (%) em sementes de amendoim, caroço de algodão, dendê, girassol, mamona, pinhão-manso e soja.

Oleaginosa	Teor de óleo (%)
Amendoim	40-50
Caroço de algodão	20
Dendê	20-30
Girassol	35-40
Mamona	45-55
Pinhão-manso	30-40
Soja	18-25

Fonte: Beltrão e Oliveira (2008); Prado et al. (2006).

Atualmente, 58 plantas de produção de biodiesel são autorizadas para operação no Brasil, sendo a soja a principal matéria-prima utilizada para a produção de biodiesel e responsável por cerca de 70% das oleaginosas utilizadas para a produção. A segunda mais utilizada é a gordura bovina, depois o óleo de algodão e em menor escala, óleo de fritura, gordura de porco e de frango e outros materiais gordurosos, conforme a Figura 2.1 (ANP, 2014).

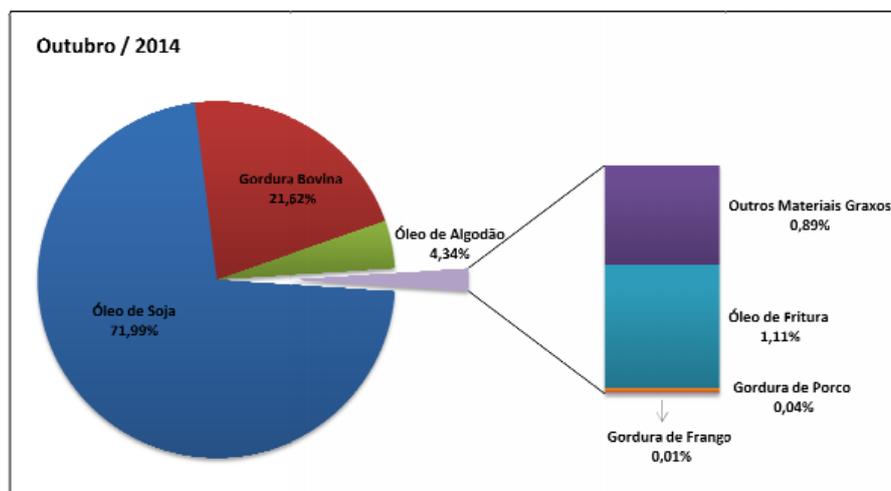


Figura 2.1 - Perfil nacional das matérias primas utilizadas para a produção de biodiesel (Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP, 2014)

Apesar da soja ser destinada à alimentação e não ter o maior teor de óleo comparado aos outros grãos potenciais para a produção de biodiesel, no Brasil, seu processamento industrial é conhecido e estabelecido, isto é, a cadeia produtiva é consolidada, assim como sua viabilidade industrial, diferentemente do pinhão-manso que iniciou sua produção em algumas indústrias e depois declinou o processamento devido às complicações na plantação, descasque, prensagem e presença dos ésteres de forbol.

2.2.1. Processo de produção do biodiesel: Obtenção da glicerina

O óleo é composto por moléculas de triacilgliceróis, formadas por três radicais de ácidos graxos de cadeias longas ligadas a um esqueleto de glicerol (ZHANG et al., 2003). O processo mais utilizado para a produção do biodiesel é a reação de transesterificação do óleo (BARNWAL; SHARMA, 2005; DONKIN, 2008), com um álcool na presença de um catalisador (KNOTHE et al., 2006).

Na produção do biodiesel, três cadeias de ácidos graxos são libertas do esqueleto de glicerol e ligadas com o metanol, formando os ésteres metílicos de ácidos graxos (biodiesel) e como subproduto, a glicerina (ZHANG et al., 2003; MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009). A glicerina é liberada em aproximadamente 10 % em relação à massa do óleo (CIRIMINNA et al., 2014). A Figura 2.2. ilustra a reação de transesterificação sob catálise básica.

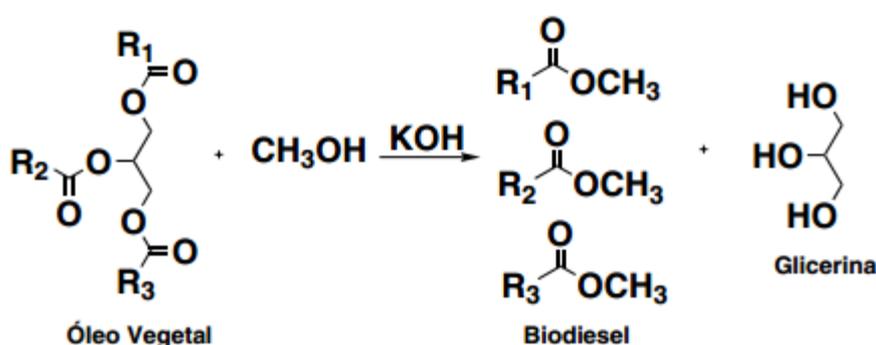


Figura 2.2 - Produção de biodiesel a partir da transesterificação de óleos vegetais (MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009)

Embora o metanol apresente alta toxicidade, seja sintetizado a partir de fontes não renováveis e o país não tenha autossuficiência em sua produção, a sua utilização na produção do biodiesel proporciona (BRANDÃO et al., 2006):

- Menor tempo de reação;
- Separação espontânea das fases de glicerina e biodiesel;
- Alta conversão dos triacilgliceróis em biodiesel;
- Utilização em menor excesso no processo.

Normalmente um excesso de álcool é utilizado para aumentar o rendimento do biodiesel e simultaneamente separar a glicerina (SCHUCHARDTA; SERCHELIA; VARGAS, 1998). Em decorrência do caráter polar da glicerina e do metanol, o excesso que não reagiu no processo migra e permanece na glicerina (DASARI, 2007).

2.3. Glicerina vs Glicerol

O termo glicerol se aplica somente ao componente puro, 1,2,3-propanotriol (MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009), de aspecto físico um líquido bastante viscoso, de coloração transparente, inodoro e com sabor adocicado (BEATRIZ; ARAÚJO; LIMA, 2011), sendo classificado, nutricionalmente, como um carboidrato (DASARI, 2007). Segundo Oliveira et al. (2011) a glicerina produzida na indústria de biodiesel pode ser classificada em função de sua composição química, pois, além de quantidades variadas de glicerol contém outras substâncias:

- Glicerina bruta: Apresenta pH na faixa de 12; 40 a 70% de glicerol; altos níveis de catalisadores, álcool, água, ácidos graxos e sabões. É obtida após a separação do biodiesel;
- Glicerina bruta “loira”: É a glicerina bruta tratada com solução ácida, retirada dos ácidos graxos e sabões, resultando em 75 a 90% de glicerol, água, sais, metanol e pH entre 5 e 6;
- Glicerina grau farmacêutico (grau USP): É a glicerina “loira” destilada duas vezes a vácuo e tratada com adsorventes, concentrando níveis de glicerol superiores a 99%;
- Glicerina grau alimentício (*food grade*): Glicerina sem qualquer resíduo de metanol ou outros contaminantes.

A composição da glicerina bruta varia conforme a escolha da matéria prima empregada e do processo de produção (THOMPSON; HE, 2006). Quando pura (mínimo 99%), a glicerina

pode ser comercializada nas áreas farmacêutica, cosmetológica (SINGHABHANDHU; TEZUCA, 2010), alimentícia e indústrias de fumo (MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009).

Considerando que os processos de purificação aumentam os custos para a indústria, uma vez que estão envolvidas etapas de filtração, destilação à vácuo, descoloração e troca iônica, normalmente tornam-se inviáveis economicamente para os pequenos e médios produtores de biodiesel (DASARI, 2007; BARROS, 2011).

Em algumas pequenas e médias indústrias, é realizada uma purificação parcial para retirar ácidos graxos, metanol e maior parte da água, a fim de aumentar seu valor agregado e depois vende-la para a refinação em empresas específicas em escala industrial (HAAS et al., 2006).

Ante a necessidade de fontes renováveis de energia e a crescente demanda e produção de biodiesel, a geração de glicerina tende a crescer (SILVA; MACK; CONTRIERO, 2009). O aumento de produção torna a capacidade de absorção do mercado nacional reduzida, uma vez que a glicerina bruta possui impurezas com potencial para limitar sua utilização em substituição à glicerina comercial (LEONEL et al., 2012). Devido à presença destes compostos residuais, a glicerina bruta possui baixo valor comercial. (THOMPSON; HE, 2006).

Visando a sustentabilidade e a viabilidade econômica do setor, é de vital importância que os subprodutos gerados sejam aproveitados. Novas aplicações para a glicerina bruta têm sido estudadas, como por exemplo, a produção de hidrogênio e álcoois, uso como aditivos para combustíveis automotivos e aplicação na alimentação animal, a qual se destacou (LEONETI; ARAGÃO-LEONETI; BORGES de OLIVEIRA, 2012).

2.3.1. Aplicação na alimentação de ruminantes

A inclusão de subprodutos como ingrediente alimentar na dieta de ruminantes é atrativa sob o ponto de vista econômico, uma vez que os gastos com alimentação estão compreendidos em torno de 30 a 70% (CÂNDIDO et al., 2008); e os subprodutos da cadeia do biodiesel, como farelos e tortas, são bastante interessantes (ABDALLA et al., 2008). Entre os cereais comumente utilizados na alimentação animal, o milho tem sofrido variações de preço principalmente nos Estados Unidos, pois além da alimentação, ele é utilizado na produção de etanol (USDA, 2014).

Considerando que a glicerina poder substituir, parcialmente os ingredientes à base de amido (SANTOS, 2013), ela se torna uma opção de menor custo comparado às fontes

usualmente utilizadas (MACH; BACH; DEVANT, 2009). Além de ser interessante economicamente, a glicerina apresenta importância ambiental por sua tendência a diminuir a produção de metano proveniente da fermentação ruminal (SANTOS, 2013), uma vez que a “fração” glicerol tende à produção de propionato (KREHBIEL, 2008).

2.4. Metabolismo do glicerol em ruminantes

Os tecidos e o estado nutricional do animal são variáveis que podem orientar o destino do glicerol no organismo, sendo que, ele tanto pode entrar no processo de gliconeogênese e produzir glicose, quanto produzir energia na via glicolítica ou então, ser utilizado na lipogênese (MENTEN; MIYADA; BERENCHTEIN, 2009). Os órgãos fundamentais que atuam em seu metabolismo são os rins e o fígado (LENG, 1970).

Quando o glicerol é ingerido pelos ruminantes, aproximadamente 13% desaparecem por passagem com a digesta, 43% são absorvidos pelo epitélio ruminal e 44% sofre fermentação. Estudos *in vitro* apontam que entre as principais bactérias que atuam na fermentação do glicerol estão as espécies *Selenomonas*, produzindo lactato, succinato, acetato e propionato (KREHBIEL, 2008). A maior parte do propionato produzido segue para a gliconeogênese para a síntese de glicose (YOST et al., 1977).

Schröder e Südekum (1999) investigaram o efeito de glicerol e glicerina de média e baixa pureza na dieta de ruminantes e observaram que houve aumento na produção de propionato e diminuição de acetato para estas dietas comparadas ao controle. Normalmente, a maior produção de propionato e diminuição de acetato pode reduzir a produção de metano (GARCIA-LOPEZ et al., 1996).

Já a fração de glicerol que foi absorvida pelo epitélio ruminal segue para o fígado e com a ação da enzima glicerol quinase, ele é convertido em glicerol 3-fosfato (KREHBIEL, 2008). A partir de então, o glicerol-3-fosfato pode se converter a dois intermediários na formação de glicose, a diidroxiacetona fosfato e gliceraldeído-6-fosfato (PATSOURIS et al., 2004).

Quando há excesso de energia no organismo, os ruminantes armazenam no tecido adiposo para utilização posterior, a partir de sua mobilização, num processo conhecido como hidrólise (PALMQUIST; MATTOS, 2011). Neste processo, o glicerol é liberado na corrente sanguínea (VAN SOEST, 1994) e pode atuar como precursor gliconeogênico (CHUNG, 2007). Assim, a produção máxima de glicose a partir do glicerol depende da taxa lipólise do tecido

adiposo, que ocorre em função da taxa de utilização dos ácidos graxos livres que foram liberados da gordura (LENG, 1970).

2.5. Glicerina bruta na alimentação

O glicerol é reconhecido pelo Código de Regulações Federais dos Estados Unidos como seguro para a alimentação animal quando utilizado de acordo com critérios de as boas práticas de fabricação ou práticas alimentares (FDA, 2006). No Brasil, sob a Resolução 386 de 1999 o glicerol com INS 422 está incluído entre os aditivos alimentares permitidos (ANVISA, 1999).

Leão et al. (2012) incluíram a glicerina bruta em dietas de ruminantes e observaram que em até 24% da matéria seca total a glicerina bruta (0,01% de metanol) pode ser utilizada sem apresentar alterações no desempenho ou toxidez. Outros estudos quanto ao emprego de glicerina sob sua forma bruta na nutrição animal vêm sendo realizados, como por exemplo na alimentação de frangos (CERRATE et al., 2006; LAMMERS et al., 2008), suínos (ZIJLSTRA et al., 2009) e cordeiros (GUNN et al., 2010; SANTOS, 2013; LAGE et al., 2014).

Apesar do atendimento aos critérios que caracterizam a glicerina pura (glicerol) como “grau alimentício” indicarem a segurança de sua utilização, a glicerina bruta, entretanto, não segue esses parâmetros e pode conter contaminantes como o metanol, que deve estar presente em níveis inferiores a 0,5% (DONKIN, 2008).

Segundo Leão et al., (2012) o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabeleceu a utilização em teor máximo de inclusão de glicerina bruta em até 12% da matéria-seca nas dietas de animais de produção, considerando a ausência de estudos quanto a níveis seguros metanol.

Em documento emitido pelo Food and Drugs Administration (FDA) consta que o metanol em concentrações superiores a 0,015% pode ser considerado inseguro para uso na alimentação animal (FDA, 2014). Em contrapartida, o Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA, 2007) sugere o nível de segurança de até 0,5% de metanol como matéria-prima para a alimentação animal, considerando a substituição de no máximo 10% de glicerina bruta em dieta padronizada com 88% de matéria seca.

O Office of the Texas State Chemist (OTSC) emitiu em 2008 um memorando a cerca da concentração de metanol na dieta de animais não ruminantes, o qual não deve ser superior a 1% na glicerina bruta considerando a inclusão de até 10%. Já para os ruminantes, apesar de o metanol ser produzido naturalmente durante o processo digestivo e destes animais possuem

capacidade de tolerar níveis maiores do que os recomendados pelo FDA, a concentração de metanol também não deve exceder 1% na glicerina bruta.

Por outro lado, a concentração de metanol na glicerina bruta proveniente das indústrias não é padronizada. Em estudos com glicerina bruta na alimentação animal a concentração de metanol variou em níveis como 0,009% (GUNN et al., 2010); <0,01% (PARSONS; SHELOR; DROUILLARD, 2009); 0,33% (FRANÇOZO et al., 2013); 1,79, 2,23 e 3,10% (JUNK; BATAL, 2011), 5,73% (MENESES et al., 2014); 8,7% na glicerina bruta (LAGE et al., 2014), sendo ainda que em alguns estudos o metanol não foi determinado (GUERRA et al., 2011; PELLEGRIN et al., 2013). Assim, a quantificação de metanol na glicerina bruta utilizadas em dietas de animais nem sempre é analisada (KERR, 2007; GOTT, 2009).

De acordo com Dasari (2007), em monogástricos, o metanol é metabolizado à ácido fórmico e formaldeído no fígado pela ação da enzima desidrogenase alcoólica causando a destruição do nervo óptico e em consequência, a cegueira nos animais. Segundo Kerr et al. (2007), dentre outros efeitos tóxicos, estão a acidose metabólica grave, vômito, depressão no sistema nervoso central e doença de Parkinson.

Perante as informações apresentadas, é possível observar que existe uma divergência entre os níveis de metanol aceitáveis tanto para animais ruminantes, quanto para não ruminantes, sendo de interesse a padronização dos limites. No item seguinte (2.6.) são apresentados estudos sobre os possíveis destinos do metanol no organismo de ruminantes.

2.6. Metanol no organismo de ruminantes

Em ruminantes, o metanol é produzido naturalmente como resultado da hidrólise de substâncias pécticas no rúmen (POL; DEMEYER, 1988). Em um estudo *in vitro*, Vantcheva, Prodhan e Hemken (1970) observaram que certos microrganismos podem produzir metanol a partir da pectina, e essa produção é favorecida com aumento de pH e com aumento da temperatura do meio, comparando a temperatura ambiente e a temperatura do rúmen, 39 °C.

