

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

WILIAN DOS SANTOS DA COSTA

**Potencial nutricional dos coprodutos das sementes oleaginosas do
setor de bioenergia na substituição do farelo de soja e do milho
para a segurança alimentar e sustentabilidade da produção de
pequenos ruminantes**

Piracicaba

2019

WILIAN DOS SANTOS DA COSTA

**Potencial nutricional dos coprodutos das sementes oleaginosas do
setor de bioenergia na substituição do farelo de soja e do milho
para a segurança alimentar e sustentabilidade da produção de
pequenos ruminantes**

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: Energia Nuclear na
Agricultura e no Ambiente**

Orientador: Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla

Piracicaba

2019

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)

Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Costa, Wilian dos Santos da

Potencial nutricional dos coprodutos das sementes oleaginosas do setor de bioenergia na substituição do farelo de soja e do milho para a segurança alimentar e sustentabilidade da produção de pequenos ruminantes / Wilian dos Santos da Costa; orientador Adibe Luiz Abdalla. - - Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2019.

110 p. : il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, 2019.

1. Crescimento populacional 2. Efeito estufa 3. Energia de biomassa 4. Metabólitos secundários 5. Pecuária de corte 6. Plantas oleaginosas 7. Produção animal 8. Resíduos de combustível 9 Suplementos proteicos para animais I. Título.

CDU 591.133.11 : 628.4.038

Elaborada por:

Marília Ribeiro Garcia Henyei

CRB-8/3631

Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

Ao meu pai, Josinaldo; a minha mãe, Darci (*in memoriam*); e a minha irmã, Amanda, por estarem presentes em todos os momentos oferecendo amor e incentivo.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela vida, pela saúde, por todo o cuidado e suporte, me guiando em todos os momentos.

A minha família por todo o suporte, dedicação, amor e educação. Por sempre estarem presentes e não desanimarem diante as batalhas que a vida nos proporcionou, ao lado de vocês tudo foi mais fácil!

Aos meus familiares e amigos, por toda contribuição na construção de minhas conquistas direta ou indiretamente.

Ao Dr. Pedro M.E. Villar e toda equipe médica do Hospital de Clínicas da Unicamp, a todos os funcionários, a equipe da enfermagem e todos os profissionais da saúde pelo acolhimento e dedicação para que eu pudesse continuar a minha caminhada, muito obrigado!

Ao professor Dr. Adibe Luiz Abdalla, por me acolher e me orientar, por todo o conhecimento proporcionado e toda a dedicação durante minha caminhada acadêmica.

Ao professor Dr. Helder Louvandini, por todo o conhecimento proporcionado e por toda ajuda oferecida para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço aos funcionários do Laboratório de Nutrição Animal (LANA), Maria Regina S. R. Peçanha, Lécio Aparecido Castilho, Karinna Scotton e Francisco da Silva, por todo auxílio prestado, muito obrigado!

Aos colegas do laboratório, Adibe Luiz Abdalla Filho, Alessandra C. Romero, Aline M. Schumann, Ana Maria Krüger, Beatriz E. Bizzuti, Camila Chaves, Carolina Jimenez, Clara Quiróz, Efraim Arteaga, Egon I. Ieda, Emiliana Romagnoli, Fabio Pinese, Felipe Ortiz, Fernando Vivas, Gabriel Z. Sakita, Linander Campos, Murilo Fernandes, Patricia Louvandini, Patricia Righetto, Paulo M.T. Lima, Pierre Crouzoulon, Tairon Panunzio, Simón Pérez, Thiago F. Bompadre e Vagner Ovani.

Aos estagiários, alunos de iniciação e pré iniciação científica do LANA, Alais Oliveira, Ayrton Soares, Felipe da Silva, Frederico da Silva, Gabriel Stefani, Gabriela de Jesus, Gustavo Severiano, Jhonatan Valeriano, João Pedro Bortoleto, Mayara Ikeda, Nicolas Diehl, Rafael Cesar, Rafael Sevija, Rafaela Torresan, Renan Cunha, Tássio Martins, Victor Massaki, Virgílio Esteves, Vitor Burjato, Thainá Graciano, Theo Almeida e Weidy Alves.

Agradeço a todos os membros da Comissão de Pós-Graduação por toda a dedicação e auxílio prestado durante a realização do programa.

Agradeço ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura e a Universidade de São Paulo pela oportunidade de crescimento acadêmico proporcionado através de toda a infraestrutura para pesquisa e todo o corpo docente que contribuiu para que este trabalho pudesse ser realizado.

Muito obrigado!

*Wheels within wheels
in a spiral array
a pattern so grand and complex.*

*Time after time
we lose sight of the way
our causes can't see their effects.*

*Science, like nature
must also be tamed
with a view towards its preservation,
given the same
state of integrity
it will surely serve us well!*

Neil Peart, 1980.
“Natural Science”, faixa nº 6 do álbum “Permanent Waves” da banda canadense “Rush”.

RESUMO

COSTA, W. S. **Potencial nutricional dos coprodutos das sementes oleaginosas do setor de bioenergia na substituição do farelo de soja e do milho para a segurança alimentar e sustentabilidade da produção de pequenos ruminantes.** 2019. 110 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.

A população mundial deverá atingir a marca de 9 bilhões de habitantes até a metade do século XXI, trazendo como consequência a elevação da demanda por alimentos. Evitar o uso de culturas para fins que não a alimentação humana, é uma estratégia para elevar a oferta de alimentos. As tortas e farelos gerados como coprodutos apresentam potencial para substituir o milho e a soja, fornecendo uma alternativa favorável à segurança alimentar. Neste sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial nutricional de alguns coprodutos e seus efeitos sobre a fermentação entérica de ruminantes. O primeiro ensaio foi realizado avaliando os farelos de, algodão (ALG), canola (CAN), girassol (GIR), e soja (CON, como tratamento controle), e as tortas de, macaúba (MAC), mamona (MAM), nabo forrageiro (NF), pinhão manso (PM), utilizando a técnica *in vitro* de produção de gases, assim como 3 dietas utilizando coprodutos, Dieta1 (60% feno de Tifton (FT), 30% GIR e 10% milho desintegrado (MD)), Dieta2 (60 % FT, 18% GIR, 16% MD e 6% ALG) e DietaCON (60% FT, 30% MD e 10% farelo de soja (FS)), para determinar a degradabilidade e a cinética fermentativa. Os tratamentos PM e MAM obtiveram menor performance fermentativa, diferentemente de CAN e NF, com degradabilidade similar a CON, e não foram observadas diferenças para a produção de metano entérico (CH₄). A DietaCON foi superior as demais dietas; a Dieta 2 obteve melhor rendimento comparada a Dieta 1 Os resultados foram positivos e demonstraram a possibilidade de substituição do milho e da soja. O segundo ensaio teve por objetivo avaliar a digestibilidade aparente, balanço energético e proteico e emissão de CH₄ em dieta utilizando coproduto na substituição a MD e FS. Duas dietas foram elaboradas na proporção 60% volumoso (Tifton 85, *Cynodon ssp.*) e 40% concentrado. Dieta com concentrado com coproduto (Dieta CPDT: 45% farelo GIR, 40% MD e 15% farelo ALG), e Dieta com concentrado controle (Dieta CON: 70% MD e 30% FS). Foram utilizados 7 carneiros, da raça Santa Inês, machos, com peso vivo (PV) médio de 63 ± 7,6 kg, em 2 períodos experimentais de 21 dias. As dietas (2 % PV) foram fornecidas em dois períodos, o sal mineral somente na refeição da tarde e a água fornecida *ad libitum*. Os animais ficaram em adaptação às dietas por 13 dias, então transferidos para gaiolas de metabolismo para o ensaio de digestibilidade (5 dias) e em câmara para troca de gases para quantificação do CH₄ produzido (3 dias). Não foram encontradas diferenças para o balanço energético e proteico, e todos os parâmetros fermentativos com exceção na produção de acetato,

butirato, produção total de ácidos graxos de cadeia curta, e a digestibilidade da matéria seca e orgânica, com a Dieta CON superior em todas as observações. No entanto, as emissões de CH₄ não foram significativamente diferentes entre as dietas testadas. A substituição de alimentos tradicionais por coprodutos do biodiesel mostrou-se satisfatória, não sendo observados efeitos negativos sobre os parâmetros fermentativos.

Palavras-chave: Crescimento populacional. Nutrição animal. Metano.

ABSTRACT

COSTA, W. S. **Nutritional potential of oilseeds co-products from the bioenergy sector in replacing soybean meal towards food security and sustainability of small ruminant production.** 2019. 110 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.

World population growth must reach 9 billion inhabitants until the half of XXI century, as consequence food demand is increasing. Avoiding the use of human edible food other than human feed is one of the strategies to increase food supply. Cakes and meals generated as a coproduct of biodiesel production has shown potential as replacement for corn and soybean, presenting a favorable alternative towards food security. In these sense, the aim of this work was to evaluate the nutritional potential of biodiesel coproducts and their effects on enteric fermentation by ruminants. First assay was performed assessing cottonseed (CS), rapeseed (RS), sunflower seed (SF), and soybean (CON, as control treatment) as meal, and macaw palm fruit (MP), castor bean (CB) radish seed (RD) jatropha seed (JS) as cake, all submitted to in vitro gas production technique, as well as 3 diets containing coproduct, Diet1 (60% Tifton hay (TH), 30% SF and 10% disintegrated corn (DC)), Diet2 (60% TH, 18% SF, 16% DC and 6% CS) and DietCON (60% TH, 30% DC and 10% soybean meal (SM)), for determine degradability and fermentative kinetics. JS and CB presented lower fermentative performance, differently to RS and RD, whose degradability was similar to CON, and differences were not observed for enteric methane production (CH₄). DietCON was superior to other ones; Diet2 had a better performance compared to Diet1. These were interesting results and showed that's possible to replace corn and soybean. The second assay aimed to evaluate apparent digestibility, energy and protein balance, and CH₄ production in diets using coproducts as replacement for DC and SM. Two diets were formulated at the proportion 60% roughage (Tifton 85 hay, *Cynodon ssp*) 40% concentrate. Diet CPDT (45% of SF, 40% of DC and 15% of CS) and Diet CON (70% of DC and 30% of SM). Seven male Santa Ines sheep, with body weight (BW) average of 63 kg \pm 7.6, were used in two experimental periods of 21 days. The diets were offered (2% BW) twice a day, mineral salt only in the afternoon and water *ad libitum*. The animals were kept for adaptation to diet for 13 days, then moved to metabolism cages for apparent digestibility assay (5 days) and then in gases exchange chamber for CH₄ production quantification (3 days). No differences were observed for energetic and protein balance, and all fermentative parameters between experimental diets, except acetate, butyrate, total short fatty chain acids production and digestibility of dry and organic matter, when Diet CON showed greater values. However,

CH₄ emissions were not significantly different. The replacement of traditional food by biodiesel coproducts was satisfying, with no negative effects observed upon ruminal fermentative parameters.

Keywords: Population growth. Animal nutrition. Methane.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Representação da reação de transesterificação utilizando metanol como álcool da reação e seus respectivos produtos.....	34
Figura 2.2 – Produção de biodiesel (B100) no Brasil entre os anos de 2005-2017 em metros cúbicos	37
Figura 2.3 – Número de famílias fornecedoras de matéria-prima para o PNPB entre os anos de 2008-2015	38
Figura 2.4 – Matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel entre os anos de 2016-2017	39
Figura 3.1 – Produção de gases e degradabilidade da matéria orgânica entre diferentes tratamentos e período de incubação.....	65
Figura 3.2 – Produção ácidos graxos de cadeia curta e relação acetato:propionato entre diferentes tratamentos e períodos de incubação.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Rendimento agrônomo, oleaginoso de culturas com potencial para produção de biodiesel e conteúdo proteico do coproduto da extração de óleo	42
Tabela 3.1 – Composição bromatológica dos coprodutos avaliados no ensaio <i>in vitro</i> de produção de gases	57
Tabela 3.2 – Composição centesimal e bromatológica do feno, dietas experimentais e dieta controle	58
Tabela 3.3 – Produção de gases e degradabilidade dos coprodutos do biodiesel	64
Tabela 3.4 – Produção de gases e degradabilidade de dietas experimentais	67
Tabela 3.5 – Parâmetros fermentativos dos coprodutos do biodiesel e produção de ácidos graxos de cadeia curta	69
Tabela 3.6 – Parâmetros fermentativos das dietas experimentais e produção de ácidos graxos de cadeia curta	71
Tabela 4.1 – Composição centesimal e bromatológica do feno e dietas experimentais	86
Tabela 4.2 – Consumo e digestibilidade aparente de nutrientes, e ingestão de água para ovinos suplementados com dieta composta por coprodutos do biodiesel e controle	95
Tabela 4.3 – Balanço do nitrogênio disponível na dieta por ovinos suplementados com dieta composta por coprodutos do biodiesel e controle	96
Tabela 4.4 – Excreção de derivados de purina na urina e absorção de nitrogênio microbiano por ovinos suplementados com dieta composta por coprodutos do biodiesel e controle	97
Tabela 4.5 – Balanço energético e emissão de metano por ovinos suplementados com dieta composta por coprodutos do biodiesel e controle	98
Tabela 4.6 – Parâmetros fermentativos no líquido ruminal de ovinos suplementados com dieta composta por coprodutos do biodiesel e controle	99
Tabela 4.7 – Ingestão de gossipol total por ovinos suplementados com dieta contendo farelo de algodão	99

LISTA DE ABREVIações

°C	Graus célsius
µL	Microlitro
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AGCCt	Ácidos graxos de cadeia curta totais
ALG	Farelo de algodão
B2	Diesel com 2% de biodiesel em sua composição
BX	Diesel com 10% de biodiesel em sua composição
C2	Acetato
C2:C3	Relação acetato/propionato
C3	Propionato
C4	Butirato
CAN	Farelo de canola
CEL	Celulose
CH ₂ O	Consumo de água
CH ₄	Metano
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMO	Consumo de matéria orgânica
CMS	Consumo de matéria seca
CPB	Consumo de proteína bruta
CO ₂	Dióxido de carbono
COFINS	Contribuição para o financiamento da seguridade social
CON	Tratamento controle
d	Dia
DAP	Declaração de aptidão ao PRONAF
DE	Digestibilidade da energia
Dieta CON	Dieta controle
Dieta CPDT	Dieta coproduto
DFDN	Degradabilidade da fibra em detergente neutro
DgMO	Digestibilidade de matéria orgânica
dL	Decilitro

DMO	Degradabilidade da matéria orgânica
DMS	Digestibilidade de matéria seca
DP	Derivados de purina
DPB	Digestibilidade da proteína bruta
EB	Energia bruta
EBC	Energia bruta consumida
EBCH4	Energia bruta do metano produzido
ED	Energia digestível
EE	Extrato etéreo
EM	Energia metabolizável
EPM	Erro padrão da média
ETC	Exposição total corpórea
FDA	Fibra em detergente ácido
FDN	Fibra em detergente neutro
FID	Detector por ionização de chama
FP	Fator de partição
FS	Farelo de soja
FT	Feno de tifton
g	gramas
GIR	Farelo de girassol
GL	Gossipol livre
GP	Produção total de gases
GT	Gossipol total
H	Hora
H ₂	Di-hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácidos sulfúrico
ha	Hectare
HM	Hemicelulose
IMD	Ingestão média diária
IT	Ingestão total
kcal	Quilocalorias
kg	Quilograma
L	Litro
LIG	Lignina

m	Metro
MAC	Torta de macaúba
MAM	Torta de mamona
MD	Milho desintegrado
MF	Matéria fresca
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
MM	Matéria mineral
mmol	Milimol
MO	Matéria orgânica
MOC	Matéria orgânica consumida
MOVD	Matéria orgânica verdadeiramente degradada
MS	Matéria seca
MSC	Matéria seca consumida
N	Normalidade
N ₂	Di-nitrogênio
N ₂ O	Óxido nitroso
N-NH ₃	Nitrogênio amoniacal
NA ₂ SO ₃	Sulfito de sódio
NetCH ₄	Produção líquida de metano
NetGP	Produção líquida de gases
N _{excretado}	Nitrogênio excretado
NF	Torta de nabo forrageiro
N _{fezes}	Nitrogênio excretado nas fezes
NIDN	Nitrogênio insolúvel em detergente neutro
N _{ingerido}	Nitrogênio ingerido
NMforn	Nitrogênio fornecido
NM/Ntotal	Relação entre nitrogênio microbiano e nitrogênio total
N _{retido}	Nitrogênio absorvido
N _{retido} /N _{ingerido}	Razão de absorção do nitrogênio
N _{urina}	Nitrogênio excretado na urina
OVEG	Programa de óleos vegetais