Pol e Demeyer (1987) realizaram experimento *in vitro* com a adição de metanol em ovinos adaptados à alimentação com pectina. Os autores constataram que o metanol foi convertido a metano, não havendo diferenças nas proporções molares de ácidos graxos de cadeia curta. Czerkawski e Breckenrise (1971) estudaram a infusão de metanol *in vitro* e também observaram aumento da produção de metano, sendo que existiu a conversão para formato e relação direta entre essa oxidação e a produção de metano.

A infusão ruminal de metanol em níveis crescentes, não apresentou diferenças na concentração total de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), contudo, à medida que maiores concentrações de metanol foram adicionadas, houve uma tendência à redução na proporção molar do propionato e aumento para o butirato (WINSKO et al., 2011).

De acordo com alguns pesquisadores, a bactéria metanogênica *Methanosarcina barkeri*, pode crescer em meio contendo metanol, bem como metabolizá-lo a metano como produto final (SMITH; MAH, 1978; NEUMANN; WEIGAND; MOST, 1999). A *Eubacterium limosum* encontrada no rúmen de ovelhas é capaz de utilizar metanol como fonte de energia e produzir acetato e butirato (GENTHNER; DAVIS; BRYANT, 1981).

No caso dos ruminantes, apesar de alguns microrganismos serem capazes de metabolizar o metanol produzido pela degradação da pectina, segundo Styler (1976), se houver excesso de pectina na ração é possível que ocorra um efeito tóxico devido à produção do metanol. No entanto, o efeito do excesso de metanol para os ruminantes não é totalmente conhecido (WINSKO et al., 2011).

Em 1982, foi detectada a presença de metanol no rúmen de bovinos encontrados mortos próximos a uma estação de bombeamento de óleo. Houve suspeita de que os animais quebraram a cerca que isolava o local, colidindo com um tambor de 200 litros de metanol. Os animais apresentaram lesões no trato gastrintestinal, sangue no fluido do cólon e íleo, alteração na cor, coagulação sanguínea e antes da morte, com indício de vômito antemortem (ROUSSEAU; AUDETE; ELLEFSON, 1982). Assim, níveis seguros de metanol na glicerina bruta como alimento para os ruminantes precisam ser estabelecidos (HAAG, 2007).

2.7. Técnica de cromatografia gasosa (CG)

A cromatografia é uma técnica analítica de fácil separação, identificação e quantificação de compostos, podendo ser acoplada a outros métodos instrumentais de análise. Basicamente, a cromatografia consiste num método físico-químico em que ocorre a separação dos analitos de uma mistura por meio da distribuição desses analitos em duas fases, estacionária e móvel. Cada analito interage com a fase estacionária em tempos característicos, resultando em sua separação (COLLINS, BRAGA; BONATO, 2009).

Existem diversas técnicas cromatográficas, as quais dependem das características da amostra, mas as mais utilizadas atualmente são a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

(HPLC) utilizada para análise de compostos solúveis na fase móvel e Cromatografia Gasosa (GC) para compostos voláteis e termicamente estáveis (COLLINS, BRAGA; BONATO, 2009).

A quantificação de metanol em amostras de biodiesel é realizada usualmente empregando o método da Comunidade Europeia EN 14110 por meio da técnica de cromatografia gasosa (EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION, 2003). Na cromatografia gasosa, a amostra é injetada em uma coluna cromatográfica e, então, vaporizada devido às temperaturas do injetor e da coluna. Na coluna, os analitos presentes são separados por interação diferencial com a fase estacionária e com o auxílio de detector presente na saída da coluna, os analitos podem ser detectados e quantificados. Esta técnica possui alto poder de resolução e rapidez na análise, porém muitas vezes é necessário o preparo da amostra, que pode ser longo e complexo (BONATO, 2009).

Diversos trabalhos apresentam a quantificação de metanol em glicerina bruta por cromatografia gasosa (GOTT, 2009; HANSEN et al., 2009; GUNN et al., 2010). Em outros, os pesquisadores encontraram dificuldade estabelecer a metodologia com resultados satisfatórios na análise de metanol em glicerina bruta utilizando a mesma técnica, sendo necessário adequar o método (SILVA et al., 2011; SEQUINEL, 2013).

A confiabilidade dos dados obtidos a partir de um método de análise pode ser obtida na validação analítica (SKOOG; HOLER, 2006). A validação consiste basicamente, em uma série de testes a fim de averiguar os pressupostos em que o método se fundamenta, a fim de confirmar se o método é apropriado para uma finalidade específica. Entre os parâmetros avaliados em uma validação estão a linearidade, limite de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão e recuperação (THOMPSON; ELLISON, WOOD, 2002).

A linearidade de um método indica o quão proporcional é o resultado obtido em relação à quantidade do analito presente na amostra dentro de uma faixa específica, sendo linear quando $r^2 \geq 0,99$. Já o LD se refere à quantidade mínima em que o analito pode ser detectado em uma análise, inequivocadamente, enquanto que o LQ é a menor concentração em que este pode ser quantificado, considerando a exatidão e a precisão aceitáveis (ANVISA, 2003).

A exatidão é o parâmetro que indica o quanto o valor medido se aproxima da concentração verdadeira, sendo associada com a recuperação do analito pelo método utilizado (FAO, 1997), enquanto que, a precisão mede o quanto os resultados de uma amostra analisada repetidas vezes (num curto intervalo de tempo) se aproximam entre si (ANVISA, 2003).

O efeito matriz prediz a influência de outros compostos presentes na amostra, atuando de modo independente do analito (International Organization for Standardization - ISO 15194:2009). Entre algumas das consequências do efeito matriz sobre a análise estão a

imprecisão dos resultados, aumento da linha de base e aumento ou decréscimo de sensibilidade (GHOSH et al., 2010).

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.; BUENO, I. C.; TSAI, S. M.; FIGUEIRA, A. V. *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, n. 5, p. 953-964, 2012.

AGENCE FRANÇAISE DE SÉCURITÉ SANITAIRE DES ALIMENTS, DE L'ENVIRONNEMENT ET DU TRAVAIL – AFSSA. **Avis de l'Agence Française de Sécurité des aliments sur l'innocuité de la glycérine utilisée en tant que matière première en alimentation animale pour toutes espèces**. Maisons-Alfort, 2007. 4 p. (Saisine n° 2007-SA-0013).

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS – ANP. **Biocombustíveis**. Brasília, DF: Superintendência de Refino e Processamento de Gás Natural, 2012. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=33972&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1300211814116>>. Acesso em: 08 set. 2012.

_____. Resolução ANP n. 07, de 19 de março de 2008. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 mar. 2008.

_____. **Boletim mensal do biodiesel**: novembro de 2014. Brasília, DF: Superintendência de Refino e Processamento de Gás Natural – SRP, 2014. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=73227&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1420469427981>>. Acesso em: 05 jan. 2015.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Resolução n° 386, de 05 de agosto de 1999. Aprova o "Regulamento Técnico sobre aditivos utilizados segundo as boas práticas de fabricação e suas funções", contendo os Procedimentos para Consulta da Tabela e a Tabela de Aditivos Utilizados Segundo as Boas Práticas de Fabricação. **Diário Oficial da União**. Poder Executivo, Brasília, DF, 09 ago. 1999. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/0556e3004745787485bdd53fbc4c6735/RESO_LUCAO_386_1999.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 02. set. 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Resolução RE n° 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"; fica revogada a Resolução RE n° 475, de 19 de março de 2002. **Diário Oficial da União; Poder Executivo**, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

BARCELOUX, D. G.; BOND, R.; KRENZELOK, E.P.; COOPER, H. VALE. J. A. Methanol Guidelines - AACT/EAPCCT American Academy of Clinical Toxicology Practice Guidelines

on the treatment of methanol poisoning. **Journal of Toxicology. Clinical Toxicology**, New York, v. 40, n. 4, p. 415-446, 2002.

BARNWAL, B. K.; SHARMA, M. P. Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 9, p. 363-378, 2005.

BARROS, T. D. **Glicerol**. Brasília, DF: Agência Embrapa de Informação Tecnológica, 2011. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/CONT000fj1mqgo602wyiv802hvm3j818huet.html#>>. Acesso em: 19. ago. 2013.

BEATRIZ, A.; ARAUJO, Y. J. K.; LIMA, D. P. Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 306-319, 2011.

BELTRÃO, N. E. M.; OLIVEIRA, M.I.P. Oleaginosas e seus óleos: vantagens e desvantagens para produção de biodiesel. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2008. (Documentos, 201). Disponível em <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPA-2009-09/22146/1/DOC201.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2015.

BERNDT, A. Impacto da pecuária de corte brasileira sobre os gases do efeito estufa. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 7.; SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 3., 2010, Sebastião de Campos, Viçosa. p. 121-140.

BONATO, P. S. Cromatografia gasosa. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2009. p. 203-272.

BRANDÃO, K. S. R.; SILVA, F. C.; NASCIMENTO, U. M.; SOUZA, M. C.; MOUZINHO, A. M. C.; SOUZA, A. G.; CONCEIÇÃO, M. M.; MOURA, K. R. M. **Produção de biodiesel por transesterificação do óleo de soja com misturas de metanol-etanol**. Brasília, DF: Agência Embrapa de Informação Tecnológica, 2006. p. 141-146, Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Transesterifica%25E7%25E3o+1_000g76oadw902wx5ok0wtedt36958h0l.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2013.

BRACMORT, K.; RAMSEUR, J. L.; McCARTHY, J. E.; FOLGER, P.; MARPLES, D. J. **Methane capture**: options for greenhouse gas emission reduction. Washington, DC: Congressional Research Service, 2009. (CRS Report for Congress, R-40813).

CÂNDIDO, M. J. D.; BOMFIM, M. A. D.; SEVERINO, L. S.; OLIVEIRA, S. Z. R. Utilização de co-produtos da mamona na alimentação animal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 3., 2008, Salvador. **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2008. p. 1-21.

CERRATE, S.; YAN, F.; WANG, Z.; COTO, C.; SACAKLI, P.; WASLDROUP, P. W. Evaluation of glycerine from biodiesel production as a feed ingredient for broilers. **International Journal of Poultry Science**, Faisalabad, v. 5, n. 11, p. 1001-1007, 2006.

CIRIMINNA, R.; DELLA PINA, C.; ROSSI, M.; PAGLIARO, M. Understanding the glycerol Market. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 116, p. 1432-1439, 2014.

CHENG, J. J.; TIMILSINA, G. R. Status and barriers of advanced biofuel technologies: A review. **Renewable Energy**, Amsterdam, v. 36, n. 12, p. 3541–3549, 2011.

CHUNG, Y. H.; RICO, D. E.; MARTINEZ, C. M.; CASSIDY, T. W.; NOIROT, V.; AMES, A.; VARGA, G. A. Effects of feeding dry glycerin to early postpartum holstein dairy cows on lactational performance and metabolic profiles. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, p. 5682–5691, 2007.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Food additives details**. Glycerol (422). Rome: FAO, 2014. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.net/gsfaonline/additives/details.html?id=62&l>>. Acesso em: 02 set. 2013.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Ed. Unicamp, 2006.

CZERKAWSKI, J. W.; BRECKENRIDGE, G. Fermentation of various glycolytic intermediates and other compounds by rumen micro-organisms, with particular reference to methane production. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 27, p. 131-146, 1972.

DASARI, M. Crude glycerol potential described. **Feedstuffs**, Minneapolis, v. 79, n. 43, 3 p. 2007. Disponível em: <http://www.feedenergy.com/upl/downloads/white-papers/crude-glycerol-potential-described-badec0f3.pdf>.

DAVIS, S. C. **Transportation energy data book**. Edition 20. Oak Ridge: Oak Ridge National Laboratory, 2000.

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

EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION. **EN 14110**: Fat and oil derivatives – Fat acid methyl esters (FAME). Determination of methanol content. Brussels, 2003. 3 p.

FAO. **Validation of analytical methods for food control**. Report of a joint FAO/ IAEA Expert Consultation. Rome, 1997. (Food and Nutrition Paper, 68).

FAO. **Agriculture's greenhouse gas emissions on the rise**. Rome, 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/news/story/en/item/216137/icode/>>. Acesso em: 06 jan. 2015.

FDA. **Code of Federal Regulations**. Title 21, v.6, n.21, CFR582.1320, 2006. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=582.1320>>. Acesso em: 16 jan. 2015.

FDA. **Code of Federal Regulations**. Title 21, v.6, CFR573.640, 2014. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=573.640>>. Acesso em: 16 jan. 2015.

FORSTER, P.; RAMASWAMY, V.; ARTAXO, P.; BERNTSEN, T.; BETTS, R.; FAHEY, D.W.; HAYWOOD, J.; LEAN, J.; LOWE, D.C.; MYHRE, G.; NGANGA, J.; PRINN, R.; RAGA, G.; SCHULZ, M.; VAN DORLAND, R. Changes in atmospheric constituents and in

radiative forcing. In: Solomon, S.; Qin, D.; Manning, M.; Chen, Z.; Marquis, M.; Averyt, K. B.; Tignor, M.; Miller, H. L. (Ed.). **Climate Change 2007: The physical science basis**. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.

FRANÇOZO, M. C.; DO PRADO, I. N.; CECATO, U. Growth performance, carcass characteristics and meat quality of finishing bulls fed crude glycerin-supplemented diets. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 56, n. 2, p. 327-336, 2013.

GARCIA-LOPEZ, P. M.; KUNG JUNIOR, L.; ODOM, J. M. *In vitro* inhibition of microbial methane production by 9,10-anthraquinone. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 74, p. 2276-2284, 1996.

GENTHNER, B. R. S.; DAVIS, C. L.; BRYANT, M. P. Features of rumen and sewage sludge strains of *Eubacterium limosum*, a methanol- and H₂-CO₂-utilizing species. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 42, n. 1, p. 12-19, 1981.

GOTT, P. **Variation in the chemical composition of crude glycerin**. Columbus: Department of Animal Sciences, Ohio State University. 2009. Disponível em: <https://kb.osu.edu/dspace/bitstream/handle/1811/37082/Paige_N_Got?sequence=1>. Acesso em: 08 jan. 2015.

GHOSH, C.; SHINDE, C. P.; CHAKRABORTY, B. S. Ionization polarity as a cause of matrix effects, its removal and estimation in ESI-LC-MS/MS Bio-analysis. **Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques**, Foster City, v. 1, p. 106, 2010. doi:10.4172/2155-9872.1000106.

GUERRA, R. L. H.; MURAKAMI, A. E.; GARCIA, A. F. Q. M.; URGNANI, F. J. MOREIRA, I.; PICOLI, K. P. Glicerina bruta mista na alimentação de frangos de corte (1 a 42 dias). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 12, n. 4, p. 1038-1050, 2011.

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

HAAG, E. Glycerin: Beef industry's new corn? **Angus Journal**, St. Joseph, p. 330-333, oct. 2007.

HAAS, M. J.; MCALOON, A. J.; YEE, W. C.; FOGLIA, T. A. A process model to estimate biodiesel production costs. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, p. 671-678, 2006.

HANSEN, C. F.; HERNANDEZ, A.; MULLAN, B. P.; MOORE, K.; TREZONA-MURRAY, M.; KING, R. H.; PLUSKE, J. R. A chemical analysis of samples of crude glycerol from the production of biodiesel in Australia, and the effects of feeding crude glycerol to growing-finishing pigs on performance, plasma metabolites and meat quality at slaughter. **Animal Production Science**, Melbourne, v. 49, p. 154 – 161, 2009.

HENN, J. D.; ZANIN, A. O agronegócio do beiodiesel: potencialidades e limitações da utilização da glicerina (co-produto) na alimentação de suínos e aves. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA

RURAL, 47., 2009, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 2009.

HONG, J. Uncertainty propagation in life cycle assessment of biodiesel versus diesel: Global warming and non-renewable energy. **Bioresource Technology**, Essex, v. 113, p. 3–7, 2012.

ISO. *In vitro* diagnostic systems-measurement of quantities in samples of biological origin — description of reference materials. Geneva, 2009. (ISO 15194:2009).

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE –IPCC. **Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories**. Geneva, 2006.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE –IPCC. **Climate Change 2007: Synthesis Report**. Summary for Policymakers. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE –IPCC. **Climate Change 2014: Mitigation of climate change**. Assessment Report 5, Final Draft. Geneva, 2014.

JUNK, A.; BATAL, A. B. Nutritional and feeding value of crude glycerin for poultry. 2. Evaluation of feeding crude glycerin to broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 20, n. 4, p. 514-527, 2011.