PASEB	Programa de Formação do Patrimônio do Servidor Público
PB	Proteína bruta
Perda ED	Energia digestível perdida via produção de metano entérico
PG24	Produção de gases em 24 horas
PG48	Produção de gases em 48 horas
PGCP	Produção de gases dos coprodutos
PGDT	Produção de gases das dietas
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Período de incubação
PIS	Programa de integração social
PM	Torta de pinhão manso
PMabs	Proteína microbiana absorvida
PNPB	Programa nacional de produção e uso de biodiesel
PRONAF	Programa nacional de fortalecimento da agricultura familiar
PROÓLEO energéticos	Programa nacional de produção de óleos vegetais para fins energéticos
PSI	Libra por polegada quadrada
PTFE	Politetrafluoretileno
PV	Peso vivo
RenovaBio	Política nacional de biocombustíveis
SCS	Selo combustível social
S10	Diesel com baixo teor de enxofre
Total N _{forn}	Total de nitrogênio fornecido
Trat	Efeito de tratamento
Trat*PI	Efeito da interação entre tratamento e período de incubação

SUMÁRIO

1	Introdução	23
1.1	Hipóteses	24
1.2	Objetivos	25
2	Produção Sustentável: Integração Energia e Alimento	27
2.1	Crescimento populacional e suas implicações	27
2.1.1	Fundamentos da Segurança alimentar	28
2.1.2	Desenvolvimento sustentável e promoção da segurança alimentar	30
2.2	O uso de Biodiesel como fonte renovável	32
2.2.1	Transesterificação, o processo que dá origem ao Biodiesel	33
2.2.2	Políticas públicas para produção de biodiesel no Brasil	35
2.2.3	Produção brasileira e a diversificação de fontes oleaginosas	36
2.3	Ruminantes e promoção da segurança alimentar	39
2.3.1	Coprodutos do biodiesel e o uso na nutrição de ruminantes	41
3	Características Nutricionais e Cinética Fermentativa In Vitro de Coprodutos do Biodiesel em Dietas Experimentais para Ovinos	52
3.1	Introdução	54
3.2	Material e métodos	55
3.2.1	Extração de óleo de pinhão manso	55
3.2.2	Extração de óleo mamona	56
3.2.3	Preparo das amostras	56
3.2.4	Preparo e moagem da torta de Mamona	56
3.2.5	Análise bromatológica	57
3.2.6	Elaboração das dietas	58
3.2.7	Produção de gases <i>in vitro</i>	58
3.2.7.1	Degradabilidade da matéria orgânica (DMO)	60
3.2.7.2	Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)	61
3.2.7.3	Nitrogênio amoniacal (N-NH ₃)	61
3.2.7.4	Produção de metano	61
3.2.8	Análise estatística	62
3.3	Resultados	62
3.3.1	Degradabilidade de nutrientes e produção de gases	62

3.3.1.1	Coprodutos	62
3.3.1.2	Dietas experimentais.....	65
3.3.2	Parâmetros fermentativos e produção de ácidos graxos	68
3.3.2.1	Coprodutos	68
3.3.2.2	Dietas experimentais.....	71
3.4	Discussão.....	71
3.5	Conclusão	76
4	Digestibilidade, Balanço Energético e Produção de Metano por Ovinos Alimentados com Dieta Contendo Coprodutos do Algodão e Girassol em Substituição a Alimentos Convencionais	82
4.1	Introdução	84
4.2	Material e Métodos	85
4.2.1	Distribuição das Parcelas e Período de Adaptação	86
4.2.2	Digestibilidade Aparente.....	87
4.2.3	Metano entérico	89
4.2.4	Colheita de Líquido Ruminal	90
4.2.5	Balanço de energia.....	92
4.2.6	Extração de Gossipol livre em Farelo de Algodão	93
4.2.7	Extração de Gossipol total em Farelo de Algodão	93
4.2.8	Deteção e Quantificação de Gossipol em Farelo de Algodão.....	93
4.2.9	Cálculo de ingestão de Gossipol.....	94
4.2.10	Análise estatística.....	94
4.3	Resultados	95
4.4	Discussão.....	100
4.5	Conclusão	104
5	Considerações finais.....	109

1 Introdução

Desde o início do século XXI o crescente aumento da população mundial, cujas estimativas preveem o aumento de 2 bilhões de habitantes até 2050, tem imposto como desafio à sociedade garantir o suprimento da crescente demanda por alimentos e energia. Devido à disposição finita de terras agricultáveis e a necessidade em conservar os ecossistemas para manutenção do planeta, a expansão agrícola deixa de ser a principal resposta para elevar a oferta de alimentos, e novas estratégias passam a ser abordadas.

Reduzir os desperdícios gerados pela indústria alimentícia e o uso de alimentos como matéria-prima em processos industriais que não tenham como finalidade a alimentação, podem promover a elevação na oferta de alimentos sem a necessidade em explorar novas áreas.

Assim como a demanda por alimentos, a demanda energética também aumentará. Devido à natureza finita do petróleo e o seu longo ciclo para renovação, mantê-la como a principal fonte energética para o abastecimento energético do planeta trará uma rápida redução aos estoques das reservas. Em um cenário onde o descobrimento de novas reservas representa uma probabilidade baixa, a exploração de fontes renováveis de energia deverá ser a abordagem para atender as implicações do crescimento populacional previsto.

No entanto, boa parte da produção de biocombustíveis na atualidade é oriunda de culturas alimentares, o que caminha em direção oposta aos ideais traçados para elevar a oferta de alimentos. Neste contexto, a indústria de bioenergia deverá elevar o rendimento de seu sistema para que seja possível gerar mais energia sem elevar o uso de alimentos. Outra estratégia é buscar diferentes culturas que não promovam esta competição, o que poderia elevar significativamente a disponibilidade dos alimentos.

Da mesma forma, a produção animal também representa parte da competição, pois a base nutricional de muitos sistemas é pautada no uso de culturas como o milho e a soja. Alguns setores da produção animal possuem maior flexibilidade para reduzir o consumo destas culturas. Animais ruminantes, por exemplo, possuem a capacidade de transformar alimentos fibrosos de baixo valor nutricional para humanos, e culturas não utilizadas na nutrição humana, em alimento

de alto valor nutricional, como a carne e o leite. Portanto, com as implicações impostas pelo crescimento populacional previsto, novas rotas deverão ser estabelecidas dentro de cada sistema para que seja possível produzir mais insumos sem a promoção da competição pela mesma matéria-prima entre os diferentes setores.

O biodiesel é um dos biocombustíveis de grande interesse na atualidade, devido à grande flexibilidade em sua produção, podendo ser originado a partir de várias fontes oleaginosas, de origem vegetal ou até mesmo de gorduras animais. Já é de conhecimento a sua produção a partir de culturas não comestíveis. No entanto, a produção brasileira é majoritariamente pautada sobre matérias-primas de origem alimentícia.

Visando mitigar os efeitos gerados por esta competição, alguns coprodutos gerados durante o processo de extração dos óleos (tortas e farelos), apresentam características que permitiriam seu uso como fonte proteica e energética, podendo substituir alguns alimentos atualmente empregados na nutrição de ruminantes. Neste sentido, comprovada sua eficiência, a introdução destes coprodutos como fonte alimentar na produção animal atenderia aos interesses da sociedade, promovendo a segurança alimentar de forma mais sustentável.

1.1 Hipóteses

A substituição de milho e soja na dieta por coprodutos do biodiesel tais quais, tortas e farelos, podem fornecer teores satisfatórios de energia e proteína em atenção aos teores preconizados na literatura, com respostas desejáveis para os parâmetros fermentativos, sem comprometer o consumo voluntário, com boa digestibilidade, e sem causar efeitos clínicos negativos.

O comportamento dos coprodutos deverá ser similar a alimentos tradicionais, e não deverão comprometer a capacidade de degradação exercida pela comunidade microbiana, assim como seu crescimento. O aporte de nutrientes deverá ser satisfatório em qualidade e quantidade para o bom funcionamento do sistema fermentativo.

1.2 Objetivos

Determinar o potencial nutricional dos farelos de algodão, canola, girassol e soja, e das tortas de macaúba, mamona, nabo forrageiro e pinhão manso, os principais coprodutos gerados pela indústria produtora de biodiesel, bem como os efeitos sobre a degradabilidade e parâmetros da cinética fermentativa entérica através de ensaios in vitro.

Determinar a digestibilidade aparente dos nutrientes, o balanço energético e proteico, efeitos sobre os parâmetros fermentativos, e as emissões de metano em dietas formuladas com o uso de coprodutos do biodiesel em substituição total a soja e parcial do milho através de ensaios in vivo.

2 Produção Sustentável: Integração Energia e Alimento

2.1 Crescimento populacional e suas implicações

Dentre os grandes desafios para o século XXI está a capacidade em atender à demanda por alimentos e à energia a ser gerada pela elevação da população global para 9 bilhões de habitantes, projetada para ocorrer até a metade do século (ERICKSEN; INGRAM; LIVERMAN, 2010; BRIDGE et al., 2018). No cenário atual a produção total de alimentos é superior à demanda (SCHANES; STAGL, 2019), no entanto a má distribuição e o desperdício permitem que, aproximadamente, 821 milhões de pessoas estejam na linha da desnutrição, tendo insatisfatórios os níveis de ingestão de macro ou micronutrientes (FAO, 2018).

De acordo com Mottet et al. (2018) o desenvolvimento tecnológico, a elevação da renda familiar e a capacidade migratória estão diretamente ligados ao crescimento populacional. Assim como o crescimento populacional eleva a demanda por itens de subsistência, o desenvolvimento econômico promove aquisição de recursos tecnológicos, o que aumenta a demanda por bens de consumo, acelera a indústria e demanda mais recursos energéticos (CHU; MAJUMDAR, 2012; LIEDER; RASHID, 2016).

Entre a revolução industrial e o início do século XXI, a população mundial cresceu em 7 vezes seu número inicial, com aceleração da taxa de crescimento em 2% ao ano a partir da segunda metade do século XX, desacelerando para 1,1% somente no início da atual década (LEE, 2011). Para Foley et al. (2005), a alta demanda por alimentos foi atendida devido ao desenvolvimento agrônomo conhecido como “revolução verde”, cujo desenvolvimento de cultivares de alto rendimento, aplicação de fertilizantes, implantação de irrigação, mecanização, controle de pragas e a exploração de novas áreas agricultáveis elevaram a produtividade no campo. Desde então a produção mundial de alimentos aumentou 145% entre 1960 e a virada do século, com destaque para América Latina e Ásia com 200 e 280% de aumento, respectivamente (EVENSON; GOLLIN, 2003; PRETTY, 2008).

Para o mesmo período a demanda energética global sofreu grande elevação. O consumo de energia primária passou de 50 gigajoules per capita, para 530 exajoules (equivalente a $5,3 \times 10^{11}$ gigajoules) (WILSON; GRUBLER, 2011), a qual foi atendida de forma majoritária por combustíveis fósseis (86%), sendo carvão

mineral, gás natural e produtos petrolíferos as principais fontes energéticas exploradas (ABAS; KALAIR; KHAN, 2015).

O desenvolvimento econômico e tecnológico tem sido responsável pela elevação da qualidade de vida da sociedade, facilidade no acesso a recursos básicos e, principalmente, a elevação da expectativa de vida (CERVELLATI; SUNDE, 2005). No entanto, a massiva exploração de recursos naturais para alimentar o desenvolvimento tecnológico e populacional trouxe como ônus a elevação da temperatura média do planeta, mudanças no regime de chuvas, aumento na incidência de períodos de extrema seca e fenômenos naturais extremos, elevação na concentração dos gases de efeitos estufa, decréscimo na qualidade do ar, entre outros distúrbios climáticos, os quais são atribuídos em sua maioria aos produtos da queima de combustíveis fósseis e a mudanças no uso da terra (RAUPACH et al., 2007; KJELLSTROM; MCMICHAEL, 2013; WHEELER; VON BRAUN, 2013).

Logo, a expansão da produção agrícola deverá permear caminhos diferentes aos realizados no passado, uma vez que as mudanças climáticas requerem cada vez mais a preservação de ecossistemas e florestas nativas, (GODFRAY et al., 2010; GODFRAY; GARNETT, 2014; MOTTET et al., 2018), portanto, diferentes alternativas deverão ser exploradas para que seja possível a expansão da produção de alimentos, cuja demanda poderá exigir o dobro da produção atual nos próximos 30 anos (FAO, 2018).

Do ponto de vista energético, a capacidade excedente da produção de petróleo (*spare capacity*), este parâmetro indica a capacidade de suprimento da demanda energética global para 30 dias, caso não fosse mais possível a extração de petróleo, a qual historicamente sempre obteve níveis crescentes, mas passou a cair, atingindo em 2003 o volume de 2,8% (AZADI et al., 2017), o que reforça a necessidade em gerenciar de forma eficiente os recursos de natureza finita (fontes não renováveis de energia), além da ampliação na exploração de recursos energéticos renováveis. Caso contrário novos cenários de desabastecimento poderão ocorrer (CHU; MAJUMDAR, 2012; GUO; SONG; BUHAIN, 2015).

2.1.1 Fundamentos da Segurança Alimentar

A existência da “segurança alimentar” é definida como a capacidade de todas as pessoas, em todos os momentos, terem acesso físico e econômico a alimento

seguro e nutritivo, em quantidades suficientes para atingir o aporte diário de nutrientes para uma vida ativa e saudável (FAO, 1996), fundamentada na disponibilidade, acessibilidade, utilidade e estabilidade dos recursos alimentares (ABORISADE; BACH, 2014).

Atribuir à indústria a maior fração possível do alimento cultivado favorece a ampliação da disponibilidade de alimentos. Por outro lado, a aplicação de culturas agrícolas em diferentes setores sem fins alimentares, perdas por ineficiência no processamento pela indústria de alimentos, desperdício por má conservação, transporte inadequado e a ocorrência de eventos climáticos extremos, atuam no sentido oposto (TILMAN et al., 2011; ALEXANDER et al., 2017). A redução da disponibilidade também influencia o preço dos alimentos pelo próprio mecanismo de demanda e oferta, restringindo não só de forma numérica, mas também econômica a acessibilidade ao alimento nas classes menos favorecidas da sociedade (ABORISADE; BACH, 2014).

A acessibilidade por sua vez é influenciada de forma direta pelos custos de produção e distribuição; logo a comercialização da produção a nível local favorece o acesso a alimentos mais frescos, nutricionalmente melhores e financeiramente viáveis a população, além de reduzir desperdícios ocasionados pelo transporte em longas distâncias (BUREAU; SWINNEN, 2018; STEPHENS; JONES; PARSONS, 2018).

O preço das *commodities* não sofreu grandes variações desde o período da expansão agrícola, com exceção a eventos pontuais tais qual a recessão econômica global ocorrida em 2008 e também o desabastecimento do petróleo em 1973 (GODFRAY et al., 2010). Segundo Piesse e Thirtle (2009) o petróleo atua diretamente no preço dos alimentos, uma vez que os implementos, insumos agrícolas e toda cadeia logística são dependentes do mesmo, ressaltando que a as quedas no preço do barril desde 2006, tem contribuído para disponibilidade, acessibilidade e manutenção no preço dos alimentos.

No entanto, além da disponibilidade e acesso, é de fundamental importância a boa utilização dos alimentos para que possam ser atingidos os níveis mínimos para a boa manutenção da saúde (MCCARTHY et al., 2018; PROSEKOV; IVANOVA, 2018). De acordo com a FAO (2018) o consumo de alimentos ultraprocessados e deficientes nutricionalmente tem promovido o efeito “fome oculta” no qual a deficiência na absorção de minerais e proteínas tem elevado a ocorrência de

anemia, o subdesenvolvimento de crianças e aumento na população obesa, além do efeito materno-descendente cuja deficiência nutricional é refletida na redução da qualidade do leite materno e tem elevado o número de recém-nascidos abaixo do peso ideal.

O último pilar é a estabilidade, a qual permeia entre a disponibilidade, acessibilidade e utilidade, onde o equilíbrio entre estes três pilares é o que garante o acesso de todos em todos os momentos (ABORISADE; BACH, 2014). Para tal é exigida a participação de políticas públicas que possam permitir a suplementação de bens essenciais à população, cuja produção regional seja insuficiente ou inexistente, assim como evitar o repasse de custos excepcionais (GODFRAY et al., 2010; BUREAU; SWINNEN, 2018).

2.1.2 Desenvolvimento sustentável e promoção da segurança alimentar

A extensão das áreas agrícolas ou a intensificação das áreas já existentes são alternativas discutidas para elevar a produção de alimentos (TILMAN et al., 2011), no entanto, promover mudanças no uso da terra e substituir áreas de mata nativa por agricultura não atende aos ideais ambientais, tidos como fundamentais para desacelerar as alterações climáticas já recorrentes (WHEELER; VON BRAUN, 2013).

Para o desenvolvimento agrícola sustentável são exigidas práticas que busquem a melhoria dos sistemas já existentes, que sejam capazes de elevar a produtividade sem o dispêndio de novas áreas, destinando áreas inexploradas a conservação ambiental e desenvolvimento urbano (LAMBIN; MEYFROIDT, 2011).

Embora a produção de alimentos tenha apresentado alta produtividade nas últimas quatro décadas, com produção superior a atual demanda (SCHANES; STAGL, 2019), é reconhecida a existência de áreas com baixa produtividade, onde a falta de acesso ao conhecimento, cultivares de alto rendimento, mecanização, manutenção do solo, aplicação correta de insumos, infraestrutura hídrica e recursos financeiros, acabam sendo determinantes para alta produtividade do sistema agrícola (GODFRAY et al., 2010).

De acordo com Cash et al. (2003) os desafios estabelecidos para o desenvolvimento sustentável devem ser pautados no conhecimento científico já estabelecido, e é necessário cada vez mais investimento em ciência e tecnologia para garantir longevidade aos recursos naturais. Deverá também ser amplamente

explorada a transferência do conhecimento acadêmico ao campo, a adoção de práticas fundamentadas no conhecimento científico promoverá melhores rendimentos em áreas ineficientes, garantindo maior produção e sustentabilidade do sistema (TILMAN et al., 2011).

Além da melhora na eficiência dos sistemas produtivos, reduzir a participação de alimentos como matéria-prima em processos industriais cujo produto final não tenha finalidade alimentar e substituí-los por culturas agrícolas que não sejam humanamente comestíveis, elevará a disponibilidade de alimentos (WEST et al., 2014). De acordo com Kummu et al. (2012) da produção total de alimentos, 66% são destinados a alimentação humana, no entanto, 16% são desperdiçados na própria cadeia de distribuição e não chegam ao consumidor, 6% são destinados a fins não alimentares, incluindo a produção de bioenergia e o restante é empregado na produção animal.

A produção de biocombustíveis de primeira geração, à base de alimentos, caminha em sentido oposto à segurança alimentar; diferentes culturas sem características alimentares têm sido exploradas para evitar a dependência por alimentos, uma vez que a disponibilidade deverá encolher nas próximas décadas (ATABANI et al., 2012). Além da exploração de diferentes culturas, a utilização de resíduos e descartes de diversos setores como matéria-prima para a geração de bioenergia, será capaz de estabelecer um paralelo positivo ao desenvolvimento sustentável, segurança energética e segurança alimentar (VIRMOND et al., 2012; MAMMA; CHRISTAKOPOULOS, 2014).

Diferentemente da produção de bioenergia, a produção animal oferece alimentos de alto valor nutritivo tais quais, carne, leite e ovos (compreendendo ruminantes e monogástricos), importantes fontes de minerais, aminoácidos essenciais e vitaminas do complexo B; elementos com alta biodisponibilidade na proteína animal e fundamentais para o desenvolvimento cognitivo e manutenção da saúde (ABBASPOUR; HURRELL; KELISHADI, 2014; PERIGNON et al., 2018). No entanto, a conversão alimentar, quantidade de quilocalorias (kcal) necessárias para geração de 1 kcal, é relativamente baixa (16:1 e 3:1, para carne bovina e aves, respectivamente) o que revela a necessidade em elevar a eficiência dos sistemas de produção para melhor aproveitamento dos recursos (CHEN et al., 2014).

Todo este cenário abre espaço para a integração de diferentes setores, diferentes cadeias deverão estabelecer relações para viabilizar a máxima exploração do potencial contido nos recursos naturais, promovendo o desenvolvimento sustentável (LE BLANC, 2015). Neste sentido, explorar todo o potencial de culturas já empregadas em setores competitivos à produção de alimentos, visando maior produtividade das cadeias e sempre que possível, oferecendo aplicações que possam auxiliar a segurança alimentar, passam a ser medidas fundamentais (JORDAN et al., 2007; KARMEE, 2016).

2.2 O uso de Biodiesel como fonte renovável

Com a crescente demanda por energia, diferentes fontes energéticas têm sido exploradas como alternativa aos combustíveis fósseis. Entre elas destaca-se o crescimento na produção de biodiesel (SINGH; SINGH, 2010), atribuído a sua versatilidade, podendo ser produzido por uma ampla gama de fontes oleaginosas (NIGAM; SINGH, 2011).

Estas fontes são divididas em duas categorias, as de primeira geração, compostas por culturas aplicáveis a alimentação humana sendo as principais, amendoim (*Arachis hypogaea* L.), colza (*Brassica napus*), gergelim (*Sesamum orientale*), girassol (*Helianthus annuus*), milho (*Zea mays*), palma (*Elaeis guineenses*) e soja (*Glycine max*), e as de segunda geração, compostas por sebos e gorduras viscerais de origem animal, óleo residual e de fritura, e plantas oleaginosas não comestíveis. Destacam-se, algodão (*Gossypium spp.* L.), babaçu (*Orrbygnya speciosa*), macaúba (*Acrocomia aculeata*), mamona (*Ricinus communis*), nabo forrageiro (*Raphanus sativus*), pinhão manso (*Jatropha curcas*) e sésamo (PALMERI; CAVALLARO, 2010; ATABANI et al., 2013; BART; KNOTHE; RAZON, 2017).

Dos custos totais para produção de biodiesel estima-se que 75% estejam diretamente ligados a aquisição da matéria-prima, fatores tais quais, a produção em larga escala, alta mecanização, logística estabelecida, garantia de abastecimento, e a capacidade de armazenamento sem perda de qualidade, contribuem para redução dos custos. O que explica a produção majoritária de biodiesel a partir de oleaginosas de primeira geração (ATABANI et al., 2012; MARWAHA et al., 2018).

Além de características agrônômicas, parâmetros físico-químicos são fundamentais na escolha da matéria-prima. As oleaginosas com alta viscosidade e excesso de ácidos graxos saturados, exigem o acréscimo de processos industriais, o que encarece os custos e reduz a competitividade do biodiesel (PINZI et al., 2009; PINZI; PILAR DORADO, 2012).

Com base no uso massivo de oleaginosas do gênero alimentício surge o conceito de biorefinaria, o qual procura estabelecer soluções que contribuam para geração de novos recursos (bens de valor agregado) utilizando os resíduos da produção (proteínas, carboidratos, lipídeos e etc.) como matéria-prima para produção de químicos, suplementos, combustível, materiais estruturais, entre outros, procurando estabelecer um processo análogo ao da cadeia petrolífera (CHERUBINI, 2010).

Portanto, não só a diversificação de matérias-primas poderá contribuir para elevar a disponibilidade de alimentos, mas o estabelecimento de mecanismos que possam utilizar os resíduos produzidos como insumos para a produção de alimentos (VALENTINE et al., 2012).

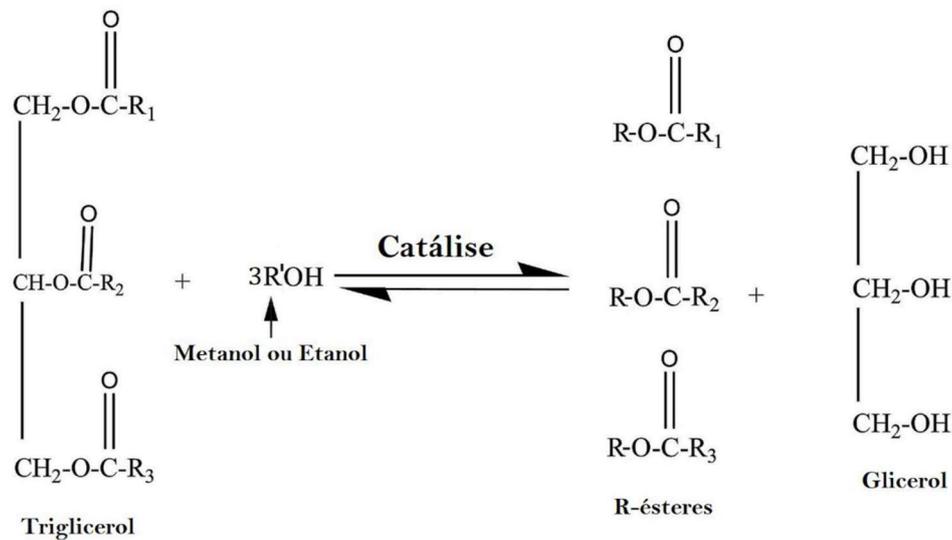
2.2.1 Transesterificação, o processo que dá origem ao biodiesel

O uso de óleos vegetais *in natura* como combustível não é viável devido à alta viscosidade, teor de acidez, excesso de humidade e grande quantidade de ácidos graxos livres. Estas características danificam os motores, empobrecem a combustão e dificultam o funcionamento em locais de clima temperado, além de dificuldades no armazenamento devido à formação de gomas, resultantes dos processos de polimerização e oxidação (SINGH; SINGH, 2010).

O processo de transesterificação foi uma alternativa adotada para conferir aos óleos propriedades físicas compatíveis aos combustíveis. Esta reação (Figura 2.1) é capaz de romper ligações entre ésteres e o glicerol; a molécula de álcool cede a hidroxila para substituir o éster removido, enquanto o radical do álcool (1 ou 2 carbonos) se une ao éster, formando um metil ou etil-éster (R-éster). Para cada molécula de triacilglicerol são formados três R-ésteres e um glicerol (razão molar álcool:triacilglicerol = 3:1). Como resultado a fração mais pesada (glicerol) é removida, o peso molecular é reduzido a 1/3 e a viscosidade passa a ser similar ao diesel (KNOTHE; KRAHL; VAN GERPEN, 2010).

Logo, o biodiesel é definido como um biocombustível gerado pela alcoólise de triacilgliceróis, formações entre ésteres de ácidos graxos e glicerol (propano-1,2,3-triol), podendo ser de origem vegetal ou animal, junto a álcoois de baixo peso molecular (metanol e etanol, principalmente) e um catalisador químico (ácido ou básico) ou enzimático (KNOTHE, 2010; LUQUE; MELERO, 2012).

Figura 2.1 – Representação da reação de transesterificação e seus respectivos produtos



Fonte: Adaptado (ULLAH et al., 2018).

Após transformado, o biodiesel pode ser utilizado na forma integral (B100), ou por meio de misturas ao próprio diesel. Características físico-químicas como maior octanagem, alto ponto de fulgor, lubrificidade e número de cetano, são favoráveis à sua integração ao diesel. Esta adição tem sido explorada em vários países como forma de melhorar as características do diesel menos eficiente (Diesel N°2), o qual possui baixo teor de lubrificidade, o mesmo problema obtido na produção do diesel com baixo teor de enxofre (S10, no Brasil). Pequenas adições de biodiesel entre 1 e 3% são suficientes para adequar este parâmetro (KNOTHE; KRAHL; VAN GERPEN, 2010; KANNAN; ANAND, 2012).

2.2.2 Políticas públicas para produção de biodiesel no Brasil

A produção de biodiesel no Brasil teve seu marco inicial através do Programa Nacional de Produção de Óleos Vegetais para fins Energéticos (PROÓLEO), primeiro programa brasileiro criado para o desenvolvimento de um biocombustível compatível ao diesel, seguido pelo Programa de Óleos Vegetais (OVEG), criado para avaliar o desempenho de combustíveis alternativos em motores a diesel. (PINHO; TEIXEIRA, 2016).

Ambos os programas foram impulsionados pela crise mundial do petróleo e perderam força assim que o mercado se estabilizou, sendo desativados em pouco tempo. O país voltou a instituir medidas com o mesmo objetivo somente após a virada do século, com a criação do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), promulgado pela Lei N°11.097, de 13 de janeiro de 2005 (OLIVEIRA et al., 2010). O programa tinha como objetivo estabelecer o mercado de biodiesel no país, para ter como benefício a redução ao número de exportações de petróleo, assim como diversificar a matriz energética nacional (NOGUEIRA et al., 2016).

Como estratégia para gerar demanda e impulsionar investimentos para o desenvolvimento do setor, foram estabelecidas metas de acréscimo ao diesel comercializado em todos o país, adotando de forma compulsória 2% (conhecido como B2) entre os anos de 2005 e 2007, tornando obrigatório pelos anos seguintes (USHER et al., 2014). De forma gradativa os teores foram elevados até atingir 10% em 2018, com predeterminação para 15% até 2023, caso sejam satisfatórios os testes desenvolvidos pelo Instituto Nacional de Pesquisas Energéticas (BRASIL, 2017).

Além do viés econômico, o PNPB também abrange dois importantes pilares da sustentabilidade, o ambiental e o social. Do ponto de vista ambiental o programa se debruça sobre as reduções inerentes ao uso de biodiesel nas emissões de gases de efeito estufa, assim como a ampliação da participação dos biocombustíveis na matriz energética nacional, garantindo o cumprimento de metas de diversificação, seladas em acordos internacionais (MORENO-PÉREZ; MARCOSSI; ORTIZ-MIRANDA, 2017).

Com objetivo de promover o desenvolvimento regional de pequenas comunidades e integrar a agricultura familiar e pequenos agricultores, o PNPB desenvolve uma estratégia mercadológica através do desenvolvimento de uma

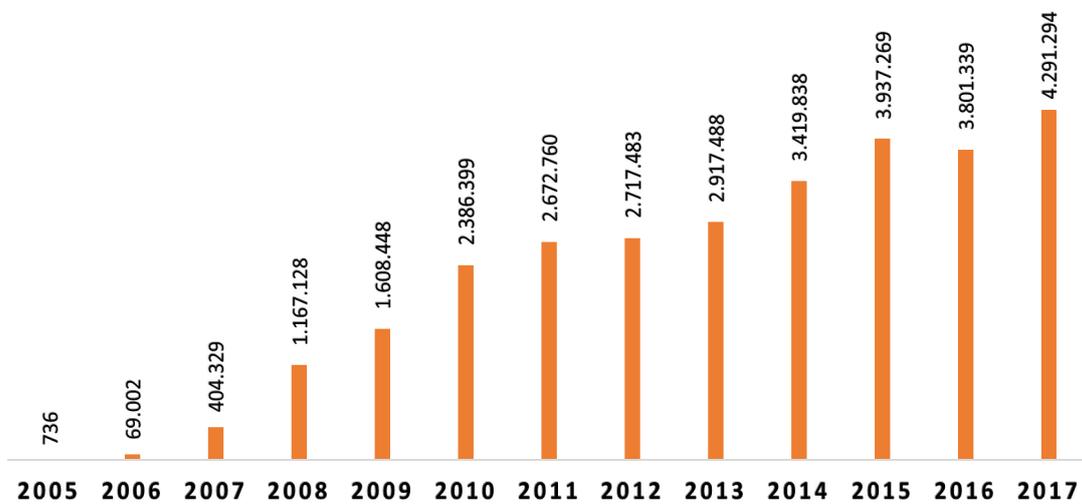
certificação, o Selo Combustível Social (SCS). Esta certificação utiliza como ferramenta a estrutura já existente junto ao Programa Nacional de Fortalecimento da Agricultura Familiar (PRONAF), onde agricultores e comunidades agrícolas com interesse em se unir ao programa, podem requisitar a declaração de aptidão ao PRONAF (DAP) e estabelecer contratos com unidades produtoras de biodiesel para compra antecipada de sua produção agrícola (NOGUEIRA et al., 2016).