KERR, B. J.; LOWA, A.; HONEYMAN, M.; PEDRO, L. **Feeding bioenergy coproducts to swine**. Ames: Iowa Pork Industry Center, 2007. Disponível em: <<http://www.thepigsite.com/articles/?Display=2136>>. Acesso em: 07 set. 2012.

KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. **Manual de biodiesel**. São Paulo: Ed. Edgard Blucher, 2006.

KREHBIEL, C. R. Ruminant and physiological metabolism of glycerin. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 86, E-Suppl. 2, p. 392, 2008. Abstract.

LAGE, J. F.; PAULINO, P. V. R.; PEREIRA, L. G. R.; DUARTE, M. S.; VALADARES FILHO, S. C.; OLIVEIRA, A. S.; SOUZA, N. K. P.; LIMA, J. C. M. Carcass characteristics of feedlot lambs fed crude glycerin contaminated with high concentrations of crude fat. **Meat Science**, Barking, v. 96, p. 108–113, 2014.

LAMMERS, P. J.; KERR, B. J.; HONEYMAN, M. S.; STALDER, K.; DOZIER III, W. A.; WEBER, T. E.; KIDD, M. T.; BREGENDAHL, K. Nitrogen-corrected apparent metabolizable energy value of crude glycerol for laying hens. **Poultry Science**, Ithaca, v.87, p. 104–107, 2008.

LEÃO, J. P.; RAMOS, A. T.; MARUO, V. M.; SOUZA, D. P. M.; NEIVA, J. N. M.; RETLE, J.; MORON, S. E. Anatomopatologia de amostras de bovinos alimentados com glicerol. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 7, p. 1253-1256, 2012.

LENG, R. A. Glucose synthesis in ruminants. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, New York, v. 14, p. 209–60, 1970.

LEONEL, E. C.; FARIA, E. H.; PIMENTEL, R. C.; NASSAR, E. J. CIUFFI, K. J.; REIS, M. J.; CALEFI, P. S. Aproveitamento da glicerina proveniente da produção de biodiesel na obtenção de híbrido de caulinita para adsorção de Cr³⁺. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 7, p. 1407-1411, 2012.

LEONETI, A. B.; ARAGAO-LEONETI, V.; BORGES de OLIVEIRA, S. V. W. Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: alternatives for the use of unrefined glycerol. **Renewable Energy**, Amsterdam, v. 45, p. 138–145, 2012.

LIMA, P. M.; OLIVEIRA, P. B.; CAMPECHE, A.; MOREIRA, G. D.; PAIM, T. P.; MCMANUS, C.; ABDALLA, A. L.; DANTAS, A. M.; SOUZA, J. R.; LOUVANDINI, H. Methane emission of Santa Ines sheep fed cottonseed by-products containing different levels of gossypol. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 46, n. 1, p. 285-288, 2014.

LIN, L.; CUNSHAN, Z.; VITTAYAPADUNG, S.; XIANGQIAN, S.; MINGDONG, D. Opportunities and challenges for biodiesel fuel. **Applied Energy**, London, v. 88, p. 1020-1031, 2010.

LIPMAN, T. E.; DELUCCHI, M. A. Emissions of nitrous oxide and methane from conventional and alternative fuel motor vehicles. **Climatic Change**, Dordrecht, v. 53, p. 477–516, 2002.

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

MATA, T.; MARTINS, A. A.; SIKDAR, S. K.; COSTA, C. A. V. Sustainability considerations of biodiesel based on supply chain analysis. **Clean Technologies Environmental Policy**, v. 13, p. 655-671, 2011.

MEALE, S. J.; MCALLISTER, T. A.; BEAUCHEMIN, K. A.; HARSTAD, O. M.; CHAVES, A. V. Strategies to reduce greenhouse gases from ruminant livestock. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section A — Animal Science**, Oxon, v. 62, n. 4, p. 199-211, 2012.

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

MENESES, M. A.; SILVA, F. F.; SCHIO, A. R.; SILVA, R. R.; SOUZA, D. D.; PORTO JUNIOR, A. F. Feeding behavior of dairy cows in feedlot and fed on crude glycerin levels in the diet. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 36, n. 2, p. 171-176, 2014.

MOREIRA, G. D.; LIMA, P. M.; BORGES, B. O.; PRIMAVESI, O.; LONGO, C.; MCMANUS, C.; ABDALLA, A. L.; LOUVANDINI, H. Tropical tanniferous legumes used as an option to mitigate sheep enteric methane emission. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 45, n. 3, p. 879-882, 2013.

MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V. L. C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina da produção de biodiesel. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 639-648, 2009.

NEUMANN, L. WEIGAND, E.; MOST, E. Effect of methanol on methanogenesis and fermentation in the rumen simulation technique (RUSITEC). **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 82, p. 142–149, 1999.

OFFICE OF THE TEXAS STATE CHEMIST. **Definition of crude glycerin from biodiesel production**. College Station, 2008. (Feed Industry Memorandum, 5-22).

OLIVEIRA, A. S.; OLIVEIRA, M. R. C.; SOUZA, J. G. de; GABRIEL, J. A.; ALESSI, K. C.; SOUZA, M. C. de; SCHWAMBACH, T. I. **Perspectiva da utilização dos co-produtos do biodiesel na produção de bovinos de corte**. Sinop, MT: Amazônia Phos, 2011.

PALMQUIST, D. L.; MATTOS, W. R. S. Metabolismo de lipídeos. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2011.

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.

PATSOURIS, D.; MANDARD, S.; VOSHOL, P. J.; ESCHER, P.; TAN, N. S.; HAVEKES, L. M.; KOENING, W.; MÄRZ, W.; TAFURI, S.; WAHLI, W.; MÜLLER, M.; KERSTEN, S. PPARgoverns glycerol metabolism. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 114, n. 1, p. 94-103. 2004.

PELLEGRIN, A. C. R. S.; PIRES, C. C.; MÜLLER, L.; CARVALHO, S.; LOPES, J. F. Glicerina bruta no suplemento e seus efeitos nas características da carcaça e nos componentes do peso vivo de cordeiros lactentes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 65, n. 5, p. 1509-1518, 2013.

POL, A.; DEMEYER, D. I. Fermentation of methanol in the sheep rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 54, n. 3, p. 832-834, 1988.

PRADO, E. A.; ZAN, R. A.; GOLFETTO, D. C.; SCHWADE, V. D. Biodiesel: um tema para uma aprendizagem efetiva. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENSINO DE ENGENHARIA – COBENGE, 34., 2006, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: UFRGS, 2006.

ROUSSEAU, C. R.; AUDETTE, R. J.; ELLEFSON, G. Methyl alcohol toxicity in cattle. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 23, p. 252, 1982.

SALLAM, S.; ABDELGALEIL, S. A.; BUENO, I. C.; NASSER, M. E.; ARAUJO, R. C.; ABDALLA, A. L. Effect of some essential oils on in vitro methane emission. **Archives of Animal Nutrition**, Abingdon, v. 65, n. 3, p. 203-214, 2011

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

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.

SCHUCHARDTA, U. L. F.; SERCHELIA, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of Vegetable Oils: a Review. **Journal of the Brazilian of Chemical Society**, São Paulo, v. 9, n. 1, p.199-210, 1998.

SEQUINEL, R. **Caracterização físico-química da glicerina proveniente de usinas de biodiesel e determinação de metanol residual por CG com amostragem por Headspace estático**. 2013. 104 p. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2013.

SILVA, P. N. da; BIZZO, H. R.; ANTONIASSI, R.; POMINI, A. M. Determinação de metanol em glicerina por headspace estático/CG/EM. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 34, 2011, Florianópolis. **Química para um mundo melhor**. São Paulo: SBQ, 2011. 1 CD-ROM.

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

SKOOG, W.; HOLLER, C. Amostragem, padronização e calibração. In: SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica**. São Paulo: Thomson Learning, 2006.

SILVA; G.P.; MACK, M. CONTIERO, J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 27 p. 30–39, 2009.

SINGHABHANDHU, A.; TEZUKA, T. A perspective on incorporation of glycerin purification process in biodiesel plants using waste cooking oil feedstock. **Energy**, Amsterdam, v. 35, n. 6, p. 2493-2504, 2010.

SMITH, M. R.; MAH, R. A. Growth and methanogenesis by *Methanosarcina* Strain 227 on acetate and methanol. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 36, n. 6, p. 870–879, 1978.

SOUZA, A. P. L.; TARGINO, I.; MOREIRA, E. Impactos do programa nacional de produção e uso de biodiesel sobre o emprego e a agricultura familiar do nordeste do Brasil. **Geonordeste**, v. 22, n. 2, p. 17-45, 2011.

STYLER, L. L. Influence of acidosis on rumen function. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 43, p. 910-929, 1976.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for singlelaboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 74, n. 5, p. 835-885, 2002.

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, 2006.1

USDA. **Corn**. Background. Washington, DC, 2014. Disponível em: <<http://www.ers.usda.gov/topics/crops/corn/background.aspx>>. Acesso em: 16 dez. 2014.

USEPA. **Overview of greenhouse gases.** Carbon dioxide emissions. Washington, DC, 2014a. Disponível em: <<http://www.epa.gov/climatechange/ghgemissions/gases/co2.html>>. Acesso em: 05 jan. 2014.

USEPA. **Overview of greenhouse gases.** Methane emissions. Washington, DC, 2014b. Disponível em: <<http://epa.gov/climatechange/ghgemissions/gases/ch4.html>>. Acesso em: 27 ago. 2013.

USEPA. **Climate change:** basic information. Washington, DC, 2009. Disponível em: <<http://www.epa.gov/climatechange/basics/>>. Acesso em: 17 jan. 2014.

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

VANTCHEVA, Z. M.; PRODHAN, K.; HEMKEN, R. W. Rumens methanol *in vivo and in vitro*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 53, n. 10, p. 1511-1514, 1970.

WINSKO, K. N.; KENNEY, N. M.; DITTMAR, R. O.; COVERDALE III, J. A.; SAWYER, J. E.; WICKERSHAM, T. A. Effect of methanol infusion on intake and digestion of a grain-based diet by beef cattle. In: THE PLAINS NUTRITION COUNCIL, SPRING CONFERENCE, 2011, Amarillo, Texas. Amarillo, TX: The Plains Nutrition Council, 2011.

YANG, F.; HANNA, M. A.; SUN, R. Value-added uses for crude glycerol—a byproduct of biodiesel production. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 5, n. 1, p. 13-23, 2012.

YOST, I. M.; YOUNG, J. W.; SCHMIDT, S. P.; MCGILIARD, A. D. Gluconeogenesis in ruminants: propionic acid production from a high-grain diet fed to cattle. **Journal of Nutrition**, Springfield, v. 107, n. 1, p. 2036-2043, 1977.

ZHANG, Y.; DUBÉ, M. A.; McLEAN, D. D.; KATES, M. Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment. **Bioresource Technology**, Essex, v. 89, p. 1-16, 2003.

ZIJLSTRA, R. T.; MENJIVAR, K.; LAWRENCE, E.; BELTRANENA, E. The effect of feeding crude glycerol on growth performance and nutrient digestibility in weaned pigs. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 89, n. 1, p. 85-89, 2009.

ZOTTI, C. A.; PAULINO, V. T. Metano na produção animal: emissão e minimização de seu impacto. **Pubvet**, Londrina, v. 3, n. 28, Art. 641, 2009.

3 Otimização de metodologia por GC – FID para análise de metanol em glicerina bruta

Resumo

A glicerina bruta proveniente da produção do biodiesel é um ingrediente economicamente atrativo quando incluído na dieta de ruminantes, podendo substituir, parcialmente, substâncias a base de amido. No entanto, ela apresenta resíduos de metanol e pode ser nocivo ao animal quando ingerido. A metodologia EN 14 110 da União Europeia para determinar metanol em biodiesel por Cromatografia Gasosa (GC) foi otimizada para determinar metanol em glicerina bruta. A extração foi realizada por meio da técnica de “*headspace*”, depois da homogeneização da amostra por sonicação. Foi utilizado um cromatógrafo gasoso Shimadzu modelo GC 2014 equipado com um detector de ionização de chamas (FID) e uma coluna Stabilwax column 15 m x 0,53 mm x 1 mm. O método demonstrou-se linear $r^2 \geq 0,99$. O limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram 0,015 e 0,031%, respectivamente. Não foi observado efeito matriz (4,36%). A precisão foi entre 2,09% (0,05) e 2,39% (0,5) nestes dois níveis testados. As concentrações de 0,05%, 0,2% e 0,5% (m/m) apresentaram recuperações de 88%, 95% e 91%, respectivamente. O método proposto foi adequado para a detecção e quantificação de metanol em amostras de glicerina bruta a partir da produção do biodiesel e, conformidade para detectar o limite máximo de metanol na glicerina bruta para alimentação recomendado pelo Food and Drugs Administration (FDA), de 0,015%.

Palavras-chave: Biodiesel. Metanol. Nutrição animal. Subproduto. Validação.

Abstract

The crude glycerin from the biodiesel production is an economically attractive ingredient when included in the diet of ruminants. It can partly replace starch-based substances. However, it contains residual methanol that can be harmful to animals when ingested. The methodology of the European Union “EN 14110” for determining methanol in biodiesel by Gas Chromatography (GC) was optimized for crude glycerin. The extraction was performed by headspace technique, after homogenization of the sample by sonication. A GC Shimadzu GC-2014 equipped with a flame ionization detector (FID) and a Stabilwax column 15 m x 0.53 mm x 1 mm was used. The method was linear ≥ 0.99 . The limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 0.015 and 0.031%, respectively. No significant matrix effect (4.36%) was observed. Precision was between 2.09% (0.05) and 2.39% (0.5) in two levels tested. The concentrations 0.05%, 0.2% and 0.5% (w/w) showed recovery levels of 88%, 95% and 91% respectively. The method proposed was suitable for detection and quantification of methanol in samples of crude glycerin from biodiesel production and LOD complies with the maximum limit of methanol in crude glycerin feed recommended by the Food and Drug Administration (FDA) of 0.015%.

Keywords: Animal nutrition. Biodiesel. By-product. Methanol. Validation.

3.1. Introdução

A glicerina bruta é obtida como subproduto da produção do biodiesel, representando cerca de 10% (m/m) do produto final (KARINEN; KRAUSE, 2006). Embora a glicerina pura tenha aplicação nas indústrias farmacêutica, alimentícia, cosmética e outras, o processo de purificação tem alto custo e normalmente a glicerina em sua forma bruta possui baixo valor agregado para os pequenos produtores (DASARI, 2007). A composição da glicerina depende das características dos compostos usados no processo de produção do biodiesel na indústria (YANG et al., 2012), mas o metanol e o sabão são os principais contaminantes (PYLE; WEN GARCIA, 2008).

Na alimentação animal, o uso da glicerina como ingrediente energético tem atraído atenção tanto pelo aumento no preço de outros ingredientes tradicionais como o milho, assim como a disponibilidade de glicerina bruta proveniente da crescente demanda da produção do biodiesel (YANG et al., 2012). Vários estudos têm demonstrado que o uso do glicerol presente na glicerina bruta como precursor de glicose na alimentação de ruminantes a torna um bom ingrediente para a alimentação (SCHRÖDER; SÜDEKUM, 1999; LOMANDER et al., 2012).

No entanto, um documento elaborado pelo Food and Drugs Administration (FDA) adverte que níveis de metanol acima de 150 ppm (0,015%) na alimentação animal pode representar riscos para o organismo (FDA, 2014). Um relatório publicado em 1982, notificou suspeita de envenenamento de gado por metanol. Os animais apresentaram evidência de vômitos antes da morte, lesões graves no trato gastrointestinal e sangue no cólon e íleo, e alterações da coagulação sanguínea e cor. O nível de metanol no fluido do rúmen foi de aproximadamente $3,70 \text{ mg mL}^{-1}$ (ROUSSEAU; AUDETE; ELLEFSON, 1982).

A quantificação de metanol em amostras de biodiesel tem sido realizada por técnicas de cromatografia em fase gasosa. A norma europeia EN-14110 fornece uma boa ferramenta para análise da qualidade do biodiesel, no entanto, a quantificação deste composto em glicerina bruta não é descrita neste método. Este estudo teve como objetivo otimizar o método original "EN 14110" de quantificação de metanol em biodiesel para quantificar metanol na matriz de glicerina bruta, possibilitando a medição prévia deste contaminante antes da sua utilização na alimentação animal.