Para garantir a compra da produção destes pequenos agricultores o SCS estabelece para cada região do país diferentes níveis de inclusão para oleaginosas provenientes de agricultura familiar, o Norte e Centro-Oeste 15%, Sudeste e Nordeste 30%, e Sul 40%. As unidades produtoras certificadas com SCS passam a obter como benefício à oferta de seus produtos de forma prioritária nos leilões promovidos pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), além da redução de encargos fiscais (PIS/PASEB e COFINS) e acesso facilitado a linhas de crédito. As unidades também ficam responsáveis pela oferta de aporte tecnológico e assistência técnica para a melhoria no rendimento agrônômico dos pequenos agricultores, além de garantir a compra prévia de toda produção (NOGUEIRA et al., 2016; MARCOSSI; MORENO-PÉREZ, 2018).

2.2.3 Produção brasileira e a diversificação de fontes oleaginosas

O Brasil ocupa atualmente o posto de segundo maior produtor de biodiesel no mundo, responsável por 11% da produção mundial, antecedido por Estados Unidos da América com 16% e precedido por Alemanha com 9%. A produção brasileira foi a que mais cresceu no último senso publicado pela Renewable Police Network for the 21st Century (REN21), atingindo o recorde de produção com, aproximadamente, 4,3 bilhões de litros produzidos (Figura 2.2), um crescimento de 13% em comparação a produção do ano anterior (ANP, 2018; REN21, 2018).

Figura 2.2 – Produção de biodiesel (B100) no Brasil entre os anos de 2005-2017 em metros cúbicos

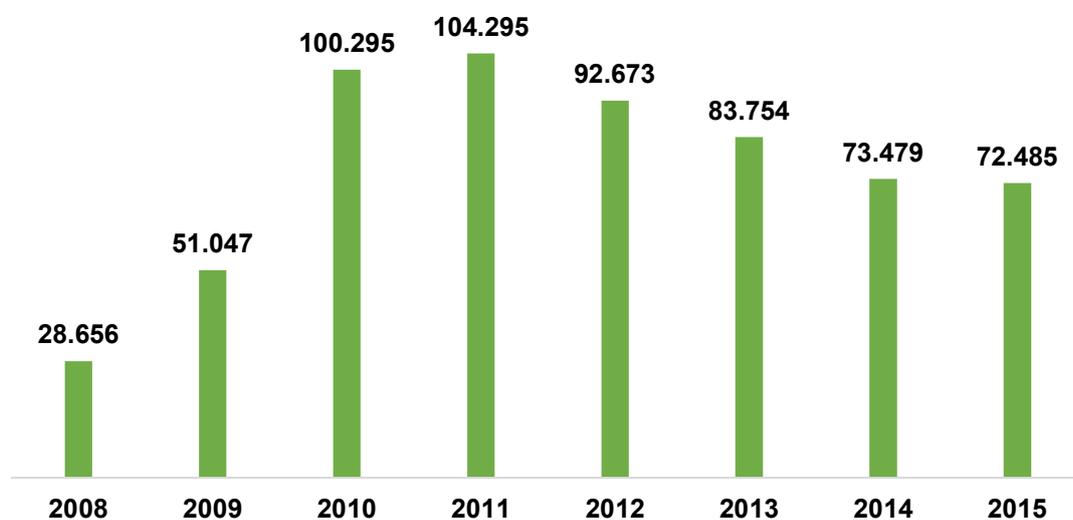


Fonte: Elaborado a partir de dados de ANP (2016) e ANP (2018).

A participação de culturas regionais bem adaptadas às condições climáticas das regiões norte e nordeste do país eram a aposta inicial para diversificar a base da produção brasileira de biodiesel, com destaques para a mamona, palma e o caroço de algodão. Estas culturas seriam empregadas como consequência à adesão de pequenos agricultores ao SCS, cuja meta era estimada em 200 mil adesões, o que atuaria diretamente no desenvolvimento social e fortalecimento da economia local, assim como reduziria a dependência do setor a uma única cultura oleaginosa (RIBEIRO et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2019).

No entanto, os resultados obtidos não atingiram a expectativa inicial, a participação no programa obteve em seu ápice um total de 104.295 adesões (Figura 2.3), número pouco acima da metade da meta prevista (MARCOSSI; MORENO-PÉREZ, 2018). Assim como mamona e palma não obtiveram grande sucesso, representando menos de 1% das oleaginosas aplicadas no setor desde o estabelecimento da obrigatoriedade do B2 até o ano de 2015 (CREMONEZ et al., 2015; NOGUEIRA et al., 2016).

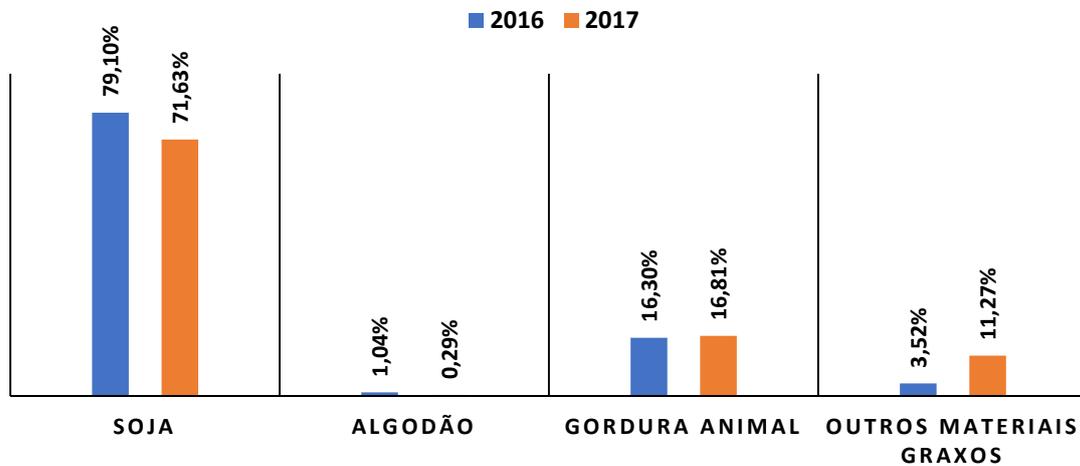
Figura 2.3 – Número de famílias fornecedoras de matéria-prima para o PNPB entre os anos de 2008-2015



Fonte: Adaptado de Marcossi e Moreno-Pérez (2018).

O que podemos observar a partir desta divisão entre a produção de 2017 e 2016 (Figura 2.4) é uma redução drástica do uso do caroço de algodão (- 69%), aumento de 16% para as gorduras animais e a soja permanece como principal cultura processada, responsável pela produção de 72% do biodiesel brasileiro. No entanto, a participação de outros materiais graxos passou a ser a categoria com maior crescimento (260%), porém, não é possível precisar quais culturas obtiveram maior representatividade neste montante. Em 2017 esta categoria foi responsável por 11% da produção nacional, cenário bem distante dos 3,5% em 2016 (ANP, 2018).

Figura 2.4 – Matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel entre os anos de 2016-2017



Fonte: Elaborado a partir de dados de ANP (2018).

A antecipação da inclusão de 10% de biodiesel ao diesel comercial (BX) em 2018, anteriormente prevista para 2019, a nova proposta de integrar o B15 em 2023, e o lançamento do RenovaBio, programa que tem como meta garantir que 18% da matriz energética nacional seja representada por biocombustíveis, trarão como consequência a necessidade em explorar diferentes culturas para atender à crescente demanda traçada (BRASIL, 2017; GRASSI; REN21, 2018; SOUZA; SEABRA; NOGUEIRA, 2018; PEREIRA, 2019).

2.3 Ruminantes e promoção da segurança alimentar

Ruminantes possuem a capacidade de degradar fibras vegetais devido à simbiose evolutiva entre o hospedeiro e a ampla comunidade microbiana residente no rúmen, composta principalmente por fungos, bactérias, protozoários e archaeas (BERCHIELLI, 2011).

Estes microrganismos possuem um complexo enzimático capaz de hidrolisar frações da parede celular, promovendo a quebra de ligações glicosídicas na celulose (β -1,4); este mecanismo libera monómeros de glicose que são absorvidos e transformados em energia para manutenção do sistema biológico e produção de produtos proteicos (carne ou leite) (VARGA; KOLVER, 1997; HUWS et al., 2018). O que confere ao ruminante a capacidade de transformar fibras sem características

nutritivas a humanos em proteína de alta qualidade, indispensável para o desenvolvimento humano (WILKINSON; LEE, 2018).

Devido as suas dimensões continentais, a produção de ruminantes no Brasil é desenvolvida sob o sistema de criação extensivo, constituído em sua maioria por forragens tropicais de ciclo fotossintético C4 (BEZERRA et al., 2018). Dentro deste sistema as forragens atuam como a principal fonte de nutrientes para o desenvolvimento e manutenção dos animais (WILKINSON; LEE, 2018).

No entanto, em regiões tropicais a existência de períodos de baixa precipitação (seca) e grande elevação da temperatura promovem mudanças na fisiologia da planta, o que estimula maior produção de material lignificado (para sustentação da planta) e menor produção de massa vegetal (redução da taxa de crescimento) (BEZERRA et al., 2018). Estes fatores contribuem para redução da qualidade nutricional da forragem, afetando a disponibilidade da proteína (LEE et al., 2017).

De acordo com GRABBER et al. (2009) a degradação da hemicelulose pode ser reduzida em até 37%, assim como o período entre a colonização e início da degradação da celulose (*lag time*) pode ser elevado em 12 vezes, para forragens com maior concentração de lignina, reduzindo a capacidade fermentativa do rúmen. Forragens com elevada quantidade de carboidratos estruturais favorecem a produção de metano, ao disponibilizar maiores concentrações de H₂ no rúmen, o que representa perdas energéticas e reduz a eficiência do sistema fermentativo (VARGA; KOLVER, 1997; LEE et al., 2017). Como consequência a baixa digestibilidade destes alimentos, reduz o ganho em peso, eleva o período de terminação e, por consequência, as emissões de gases de efeito estufa (MCLENNAN et al., 2017; HABERMANN et al., 2019).

Estima-se que, da produção antropogênica total de gases de efeito estufa, a produção animal seja responsável por 14,5% (RIPPLE et al., 2013), dos quais 43% seja representado pelo metano (CH₄), 27% por dióxido de carbono (CO₂) e 29% por óxido nitroso (N₂O), sendo a fermentação entérica a principal responsável pela produção de CH₄ e CO₂, e excreções (urina e fezes) pela produção de N₂O (HERRERO et al., 2016).

De acordo com Thornton e Herrero (2010), Llonch et al. (2017) e Vendramini e Moriel (2018), a suplementação da dieta é uma estratégia com ampla flexibilidade, cujo fornecimento de alimentos ricos em carboidratos solúveis e o aporte adequado

de nutrientes, favorecem a maior eficiência do sistema ruminal, elevando a produção de produtos tais quais, leite e carne e, por consequência, mitigando as emissões do sistema por kg de produto gerado.

2.3.1 Coprodutos do biodiesel e o uso na nutrição de ruminantes

A produção de biodiesel é responsável pela geração de produtos secundários gerados em eventos anteriores e posteriores ao processo de transesterificação (KNOTHE; KRAHL; VAN GERPEN, 2010). Destacam-se as produções de glicerina bruta, águas residuais (contendo ácidos graxos de cadeia curta, sabões e metanol) e tortas e farelos (ÖZDEMIR; HÄRDTLEIN; ELTROP, 2009; KOLESÁROVÁ et al., 2011).

É de fundamental importância para a competitividade do biodiesel o abatimento nos custos de produção. A aplicação de produtos secundários em processos que possam garantir sua conversão em produtos de valor agregado atribui o conceito de “coproduto”, satisfazendo não só o viés econômico, mas também ambiental (ZHANG, 2011). Muitos destes coprodutos possuem características que permitem o desenvolvimento de biomateriais, produtos químicos e insumos para o setor de cosméticos, todas as aplicações de alto valor agregado (TUCK et al., 2012).

Além do alívio ao uso de recursos naturais escassos e abatimento de custos, também são exploradas opções que possam contribuir para a segurança alimentar, neste sentido, o uso de tortas e farelos tem sido sugeridos como substituto a suplementos tradicionais na nutrição de ruminantes (MAKKAR, 2012).

Estes coprodutos são produzidos durante o processo de extração do óleo, o qual pode ser realizado por prensagem (extração mecânica) dando origem a torta (matéria orgânica com óleo residual) ou por meio da aplicação de solventes (extração química), gerando o farelo (com menor percentual de óleo residual) (LUQUE; MELERO, 2012).

De acordo com Abdalla et al. (2008) e Carrera et al. (2012) ao avaliarem diversas tortas e farelos de diferentes culturas oleaginosas, observaram características nutricionais que permitiam hipotetizar o seu uso como substituto a farelos tradicionais utilizados como suplemento alimentar, devido ao conteúdo proteico destes coprodutos (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 – Rendimento agrônômico, oleaginoso de culturas com potencial para produção de biodiesel e conteúdo proteico do coproduto da extração de óleo

Cultura	Produtividade (kg/ha)	Produção de óleo (kg/ha)	Teor de proteína (%)
Colza (canola)	1800	684	34
Caroço de algodão	1800	270	45
Gergelim	1000	390	38
Girassol	1600	672	21
Macaúba	28000	5000	37
Mamona	1500	660	41
Nabo forrageiro	500	145	36
Pinhão manso	8000	3200	43
Soja	2200	418	45

Fonte: Elaborado a partir de dados de Abdalla et al., 2008 e Carrera et al., 2012.

Devido à constituição dos suplementos tradicionais ser a base de milho e soja, em sua maioria, a substituição pelos coprodutos do biodiesel favorece uma importante alternativa à sustentabilidade de ambos os setores, reduzindo a competição por alimentos humanos (SCHADER et al., 2015).

Apesar do conteúdo proteico satisfatório, algumas culturas oleaginosas possuem fatores antinutricionais indesejáveis, destacando-se o pinhão-manso, a mamona e o caroço de algodão, devido à presença de ésteres de forbol, ricina e gossipol, respectivamente (MAKKAR; SIDDHURAJU; BECKER, 2007).

A presença destes compostos exige a aplicação de tratamentos detoxificantes, destacando-se os tratamentos térmicos, químicos e físicos, sendo possível também o uso da irradiação. Estes tratamentos permitem a redução a níveis aceitáveis de ingestão sem que haja presença de efeitos negativos ao metabolismo, deixando de inviabilizar a aplicação destes coprodutos (MAKKAR, 2008; DUBOIS et al., 2013; AKANDE; ODUNSI; AKINFALA, 2016; MAKKAR, 2016).

Diferentemente do éster de forbol e a ricina, cujos efeitos no metabolismo animal são severos podendo causar até mesmo a morte, e sendo necessária a detoxificação antes da oferta aos animais (AKANDE; ODUNSI; AKINFALA, 2016; SOUZA et al., 2018), o gossipol pode ser detoxificado pelo próprio metabolismo dos ruminantes (PAIM et al., 2014).