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. Reagentes e Equipamentos

Foi utilizado um cromatógrafo de gasoso Shimadzu "GC 2014" equipado com um detector de ionização de chama (FID) e uma coluna Stabilwax 15 m x 0,53 mm x 1 micron. Banho-maria THELCO modelo 85 (Tecnal, Piracicaba, SP); estufa Retilínea (Fanem LTDA, Brasil); seringa para gases Gas Hamilton Syringe Sample Lock (Sync, Brasil), ultrassom QH Kerry (Catel, Piracicaba, SP). Metanol grau analítico HPLC (J.T. Baker®) e 2-propanol grau analítico (Sigma-Aldrich®, Brasil). A glicerina pura 99% (glicerol) foi obtida da Sigma-Aldrich® (Brasil) e utilizada como "branco" para validação do método.

3.2.2. Condições do GC-FID

Como gás de arraste foi utilizado o gás hélio (He) com fluxo constante de 7,7 mL min⁻¹ com *make-up* de 3 mL min⁻¹. A temperatura do injetor e do detector foram de 100 e 250 °C, respectivamente. Foi realizada uma programação de temperatura do forno da coluna, que iniciou a 40 °C permanecendo por 1,20 minutos, posteriormente aumentando a uma taxa de 20 °C min⁻¹ até 50 °C quando permaneceu por 2,30 minutos. O tempo total da corrida foi de 4 minutos. O volume de injeção foi 100 µL. Foi utilizado o software "GC Solution" para aquisição de dados.

3.3.3. Soluções de calibração

Inicialmente, o mesmo procedimento apresentado no método EN 14110 quanto ao preparo de três soluções de calibração, extração do metanol e do padrão interno, injeção e checagem dos fatores de calibração foi utilizado.

Foi realizado, inicialmente, o preparo da solução de calibração de maior concentração (0,5%) adicionando metanol em um balão volumétrico contendo glicerol (glicerina pura), e homogeneizada manualmente. Em seguida, esta solução foi diluída para se obter a segunda solução de calibração, na concentração de 0,1%. A partir desta, foi obtida igualmente por

diluição, a terceira solução de calibração (0,01%). Então 5g de cada uma das soluções preparadas eram transferidas para seus respectivos vials e adicionado o padrão interno (2-propanol). A homogeneização era realizada por agitação manual e, a extração por *headspace*, onde os vials permaneciam em banho maria a 80°C durante 45 minutos. Com uma seringa a gás aquecida a 60°C a amostra era coletada e injetada no sistema cromatográfico e então, se obtinha o fator de calibração para cada concentração (F_c) (item 3.3.5.). A partir disso, foi calculado o coeficiente de variação (CV) entre os F_c , o qual deveria estar em até 15% como critério de aceitação. Porém, os valores obtidos eram superiores.

O alto CV foi creditado à insuficiência na homogeneização do metanol e do padrão interno adicionados ao glicerol na solução mais concentrada, de 0,5%, uma vez que as soluções seguintes (0,1% e 0,01%) foram obtidas por diluições. Assim, foram realizados testes para otimização da homogeneização do preparo das soluções de calibração do método EN 14110.

3.3.4. Preparo das soluções de calibração

Como descrito brevemente no item anterior (3.3.3.) foram preparadas três soluções de calibração de forma sequencial, ou seja, a partir de diluições sucessivas. A solução mais concentrada "A" (0,5%) foi preparada adicionando 200 μL de MeOH em um balão (25 mL), cujo volume final foi completado com glicerol. Para obter a solução "B" (0,1%), foi realizada uma diluição da solução A por pesagem, considerando a densidade do glicerol, onde foram pesados 6,25 g de solução "A" em balão volumétrico (25 mL). Da mesma forma, a solução "C" (0,01%) foi obtida a partir da solução "B" pesando 1,25 g em balão volumétrico (10 mL). As soluções foram homogeneizadas imediatamente após o preparo, como descrito no próximo item (3.3.4.1.).

3.3.4.1. Homogeneização

Para evitar a perda do metanol para o ambiente via evaporação, os balões foram selados com parafilme após completar o volume com glicerol, agitados manualmente e colocados em banho de ultrassom com gelo durante três minutos. Como após a sonicação sob gelo houve aparentemente uma mudança na viscosidade da solução, o balão contendo a solução foi imerso em água corrente durante um minuto, a fim de que a solução alcançasse, visualmente, a viscosidade inicial.

Esse procedimento foi adotado para evitar perdas diferenciadas de metanol entre os preparos das soluções (pesagem), que poderiam ser proporcionadas pela alteração no escoamento da solução entre as diluições. Além disso, a glicerina transferida poderia conter metanol distribuído heterogeneamente na solução, proporcionando um possível aumento do CV e erros nas concentrações de metanol desejadas nas soluções diluídas.

Foram transferidos cinco gramas das soluções de calibração preparadas para vials de 20 mL e, para testar a metodologia padrão, foram pipetados em cada vial, cinco μL de 2-propanol como padrão interno. Os vials foram vedados com parafilme e mantidos em banho de ultrassom com gelo durante três minutos para a homogeneização do padrão interno na solução.

3.3.4.2. Extração metanol

A extração de metanol foi realizada por meio da técnica de *headspace* utilizando banho-maria a 80 ° C durante 45 minutos. Foram coletados 100 μL do conteúdo evaporado com uma seringa para gases pré-aquecida em estufa a 60 °C e esse volume foi injetado manualmente no sistema cromatográfico.

3.3.5. Critério para aceitação do método

Com objetivo de verificar a adequação da extração e das condições cromatográficas segundo método EN 14110, foram calculados os fatores de calibração das três soluções. Como critério para aceitação, o CV entre os fatores deve ser de até 15%. O cálculo dos fatores de calibração foi realizado conforme descrito na Equação 1:

$$Fc = \frac{Cm \cdot St}{Ci \cdot Sm} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

Fc = Fator de calibração;

Sm = Área do pico de metanol;

Ci = Concentração do 2-propanol adicionada de 0,0785 (%);

St = Área do pico do 2-propanol.

3.3.5.1. Quantificação de metanol em amostra industrial

Depois de checar o CV entre os fatores de calibração, o metanol foi quantificado (Cm) em uma amostra de glicerina bruta obtida na indústria. Três replicatas foram coletadas, extraídas e injetadas em triplicata. O cálculo foi realizado de acordo com método EN 14110 (Equação 2). A determinação do teor de metanol em uma amostra industrial foi realizada a fim de ser obtido o intervalo de trabalho para a construção da curva analítica.

$$C_m = \frac{F \cdot S_m \cdot C_i}{S_t} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

Cm = Concentração do metanol (%);

St = Área do pico de 2-propanol;

Ci = Concentração do 2-propanol (%);

Sm = Área do pico de metanol.

Após ser obtida a concentração na amostra industrial, utilizada como referencial para a construção da curva analítica, a validação do método foi realizada.

3.3.6. Validação do método

Os parâmetros de validação foram: linearidade, limite de detecção (LD) e quantificação (LQ), exatidão (recuperação), precisão (repetibilidade) e efeito matriz.

A linearidade foi determinada por meio de uma curva analítica do metanol em glicerol (considerado como solvente), adicionado em 7 níveis: 0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 e 0,5%, sendo considerada linear quando $r^2 \geq 0,99$ (ANVISA, 2003).

Considerando a ausência de uma amostra de glicerina bruta isenta de metanol residual, uma glicerina bruta da indústria de biodiesel, foi pré-aquecida durante 120 minutos a 100°C para que o metanol residual evaporasse e ela pudesse ser usada para construir uma segunda curva, para determinação do efeito matriz, com os mesmos níveis da curva em solvente (glicerol). O efeito da matriz foi calculado a partir dos declives das curvas utilizando a equação 3 (ECONOMOU et al., 2009):

$$C\% = 100 \cdot \left(1 - \frac{\text{Inclinação da curva na matriz}}{\text{Inclinação da curva no solvente}} \right) \quad (\text{Equação 3})$$

Para obter o limite de detecção (LD), foi realizada a extração utilizando glicerol como branco. A partir dos cromatogramas emitidos, o ruído foi obtido por meio da integração da área do pico registrado próximo ao tR do metanol, entre de 2,0 e 2,4 minutos. O LD foi obtido como sendo duas vezes a área do pico do ruído, onde a concentração foi obtida utilizando a curva analítica em solvente. O limite de quantificação (LQ) foi considerado como sendo 3 vezes a concentração do LD (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE – ICH, 1994; ROMERO, 2007)

A exatidão foi avaliada por meio de testes de recuperação, com a adição 0,5% de metanol, em 4 replicatas. Para verificar o comportamento da recuperação em níveis mais baixos, foram realizados testes com adição de 0,05 e 0,2% de metanol, adicionados em glicerol, os quais foram pipetados diretamente nos vials, homogeneizados (conforme descrito no item 3.3.5.) e injetados. Os resultados foram obtidos por meio da razão entre a concentração medida pela concentração teórica como apresentado na Equação 4 (RIBANI et al., 2007):

$$R (\%) = \frac{\text{Concentração medida}}{\text{Concentração teórica}} \cdot 100 \quad (\text{Equação 4})$$

A precisão foi calculada pela repetibilidade, obtida a partir do desvio padrão relativo (RSD) das injeções. A repetibilidade foi avaliada em dois níveis, onde, dois vials foram preparados com concentrações de 0,05 e 0,5% e injetados 7 vezes (RIBANI et al., 2004).

3.4. Resultados e Discussão

3.4.1. Separação cromatográfica

O tempo de retenção (t_R) do metanol e do padrão interno, 2-propanol foram 2,32 e 2,65 minutos, respectivamente. O tempo total de corrida foi de quatro minutos, portanto, o método otimizado demonstrou ser mais rápido que a metodologia EN 14110. Na Figura 3.1., o cromatograma obtido na metodologia otimizada é apresentado.

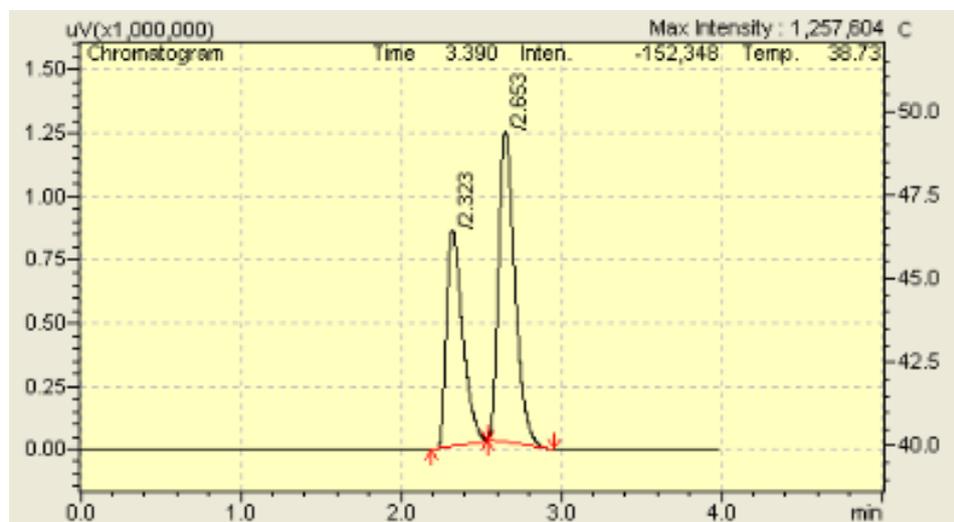


Figura 3.1 - Cromatograma dos picos de metanol e 2-propanol saindo a 2,32 e 2,65 minutos, respectivamente

Além do tempo de análise, outro fator importante na otimização de um método cromatográfico é a resolução (R_s). A resolução se refere a quão separados estão dois picos consecutivos (ARAGÃO et al., 2009). Segundo Collins, Braga e Bonato (2006), a resolução mínima aceitável para a quantificação em um método é de 1,25, sendo que o valor de 1,5 indica a completa separação dos analitos. No método otimizado neste estudo, a resolução entre o metanol e o 2-propanol foi de 1,8, apresentando, portanto, uma boa separação.

3.4.2. Otimização da homogeneização

O critério de aceitação do método oficial, consiste na obtenção do CV dos fatores de calibração até 15% (EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION, 2003) . No

entanto, nos testes iniciais, o preparo das soluções foi realizado conforme descrito no método original, a partir das diluições sequenciais, com agitação vigorosa mas não foram obtidos valores satisfatórios, alcançando valores de até 30%, apesar da boa separação entre os picos.

Essa dificuldade em atingir um CV adequado entre as soluções pode ter sido consequência de uma homogeneização insuficiente no preparo das soluções, ocasionada pela diferença de viscosidade entre o biodiesel e a glicerina.

Sequinel (2013) também encontrou percalços trabalhando com o método EN 14110 para amostras de glicerina, sendo necessário otimizar o método para esta matriz. De forma semelhante, Silva et al. (2011) encontraram dificuldades na dispersão do metanol em glicerina e optaram por preparar as soluções de calibração em água. Diante disso, foi necessário otimizar a homogeneização para as matrizes de glicerol e glicerina bruta.

A otimização da homogeneização consistiu na inclusão da etapa de sonicação das soluções de calibração por três minutos em gelo, em seguida, permanecendo durante um minuto em água corrente. Após a transferência das soluções para vials, elas foram sonicadas por mais três minutos com gelo. Depois das modificações, o CV obtido demonstrou a adequação da metodologia, segundo o EN 14110 (Tabela 3.1.).

Tabela 3.1 - Fatores de calibração, média e coeficiente de variação das soluções de calibração

Concentração %	Fatores de calibração	Média	Desvio padrão	CV%
0,01	3,01			
0,1	2,73	2,81	0,1806	6,43
0,5	2,68			

De acordo com o Comitê Europeu de Normalização, a viscosidade do biodiesel situa-se entre 3,50 – 5,0 mm²/s (LOBÔ et al., 2009), enquanto a viscosidade da glicerina bruta está em torno de 44.38 mm²/s (PATZER et al., 2007). Assim, é possível que a dificuldade na dispersão do metanol na glicerina possa estar relacionada com essa diferença na viscosidade (COUTINHO et al., 2002).

Deste modo, o intuito da inclusão da etapa com sonicação por ultrassom foi melhorar a dispersão do metanol na glicerina, considerando que a agitação das moléculas proporcionada pelo ultrassom tem a ação de melhorar a uniformidade na distribuição da massa (OHSAKA et al., 2010).

A partir da hipótese de que a sonicação poderia favorecer a volatilização do metanol pelo aquecimento do vidro e metal da tampa do vial, foi realizada a inclusão de gelo na água do aparelho de ultrassom. De fato, nos testes iniciais foram observadas discrepâncias entre os fatores de calibração e que as tampas se aqueciam, o que poderia ter favorecido uma certa volatilização do metanol, ainda que o vial estivesse vedado com parafilme.

3.4.3. Quantificação de metanol em amostra industrial

A amostra de glicerina bruta obtida de uma indústria de biodiesel foi analisada conforme a EN 14110 para determinar a concentração de metanol (Tabela 3.2.). A partir do valor encontrado, foram estabelecidos os pontos da curva analítica.

Tabela 3.2 - Quantificação de metanol nas replicatas de uma glicerina bruta (GB) e média dos valores (%)

Amostra industrial de GB	Concentração (%)	Média	RSD (%)
1	0,048		
2	0,039	0,045	9,0
3	0,047		

3.4.4. Validação do método

A linearidade obtida por meio da curva analítica no solvente (glicerol) nas concentrações de 0 a 0,5% de metanol demonstrou um bom coeficiente de correlação (r^2) = 0,996, sendo linear quando $r^2 \geq 0,99$ (ANVISA, 2003).

Os pontos da curva analítica foram selecionados tendo referência de ponto mínimo o valor de 0,015% de metanol, descrito pelo FDA como limite para a presença deste contaminante na alimentação animal. Segundo a literatura disponível, foram obtidos teores de metanol desde <0,01 até 1,15% em amostras de glicerina bruta nos Estados Unidos (DASARI, 2007). No Brasil, entretanto, foram encontrados teores de metanol de 0,33% a 8,66% (LAGE et al., 2010; BARROS, 2012; FRANÇOZO et al., 2013).

Da mesma forma, a curva na matriz (glicerina bruta) também apresentou boa linearidade nas mesmas faixas de concentração (r^2) = 0,994.

A verificação do efeito matriz foi realizada a partir dos coeficientes angulares das curvas no solvente e na matriz. O valor encontrado foi de 4,36%, que é considerado baixo por se situar entre a faixa de $-20\% < \% C < 20\%$, portanto, sem influência significativa sobre a exatidão da metodologia (ECONOMOU et al., 2009). Na Figura 3.2. são apresentadas as curvas no solvente e na matriz.

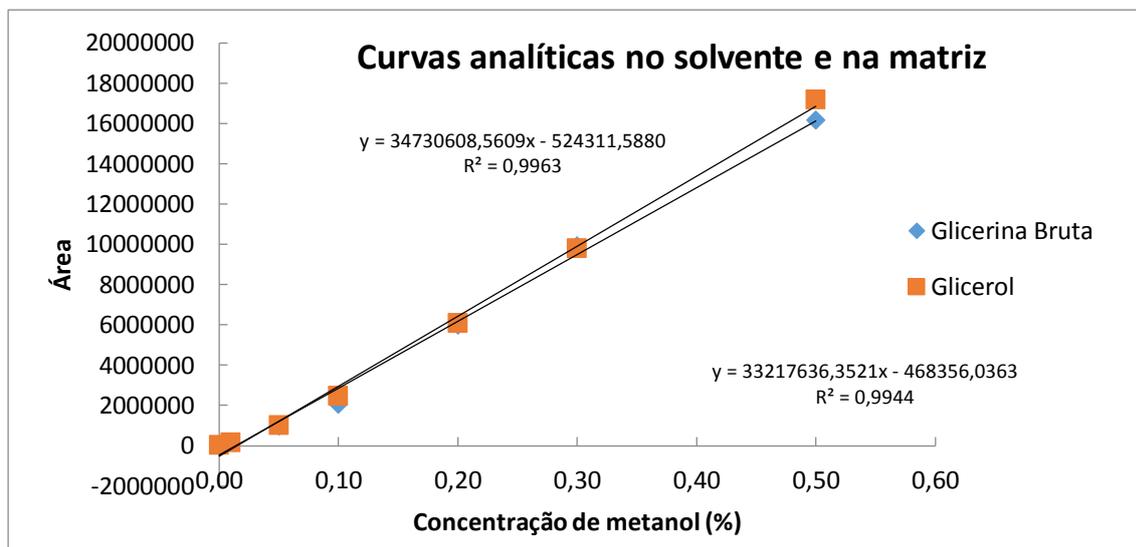


Figura 3.2 - Curvas analíticas no solvente e na matriz

O LD do metanol foi 0,015% e o LQ foi 0,031%. Assim, o método otimizado demonstrou ser eficaz para detectar desde o nível máximo recomendado pelo Food and Drugs Administration (FDA, 2014), de 0,015%.

De acordo com Horwitz (2003) são considerados adequados valores de recuperação entre 90 e 105% para adições de 0,5% e 0,2%, ao passo que, para valores mais baixos, como 0,05%, a faixa aceita situa-se entre 85% a 108%. Foram obtidos 91% para a adição de 0,5%, de 95% para a adição de 0,2% e de 88%, para 0,05%, assim, todos dentro da faixa de aceitação. Pode-se observar que o padrão de aceitação citado não se refere especificamente ao metanol ou compostos voláteis, sendo que, as faixas aqui citadas são utilizadas apenas como valor referencial. Como alternativa, a confiabilidade dos resultados gerados pode ser obtida a partir da inclusão de uma recuperação entre as análises de rotina em batelada (EUROPEAN COMMISSION, 2004), o que possibilita a correção das amostras analisadas (THOMPSON et al., 1999).

Quanto à precisão, é considerado como aceitável um RSD de 3,5 e 2,5% para os níveis de 0,05 e 0,5% (HORWITZ, 2003). Os valores alcançados para estas duas concentrações foram 2,39 e 2,09%, sendo, portanto, adequados.

3.5. Conclusão

O método apresentou boa linearidade, precisão, sem interferência significativa do efeito matriz e uma redução de 20% no tempo de corrida em relação ao método de referência. O método otimizado permite a detecção de metanol no limite recomendado pelo FDA para alimentação animal (0,015%), possibilitando seu uso para determinar a qualidade da glicerina bruta quanto a este contaminante.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"; fica revogada a Resolução RE nº 475, de 19 de março de 2002. **Diário Oficial da União; Poder Executivo**, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

ARAGAO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; BISPO, M. S.; ANDRADE, J. B. Efeito da acidez e de modificadores orgânicos na determinação de metilxantinas: um experimento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) empregando otimização uni e multivariada. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2482-2486, 2009.

BARROS, M. C. C. **Glicerina bruta na dieta de ovinos confinados**: Consumo, digestibilidade, desempenho, medidas morfométricas da carcaça e características da carne. 2012. Tese (Doutorado em Zootecnia - Produção Ruminantes) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, Itapetinga-BA, 2012.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Ed. Unicamp, 2006.

COUTINHO, F. M. B.; DELPECH, M. C.; ALVES, T. L.; GOMES, A. S. Síntese e caracterização de poliuretanos em dispersão aquosa à base de polibutadieno líquido hidroxilado e diferentes diisocianatos. **Polímeros**, São Carlos, v. 12, n. 4, p. 248-254, 2002.

DASARI, M. Crude glycerol potential described. **Feedstuffs**, Minneapolis, v. 79, n. 43, 3 p. 2007. Disponível em: <http://www.feedenergy.com/upl/downloads/white-papers/crude-glycerol-potential-described-badec0f3.pdf>.

ECONOMOU, A.; BOTITSI, H.; ANTONIOU, S.; TSIPI, D. Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1216, n. 31, p. 5856-5867, 2009.

EUROPEAN COMMISSION. **Report on the relationship between analytical results, measurement uncertainty, recovery factors and the provisions of EU food and feed legislation, with particular reference to community legislation concerning**. Brussels, 2004. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/report-sampling_analysis_2004_en.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2015.

EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION. **EN 14110: Fat and oil derivatives – Fat acid methyl esters (FAME). Determination of methanol content**. Brussels, 2003. 3 p.

FDA. **CodeJ of Federal Regulations**. Title 21, v.6, CFR573.640, 2014. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=573.640>>. Acesso em: 16 jan. 2015.

FRANÇOZO, M. C.; DO PRADO, I. N.; CECATO, U. Growth performance, carcass characteristics and meat quality of finishing bulls fed crude glycerin-supplemented diets. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 56, n. 2, p. 327-336, 2013.

HORWITZ, W. **Validation: an invisible component of measurement**. Gaithersburg: AOAC International, 2003. 10 p.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. **Q2(R1) - Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**. (The Addendum dated November 1996 has been incorporated into the core guideline in November 2005). Geneva, 1996.

KARINEN, R. S.; KRAUSE, A. O. I. New biocomponents from glycerol. **Applied Catalisys A: General**, Amsterdam, v. 306, p. 128-133, 2006.

LAGE, J. F.; PAULINO, P. V. R.; PEREIRA, L. G. R.; VALADARES, S. C. F.; 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.

LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; SERPA da CRUZ, R. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1596-1608, 2009.

LOMANDER, H.; FROSSLING, J.; INGVARTSEN, K. L.; GUSTAFSSON, H.; SVENSSON, C. Supplemental feeding with glycerol or propylene glycol of dairy cows in early lactation-Effects on metabolic status, body condition, and milk yield. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 95, n. 5, p. 2397-2408, 2012.

OHSAKA, T.; GOTO, Y.; SAKAMOTO, K.; ISAKA, M.; IMABAYASHI, S.; HIRANO, K. Effect of intensities of ultrasound sonication on reduction of crack formation and surface roughness in iridium electrodeposits. **Transactions of the Institute of Metal Finishing**, Birmingham, v. 88, n. 4, p. 204-208, 2010.

PATZER, R. **Stack emissions evaluation: combustion of crude glycerin and yellow grease in an industrial fire tube boiler**. Marshall, MN, Agricultural Utilization Research Institute, 2007. 12 p.

PYLE, D. J.; GARCIA, R. A.; WEN, Z. Producing docosahexaenoic acid (DHA)-rich algae from biodiesel-derived crude glycerol: effects of impurities on dha production and algal biomass composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 56, n. 11, p. 3933–3939, 2008.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, p. 771-780, 2004.

ROMERO, A. C. **Mensuração de biomarcador de exposição às aflatoxinas em fluidos biológicos**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

ROUSSEAU, C. R.; AUDETTE, R. J.; ELLEFSON, G. Methyl alcohol toxicity in cattle. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 23, p. 252, 1982.

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.

SEQUINEL, R. **Caracterização físico-química da glicerina proveniente de usinas de biodiesel e determinação de metanol residual por CG com amostragem por *Headspace* estático**. 2013. 104 p. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2013.

SILVA, P. N. da; BIZZO, H. R.; ANTONIASSI, R.; POMINI, A. M. Determinação de metanol em glicerina por headspace estático/CG/EM. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 34., 2011, Florianópolis. **Química para um mundo melhor**. São Paulo: SBQ, 2011. 1 CD-ROM.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; FAJGELJ, A.; WILLETTS, P.; WOOD, R. Harmonised guidelines for the use of recovery information in analytical measurement. (Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 71, n. 2, p. 337-348, 1999.

YANG, F.; HANNA, M. A.; SUN, R. Value-added uses for crude glycerol—a byproduct of biodiesel production. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 5, n. 1, p. 13-23, 2012.

4 Aplicabilidade do método na matriz glicerina bruta e potencial para análise em ração animal

Resumo

Pesquisadores da área de ciência animal têm realizado a quantificação de metanol em amostras de glicerina bruta (GB) obtida na produção de biodiesel utilizando a técnica de Cromatografia Gasosa. No entanto, esta análise nem sempre é realizada antes da utilização deste subproduto nas dietas dos animais. Uma opção prática quanto à análise do metanol na alimentação animal, é sua determinação na própria ração. Com este trabalho objetivou-se aplicar o método validado no LANA-CENA/USP em amostras de glicerina bruta. Além disso, a mesma metodologia foi testada para avaliar possível uso para análise de metanol no concentrado de uma ração formulada contendo GB. Foram analisadas três amostras de GB, duas obtidas em indústrias, amostras A e B, e uma obtida a partir da produção de biodiesel no laboratório da FATEC, amostra C. Para a análise no concentrado da ração, foram feitos três testes com a mesma amostra, variando a quantidade de concentrado em teste (CT) utilizada para extração, sendo 5g de concentrado (CT1); 1g (CT2) e 1g diluído em 4g de glicerol (CT3). As amostras obtidas na indústria apresentaram menores concentrações de metanol, 0,047% (amostra A) e <LQ (amostra B), ao passo que a amostra C apresentou 7,9% de metanol. Já nos concentrados, apesar da manutenção nos tempos de retenção do metanol e 2-propanol e da resolução, os valores obtidos estiveram entre o LD (0,015%) e o LQ (0,031%). O método pode ser aplicado para amostras de GB, apresentando bom potencial para a análise do concentrado, desde que o método seja adaptado e validado para essa matriz.

Palavras-chave: Cromatografia gasosa. Glicerina bruta. Metanol. Ração. Ruminantes.

Abstract

Researchers from animal science have performed the quantification of methanol in crude glycerin samples (CG) obtained in biodiesel production using the gas chromatography technique. However, this analysis is not always performed prior to use of the by-product in the animals's diet. A practical option for analysis of the methanol in the animal's feed is the determination right in the feed. This study aimed to apply the validated method at LANA-CENA/USP in crude glycerin samples. In addition, the same methodology was tested to assess the possibility of applying it to the concentrate of ration containing CG. Three CG samples were analyzed, two obtained in different industries, sample A and sample B, and other obtained from the biodiesel production in the laboratory at FATEC, sample C. For the analysis on the feed concentrate, three tests were made on the same sample, test varying amounts of concentrated used for extraction, 5 g of concentrated (CT1); 1g (CT2) and 1g diluted in 4g of glycerol (CT3). The samples obtained in the industry had smaller concentrations of methanol, 0.047% (sample A) and <LQ (sample B), while sample C showed 7.9% of methanol. On the other hand, using concentrates, despite of observe maintaining the retention time of methanol and 2-propanol and resolution, the values obtained were between LD (0.015%) and LQ (0.031%). The method can be applied to CG samples. It showed potential for analysis of the concentrate, provided that it is adapted and validated for this matrix.

Keywords: Gas chromatography. Crude glycerin. Methanol. Feed. Ruminants.

4.1. Introdução

A glicerina constitui o principal subproduto gerado durante a produção de biodiesel, em proporção aproximada de 10% da massa do óleo. Na alimentação animal, a glicerina bruta (GB) pode atuar como fonte de energia, mas é indispensável caracterizá-la antes do uso, uma vez que ela apresenta impurezas do processo de produção do biodiesel, como o metanol (THOMPSON; HE, 2006; DONKIN, 2008), que pode ser prejudicial para a saúde do animal (KERR, 2007).

Além da presença deste contaminante indesejado, é possível observar a existência de uma heterogeneidade em relação aos teores de metanol encontrados em amostras de glicerina bruta. Estudos relatam teores de 0,009 até 8,7% (PARSONS; SHELOR; DROUILLARD, 2009; GUNN et al., 2010; JUNK; BATAL, 2011; FRANÇOZO et al., 2013; LAGE et al., 2014; MENESES et al., 2014). Algumas vezes a quantificação do metanol nesta matriz não é realizada (KERR, 2007; GOTT, 2009; PELLEGRIN et al., 2013).

Tendo em vista a carência de uma padronização e verificação quanto aos teores de metanol nas amostras de glicerina bruta disponíveis no mercado, dependendo da concentração deste contaminante, a sua utilização para a alimentação pode causar riscos à saúde dos animais. De acordo com o United States Environmental Protection Agency (USEPA, 1994) entre os efeitos potenciais do metanol na saúde animal estão a acidose metabólica provocada pelo acúmulo de ácido fórmico (metabólito), depressão do sistema nervoso central, degeneração no cérebro e sistema visual.

Da mesma forma, não existem relatos sobre a quantificação deste contaminante em rações formuladas com a glicerina bruta. Diante disso, objetivou-se com este estudo realizar a quantificação dos teores de metanol em amostras de glicerina bruta obtida por processamento industrial e laboratorial; testando a metodologia de “headspace” com sonicação, desenvolvida no LANA-CENA/USP para a matriz ração contendo glicerina bruta em sua composição.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1. Obtenção das amostras de glicerina bruta e do concentrado presente na ração

Foram analisadas três amostras de glicerina bruta obtidas na produção de biodiesel. Duas amostras foram obtidas por doação de indústrias produtoras de biodiesel (amostra A e amostra B). Uma amostra de glicerina bruta foi obtida pela produção laboratorial (amostra C) de biodiesel utilizando óleo de pinhão-manso (*Jatropha curcas*). Com a produção do biodiesel

em escala laboratorial objetivou a obtenção da glicerina bruta proveniente de uma fonte vegetal alternativa à soja, avaliando, assim, a aplicabilidade do método validado nestas amostras.

O biodiesel foi produzido no Laboratório de Química da Faculdade de Tecnologia do Estado de São Paulo (FATEC, Piracicaba) de acordo com Melo et al. (2006), com adaptação na temperatura e tempo de incubação. A fração do concentrado foi preparado a partir da mistura dos ingredientes, no Laboratório de Nutrição Animal do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (LANA-CENA/USP, Piracicaba, SP).

A produção do biodiesel foi realizada a partir da reação de transesterificação pela rota metílica (metanol, 99%), sob catálise alcalina (hidróxido de sódio – NaOH). O óleo foi inicialmente centrifugado a 10.000 rpm durante 10 minutos para remoção das impurezas grosseiras. Em seguida, 448,4 mL de óleo foram aquecidos até 60 °C em chapa aquecedora, e então, foi adicionado 1,5 g de NaOH diluído em 75 mL de metanol e a mistura foi levada à incubadora com agitação de 200 rpm durante 90 minutos, a 55 °C. Ao término da reação, a mistura foi transferida para funil de separação durante 48 horas, para a separação das fases de biodiesel e glicerina bruta.

Para obtenção da matriz ração utilizada na alimentação de ruminantes, a parcela contendo glicerina bruta (concentrado), foi preparada procedendo a substituição do milho (ingrediente energético), o qual compunha 30% da formulação do concentrado. A fração de concentrado foi composta por 60g de glicerina bruta, 30,3g de farelo de soja e 6,7g de mistura mineral. Na alimentação de ruminantes a fração concentrado é balanceada com a fração volumoso, composta por ingredientes fibrosos, podendo ser utilizada em proporções como 70:30 (SANTOS, 2013), 50:50 (RODRIGUES et al., 2001), entre outras. Considerando a modificação da matriz inicial (glicerina bruta), foram realizados testes na matriz ração em três condições para extração do metanol.

4.2.2. Extração do metanol em glicerina bruta

Para a homogeneização e extração das amostras de glicerina bruta, cinco gramas de glicerina bruta foram pesados em vials de 20 mL e adicionados 5µL de 2-propanol como padrão interno. Em seguida, foi realizada a sonicação em banho de ultrassom com gelo durante três minutos, e então, a extração ocorreu com a técnica *headspace* em banho-maria durante 45 minutos a 80 °C. Utilizando uma seringa para gases (aquecida a 60 °C em estufa), foram coletados 100 µL do conteúdo evaporado e injetados manualmente no cromatógrafo gasoso.