O gossipol é um composto fenólico metabolizado pelo algodoeiro como defesa às pragas e predadores, podendo ser encontrado na forma livre (gossipol livre, GL) à qual é biologicamente ativa e encontrada em maior abundância no grão

integral. O GL possui grande afinidade por bases nitrogenadas interagindo principalmente com proteínas, o que lhe confere características tóxicas. Por outro lado, o grão quando processado promove a exposição da molécula do gossipol, que pode se complexar por ligação covalente a aminoácidos ou sofrer oxidação, tornando-a indisponível biologicamente (gossipol ligado). Esta forma também é encontrada naturalmente no grão integral, porém em pequenas quantidades (GADELHA et al., 2014).

O conjunto de pré-estômagos nos ruminantes, mais especificamente o rúmen, é capaz de promover ligações entre as proteínas solúveis presentes no meio com gossipol na forma livre, tornando o composto indisponível biologicamente de forma a não interagir no sítio de absorção do intestino, deixando de apresentar efeitos toxicológicos (ZHANG et al., 2007).

No entanto, apesar de condições mais favoráveis, ruminantes não são imunes à ação do gossipol na forma livre; a exposição a altas concentrações ou por longos períodos podem comprometer a capacidade de detoxificação, trazendo os mesmos sintomas clínicos que acometem os monogástricos (RANDEL; CHASE; WYSE, 1992).

Diferentemente do coproduto gerado pela indústria algodoeira, que oferta os grãos integrais, cujos níveis de gossipol livre poderiam atingir valores superiores a 14 mg/kg (GADELHA et al., 2014), a cadeia produtiva de biodiesel promove a ruptura dos grãos para extração dos óleos; este processo permite maior formação de complexos entre o gossipol livre e o meio, reduzindo os teores de GL (GUEDES; SOTO-BLANCO, 2010; LUQUE; MELERO, 2012).

De acordo com Conceição et al. (2018) após extração utilizando somente solvente ou precedida por extração mecânica, a presença de GL pode ser reduzida para até 0,5 mg/kg. Estes valores permitem considerar este coproduto da produção de biodiesel menos tóxicos aos animais, conferindo a este uma alternativa viável a substituição de fontes tradicionais.

Referências

ABAS, N.; KALAIR, A.; KHAN, N. Review of fossil fuels and future energy technologies. **Futures**, Guildford, v. 69, p. 31–49, 2015.

ABBASPOUR, N.; HURRELL, R.; KELISHADI, R. Review on iron and its importance for human health. **Journal of Research in Medical Sciences**, Mumbai, v. 19, n. 2, p. 164–174, 2014.

ABDALLA, A. L. et al. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, p. 260–268, 2008. Suplemento especial.

ABORISADE, B.; BACH, C. Assessing the pillars of sustainable food security. **European International Journal of Science and Technology**, Barking, v. 3, n. 4, p. 117–125, 2014.

AKANDE, T. O.; ODUNSI, A. A.; AKINFALA, E. O. A review of nutritional and toxicological implications of castor bean (*Ricinus communis* L.) meal in animal feeding systems. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 100, n. 2, p. 201–210, 2016.

ALEXANDER, P. et al. Losses, inefficiencies and waste in the global food system. **Agricultural Systems**, Barking, v. 153, p. 190–200, 2017.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS - ANP. **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis**. Rio de Janeiro, 2016.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS - ANP. **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis**. Rio de Janeiro, 2018.

ATABANI, A. E. et al. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, London, v. 16, n. 4, p. 2070–2093, 2012.

ATABANI, A. E. et al. Non-edible vegetable oils: A critical evaluation of oil extraction, fatty acid compositions, biodiesel production, characteristics, engine performance and emissions production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, London, v. 18, p. 211–245, 2013.

AZADI, P. et al. The evolution of the biofuel science. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, London, v. 76, p. 1479–1484, 2017.

BARROS RIBEIRO, E. C. et al. Biodiesel and social inclusion: An analysis of institutional pressures between biodiesel plants and family farmers in southern Brazil. **Journal of Cleaner Production**, Amsterdam, v. 204, p. 726–734, 2018.

BART, J. C. J.; PALMERI, N.; CAVALLARO, S. **Biodiesel science and technology: from soil to oil**. 1. ed. Cambridge: Woodhead Publishing, 2010. 864 p.

BERCHIELLI, T. T. **Nutrição de ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2011. 616 p.

BEZERRA, L. R. et al. Protein supplementation is vital for beef cattle fed with tropical pasture. In: TADELE, Z. (Ed.). **Grasses as food and feed**. 1. ed. London: IntechOpen, 2018. p. 97–107.

BRASIL. Portaria Nº 80, de 2 de março de 2017. Dispõe da necessidade de realização de testes e ensaios em motores e veículos para validar a utilização de misturas com adição, de até 10% (B10) e até 15% (B15) em volume, de biodiesel ao óleo diesel vendido ao consumidor final, conforme estabelecido pela Lei nº 13.263, de 23 de março de 2016, 2017. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 03 mar. 2017, Seção 1, n. 43, p. 75.

BRIDGE, G. et al. **Energy and society: a critical perspective**. London: Routledge, 2018. 292 p.

BUREAU, J.-C.; SWINNEN, J. EU policies and global food security. **Global Food Security**, Amsterdam, v. 16, p. 106–115, 2018.

CARRERA, R. A. B. et al. Protein co-products and by-products of the biodiesel industry for ruminants feeding. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 41, p. 1202–1211, 2012.

CASH, D. W. et al. Knowledge systems for sustainable development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 100, n. 14, p. 8086-8091, 2003.

CERVELLATI, M.; SUNDE, U. Human capital formation, life expectancy, and the process of development. **American Economic Review**, Nashville, v. 95, n. 5, p. 1653–1672, 2005.

CHEN, X. et al. Producing more grain with lower environmental costs. **Nature**, London, v. 514, p. 486-489, 2014.

CHERUBINI, F. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. **Energy Conversion and Management**, Amsterdam, v. 51, n. 7, p. 1412–1421, 2010.

CHU, S.; MAJUMDAR, A. Opportunities and challenges for a sustainable energy future. **Nature**, London, v. 488, p. 294-303, 2012.

CONCEIÇÃO, A. A. et al. Development of an RP-UHPLC-PDA method for quantification of free gossypol in cottonseed cake and fungal-treated cottonseed cake. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 13, n. 5, 2018.

CREMONEZ, P. A. et al. Biodiesel production in Brazil: Current scenario and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, London, v. 42, p. 415–428, 2015.

DUBOIS, J.-L. et al. Detoxification of castor meal through reactive seed crushing. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 43, n. 1, p. 194–199, 2013.

ERICKSEN, P.; INGRAM, J. S. I.; LIVERMAN, D. M. Food security and global environmental change. **Environmental Science & Policy**, Exeter, v. 12, n. 4, p. 373–377, 2009.

EVENSON, R. E.; GOLLIN, D. Assessing the Impact of the Green Revolution, 1960 to 2000. **Science**, New York, v. 300, n. 5620, p. 758–762, 2003.

FOLEY, J. A. et al. Global consequences of land use. **Science**, New York, v. 309, n. 5734, p. 570–574, 2005.

FAO. **Rome Declaration on World Food Security and World Food Summit Plan of Action**. Rome, 1996.

FAO. **The State of Food Security and Nutrition in the World**. Rome, 2018.

GADELHA, I. C. N. et al. Gossypol toxicity from cottonseed products. **Scientific World Journal**, New York, 2014. doi: 10.1155/2014/231635.

GODFRAY, H. C. J. et al. Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. **Science**, New York, v. 327, n. 5967, p. 812–818, 2010.

GODFRAY, H. C. J.; GARNETT, T. Food security and sustainable intensification. **Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences**, London, v. 369, n. 1639, 2014.

GRABBER, J. H. et al. Cell wall fermentation kinetics are impacted more by lignin content and ferulate cross-linking than by lignin composition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 89, n. 1, p. 122–129, 2009.

GRASSI, M. C. B.; PEREIRA, G. A. G. Energy-cane and RenovaBio: Brazilian vectors to boost the development of Biofuels. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 129, p. 201–205, 2019.

GUEDES, F. C. B.; SOTO-BLANCO, B. Sperm quality of sheep fed cottonseed cake. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 38, n. 4, p. 415–418, 2010.

GUO, M.; SONG, W.; BUHAIN, J. Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, London, v. 42, p. 712–725, 2015.

HABERMANN, E. et al. Warming and water deficit impact leaf photosynthesis and decrease forage quality and digestibility of a C4 tropical grass. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 165, p. 383–402, 2019.

HERRERO, M. et al. Greenhouse gas mitigation potentials in the livestock sector. **Nature Climate Change**, London, v. 6, p. 452-461, 2016.

HUWS, S. A. et al. Addressing Global Ruminant Agricultural Challenges Through Understanding the Rumen Microbiome: Past, Present, and Future. **Frontiers in Microbiology**, Lousanne, v. 9, p. 2161-1–2161-33, 2018.

JORDAN, N. et al. Sustainable development of the agricultural bio-economy. **Science**, New York, v. 316, n. 5831, p. 1570–1571, 2007.

KANNAN, G. R.; ANAND, R. Biodiesel as an alternative fuel for direct injection diesel engines: A review. **Journal of Renewable and Sustainable Energy**, Melville, v. 4, n. 1, p. 12703-1–12703-17, 2012.

KARMEE, S. K. Liquid biofuels from food waste: Current trends, prospect and limitation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, London, v. 53, p. 945–953, 2016.

KJELLSTROM, T.; MCMICHAEL, A. J. Climate change threats to population health and well-being: The imperative of protective solutions that will last. **Global Health Action**, Philadelphia, v. 6, n. 1, 2013. doi: 10.3402/gha.v6i0.20816.

KNOTHE, G. Biodiesel and renewable diesel: A comparison. **Progress in Energy and Combustion Science**, Oxford, v. 36, n. 3, p. 364–373, 2010.

KNOTHE, G.; KRAHL, J.; VAN GERPEN, J. **The biodiesel handbook**. 2. ed. Urbana: Academic Press; AOCS Press, 2010. 494 p.

KNOTHE, G.; RAZON, L. F. Biodiesel fuels. **Progress in Energy and Combustion Science**, Oxford, v. 58, p. 36–59, 2017.

KOLESÁROVÁ, N. et al. Utilization of biodiesel by-products for biogas production. **BioMed Research International**, New York, v. 2011, art. ID 126798, 16 p., 2011. doi: 10.1155/2011/126798.

KUMMU, M. et al. Lost food, wasted resources: Global food supply chain losses and their impacts on freshwater, cropland, and fertiliser use. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 438, p. 477–489, 2012.

LAMBIN, E. F.; MEYFROIDT, P. Global land use change, economic globalization, and the looming land scarcity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Wahington, DC, v. 108, n. 9, p. 3465-3472, 2011.

LE BLANC, D. Towards Integration at Last? The Sustainable Development Goals as a Network of Targets. **Sustainable Development**, Bradford, v. 23, n. 3, p. 176–187, 2015.

LEE, M. A. et al. Forage quality declines with rising temperatures, with implications for livestock production and methane emissions. **Biogeosciences**, Katlenberg-Lindau, v. 14, n. 6, p. 1403–1417, 2017.

LEE, R. The Outlook for Population Growth. **Science**, New York, v. 333, n. 6042, p. 569-573, 2011.

LIEDER, M.; RASHID, A. Towards circular economy implementation: a comprehensive review in context of manufacturing industry. **Journal of Cleaner Production**, Amsterdam, v. 115, p. 36–51, 2016.

LLONCH, P. et al. Current available strategies to mitigate greenhouse gas emissions in livestock systems: an animal welfare perspective. **Animal**, Cambridge, v. 11, n. 2, p. 274–284, 2017.

LUQUE, R.; MELERO, J. A. **Advances in biodiesel production: processes and technologies**. 1. ed. Cambridge: Woodhead Publishing, 2012. 304 p.

MAKKAR, H. P. S. A review of the use of isotopic and nuclear techniques in animal production. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 140, n. 3, p. 418–443, 2008.

MAKKAR, H. P. S. State-of-the-art on detoxification of *Jatropha curcas* products aimed for use as animal and fish feed: A review. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 222, p. 87–99, 2016.

MAKKAR, H. P. S. **Biofuel co-products as livestock feed: opportunities and challenges**. Rome: FAO, 2012. 553 p.

MAKKAR, H. P. S.; SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. **Plant secondary metabolites**. 1. ed. Totowa: Humana Press, 2007. 130 p..

MAMMA, D.; CHRISTAKOPOULOS, P. Biotransformation of Citrus By-Products into Value Added Products. **Waste and Biomass Valorization**, New York, v. 5, n. 4, p. 529–549, 2014.

MARCOSSI, G. P. C.; MORENO-PÉREZ, O. M. A closer look at the Brazilian Social Fuel Seal: uptake, operation and dysfunctions. **Biofuels**, London, v. 9, n. 4, p. 429–439, 2018.

MARWAHA, A. et al. An overview of solid base heterogeneous catalysts for biodiesel production. **Catalysis Reviews**, New York, v. 60, n. 4, p. 594–628, 2018.

MC CARTHY, U. et al. Global food security – Issues, challenges and technological solutions. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 77, p. 11–20, 2018.

MCLENNAN, S. R. et al. Responses to various protein and energy supplements by steers fed low-quality tropical hay. 1. Comparison of response surfaces for young steers. **Animal Production Science**, Melbourne, v. 57, n. 3, p. 473–488, 2017.

MORENO-PÉREZ, O. M.; MARCOSSI, G. P. C.; ORTIZ-MIRANDA, D. Taking stock of the evolution of the biodiesel industry in Brazil: Business concentration and structural traits. **Energy Policy**, Guildford, v. 110, p. 525–533, 2017.

MOTTET, A. et al. Review: Domestic herbivores and food security: current contribution, trends and challenges for a sustainable development. **Animal**, Cambridge, v. 12, n. 2, p. 188–198, 2018.

NIGAM, P. S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, Oxford, v. 37, n. 1, p. 52–68, 2011.

NOGUEIRA, L. A. H. et al. Biodiesel program in Brazil: learning curve over ten years (2005–2015). **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, Chichester, v. 10, n. 6, p. 728–737, 2016.

OLIVEIRA, F. C. et al. The Brazilian social fuel stamp program: Few strikes, many bloopers and stumbles. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, London, v. 102, p. 121–128, 2019.

OLIVEIRA, J. F. G. et al. Biodiesel production from waste coconut oil by esterification with ethanol: The effect of water removal by adsorption. **Renewable Energy**, Oxford, v. 35, n. 11, p. 2581–2584, 2010.

ÖZDEMİR, E. D.; HÄRDTLEIN, M.; ELTROP, L. Land substitution effects of biofuel side products and implications on the land area requirement for EU 2020 biofuel targets. **Energy Policy**, Guildford, v. 37, n. 8, p. 2986–2996, 2009.

PAIM, T. DO P. et al. Carcass traits and fatty acid profile of meat from lambs fed different cottonseed by-products. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 116, n. 2, p. 71–77, 2014.

PERIGNON, M. et al. The bioavailability of iron, zinc, protein and vitamin A is highly variable in French individual diets: Impact on nutrient inadequacy assessment and relation with the animal-to-plant ratio of diets. **Food Chemistry**, Barking, v. 238, p. 73–81, 2018.

PIESSE, J.; THIRTLE, C. Three bubbles and a panic: An explanatory review of recent food commodity price events. **Food Policy**, Guildford, v. 34, n. 2, p. 119–129, 2009.

PINHO, L. D. E. A.; TEIXEIRA, F. L. C. Biodiesel no brasil: uma análise da regulação e seus reflexos na diversificação das matérias-primas usadas no processo de produção. **Revista Brasileira de Administração Política**, Salvador, v. 8, n. 2, p. 141–161, 2016.

PINZI, S. et al. The Ideal Vegetable Oil-based Biodiesel Composition: A Review of Social, Economical and Technical Implications. **Energy & Fuels**, Washington, DC, v. 23, n. 5, p. 2325–2341, 2009.

PINZI, S.; PILAR DORADO, M. 4 - Feedstocks for advanced biodiesel production. In: LUQUE, R.; MELERO, J. A. (Ed.). **Woodhead Publishing Series in Energy**. 1. ed. Cambridge: Woodhead Publishing, 2012. p. 69–90.

PRETTY, J. Agricultural sustainability: Concepts, principles and evidence. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 363, n. 1491, p. 447–465, 2008.

PROSEKOV, A. Y.; IVANOVA, S. A. Food security: The challenge of the present. **Geoforum**, Oxford, v. 91, p. 73–77, 2018.

RANDEL, R.; CHASE, C. J.; WYSE, S. J. Effects of gossypol and cottonseed products on reproduction of mammals. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 0021–8812, p. 1628–1638, 1992.

RAUPACH, M. R. et al. Global and regional drivers of accelerating CO₂ emissions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 104, n. 24, p. 10288–10293, 2007.

RENEWABLE ENERGY POLICY NETWORK FOR THE 21st CENTURY - REN21. **Renewables 2018 Global Status Report**. Paris: REN 21 Secretariat, 2018. 325 p.

RIPPLE, W. J. et al. Ruminants, climate change and climate policy. **Nature Climate Change**, London, v. 4, p. 2–5, 2013.

SCHADER, C. et al. Impacts of feeding less food-competing feedstuffs to livestock on global food system sustainability. **Journal of the Royal Society Interface**, London, v. 12, n. 113, p. 20150891-1–20150891-12, 2015.

SCHANES, K.; STAGL, S. Food waste fighters: What motivates people to engage in food sharing? **Journal of Cleaner Production**, Amsterdam, v. 211, p. 1491–1501, 2019.

SINGH, S. P.; SINGH, D. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, London, v. 14, n. 1, p. 200–216, 2010.

SOUZA, J. G. et al. Performance, hepatic function and efficiency of nutrient utilisation of grazing dairy cows supplemented with alkaline-treated *Jatropha curcas* L. meal. **Animal Production Science**, Melbourne, v. 58, n. 12, p. 2280–2287, 2018.

SOUZA, S. P.; SEABRA, J. E. A.; NOGUEIRA, L. A. H. Feedstocks for biodiesel production: Brazilian and global perspectives. **Biofuels**, London, v. 9, n. 4, p. 455–478, 2018.

STEPHENS, E. C.; JONES, A. D.; PARSONS, D. Agricultural systems research and global food security in the 21st century: An overview and roadmap for future opportunities. **Agricultural Systems**, Barking, v. 163, p. 1–6, 2018.

THORNTON, P. K.; HERRERO, M. Potential for reduced methane and carbon dioxide emissions from livestock and pasture management in the tropics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 107, n. 46, p. 19667 LP-19672, 2010.

TILMAN, D. et al. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 108, n. 50, p. 20260 LP-20264, 13 dez. 2011.

TUCK, C. O. et al. Valorization of Biomass: Deriving More Value from Waste. **Science**, New York, v. 337, n. 6095, p. 695-699, 2012.

ULLAH, Z. et al. A review on ionic liquids as perspective catalysts in transesterification of different feedstock oil into biodiesel. **Journal of Molecular Liquids**, Amsterdam, v. 266, p. 673–686, 2018.

USHER, P. et al. Integrating microalgae into the Brazilian program for biodiesel production and use. **Biofuels**, London, v. 5, n. 1, p. 45–52, 2014.

VALENTINE, J. et al. Food vs. fuel: the use of land for lignocellulosic ‘next generation’ energy crops that minimize competition with primary food production. **GCB Bioenergy**, Oxford, v. 4, n. 1, p. 1–19, 2012.

VARGA, G. A.; KOLVER, E. S. Microbial and Animal Limitations to Fiber Digestion and Utilization. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 127, n. 5, p. 819–823, 1997.

VENDRAMINI, J. M. B.; MORIEL, P. Forage management and concentrate supplementation effects on performance of beef calves. **Animal Production Science**, Melbourne, v. 58, n. 8, p. 1399–1403, 2018.

VIRMOND, E. et al. Characterisation of agroindustrial solid residues as biofuels and potential application in thermochemical processes. **Waste Management**, New York, v. 32, n. 10, p. 1952–1961, 2012.

WEST, P. C. et al. Leverage points for improving global food security and the environment. **Science**, New York, v. 345, n. 6194, p. 325-328, 2014.

WHEELER, T.; VON BRAUN, J. Climate Change Impacts on Global Food Security. **Science**, New York, v. 341, n. 6145, p. 508-513, 2013.

WILKINSON, J. M.; LEE, M. R. F. Review: Use of human-edible animal feeds by ruminant livestock. **Animal**, Cambridge, v. 12, n. 8, p. 1735–1743, 2018.

WILSON, C.; GRUBLER, A. Lessons from the history of technological change for clean energy scenarios and policies. **Natural Resources Forum**, London, v. 35, n. 3, p. 165–184, 2011.

ZHANG, W.-J. et al. Development of a microbial fermentation process for detoxification of gossypol in cottonseed meal. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 135, n. 1, p. 176–186, 2007.

ZHANG, Y.-H. P. What is vital (and not vital) to advance economically-competitive biofuels production. **Process Biochemistry**, Barking, v. 46, n. 11, p. 2091–2110, 2011.

3 Características Nutricionais e Cinética Fermentativa In Vitro de Coprodutos do Biodiesel em Dietas Experimentais para Ovinos

Resumo: O uso de coprodutos do biodiesel é considerado promissor para substituir integral ou parcialmente alimentos de consumo humano na nutrição de ruminantes. Devido à presença de conteúdo proteico e energético do coproduto, é estimulada a avaliação destes coprodutos no ambiente fermentativo para elucidar seus efeitos sobre a comunidade microbiana e na eficiência da fermentação ruminal. No presente estudo, foram utilizados os coprodutos de oito culturas oleaginosas tais quais, algodão (ALG), canola (CAN), girassol (GIR), macaúba (MAC), mamona (MAM), nabo forrageiro (NF), pinhão manso (PM) e soja como tratamento controle (CON), objetivando avaliar os parâmetros fermentativos e seus produtos. As amostras foram incubadas em garrafas de vidro a 39°C, na presença de inóculos formulados a partir do conteúdo ruminal de ovinos. Foram avaliados dois períodos de incubação (PI), 24 e 48 horas (PG24 e PG48). Após 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16 e 24 horas de incubação, foram mensurados os gases produzidos (NetGP) através da pressão interna de cada garrafa (PG24); para PG 48 também foram realizadas mensurações em 36 e 48 horas. Após cada mensuração, foram amostrados os gases produzidos para determinar a produção de metano (NetCH₄). Ao final de cada PI, foi colhido o conteúdo das garrafas para determinar pH, nitrogênio amoniacal (N-NH₃) e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). A degradabilidade da matéria orgânica (DMO) e da fibra em detergente neutro (DFDN) foi determinada após tratamento do resíduo não degradado com solução de detergente neutro. O mesmo procedimento foi realizado para avaliar dietas experimentais contendo coprodutos em substituição ao milho e/ou ao farelo de soja em uma dieta controle: Dieta1 (60% feno de Tifton (FT), 30% GIR e 10% milho desintegrado (MD)), Dieta2 (60 % FT, 18% GIR, 16% MD e 6% ALG) e DietaCON (60% FT, 28% MD e 12% farelo de soja). Os dados dos tratamentos foram avaliadas pela análise de variância considerando os efeitos de tratamento (Trat), PI e a interação (Trat*PI) entre os coprodutos (PGCP) e entre as dietas (PGDT). Em PGCP, não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) para Trat na produção de acetato (C₂), AGCC totais (AGCCt) e relação acetato:propionato (C₂:C₃), embora CON tenha apresentado maior produção de propionato (C₃) e butirato (C₄), seguido por CAN e NF ($P < 0,05$). NF e CAN também apresentaram DMO similar quando comparada a CON ($P < 0,0001$), assim como para N-NH₃ ($P < 0,0001$). PM apresentou menor NetCH₄ por DMO ($P < 0,05$). PI foi significativo para C₃ e C₄ ($P < 0,05$) com maior produção para PG48. Com exceção de NetCH₄ por matéria seca ($P > 0,05$), todos parâmetros de NetGP e NetCH₄ apresentaram médias superiores para PG48, assim como DMO e DFDN. Para Trat em PGDT não houve diferença para NetCH₄, e DietaCON foi superior em todos os parâmetros de NetGP, além de DMO e N-NH₃. DietaCON foi inferior somente para o fator de partição ($P < 0,05$). Não foram observadas diferenças para Trat*PI em todos os parâmetros avaliados. Os coprodutos do biodiesel apresentaram parâmetros fermentativos similares às fontes tradicionais utilizadas na nutrição de ruminantes, podendo substituí-los para favorecer o desenvolvimento sustentável e a promoção da segurança alimentar.

Palavras-chave: coprodutos, metano, fermentação entérica, degradabilidade.

Nutritional Characteristics and In Vitro Kinetics of Biodiesel Coproducts in Experimental Diets for Sheep

Abstract: Using biodiesel coproducts to replace partially or totally edible food currently used as feed for ruminants is considered promising. Due to the protein and energy content, it's been fostered their evaluation at the ruminal environment to elucidate their effects to microbial community and for ruminal fermentation efficiency. In this trial, there were assessed eight oilseed coproducts such as, cottonseed (CS), rapeseed (RS), sunflower seed (SF), macaw palm fruit (MP), castor bean (CB) radish seed (RD) jatropha seed (JS) and soybean as control treatment (CON), aiming to evaluate fermentative parameters and its products. Samples were incubated in glass bottles at 39°C in the presence of inoculum formulated from ruminal content of sheep. Two incubation periods (IP) were evaluated, 24 and 48 hours (GP24 and GP48). After 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16 and 24 hours, internal pressure of each glass bottle was measured to determine the gases produced (NetGP) at 24hs, while for GP48 measurements at 36 and 48 hours were also performed. After each measurement the gases produced were sampled to determine methane production (NetCH₄). At the end of IP the content of each bottle was collected to determine pH, ammonia-nitrogen (N-NH₃) and short fatty chain acids (SFCA). Organic matter degradability (OMD) and neutral detergent fiber degradability (NDFD) were determined after treating the non-degraded residual with neutral detergent solution. The same procedure was used to evaluate experimental diets containing coproducts as replacement for corn and/or soy in a control diet: Diet1 (60% Tifton hay (TH), 30% SF and 10% disintegrated corn (DC)), Diet2 (60% TH, 18% SF, 16% DC and 6% CS) and DietCON (60% TH, 28% DC and 12% soybean meal). The data were compared by analysis of variance according to treatment effect (Trat), IP and interaction (Trat*IP) among coproducts (GPCP) and diets (GPDT). For GPCP differences were not observed for Trat effect ($P > 0,05$) for acetate (C₂), total SFCA (SFCA_T) and the acetate:propionate ratio (C₂:C₃); although CON showed higher propionate (C₃) and butyrate (C₄) production, followed by RS and RD ($P < 0,05$). RD and RS also presented similar OMD compared to CON ($P < 0,0001$), as well as N-NH₃ ($P < 0,0001$). JS produced lower NetCH₄ by OMD ($P < 0,05$). IP was significant for C₃ and C₄ ($P < 0,05$) with higher production for GP48. Except NetCH₄ by dry matter ($P > 0,05$), all NetGP and NetCH₄ parameters had higher values for GP48, as well as OMD and NDFD. For Trat in GPDT no significant differences were observed for NetCH₄, and DietCON was superior for all NetGP parameters, as well as OMD and N-NH₃. DietCON was lower only for partition factor ($P < 0,05$). No differences were observed for Trat*PI for all parameters evaluated. Biodiesel coproducts showed fermentative parameters performance similar to traditional feed sources, indicating to be able to replace them in order to be favorable to sustainable development and food security promotion.

Keywords: coproducts, methane, enteric fermentation, degradability.

3.1 Introdução

O uso de fontes renováveis de energia tem sido discutido pelas últimas décadas como principal alternativa para mitigar os efeitos da queima de combustíveis fósseis ao ambiente (GAFFNEY; MARLEY, 2009; GNANSOUNOU et al., 2009; BURNHAM et al., 2012). Além de reduzir a dependência pelos produtos do petróleo, uma vez que esta é uma fonte finita, não renovável (CZÚCZ; GATHMAN; MCPHERSON, 2010; AZADI et al., 2017) e tem sido altamente explorada para atender a demanda energética mundial (ABAS; KALAIR; KHAN, 2015).

Neste contexto o Brasil tem sido pioneiro na renovação de sua matriz energética desde a década de 80 (STATTMAN; HOSPES; MOL, 2013), dentre os biocombustíveis explorados, o lançamento do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) proporcionou ao país o posto de segundo maior produtor de biodiesel (OLIVEIRA; COELHO, 2017; REN21, 2018).

Devido à grande diversidade de matérias-primas aplicáveis à produção de biodiesel (NIGAM; SINGH, 2011), e a proposta brasileira em elevar a participação dos biocombustíveis na matriz energética nacional, para o abatimento de 37% dos gases de efeito estufa até 2025, novas culturas oleaginosas deverão ser exploradas (SOUZA; SEABRA; NOGUEIRA, 2018).

Assim como a produção, os resíduos da cadeia produtiva deverão aumentar, dentre eles há a possibilidade de utilização das tortas e farelos como suplemento alimentar na nutrição de ruminantes, conforme sugerido por Abdalla et al. (2008). Para os autores, esta aplicação permite conferir uma nova funcionalidade e ajudar na sustentabilidade da cadeia produtiva do biodiesel, agregando valor e abatendo as pegadas de carbono do setor. Pode também contribuir para a promoção da segurança alimentar (MAKKAR, 2012), ao substituir fontes tradicionais, como o milho e a soja, empregadas na produção animal como suplemento proteico e energético (SCHADER et al., 2015).

Desta forma o objetivo deste trabalho foi avaliar a possibilidade de utilizar os coprodutos de oleaginosas de clima temperado e tropical, devido à presença de unidades produtoras de biodiesel em todas as regiões do país, sendo estas oleaginosas já exploradas ou com potencial de utilização na produção do biodiesel brasileiro tais quais, algodão, canola, girassol, macaúba, mamona, nabo forrageiro,

pinhão manso e soja, como suplemento energético e proteico para a nutrição de ruminantes.

3.2 Material e métodos

Os ensaios foram realizados no município de Piracicaba, estado de São Paulo, no Laboratório de Nutrição Animal (LANA) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo (USP), foram avaliadas amostras de oito culturas oleaginosas, os coprodutos do algodão (ALG), canola (CAN), girassol (GIR) e soja (CON) na forma de farelo (oriundos da extração por solvente), e macaúba (MAC), mamona (MAM), nabo forrageiro (NF) e pinhão manso (PM) na forma de torta (oriundos da extração por prensagem).

As amostras de Pinhão Manso e Mamona foram obtidas *in natura*, sendo necessário realizar a extração dos óleos para obtenção de amostra representativa do coproduto, enquanto as demais oleaginosas já foram obtidas na forma de coproduto. Todas as culturas foram avaliadas nutricionalmente por meio da caracterização bromatológica, assim como a avaliação da degradabilidade potencial da matéria orgânica e quantificação de metano (CH₄) entérico através de ensaio *in vitro* de produção de gases.

Os ensaios foram divididos em 3 produções de gases entre os meses de abril e junho de 2018, sendo utilizados 5 inóculos formulados pelo conteúdo ruminal de carneiros adultos (4,2 anos \pm 1,0). Também foi realizada a avaliação (3 inóculos) de duas dietas formuladas com o uso de coprodutos selecionados com base nas performances das primeiras produções; estes coprodutos foram empregados como possíveis substitutos a soja e/ou milho e comparados a um concentrado proteico comumente utilizado na dieta de ruminantes.

3.2.1 Extração de óleo de pinhão manso

As sementes foram obtidas de 2 diferentes localidades, Ribas do Rio Pardo, Mato Grosso do Sul e Piracicaba, São Paulo. Foram homogeneizadas, amostradas e encaminhadas para o Instituto de Tecnologia em Alimentos (ITAL) na cidade de Campinas, São Paulo para extração a quente de óleos em prensa helicoidal de fluxo contínuo (Scott Tech, modelo ERT 50, Vinhedo, Brasil). Os produtos da extração (óleo e torta) foram pesados para determinação do rendimento (peso/peso) e encaminhados ao LANA/CENA para análises laboratoriais.