4.2.3. Extração do metanol em ração

Para os testes da análise do metanol no concentrado (ração) foram utilizadas diferentes massas de ração, considerando como referência a massa utilizada na análise desse contaminante na matriz glicerina.

No primeiro teste (Teste 1), 5 g de ração foram pesados nos frascos e foram adicionados 5 μL de 2-propanol (padrão interno). No segundo teste (Teste 2), 1g de ração foi utilizado e no terceiro (Teste 3), 1g de ração foi pesada juntamente com 4g de glicerol, sendo adicionados 5 μL de 2-propanol. A diluição do concentrado em glicerol teve por finalidade alcançar uma maior proximidade da característica física da glicerina bruta, assim como obter um veículo para a condução do calor durante a extração, a fim de auxiliar na evaporação do metanol contido na ração em condições similares às encontradas na metodologia para a extração em glicerina bruta. A homogeneização e extração foram realizadas seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente (4.2.2.).

4.2.4. Condições Cromatográficas

A quantificação de metanol foi realizada utilizando um Cromatógrafo à Gás Shimadzu modelo “GC 2014”, acoplado à um detector de ionização de chamas (flame ionization detector – FID), e uma coluna capilar Stabilwax. Como gás de arraste foi utilizado o gás hélio em fluxo constante de 7,7 mL min⁻¹. A programação nas temperaturas da coluna, iniciou a 40 °C durante 1,20 minutos e subindo até 50 °C a 20 °C min⁻¹, permanecendo por 2,30 minutos. As temperaturas do injetor e detector foram 100 e 250°C, respectivamente (Capítulo 3)

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Análise das amostras de glicerina bruta

As amostras de glicerina bruta A, B e C apresentaram teores de metanol de 0,047, <LQ e 7,8% de metanol, respectivamente (Tabela 4.1.). A amostra C foi inicialmente extraída com 5g, entretanto, considerando a impossibilidade de quantificação pela curva analítica utilizada, devido à alta concentração de metanol na amostra, a amostra foi diluída em glicerol. Foram realizadas diluições de 61 e 41 vezes, a partir da pesagem da amostra no vial e adição de glicerol até completar os 5g utilizados para a extração. O procedimento de homogeneização e extração desta amostra foram realizadas de acordo com o item anterior (4.2.2.).

Assim, as amostras foram homogeneizadas, extraídas e injetadas em 3 repetições e o CV entre as injeções foi obtido. Os resultados são apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Valores de concentrações (%) de metanol em amostras de GB

Amostra	Concentração (%)	CV
A	0,047	7,9
B	<LQ	-
C	7,8	15,2

Observa-se que as amostras de glicerina bruta obtidas no processo de produção industrial apresentaram menor concentração de metanol, 0,047 e <LQ, comparadas à amostra obtida no processo de produção laboratorial, de 7,8%. Estas diferenças podem estar associadas às diferentes características entre os processos de produção. Já quanto ao maior CV observado na amostra C, a realização de diluição pode ter aumentado a incerteza analítica pela inclusão desta nova etapa.

Segundo Dasari (2007), o metanol não reagido no processo de produção tende migrar para a glicerina devido ao seu caráter polar. De acordo com Haas et al. (2006) em algumas indústrias é realizada a purificação parcial da glicerina bruta para a recuperação dos reagentes utilizados. Considerando que a amostra obtida no laboratório não recebeu nenhum tratamento, é possível que ela apresente, portanto, grande parte do metanol não reagido, ao contrário das amostras de glicerina bruta industriais, que apresentaram valores mais baixos, sugerindo a possível ocorrência de um pré-tratamento realizado nestas indústrias.

Tendo em vista que a realização de um tratamento parcial poderia agregar valor a este subproduto, esse procedimento seria interessante, não só para a economia das indústrias do biodiesel, mas também para sua utilização na alimentação animal, devido à redução dos teores de metanol. Por este motivo, Oliveira et al. (2011) ressalta que a maior parte das indústrias produtoras de biodiesel tem realizado um pré-tratamento da glicerina bruta para recuperação dos reagentes utilizados no processo de produção do biodiesel. Os resultados das análises demonstram que o método utilizado para quantificar o metanol neste subproduto poderia auxiliar na decisão da melhor forma de sua utilização.

4.3.2. Análise de metanol nas amostras de ração

Apesar da análise de metanol em glicerina ser importante em termos qualitativos para certificar a inocuidade da alimentação fornecida ao animal, pode ocorrer perdas deste contaminante por evaporação durante o preparo da ração, que proporcionariam uma superestimativa da concentração teórica do metanol contido na ração. Desta forma, a quantificação do metanol contido na ração poderia permitir a obtenção do teor mais exato deste contaminante presente-na alimentação animal.

Utilizando a mesma metodologia para análise de metanol em glicerina bruta para a análise das rações, nos cromatogramas foram obtidos dois picos, sendo um correspondente ao pico do padrão interno adicionado (2-propanol), para o qual não houve alteração no tempo de retenção (tR) de 2,65 minutos em relação ao mesmo padrão interno adicionado na análise de glicerina bruta. Houve também o registro de picos no tR do metanol (2,32) obtidos em de 2,34; 2,33 e 2,33 minutos, para cada um dos testes realizados (Figura 4.1.).

Observa-se que apesar dos cromatogramas obtidos terem apresentado algumas perturbações na linha de base para esta matriz, isso não interferiu na resolução dos picos do padrão interno nem do analíto de interesse (R_s média = 1,78 e faixa entre replicatas = 1,73 - 1,84), demonstrando que a metodologia foi adequada para a detecção e quantificação de metanol nesta matriz.

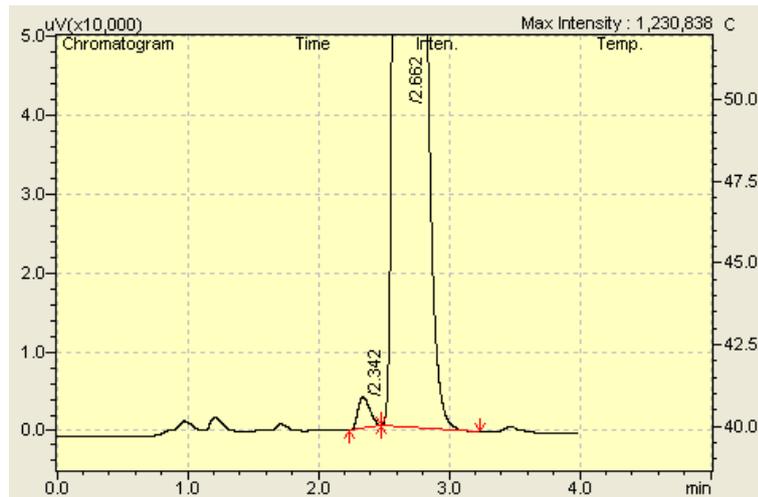


Figura 4.1 - Cromatograma de amostra de 5g concentrado

Todos os testes realizados para a análise de metanol nas amostras de ração proporcionaram resultados entre o limite de detecção (LD) e limite de quantificação do método (LQ), ou seja, apresentaram concentrações iguais ou maiores que 0,015, mas menores que 0,03%.

A fim de estimar a concentração de metanol que seria transferida para a ração após o preparo, foi realizado o cálculo da concentração teórica de metanol que estaria presente no concentrado, a partir da concentração conhecida na glicerina bruta utilizada. Considerando que a glicerina adicionada na amostra de ração totalizou 60% do concentrado e que a glicerina bruta utilizada para composição da ração apresentava 0,047% de metanol, a concentração teórica deste contaminante deveria ser de 0,028%, valor também abaixo do LQ da metodologia utilizada.

Assim, a impossibilidade de quantificação do teor de metanol contido na ração pode ter ocorrido devido à baixa quantidade de glicerina e, conseqüentemente, de metanol contido na massa da amostra de concentrado utilizado nos testes.

Da mesma forma, é possível a ocorrência de uma distribuição desuniforme da glicerina nas partículas da ração, o que poderia contribuir tanto para a redução do teor obtido na extração quanto para diferenças entre as extrações. A partir dos resultados obtidos, observa-se que a concentração mínima de metanol nas amostras seria de 0,015% (LD), considerando a presença de pico com área/concentração acima deste valor, e que a concentração teórica estaria ainda abaixo do valor quantificável, de 0,028 (LQ = 0,03%), é possível supor que a ocorrência de perdas ou variações entre as repetições seria de, no máximo, 0,014% de metanol,

correspondente a até 48% do valor de metanol esperado. Entretanto, observa-se a necessidade de um estudo mais aprofundado a fim de estimar a possibilidade real de perdas de metanol.

Da mesma forma, considerando as limitações da análise da ração, como a concentração reduzida de metanol, as possíveis perdas desse composto e a homogeneidade da amostra, para a adequação na metodologia para análise de metanol na ração, são necessários testes com o aumento da massa de ração para a extração, bem como alternativas para homogeneização da amostra.

Otimizações como estas na metodologia poderiam tornar apropriada para a quantificação nesta matriz, considerando a adequação observada quanto a resolução, tempo de retenção do analito e ausência de interferentes próximos ao tR do metanol. Da mesma forma, é provável que se a ração fosse composta por uma glicerina com maior teor de metanol, a metodologia seria adequada tanto para a detecção, como foi observado, quanto para a quantificação.

4.4. Conclusão

O método otimizado e validado para extração de metanol em glicerina bruta demonstrou ser adequado para a análise de amostras obtidas industrialmente e laboratorialmente. Foi possível quantificar a amostra obtida laboratorialmente utilizando óleo de pinhão manso, mesmo em teor acima da faixa analítica utilizada, por meio da realização de diluição durante o preparo da amostra.

Apesar da impossibilidade de quantificação em ração, que pode ter sido em decorrência da baixa massa de glicerina bruta nesta amostra, considerando os picos obtidos, com a manutenção dos tempos de retenção e da resolução e a ausência de interferentes, a utilização dessa metodologia para a quantificação de metanol em amostras de ração apresenta potencial, desde que sejam realizados alguns ajustes na massa inicial da amostra e a validação do método otimizado para certificar sua eficácia.

Referências

DASARI, M. Crude glycerol potential described. **Feedstuffs**, Minneapolis, v. 79, n. 43, 3 p. 2007. Disponível em: <http://www.feedenergy.com/upl/downloads/white-papers/crude-glycerol-potential-described-badec0f3.pdf>.

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

FRANÇOZO, M. C.; DO PRADO, I. N.; CECATO, U. Growth performance, carcass characteristics and meat quality of finishing bulls fed crude glycerin-supplemented diets. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 56, n. 2, p. 327-336, 2013.

GOTT, P. **Variation in the chemical composition of crude glycerin**. Columbus: Department of Animal Sciences, Ohio State University. 2009. Disponível em: <https://kb.osu.edu/dspace/bitstream/handle/1811/37082/Paige_N_Got?sequence=1>. Acesso em: 08 jan. 2015.

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

HAAS, M. J.; MCALOON, A. J.; YEE, W. C.; FOGLIA, T. A. A process model to estimate biodiesel production costs. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, p. 671–678, 2006.

JUNK, A.; BATAL, A. B. Nutritional and feeding value of crude glycerin for poultry. 2. Evaluation of feeding crude glycerin to broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 20, n. 4, p. 514-527, 2011.

KERR, B. J.; LOWA, A.; HONEYMMAN, M.; PEDRO, L. Feeding bioenergy coproducts to swine. Ames: Iowa Pork Industry Center, 2007. Disponível em: <<http://www.thepigsite.com/articles/?Display=2136>>. Acesso em: 07 set. 2012.

LAGE, J. F.; PAULINO, P. V. R.; PEREIRA, L. G. R.; DUARTE, M. S.; VALADARES FILHO, S. C.; OLIVEIRA, A. S.; SOUZA, N. K. P.; LIMA, J. C. M. Carcass characteristics of feedlot lambs fed crude glycerin contaminated with high concentrations of crude fat. **Meat Science**, Barking, v. 96, p. 108–113, 2014.

MELO, J. C.; BRANDER JUNIOR, W.; CAMPOS, R. J. A.; PACHECO, J. G. A.; SCHULER, A. R. P.; STRAGEVITCH, L. Avaliação preliminar do potencial do pinhão manso para a produção de biodiesel. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BODIESEL, 1., 2006, Brasília, DF. **Artigo técnico**.

MENESES, M. A.; SILVA, F. F.; SCHIO, A. R.; SILVA, R. R.; SOUZA, D. D.; PORTO JUNIOR, A. F. Feeding behavior of dairy cows in feedlot and fed on crude glycerin levels in the diet. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 36, n. 2, p. 171-176, 2014.

OLIVEIRA, A. S.; OLIVEIRA, M. R. C.; SOUZA, J. G. de; GABRIEL, J. A.; ALESSI, K. C.; SOUZA, M. C. de; SCHWAMBACH, T. I. **Perspectiva da utilização dos co-produtos do biodiesel na produção de bovinos de corte**. Sinop, MT: Amazônia Phos, 2011.

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.

PELLEGRIN, A. C. R. S.; PIRES, C. C.; MÜLLER, L.; CARVALHO, S.; LOPES, J. F. Glicerina bruta no suplemento e seus efeitos nas características da carcaça e nos componentes do peso vivo de cordeiros lactentes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 65, n. 5, p. 1509-1518, 2013.

RODRIGUES, P. H. M.; MATTOS, W. R. S.; MELOTTI, L.; RODRIGUES, R. R. Monensina e digestibilidade aparente em ovinos alimentados com proporções de volumoso/concentrado. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 3, p. 449-455, 2001.

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

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.

USEPA. Chemical summary for methanol. Washington, DC: Office of Pollution Prevention and Toxics, 1994. (EPA 749-F-94-013a). Disponível em: <http://www.epa.gov/chemfact/s_methan.txt>. Acesso em: 16 jan. 2015.

5 Avaliação *in vitro* de níveis de metanol sobre a fermentação ruminal e produção de gases

Resumo

A glicerina bruta (GB) tem sido utilizada na alimentação animal em substituição parcial do milho, possibilitando aos produtores redução dos custos com a alimentação, considerando o aumento no preço do milho. Além disso, o glicerol (substância presente na GB) quando utilizado na alimentação de ruminantes pode proporcionar a redução na produção de metano (CH₄). No entanto, a presença de metanol (MeOH) na GB pode apresentar efeitos tóxicos para os animais, dependendo de sua concentração. Objetivou-se com este estudo avaliar o efeito de níveis de metanol via glicerina bruta contaminada em substituição ao milho em ensaio *in vitro* de produção de gases. Foram realizados cinco tratamentos, distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado. A GB contendo 0,047% de metanol foi utilizada em substituição ao milho, nas proporções de 0, 25, 50, 75 e 100%, representando a concentração teórica de MeOH em cada tratamento de 0; 0,018; 0,035; 0,053 e 0,071 mg/250 mg de concentrado. Como controle positivo foi utilizado um sexto tratamento com inclusão de 8,3 mg de MeOH puro na dieta controle, o qual foi utilizado apenas em comparação ao tratamento 0, sem adição de GB. Os parâmetros avaliados foram a produção de gases total (PGT), produção de metano (CH₄ efic), degradabilidade da matéria orgânica (DMO) e o fator de partição (FP). Houve regressão positiva entre os níveis de GB sobre as variáveis DMO, PGT e produção de CH₄. O aumento observado na DMO (de 520 a 553 g/KgMS) e PGT (de 153 a 200 mL/gMS) pode ter sido devido ao aumento de carboidrato mais prontamente disponível à degradação por ação dos microrganismos. Embora, fosse esperada uma redução na produção de CH₄ em consequência ao aumento da GB, é possível que metanol presente na GB tenha influenciado as vias de fermentação, gerando aumento na produção de CH₄ (de 5,61 a 8,89 mL/100mL PGT). De forma semelhante, a adição de MeOH na dieta controle, também proporcionou aumento significativo na produção de CH₄ comparado controle sem GB, 4,59 e 5,42 mL/100 mL PGT, respectivamente, e redução no FP (1,46 – 1,03 mg DMO / mL PGT). A influência da GB contaminada com MeOH sobre a fermentação ruminal pode ter aumentado a produção de CH₄ e afetado o FP.

Palavras-chave: Contaminação. Glicerina bruta. Eficiência de síntese microbiana. Produção de metano.