3.2.2 Extração de óleo mamona

As sementes de mamona foram obtidas de 2 diferentes localidades, Lavras, Minas Gerais e Piracicaba, São Paulo. A extração foi realizada no LANA/CENA em prensa hidráulica (Marcon, modelo MPH-15, Marília, Brasil) com aparato extrator desmontável composto por peneiras de aço inox (1,0 mm) e um cilindro de cobre. As amostras foram separadas em porções individuais de 100g (em triplicata) e prensadas com aplicação contínua de 7 toneladas de pressão, conforme o material cedia novas aplicações eram realizadas até que houvesse a estabilidade. Após a estabilização da pressão foram aguardados 45 minutos para a liberação total do hidráulico. Foram colhidos os dois produtos da extração (óleo e torta) para determinação do rendimento e análises laboratoriais.

3.2.3 Preparo das amostras

Todas as amostras foram secas em estufa de circulação de ar forçado (Marconi, modelo MA 037, Piracicaba, Brasil) a 55°C até peso constante, para determinação da matéria seca (MS). Em seguida foram moídas em moinho do tipo Willey (Marconi, Piracicaba, Brasil) equipadas com peneiras de crivo a 1,0 mm, e posteriormente encaminhadas à caracterização bromatológica.

3.2.4 Preparo e moagem da torta de Mamona

Devido ao alto teor residual de óleo da torta de mamona obtida após a extração em prensa hidráulica não foi possível a moagem convencional (Wiley), o material foi então encaminhado ao Laboratório de Química Analítica no CENA para moagem em moinho criogênico (Spex, modelo SamplePrep 6870, Metuchen, USA). Porções de 25 g (em triplicata) foram submetidas a 5 minutos de pré-resfriamento em nitrogênio líquido (*precool*), seguido por 5 moagens de 2 minutos (*run time*) a velocidade de 10 ciclos por segundo, intervaladas por 1 minuto de descanso (*breakage*). Após a moagem as amostras foram encaminhadas ao LANA/CENA e secas em estufa de circulação de ar forçado (Marconi, modelo MA 037, Piracicaba, Brasil) para determinação da MS.

3.2.5 Análise bromatológica

As amostras foram caracterizadas quanto à composição bromatológica (Tabela 3.1) de acordo com a metodologia descrita pela AOAC (2011), para as determinações da matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE) e nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN). Para análise da fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), as determinações foram realizadas de acordo com Van Soest, Robertson e Lewis (1991) adaptada por Mertens (2002). Foram utilizados sacos de filtro (Ankom, modelo F57, Macedon, USA), e analisador de fibra (Tecnal, modelo TE 149, Piracicaba, Brasil). As amostras desengorduradas recuperadas após determinação de EE em extrator de gordura Goldfish (Tecnal, modelo TE 044, Piracicaba, Brasil) foram utilizadas para as determinações de FDN, FDA e lignina (LIG). Para determinação de FDN foram inclusas a aplicações de alfa amilase termoestável (2mL) e sulfito de sódio (Na_2SO_3 , 20 gramas).

Tabela 3.1 – Composição bromatológica das amostras avaliadas no ensaio *in vitro* de produção de gases

Parâmetros	ALG	CAN	GIR	MAC	MAM	NF	PM	CON
MS (g/kg MF)	920,8	917,9	910,6	964,9	981,0	937,0	935,9	882,9
MO (g/kg MS)	933,2	924,3	937,6	942,1	956,1	942,5	927,4	925,7
MM (g/kg MS)	66,8	75,7	62,4	57,9	43,9	57,5	72,6	74,3
EE (g/kg MS)	8,7	25,3	11,5	132,9	298,9	118,8	111,8	22,9
FDN (g/kg MS)	701,8	451,8	671,9	595,1	650,0	599,0	723,8	348,7
FDA (g/kg MS)	460,6	305,7	517,7	383,9	559,6	281,6	564,9	225,9
LIG (g/kg MS)	221,4	157,2	197,0	128,7	431,7	125,8	273,9	26,5
HM (g/kg MS)	241,2	146,1	154,2	211,2	90,4	317,4	159,0	122,8
CEL (g/kg MS)	239,2	148,5	320,8	255,2	127,9	155,8	291,0	199,4
PB (g/kg MS)	437,8	372,2	257,2	125,1	252,6	402,9	267,2	479,2
NIDN (g/kg MS)	59,6	39,5	31,4	25,1	48,6	85,2	28,6	77,2

MF = matéria fresca; MS = matéria seca (105°C); MO = matéria orgânica; MM = matéria mineral; EE = extrato etéreo; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; LIG = lignina; HM = hemicelulose; CEL = celulose; PB = proteína bruta; NIDN = nitrogênio insolúvel em detergente neutro; ALG = farelo de algodão; CAN = farelo de canola; GIR = farelo de girassol; MAC = torta de macaúba; MA = torta de mamona; NF = torta de nabo forrageiro; PM = torta de pinhão manso; CON = farelo de soja;

3.2.6 Elaboração das dietas

Foram elaboradas duas dietas experimentais visando à substituição total e/ou parcial de farelos e/ou alimentos provenientes/destinados à alimentação humana. Foram selecionados os coprodutos disponíveis em quantidades suficientes para conduzir um período experimental *in vivo* de aproximadamente 50 dias, sendo selecionados os farelos de algodão e girassol devido aos teores de proteína e características de fibra, ambos para substituição do milho e do farelo de soja em dietas contendo 60% de forragem (feno de tifton) e 40% de concentrado (70% de milho e 30% de farelo de soja).

Tabela 3.2 – Composição centesimal e bromatológica do feno, dietas experimentais e dieta controle

Alimentos	Feno	Dietas Experimentais		Dieta Controle
		Dieta 1	Dieta 2	
<i>Composição centesimal (%)</i>				
Feno de Tifton 85	100	60	60	60
Milho desintegrado	-	10	16	28
Farelo de Soja	-	-	-	12
Farelo de Algodão	-	-	6	-
Farelo de Girassol	-	30	18	-
Total	-	100	100	100
<i>Composição bromatológica</i>				
MS (g/kg MF)	911	911	908	902
PB (g/kg MS)	69	143	139	126
FDN (g/kg MS)	824	655	667	593
FDA (g/kg MS)	461	399	399	316
LIG (g/kg MS)	90	91	90	60
EE (g/kg MS)	10	16	19	21

MF = matéria fresca; MS = matéria seca; PB = proteína bruta; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; EE = extrato etéreo;

3.2.7 Produção de gases *in vitro*

Para a avaliação do potencial dos coprodutos e das dietas, foi realizado o ensaio de produção de gases *in vitro* conforme descrito por Theodorou et al. (1994) e Mauricio et al. (1999) cujo objetivo é simular o ambiente ruminal estimando o potencial de degradabilidade de diversos alimentos utilizando como inóculo o conteúdo ruminal de ruminantes (comunidade microbiana).

Para este ensaio foram utilizados ovinos da raça Santa Inês, machos, castrados, canulados no rúmen, com peso médio corpóreo de 65,8 kg \pm 5,3, os animais eram mantidos em dieta (60:40, volumoso: concentrado, respectivamente) a base de feno de Tifton 85 (*Cynodon ssp.*) e concentrado proteico composto por soja e milho (proporção 30:70, respectivamente) com acesso a sal mineral e água *ad libitum*. O conteúdo ruminal foi colhido pela manhã (6:00) antes da primeira refeição. Os animais foram escolhidos aleatoriamente e contidos manualmente, as coletas foram realizadas com auxílio de sonda por sucção manual e pinça metálica, para coleta da fração líquida e sólida, respectivamente. A fração líquida foi acondicionada em garrafas térmicas e a sólida em sacos plásticos mantidos em caixa térmica, visando manter a temperatura do rúmen; posteriormente o material foi enviado para o LANA/CENA para o preparo dos inóculos.

Os inóculos foram preparados a partir da combinação entre o conteúdo ruminal de dois animais (50% cada), gerando 3 diferentes combinações (A/B, A/C e B/C). Seguindo a metodologia descrita por Bueno et al. (2005), para o preparo dos inóculos foram utilizadas as frações sólidas e líquidas de cada animal na proporção 50:50, homogeneizadas em liquidificador (Hammilton, modelo 908, Washington, USA), filtradas em tecido de algodão e mantidas a temperatura de 39°C sob fluxo de CO₂.

Os substratos foram pesados individualmente (500 mg) em sacos do tipo "Ankom F57", selados e inseridos em garrafas de vidro (160mL), divididos em grupos submetidos a incubação de 24 e 48 horas para todos os coprodutos e dietas experimentais, além da adição de um substrato como padrão interno. Todos os substratos foram submetidos aos diferentes inóculos formulados, sendo 5 inóculos para avaliação dos coprodutos (total das 3 produções de gases), e três para avaliação das dietas experimentais e controle; os diferentes inóculos foram considerados como repetições.

Para a incubação, nas garrafas contendo substrato foi adicionada solução tamponante (50 mL) e 25 mL de inóculo, vedadas e mantidas a 39°C em estufa por até 48 horas. Foram adicionadas garrafas sem substrato (branco), somente com os sacos de filtro selados, solução tampão e inóculo, para a determinação da produção líquida de gás.

Após vedadas foi medida a pressão interna (psi) das garrafas com auxílio de transdutor de pressão (PressDATA 800, LANA/CENA-USP, Piracicaba, Brasil) conforme descrito por Longo et al. (2006). As leituras de pressão foram realizadas nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 36 e 48 horas após a incubação. Para metade das garrafas, a incubação foi interrompida com 24 horas e submetida à baixa temperatura (-4°C); nas demais garrafas a incubação foi interrompida com 48 horas.

A cada leitura de pressão foram colhidas alíquotas dos gases produzidos em cada garrafa (1,4 e 1,1 mL, para grupo 24 e 48 horas, respectivamente), totalizando 10 mL, estes gases foram armazenados em tubos com vácuo para determinação da concentração de metano (CH₄). Após a colheita das alíquotas foi aliviada a pressão interna de cada garrafa, o conteúdo foi homogeneizado manualmente e retornado a estufa.

Os dados de pressão obtidos foram submetidos a equação para conversão de pressão em volume definida para as condições dos ensaios in vitro de produção de gases do LANA-CENA/USP: $V = 6,442 * P - 0,336$, onde V = Volume (mL) e P = Pressão (psi).

A produção líquida de gases (PG, mL/g MS) em 24 e 48 horas foi determinada pela soma do volume de gás produzido em cada mensuração, descontando a produção de gases do branco.

3.2.7.1 Degradabilidade da matéria orgânica (DMO)

Os sacos filtros contendo o material não degradado foram recuperados após o fim da fermentação, lavados em solução de detergente neutro a 90°C por uma hora, seguido por quatro lavagens com água destilada (90°C) por 5 minutos e uma lavagem em acetona (99% de pureza). Os saquinhos foram então secos em estufa (105°C), pesados e inseridos em cadinhos para posterior incineração em forno mufla (Jung, modelo JP16590, Blumenal, Brasil) a 550°C por 4 horas. A determinação da MOVD foi determinada pela diferença entre a matéria orgânica originalmente incubada e a resultante após o período de incubação, conforme descrito por Blümmel, Makkar e Becker (1997), assim como a relação entre a MOVD e a produção total de gases (GP), considerado como Fator de Partição (FP, em g DMO/mL GP) pelos autores.

3.2.7.2 Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

Para determinação dos AGCC foi utilizado a técnica de cromatografia gasosa utilizando cromatógrafo Shimadzu, modelo CG-2014 (Quioto, Japão), equipado com detector de ionização de chama e coluna empacotada de aço inox (Supelco, modelo 11965, Bellefonte, USA). O líquido colhido de cada garrafa após o fim da fermentação (1,6 mL) foi centrifugado por 40 minutos a 10.400 g e 4°C (Sorval, modelo RC5B Plus, Wilmington, USA), colhido o sobrenadante (800 µL) e adicionado 100 µL de ácido 2-etil-butírico (padrão interno) (Sigma-Aldrich, Steinheim am Albuch, Alemanha), e 200 µL de ácido fórmico (85%). Foram utilizadas curvas de calibração com padrões de concentração conhecida para os ácidos: acético (99,5%), propiônico (99,0%), butírico (98,7%), isobutírico (99,0%), valérico (99,0%) e isovalérico (99,0%) (Chem Service, West Chester, USA) conforme descrito por Lima et al. (2017).

3.2.7.3 Nitrogênio amoniacal (N-NH₃)

Foram pipetados 1 mL do líquido colhido após a interrupção da fermentação para determinação dos níveis de N-NH₃ utilizando destilador (Tecnal, modelo TE-036/1, Piracicaba, Brasil); as amostras foram volatilizadas em presença de solução de Tetraborato 5% (10 mL) e fluxo de vapor d'água. O nitrogênio volatilizado foi capturado por solução de ácido bórico, e determinado através da diferença colorimétrica por titulação com ácido sulfúrico (0,01 N), conforme descrito por Preston (1995).

3.2.7.4 Produção de metano

Para determinação da concentração de metano nas amostras de gases produzidos durante a fermentação foi utilizado cromatógrafo gasoso (Shimadzu, modelo CG-2010, Quioto, Japão), equipado com coluna capilar (megabore) com diâmetro interno de 0,530 mm e espessura do filme de 25 µm (Agilent, modelo J&W HP-PLOT Molsieve, Santa Clara, USA), e detector por ionização de chama (FID). Foram realizadas curvas de calibração com o uso de metano (99,5%, White Martins, Osasco, Brasil) em concentrações de 0, 3, 6, 9 e 12%. As amostras foram injetadas manualmente (500 µL) utilizando nitrogênio (N₂ 4.6 FID) como gás de arraste (25 mL/minuto) sob diferentes temperaturas para, coluna (50°C), injetor (47°C), e detector (280°C).

3.2.8 Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) utilizando o software estatístico SAS® versão 9.4 (Statistical Analysis System Institute, Cary – NC, USA). A comparação entre os diferentes coprodutos foi considerada como efeito de tratamento, assim como os diferentes tempos de incubação foram considerados como efeito do período de incubação. Os parâmetros fermentativos foram avaliados para o efeito de tratamento, período de incubação e a interação tratamento x período de incubação por meio do procedimento GLM. Para os parâmetros cujas interação foi positiva, o desdobramento foi realizado utilizando o procedimento PLM. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Os mesmos procedimentos foram utilizados para as dietas experimentais, considerando as diferentes dietas como efeito de tratamento, e os diferentes períodos de incubação como efeito de período de incubação, assim como a interação entre tratamento e período de incubação, para todos os parâmetros fermentativos avaliados. Foi realizado o desdobramento das interações positivas e todas as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

3.3 Resultados

3.3.1 Degradabilidade de nutrientes e produção de gases

3.3.1.1 Coprodutos

Os parâmetros fermentativos avaliados na produção de gases e a degradabilidade dos substratos estão dispostos na Tabela 3.3. A degradabilidade da matéria orgânica (DMO) e da fibra em detergente neutro (DFDN) foram significativas tanto para o efeito de tratamento (Trat) quanto para o período de incubação (PI), $P < 0,001$. Enquanto, a interação entre Trat e PI (Trat*PI) não foi significativa ($P = 0,290$ e $P = 0,065$, para DMO e DFDN, respectivamente). As médias do controle (CON), nabo forrageiro (NF) e canola (CAN) foram superiores aos demais tratamentos para DMO. Os mesmos tratamentos também foram superiores para DFDN, com exceção de CAN.

Por outro lado, os coprodutos do pinhão manso (PM) e mamona (MAM) apresentaram menor desempenho na DMO. Para a DFDN, embora as médias de MAM, girassol (GIR), macaúba (MAC) e PM não tenham diferiram estatisticamente, a DFDN da MAM foi equivalente a 44% da DFDN de GIR, a segunda menor média entre os tratamentos. Com relação ao efeito no PI, como esperado, o maior período

de fermentação ocasionou maior degradabilidade tanto para matéria orgânica quanto para fibra em detergente neutro.