Abstract

The crude glycerin (CG) has been used as feed in partial substitution of corn, enabling producers to reduce feed costs, considering the increase in the price of corn. Moreover, the glycerol (present in CG) when used in ruminant feeds can reduce the production of methane (CH₄). However, the presence of methanol (MeOH) in the CG may have toxic effects to the animals, depending on its concentration. The objective of this study was to evaluate the effect of increasing levels of methanol via contaminated CG replacing corn, using the *in vitro* gas production technique. It were prepared five experimental treatments in a completely randomized design. CB containing 0.047% methanol was used in replacement of corn, in the proportions of 0, 25, 50, 75 and 100%, which provided a concentration of MeOH in each treatment of 0; 0.018; 0.035; 0.053 and 0.071 mg/250 mg of concentrated. As a positive control we used a sixth treatment in which there were added 8.3 mg of pure MeOH to the control diet, treatment with no addition of GB. We evaluated the total gas production (TGP), methane production (CH₄ effic), organic matter degradability (OMD) and the partition factor (PF). There was a positive regression between GB levels and TGP, OMD and CH₄ effic. The increase in OMD (520 to 553 g/KgDM) and TGP (153 to 200 mL/gDM) may have been due to the increases in carbohydrate readily available to degradation by the action of microorganisms. Although it was expected a reduction in the production of CH₄ due to the increase in GB, it is possible that methanol present in CG influenced the fermentation pathways, increasing the production of CH₄ (5.61 to 8.89 mL/100 mL TGP). Similarly, the addition of MeOH to the control diet also provided a significant increase in CH₄ production compared to control without GB, 4.59 and 5.42, mL/100 mL TGP respectively, and reduction in PF (1.46 to 1.03 mg OMD/mL TGP). It is suggested that GB contaminated with MeOH on ruminal fermentation may have increased the production of CH₄ and affected the PF.

Keywords: Contamination. Crude glycerin. Methane production. Microbial efficiency.

5.1. Introdução

Os biocombustíveis, como o biodiesel, produzidos a partir da biomassa vegetal vem ganhando espaço em um cenário onde se busca a redução das fontes fósseis de energia (TALEBI; TABATABAEI; CHISTI, 2014). Considerando o aumento na geração de seus subprodutos, em especial, a glicerina bruta, e, considerando oscilações no preço do milho, a inclusão da glicerina bruta na alimentação animal tem sido interessante sob a ótica dos produtores (YANG et al., 2012).

O valor energético da glicerina bruta situa-se em aproximadamente $3,64 \text{ kcal kg}^{-1}$ considerando no mínimo 80% de glicerol em sua composição (LAMMERS et al., 2008). O glicerol pode ser utilizado para produzir energia, ou seja, como substrato gliconeogênico para os ruminantes (CHUNG, 2007). Além disso, quando puro, é possível adicioná-lo à dieta com objetivo de manipular a fermentação ruminal a fim de reduzir a produção de metano (MEALE et al., 2012). Assim, devido à presença de glicerol em sua composição, a glicerina bruta tem sido estudada na alimentação animal (LEONETI; ARAGÃO-LEONETI; BORGES de OLIVEIRA, 2012).

Contudo, um dos principais problemas da glicerina bruta para essa aplicação é a presença do metanol residual do processo de produção do biodiesel (DONKIN, 2008). Em experimentos realizados utilizando a infusão em níveis crescentes de metanol, houve tendência ao aumento da produção de metano (POL; DEMEYER, 1987; CZERKAWSKI; BRECKENRISE, 1972). Segundo Styler (1976) dependendo da concentração, o metanol pode apresentar toxicidade.

A concentração de metanol em nível superior a 0,015% pode ser insegura para a saúde animal (FDA, 2014). No entanto, no caso dos ruminantes, os limites seguros deste contaminante nos alimentos precisam ser confirmados (HAAG, 2007). Objetivou-se com o presente estudo, avaliar o efeito de níveis crescentes de inclusão de metanol via glicerina bruta contaminada na fermentação ruminal, por meio da técnica *in vitro* de produção de gases.

5.2. Material e Métodos

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Nutrição Animal, no Centro de Energia Nuclear na Agricultura - Universidade de São Paulo, em Piracicaba- São Paulo. O uso de animais foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) – ESALQ/ USP sob o Protocolo N° 2013-22.

5.3. Delineamento Experimental e Tratamentos

Foram preparados seis tratamentos distribuídos em delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo cinco níveis de inclusão de metanol via glicerina com contaminação residual do processo de produção do biodiesel em substituição ao milho em grão moído nas proporções de 0, 25, 50, 75 e 100% (% Matéria Seca). As concentrações de metanol teóricas com estes níveis foram de 0; 0,018; 0,035; 0,053 e 0,071 mg/250 mg de concentrado, respectivamente. Como controle positivo, foi realizado um sexto tratamento com adição de 8,3 mg de metanol puro, a fim de avaliar sua influência na fermentação de modo independente da glicerina bruta. Foram utilizados quatro inóculos, os quais foram considerados como repetição e duas réplicas para cada parâmetro avaliado.

5.4. Dietas

Foi utilizada uma dieta base composta por 50% feno de Tifton-85 (*Cynodon dactylon* sp.); 30% de milho em grão moído; 17% de farelo de soja e 3% de mistura mineral. Os substratos incubados (dietas experimentais) foram moídos em moinho tipo Willey (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) com malha de 1 mm. Os tratamentos consistiram na inclusão crescente de metanol via glicerina bruta (contendo 0,047% de metanol) em substituição ao milho.

As dietas foram caracterizadas quanto sua composição química: matéria seca (MS), matéria mineral (MM), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB) e fibra em detergente ácido (FDA), extrato etéreo (EE) conforme a AOAC (2011); fibra em detergente neutro (FDN) (MERTENS, 2002) e lignina (Lig) (ROBERTSON; VAN SOEST, 1981). A composição bromatológica dos cinco tratamentos é apresentada na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Composição bromatológica (%) dos tratamentos utilizados no ensaio de produção de gases *in vitro*

Tratamento	MS²	MO	FDN	FDA	Lig	PB	EE	MeOH
0%¹	89,84	94,42	57,82	26,44	6,81	13,05	2,38	0,00
25%	86,78	94,36	54,52	25,94	5,93	13,78	2,84	0,018
50%	82,14	94,23	54,29	28,01	6,83	12,97	1,89	0,035
75%	79,48	94,25	53,48	28,38	6,37	13,17	1,61	0,053
100%	78,03	94,11	52,84	27,93	6,49	13,63	1,14	0,071

¹0%: dieta com 0% de glicerina bruta; 25% de GB; 50% de GB; 75% de GB; 100% de GB.

²MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; Lig: lignina; PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo.

Foi realizado um sexto tratamento com a adição de metanol à dieta controle “0% + 8,3 mg de metanol”. Os valores da análise bromatológica deste tratamento foram os mesmos do tratamento “0%”, uma vez que era a mesma dieta. Apesar deste tratamento conter metanol, isso não interferiria nos valores dos parâmetros bromatológicos, uma vez que seu ponto de volatilização (64,7 °C) é mais baixo em relação às temperaturas utilizadas nos métodos para estas análises: entre 90 e 105 °C (item 5.4).

O extrato etéreo da amostra de glicerina bruta foi determinado por cromatografia gasosa em um laboratório terceirizado, o metanol foi quantificado pela metodologia desenvolvida no LANA-CENA/USP e o pH foi medido com um medidor de pH digital (GEHAKA – PG 2000), todos estes dados são apresentados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Composição de ácidos graxos em glicerina bruta (%)

Ácido Graxo	Teor (%)
Ácido mirístico (C14:0)	0,01
Ácido esteárico (C18:0)	0,11
Ácido oleico (C18:1)	0,48
Ácido linoleico (C18:2)	0,75
Ácido linolênico (C18:3)	0,07
Gorduras	
Insaturada	1,3
Monoinsaturada	0,48
Poli-insaturada	0,82
Saturada	0,32
Total	1,62
Metanol	0,047
pH	6,01

5.5. Animais doadores de inóculo

Foram utilizados animais doadores de inóculo, machos, castrados e fistulados da raça Santa Inês ($60 \pm 2,5$ kg PV), os quais permaneceram durante o dia em pastagem de braquiária (*Brachiaria decumbens*). Ao entardecer, os animais foram recolhidos em baias coletivas cobertas e suplementados com concentrado a base de milho moído, farelo de soja, com acesso à água e mistura mineral *ad libitum*.

5.6. Preparo do inóculo

Foram utilizados quatro inóculos, sendo que cada um foi composto pelo conteúdo ruminal de dois animais. No dia da avaliação *in vitro*, a coleta dos inóculos foi realizada com os animais doadores em jejum, sendo coletados volumes similares (50:50, v/v) das frações sólida e líquida. O conteúdo ruminal coletado de cada animal foi armazenado individualmente em recipientes térmicos pré-aquecidos sob condições anaeróbicas, a fim de preservar a microbiota ruminal.

No laboratório, volumes semelhantes de ambas as frações foram homogeneizados por 10 segundos e filtrados por duas camadas de tecido de algodão. A mistura foi mantida em banho-maria a 39 °C sob CO₂ constante até o momento da inoculação.

5.7. Ensaio de produção de gases *in vitro*

O ensaio de produção de gases *in vitro* foi realizado segundo Theodorou et al. (1994) adaptada ao sistema semiautomático do LANA-CENA para avaliação da produção de metano *in vitro*, segundo Bueno et al. (2005) e Longo et al. (2006). A incubação foi realizada em garrafas com capacidade para 160 mL. Em cada garrafa foi adicionado um saquinho (F57 ANKOM) contendo 0,5 g das dietas experimentais (substrato), 50 mL de solução tamponante e 25 mL de inóculo. Para cada inóculo foi incluído um “branco” contendo apenas o saquinho sem substrato, para a posterior correção dos valores da produção de gases total (PGT) e degradabilidade da matéria orgânica (DMO). Além do branco, foi utilizado um “padrão interno” composto de Feno de Tifton-85 (*Cynodom spp*), a fim de verificar variações entre inóculos.

A adição de metanol puro (grau HPLC) no tratamento “T0+metanol” foi realizada com o auxílio de um micropipetador, sendo adicionados 8,3 mg diretamente sobre 0,5 g de dieta no saquinho e selado imediatamente, momentos antes da incubação, a fim de reduzir sua volatilização. As garrafas foram fechadas com tampas de borracha e incubadas em estufa com ventilação de ar à temperatura de 39 °C. A pressão dos gases produzidos nos intervalos de tempo de 4, 8, 12 e 24 h foi aferida com transducer (BUENO et al., 2005). O volume total dos gases produzidos (PGT) durante a fermentação foi estimado pela equação ($V = 0,011 p^2 + 7,365 p$) de acordo com Soltan et al. (2012), onde V= volume de gases (mL) e p= pressão (psi).

Após a leitura de pressão em cada tempo, foram coletados 2,5 mL de gases em tubos de ensaio (12 mL) vedados com tampas de borrachas para a quantificação de metano. Então, a pressão interna das garrafas era aliviada, homogeneizadas manualmente e recolocadas na estufa. Ao término do tempo de incubação de 24 h fez-se a última leitura e coleta de gases.

As garrafas foram abertas e imersas em um recipiente com água e gelo a fim de interromper a fermentação (LONGO et al., 2006). Os saquinhos foram retirados e o pH do conteúdo fermentado foi medido com medidor de pH digital. A degradabilidade da matéria orgânica (DMO) foi determinada submetendo os saquinhos em solução FDN a 90 °C por 1 h e queima em forno mufla a 550 °C.

Os valores de DMO e PGT foram utilizados para calcular o índice de eficiência de síntese microbiana (FP). Este parâmetro indica a relação entre a matéria orgânica

verdadeiramente degradada e o volume total de gases produzidos durante a fermentação (equação 1), conhecido como Fator de Partição (BLUMMEL; STEINGAS; BECKER, 1994)

$$FP = \frac{DMO \text{ (mg)}}{PGT \text{ (mL)}} \quad \text{Equação 1}$$

O CH₄ produzido durante a fermentação foi analisado em cromatógrafo gasoso Shimadzu modelo 2010 acoplado ao detector de ionização de chamas (GC-FID) com uma coluna HP Molesieve 0,53 mm x 30 m x 15,0 µm. As condições de funcionamento foram de 200 °C para a temperatura do injetor e de 280 °C para o detector e. A temperatura do forno da coluna foi de 50°C (isotérmico), o gás de arraste utilizado foi o N₂, e o volume de injeção foi de 0,5 mL. O tempo total de corrida foi de quatro minutos.

A quantificação de metano nas amostras foi realizada por meio de uma curva analítica construída com padrão de CH₄ (0 a 12%), onde $r^2 = 0,99$ e os resultados foram expressos em % de metano. Para determinação do volume total de metano (PCH₄), foi considerado o volume total de gases produzidos em mL (PG), o volume do *headspace* das garrafas em (85 mL) e a concentração de metano em % [CH₄], conforme LONGO et al. (2006): A eficiência na produção de metano foi calculada em relação à PGT.

5.8. Análise estatística

Os efeitos da adição de glicerina bruta sobre os parâmetros de fermentação estudados foram testados para regressão utilizando o procedimento REG (SAS®) e a adição de metanol (T0 + 8,3) foi comparado com o tratamento sem adição de glicerina bruta por análise de variância. As médias foram obtidas pelo comando LSMEANS e as diferenças foram consideradas significativas para $P < 0,05$.

5.9. Resultados e discussão

As variáveis estudadas no ensaio de produção de gases *in vitro* apresentaram efeito significativo com a inclusão de glicerina bruta contaminada com metanol em substituição ao milho. A DMO, PGT e CH₄ efic aumentaram com a inclusão de glicerina e o consequente aumento de metanol nas dietas (Tabela 5.3.).

Tabela 5.3 - Variáveis DMO, PGT, CH₄ e FP em função dos níveis de glicerina bruta contaminada com metanol

Item	Tratamento					CV	Equação	R ²
	0%	25%	50%	75%	100%			
DMO (g Kg⁻¹)	520	541	538	553	553	4,71	Y=462,58x+524,89*	0,173
PGT, mL.gdms⁻¹	152	170	181	176	199	12,63	Y=614,86x+154,08*	0,327
CH₄ efic(%)**	5,61	7,78	8,45	8,86	8,89	32,89	Y=45,56x+6,23*	0,164
FP	1,46	1,31	1,16	1,18	1,03	11,78	Y= -5,92x+1,44*	0,516

*Significativo a 5% de probabilidade

** mL 100mL gás produzido⁻¹

Observa-se que nas dietas contendo menores proporções de milho em grão moído e maiores níveis de glicerina bruta, houve aumento nos parâmetros DMO, PGT e a eficiência na produção de metano (Figura 5.1.)

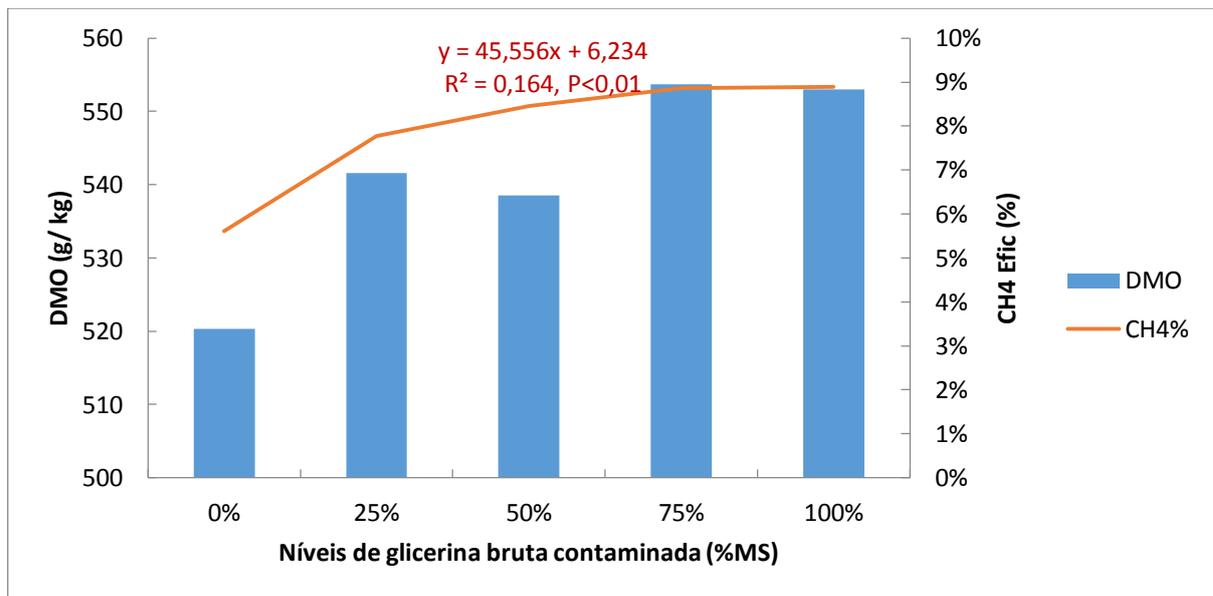


Figura 5.1 – Degradabilidade da matéria orgânica (DMO) e eficiência na produção de metano (CH₄) em função dos níveis de glicerina bruta

De acordo Jenkins (1996) e Palmquist e Mattos (2011) dependendo da quantidade e tipos de ácidos graxos insaturados na dieta, estes podem dificultar a ação de alguns microrganismos ruminais, especialmente os fibrolíticos. Segundo dados da literatura, o teor de gordura presente no milho em grão situa-se entre 3,2 e 4,9% (PALMQUIST; MATTOS, 2011;

SANTOS, 2013), sendo composto predominantemente pelos ácidos graxos poliinsaturados, linoleico (18:2) e linolênico (18:3) (PAES, 2006).

A glicerina utilizada neste estudo apresentou 1,62% de extrato etéreo, sendo composta principalmente por ácido oleico (18:1) e ácido linoleico (18:2). Foram observados menores valores de extrato etéreo nas dietas conforme os níveis de glicerina foram aumentados, apresentando redução de 2,38 para 1,14 (Tabela 5.1.). Considerando que a glicerina utilizada possa ter ácidos graxos com menor grau de insaturações comparado ao milho, é possível que quanto maior a proporção de glicerina, menor a interferência dos ácidos insaturados sobre os microrganismos, podendo contribuir para maior degradabilidade da matéria orgânica e, por consequência, aumento na produção de gases total.

Outro fator que pode ter contribuído para o aumento da DMO e PGT é a influência da forma física dos substratos. A moagem do grão de milho rompe a camada proteica que protege o carboidrato (FANCELLI; LIMA, 1981), facilitando sua degradação por ação dos microrganismos. Schröder e Südekum (1999) observaram que o glicerol no rúmen foi fermentado mais rapidamente comparado ao amido. Segundo Krehbiel (2008), a fermentação do glicerol contido na glicerina resulta em maior produção de propionato. Desta forma, ainda que o grão de milho tenha sido moído, é provável que o glicerol seja mais prontamente disponível à degradação pela microbiota ruminal, refletindo na tendência à maior degradabilidade nas dietas contendo maiores níveis de glicerina.

Quanto à produção de metano (CH_4), segundo Garcia-Lopez et al. (1996), a síntese de propionato pode promover consequente redução na sua produção. A formação do propionato requer a utilização do hidrogênio no rúmen, diminuindo sua disponibilidade para formação de CH_4 (MOSS; JOUANY; NEWBOLD, 2000). Entretanto, a utilização da glicerina neste estudo, não reduziu a produção de CH_4 .

Considerando que glicerina bruta utilizada no preparo das dietas continha metanol, é possível que o metanol tenha interferido na fermentação ruminal, direcionando à maior produção de metano observada. Para estudar essa hipótese, a dieta controle (sem a adição de glicerina) foi comparada com a dieta controle + adição de 8,3 mg de metanol puro.

Observou-se que presença de metanol na dieta controle aumentou significativamente a produção de CH_4 . (4,59 x 5,42, dieta sem metanol e dieta com 8,3 mg de metanol, respectivamente) (Figura 5.2.).

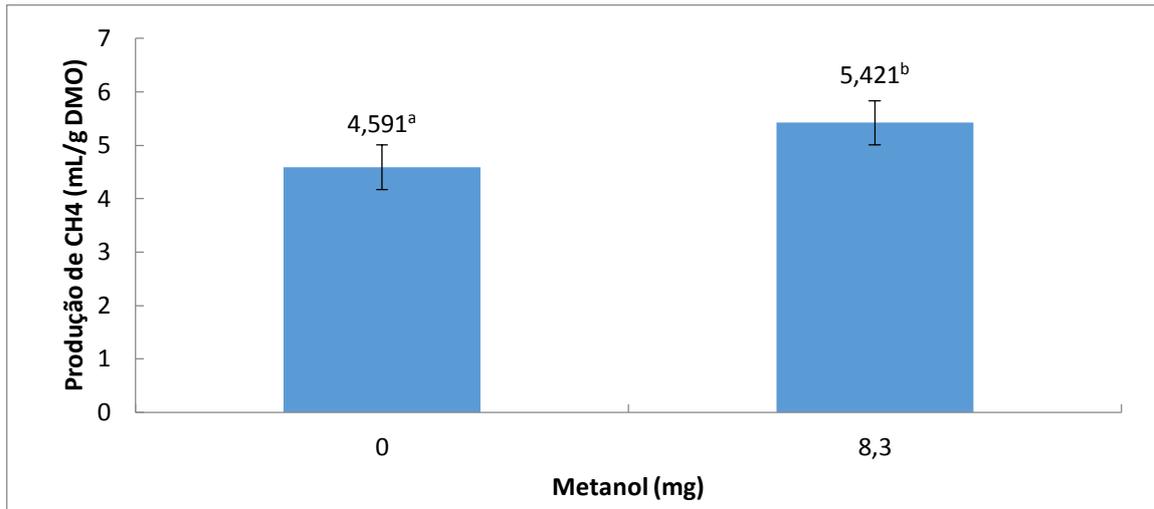


Figura 5.2 – Efeito de 8,3 mg de metanol sobre a produção de metano (mL.g DMO⁻¹)

Genthner, Davis e Bryant (1981) relataram que o metanol pode ser metabolizado por ação da bactéria ruminal *Eubacterium limosum*, produzindo acetato e butirato. Winsko et al. (2011) estudaram os efeitos de níveis de metanol sobre a fermentação ruminal, e observaram que quanto maior a concentração de metanol, menor a produção de propionato e maior a produção de butirato. Outros autores avaliaram *in vitro* a influência do metanol em diferentes proporções de adição sobre a fermentação ruminal, sendo obtida relação linear entre os crescentes níveis de metanol e a produção de CH₄ (CZERKAWSKI; BRECKENRISE, 1971; POL; DEMEYER, 1987). Segundo Moss; Jouany; Newbold (2000) tanto o acetato, como o butirato estão envolvidos na produção de hidrogênio e, portanto, consequente produção de metano. Diante do exposto, é possível que os níveis de metanol presentes nas dietas, independente da presença de glicerina bruta tenha contribuído para maior produção de metano.

Conforme discutido anteriormente, houve aumento na PGT para os níveis de glicerina comparados ao controle, entretanto, o fator de partição apresentou efeito negativo (Figura 5.3.).

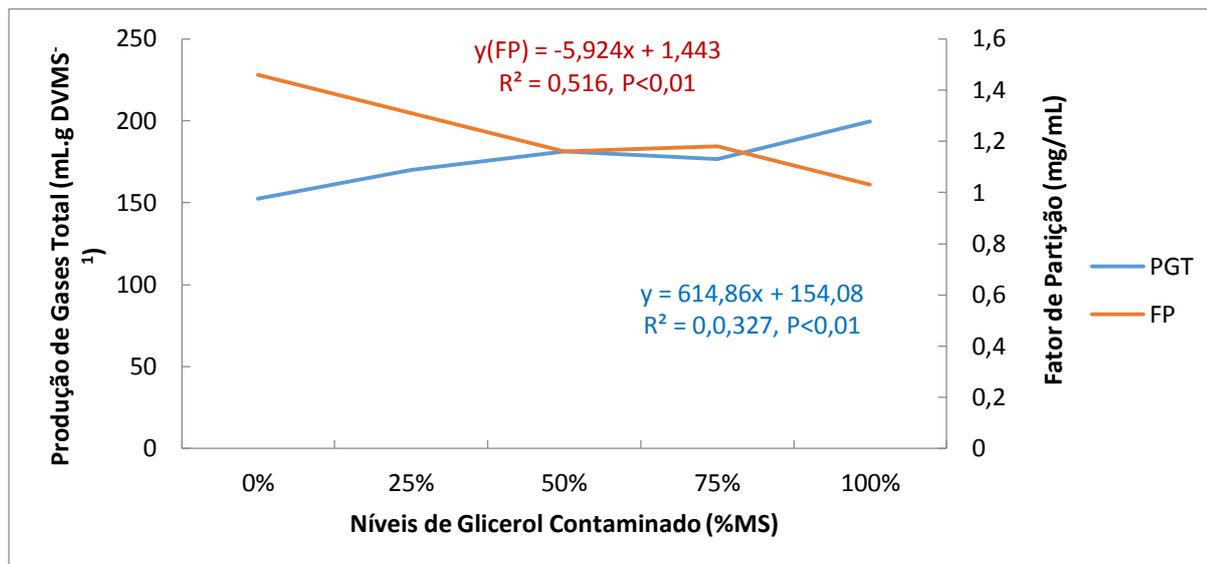


Figura 5.3 – Relação ente a Produção de gases total (PGT) e o Fator de partição (FP) em função dos níveis de glicerina contendo metanol (%MS)

A variável “fator de partição”, entretanto, indica a eficiência da síntese proteica microbiana a partir da relação entre a DMO e PGT (MAKKAR, 2010).

A redução do FP pode ter estar relacionada com a associação crescente de glicerina e metanol, tendo em vista a redução no FP à medida que a glicerina bruta e o metanol foram aumentados, evidenciando menor eficiência na síntese de proteína microbiana. Altas concentrações de metanol podem apresentar toxicidade aos microrganismos (STYLER, 1976), entretanto, seus efeitos ainda não são bem conhecidos (WINSKO et al., 2011). É possível que a associação da glicerina bruta com o metanol possa interferir na síntese proteica de massa microbiana. Contudo, é necessária a avaliação de outros parâmetros da fermentação ruminal como AGCC e PCR para confirmar a hipótese do efeito da glicerina bruta contaminada com metanol sobre a fermentação ruminal.

5.10. Conclusão

As dietas contendo maiores níveis de glicerina bruta aumentaram a DMO e a PGT, possivelmente por apresentar menores teores de ácidos graxos insaturados, e portanto, menor toxicidade para os microrganismos.

O aumento na produção de CH₄ pode estar associado aos maiores níveis de metanol presente nas dietas. Em relação à redução na síntese de proteína microbiana, o sinergismo entre a glicerina bruta e o metanol pode ter influenciado negativamente nesta produção. No entanto, mais estudos são necessários para investigar essa variável em função da glicerina bruta contaminada com metanol residual da produção do biodiesel.

Referências

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the AOAC**. 16. ed. Arlington: AOAC International, 2011. v. 1, p. 4-1.

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, p. 95-105, 2005.

BLUMMEL, M.; STEINGASS, H.; BECKER, K. The partitioning of in vitro fermentation products and its bearing of voluntary feed intake. **Proceedings of the Society of Nutrition Physiology**, Hoboken, v. 3, p. 123-123, 1994.

CZERKAWSKI, J. W.; BRECKENRIDGE, G. Fermentation of various glycolytic intermediates and other compounds by rumen micro-organisms, with particular reference to methane production. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 27, p. 131-146, 1972.

CHUNG, Y. H.; RICO, D. E.; MARTINEZ, C. M.; CASSIDY, T. W.; NOIROT, V.; AMES, A.; VARGA, G. A. Effects of feeding dry glycerin to early postpartum holstein dairy cows on lactational performance and metabolic profiles. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, p. 5682–5691, 2007.

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

FANCELLI, A. L.; LIMA, U. de A. **Milho**. Produção. Pré-processamento e transformação agroindustrial. São Paulo: Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, 1981. 112 p. (Série Extensão Agroindustrial, 3).

FDA. **Code of Federal Regulations**. Title 21, v. 6, CFR573.640, 2014. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=573.640>>. Acesso em: 16 jan. 2015.

GARCIA-LOPEZ, P. M.; KUNG JUNIOR, L.; ODOM, J. M. *In vitro* inhibition of microbial methane production by 9,10-anthraquinone. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 74, p. 2276-2284, 1996.

GENTHNER, B. R. S.; DAVIS, C. L.; BRYANT, M. P. Features of rumen and sewage sludge strains of *Eubacterium limosum*, a methanol- and H₂-CO₂-utilizing species. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 42, n. 1, p. 12-19, 1981.

HAAG, E. Glycerin: Beef industry's new corn? **Angus Journal**, St. Joseph, p. 330-333, oct. 2007.

JENKINS, T. C. Lipid metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, p. 3851-3863, 1996.

KREHBIEL C.R.; Ruminal and physiological metabolism of glycerin. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 86, E-Suppl. 2, p. 392, 2008. Abstract.

LAMMERS, P. J.; KERR, B. J.; WEBER, T. E.; DOZIER, W. A.; KIDDS, M. T.; BREGENDHAL, K.; HONEYMAN, M. S. Digestible and metabolizable energy of crude glycerol for growing pigs. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 86, n. 3, p. 602-608, 2008.

LEONETI, A. B.; ARAGAO-LEONETI, V.; BORGES de OLIVEIRA, S. V. W. Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: alternatives for the use of unrefined glycerol. **Renewable Energy**, Amsterdam, v. 45, p. 138-145, 2012.

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. 1223, p. 62-65, 2006.

MAKKAR, H. P. S. *In vitro* screening of feed resources for efficiency of microbial protein synthesis. In: VERCOE, P. E.; MAKKAR, H. P. S.; SCHLINK, A. C. (Ed.). ***In vitro* screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: nuclear and related methodologies**. Dordrecht: Springer, 2010. cap. 7, p. 107-144.

MEALE, S. J.; MCALLISTER, T. A.; BEAUCHEMIN, K. A.; HARSTAD, O. M.; CHAVES, A. V. Strategies to reduce greenhouse gases from ruminant livestock, **Acta Agriculturae Scandinavica, Section A — Animal Science**, Oxon, v. 62, n. 4, p. 199-211, 2012.

MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 85, p. 1217-1240, 2002.

MOSS, A. R.; JOUANY, J.; NEWBOLD, J. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. **Annales de Zootechnie**, Paris, v. 49, p. 231-253, 2000.

PAES, M. C. D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. (Circular Técnica, 75). 6 p. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/2006/circular/Circ_75.pdf>. Acesso em: 18 jan. 2015.

PALMQUIST, D. L.; MATTOS, W. R. S. Metabolismo de lipídeos. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2011.

POL, A.; DEMEYER, D. I. Fermentation of methanol in the sheep rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 54, n. 3, p. 832-834, 1988.

ROBERTSON, J. B.; VAN SOEST, P. J. The detergent system of analysis and its application to human foods. In: JAMES, W. P. T.; THEANDER, O. (Ed.). **The analysis of dietary fiber in food**. New York: Marcel Dekker, 1981. chap. 9, p. 123-158.

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

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.

SOLTAN, Y. A.; MORSY, A. S.; SALLAM, S. M. A.; LOUVANDINI, H.; ABDALLA, A. L. Comparative in vitro evaluation of forage legumes (prosopis, acacia, atriplex, and leucaena) on ruminal fermentation and methanogenesis. **Journal of Animal and Feed Sciences**, Jabłonna, v. 21, p. 759-772, 2012.

STYLER, L. L. Influence of acidosis on rumen function. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 43, p. 910-929, 1976.

TALEBI, A. F.; TABATABAEI, M.; CHISTI, Y. BiodieselAnalyzer: a user-friendly software for predicting the properties of prospective biodiesel. **Biofuel Research Journal**, Barking, v. 2, p. 55-57, 2014.

WINSKO, K. N.; KENNEY, N. M.; DITTMAR, R. O.; COVERDALE III, J. A.; SAWYER, J. E.; WICKERSHAM, T. A. Effect of methanol infusion on intake and digestion of a grain-based diet by beef cattle. In: THE PLAINS NUTRITION COUNCIL, SPRING CONFERENCE, 2011, Amarillo, Texas. Amarillo, TX: The Plains Nutrition Council, 2011.

YANG, F.; HANNA, M. A.; SUN, R. Value-added uses for crude glycerol—a byproduct of biodiesel production. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 5, n. 1, p. 13-23, 2012.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A adaptação e otimização na etapa de homogeneização do metanol, e a validação do método proporcionaram boas condições para a análise de metanol em glicerina bruta obtida na produção do biodiesel, tanto industrialmente, como laboratorialmente. Para a análise na matriz ração utilizada na alimentação de ruminantes, são necessárias adequações na quantidade de amostra utilizada na etapa de extração, além da validação do método. O aumento na produção de metano observado no ensaio de produção de gases *in vitro* pode estar relacionado aos maiores níveis de metanol contidos na glicerina bruta. A associação de maiores níveis de metanol com maiores níveis de glicerina bruta podem ter influenciado negativamente a síntese de proteína microbiana, entretanto, são necessários mais estudos para confirmar essa hipótese.