A produção líquida de gases (NetGP) foi avaliada em função da matéria seca incubada (NetGPMS), da matéria orgânica degradada (NetGPDMO) e da fibra em detergente neutro (NetGPDFDN). Todos estes parâmetros foram significativos ($P < 0,0001$) para o efeito de Trat, assim como para o efeito de PI ($P < 0,0001$). O tratamento CON apresentou médias superiores para todos os parâmetros NetGP avaliados. CAN foi o coproduto mais próximo ao controle (86% da média do CON para NetGPMS). Já para NetGPDMO, os tratamentos NF e CAN (equivalente a 76% e 74%, da NetGPDMO do CON, respectivamente) foram os mais próximos. Para NetGPDFDN o coproduto do NF apresentou média equivalente a 93,5% da NetGPDFDN do CON.

Assim como observado anteriormente nos parâmetros de DMO e DFDN, os tratamentos PM e MAM apresentaram médias inferiores para todos os parâmetros de NetGP avaliados. Para NetGPMS o tratamento PM foi o único a produzir menos de 100 mL/g MS, já em NetGPDMO a produção do PM foi 75% menor em comparação ao CON, a maior diferença observada entre os parâmetros avaliados da NetGP. Para NetGPDFDN ambos PM e MAM apresentaram valores próximos, diferença de 9% entre suas respectivas médias, sendo PM a menor delas.

Os NetGP avaliados, assim como os parâmetros citados anteriormente foram significativos para o efeito de PI ($P < 0,05$), sendo as médias de PG48 superiores para todos. A interação Trat*PI também foi significativa ($P < 0,05$) para todos os parâmetros de NetGP; na figura 3.1 é possível observar esta relação positiva, para NetGPMS e NetGPDMO.

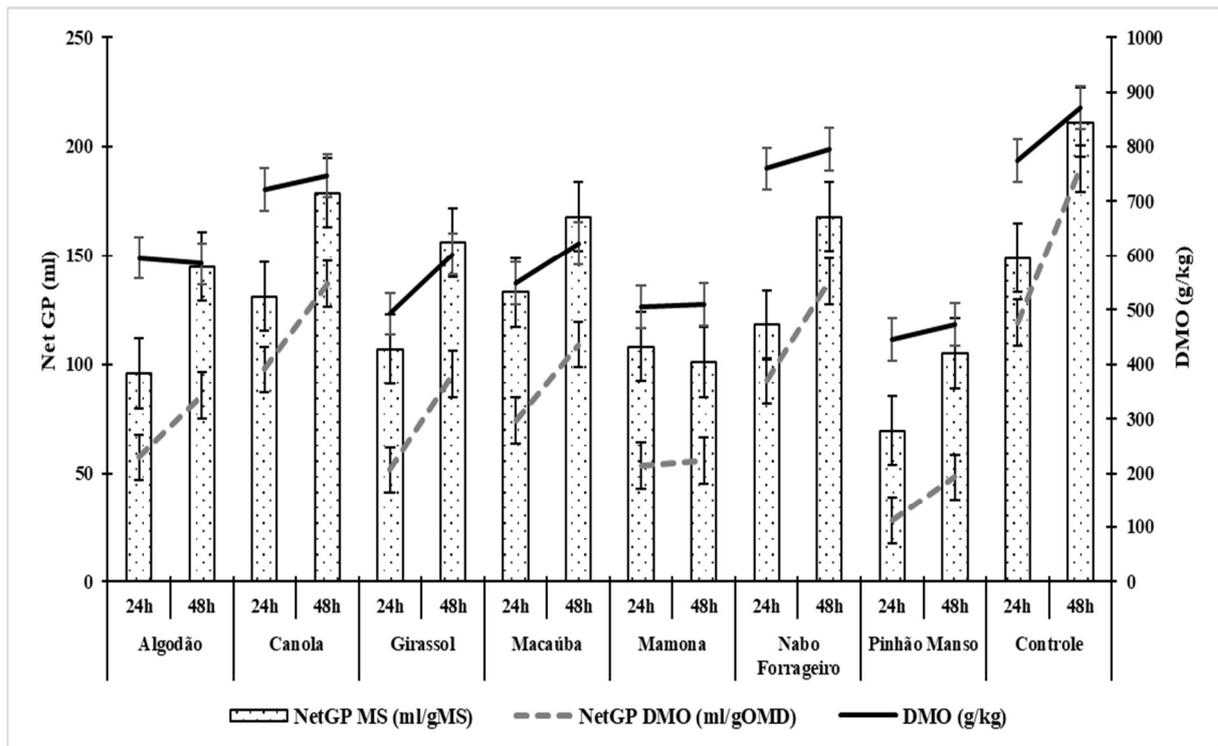
A produção total líquida de metano (NetCH₄) também foi quantificada em função da MS, DMO e DFDN, sendo significativo o efeito para todos estes parâmetros (Trat, $P < 0,05$ e PI, $P < 0,05$). Para NetCH₄MS, o tratamento MAC foi responsável pela maior média numérica, enquanto PM foi responsável pela menor produção (9,14 e 4,00 mL/g MS, respectivamente). Já o CON foi o tratamento que mais produziu NetCH₄DMO e NetCH₄DFDN (7,30 mL/g DMO e 4,94 mL/g DFDN, respectivamente), cujas médias diferiram apenas para MAM e PM, tanto para DMO quanto DFDN; os demais tratamentos apresentaram médias intermediárias. Já a interação Trat*PI não foi significativa para os parâmetros NetCH₄MS ($P = 0,053$), NetCH₄DMO ($P = 0,148$) e NetCH₄DFDN ($P = 0,157$).

Tabela 3.3 – Produção de gases e degradabilidade dos coprodutos do biodiesel

Itens	NetGP			DMO (g/kg)	DFDN (g/kg)	NetCH4		
	(mL/g MS)	(mL/g DMO)	(mL/g DFDN)			(mL/g MS)	(mL/g DMO)	(mL/g DFDN)
<i>Tratamento</i>								
ALG	120 bcd	72 cde	58,3 bc	590 b	472 bc	6,86 ab	4,03 abc	3,24 ab
CAN	155 ab	117 ab	79,4 ab	734 a	493 bc	6,03 ab	4,51 abc	3,07 ab
GIR	131 bc	74 cd	52,9 bc	548 b	387 cd	6,90 ab	3,88 abc	2,81 ab
MAC	151 ab	92 bc	61,3 b	586 b	385 cd	9,14 a	5,63 ab	3,78 ab
MAM	104 cd	55 de	30,0 c	508 bc	267 d	5,58 ab	2,93 bc	1,62 b
NF	143 b	115 b	101 a	778 a	671 a	5,96 ab	4,70 abc	4,10 ab
PM	87,5 d	38 e	27,3 c	459 c	323 cd	4,00 b	1,68 c	1,18 b
CON ¹	180 a	154 a	108 a	823 a	560 ab	8,65 ab	7,30 a	4,94 a
EPM	11,49	10,41	10,8	28,08	47,76	1,60	1,22	0,99
Valor de P	***	***	***	***	***	*	*	*
<i>Período de incubação</i>								
PG24	114 b	72,0 b	47,2 b	605 b	401 b	3,57 a	5,09 a	2,30 b
PG48	154 a	107 a	82,4 a	651 a	489 a	5,67 b	3,57 b	3,89 a
EPM	5,05	4,57	4,74	12,34	20,99	0,71	0,54	0,44
Valor de P	***	***	***	***	***	*	*	*
<i>Tratamento * Período de incubação</i>								
Valor de P	*	*	*	ns	ns	ns	ns	ns

PG = produção líquida de gases; DMO = degradabilidade da matéria orgânica; DFDN = degradabilidade da fibra em detergente neutro; CH4 = produção líquida de metano; MS = matéria seca; ALG = farelo de algodão; CAN = farelo de canola; GIR = farelo de girassol; MAC = torta de macaúba; MA = torta de mamona; NF = torta de nabo forrageiro; PM = torta de pinhão manso; CON = Controle; ¹ = farelo de soja; PG24= produção de gases em 24 horas; PG48 = produção de gases em 48 horas; EPM = erro padrão da média; * = P < 0,05; *** = P < 0,0001; ns= não significativo; Médias com letras diferentes na mesma coluna indicam efeito significativo de tratamento pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Figura 3.1 – Produção de gases e degradabilidade da matéria orgânica entre diferentes tratamentos e período de incubação



3.3.1.2 Dietas experimentais

Assim como os coprodutos, as dietas experimentais foram avaliadas por meio da produção de gases *in vitro*. A relação volumoso:concentrado e a formulação das dietas avaliadas estão descritas na Tabela 3.2. Os resultados obtidos para degradabilidade e demais parâmetros da PG estão dispostos na Tabela 3.4.

Considerando o efeito de tratamento, não foram observadas diferenças entre as dietas para a DFDN ($P = 0,21$), diferentemente da DMO ($P < 0,05$), cuja dieta controle (DietaCON) foi superior aos demais tratamentos (6,7% superior a Dieta2). A DietaCON apresentou médias superiores para todos os parâmetros de NetGP avaliados ($P < 0,05$ para NetGPMS e NetGPDMO, $P < 0,001$ para NetGPDFDN), com as médias da Dieta2 sendo as mais próximas em ambos os parâmetros. Apesar de obter maior NetGP, não foram observadas diferenças para a produção de metano em todos os parâmetros observados, NetCH4MS ($P = 0,86$), NetCH4DMO ($P = 0,10$), e NetCH4DFDN ($P = 0,22$).

Para o efeito do PI, todos os parâmetros avaliados de degradabilidade (DFDN e DMO) apresentaram maiores médias para PG48 ($P < 0,001$), o mesmo foi observado para todos os parâmetros da NetGP ($P < 0,001$). No entanto a produção

de metano apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) apenas para NetCH₄DMO e NetCH₄DFDN, ambas as médias superiores para PG48. Já a NetCH₄MS embora tenha apresentado tendência ($P = 0,06$), não foi significativa. A interação Trat*PI não foi significativa para nenhum dos parâmetros de degradabilidade avaliados, DMO ($P = 0,053$) e DFDN (0,230). O mesmo foi observado para NetGP, com $P = 0,07$ para NetGPMS e NetGPFDN, e $P = 0,06$ para NetGPDMO. Também não foi significativa a interação Trat*PI para a produção de metano, $P = 0,86$ para NetCH₄MS e NetCH₄DMO, e $P = 0,79$ para NetCH₄DFDN.

Tabela 3.4 – Produção de gases e degradabilidade de dietas experimentais

Itens	NetGP			DMO (g/kg)	DFDN (g/kg)	NetCH4		
	(mL/g MS)	(mL/g DMO)	(mL/g DFDN)			(mL/g MS)	(mL/g DMO)	(mL/g DFDN)
<i>Tratamento</i>								
Dieta1	45,1 b	25,1 b	16,4 b	533 b	330	2,98	1,67	1,09
Dieta2	51,3 b	28,5 b	19,0 b	544 b	353	3,09	1,84	1,32
DietaCON	76,9 a	46,5 a	28,0 a	583 a	331	6,95	4,13	2,42
EPM	5,40	3,19	2,13	6,37	9,56	1,27	0,80	0,53
Valor de P	*	*	***	*	ns	ns	ns	ns
<i>Período de incubação</i>								
PG24	40,7 b	19,9 b	9,65 b	484 b	235 b	2,81 b	1,41 b	0,65 b
PG48	74,9 a	46,9 a	32,7 a	623 a	440 a	5,87 a	3,69 a	2,57 a
EPM	4,41	2,60	1,74	5,20	7,80	1,03	0,65	0,44
Valor de P	***	***	***	***	***	ns	*	*
<i>Tratamento * Período de incubação</i>								
Valor de P	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

PG = produção líquida de gases; DMO = degradabilidade da matéria orgânica; DFDN = degradabilidade da fibra em detergente neutro; CH4 = produção líquida de metano; MS = matéria seca; DietaCON = dieta controle (60% feno de Tifton 85, 30% milho desintegrado e 10% farelo de soja); Dieta1 = dieta experimental composta por (60% feno de Tifton 85, 30% farelo de girassol e 10% milho desintegrado); Dieta2 = dieta experimental composta por (60% feno de Tifton 85, 18% farelo de girassol, 16% milho desintegrado e 6% farelo de algodão); PG24= produção de gases em 24 horas; PG48 = produção de gases em 48 horas; EPM = erro padrão da média; * = P < 0,05; *** = P < 0,0001; ns = não significativo; Médias com letras diferentes na mesma coluna indicam efeito significativo de tratamento pelo teste de Tukey a 5% de significância.

3.3.2 Parâmetros fermentativos e produção de ácidos graxos

3.3.2.1 Coprodutos

Para avaliar os efeitos sob a fermentação, foram avaliados os parâmetros, fator de partição (FP), nitrogênio amoniacal (N-NH₃) e potencial hidrogeniônico (pH), todos eles foram significativos ($P < 0,001$), considerando o efeito de tratamento (Tabela 3.5).

Para FP as maiores médias foram obtidas por NF e MAN, o que revela maior DMO por mL de gases produzidos, diferentemente do ocorrido para MAC e GIR, com as menores médias. A produção de N-NH₃ foi superior para NF, porém CON e CAN apresentaram médias próximas. Já as menores médias foram encontradas para MAC e MAM. Embora, as médias para pH tenham diferido, não foram encontrados índices abaixo do ideal, sendo MAM o menor com 6,7.

Foram quantificados todos os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), sendo apresentado na Tabela 3.5 os principais (encontrados em maior abundância) sendo eles, acetato (C2), propionato (C3) e butirato (C4), além do total produzido (AGCCt). A produção de C2 e AGCCt não foi significativa entre os tratamentos ($P = 0,764$ e $P = 0,124$, respectivamente). Já a produção de C3 e C4 ($P < 0,05$) apresentou o mesmo comportamento, com as maiores médias para o tratamento CON e a menor para PM. Os demais tratamentos apresentaram produção intermediária entre os anteriormente citados. Assim como C2 e AGCCt, a relação acetato:propionato (C2:C3) não foi significativa ($P = 0,524$).

Tabela 3.5 – Parâmetros fermentativos dos coprodutos do biodiesel e produção de ácidos graxos de cadeia curta

Itens	Parâmetros fermentativos			Ácidos graxos de cadeia curta (em mmol/L)				
	FP	pH	N-NH ₃	C2	C3	C4	AGCCt	C2:C3
<i>Tratamento</i>								
ALG	2,18 abc	7,26 a	62 bc	43,4	11,1 ab	8,95 ab	68,2	4,09
CAN	2,09 abc	7,11 ab	72 ab	44,6	13,8 ab	9,73 ab	73,9	3,48
GIR	1,85 c	7,26 a	63 bc	43,3	11,6 ab	8,74 ab	69,1	3,94
MAC	1,89 c	6,89 bc	48 d	41,8	11,6 ab	8,54 ab	65,2	4,00
MAM	2,37 a	6,75 c	55 cd	45,2	11,1 ab	9,33 ab	69,4	4,62
NF	2,46 a	7,22 a	74 a	45,8	13,0 ab	9,10 ab	74,5	3,74
PM	2,27 ab	7,24 a	58 c	39,7	9,6 b	7,59 b	61,7	4,31
CON ¹	1,97 bc	7,15 a	69 ab	46,0	14,0 a	10,6 a	76,7	3,51
EPM	0,11	0,07	4,36	4,36	1,26	0,85	5,69	0,59
Valor de P	***	***	***	ns	*	*	ns	ns
<i>Período de incubação</i>								
PG24	2,32 a	7,09	0,05 b	41,1 b	11,0 b	8,58 b	64,9 b	3,93
PG48	1,95 b	7,13	0,07 a	46,3 a	12,9 a	9,57 a	74,7 a	3,99
EPM	0,05	0,03	1,91	1,91	0,55	0,37	2,50	0,26
Valor de P	***	ns	***	*	ns	ns	*	ns
<i>Tratamento * Período de incubação</i>								
Valor de P	***	*	*	ns	*	*	ns	*

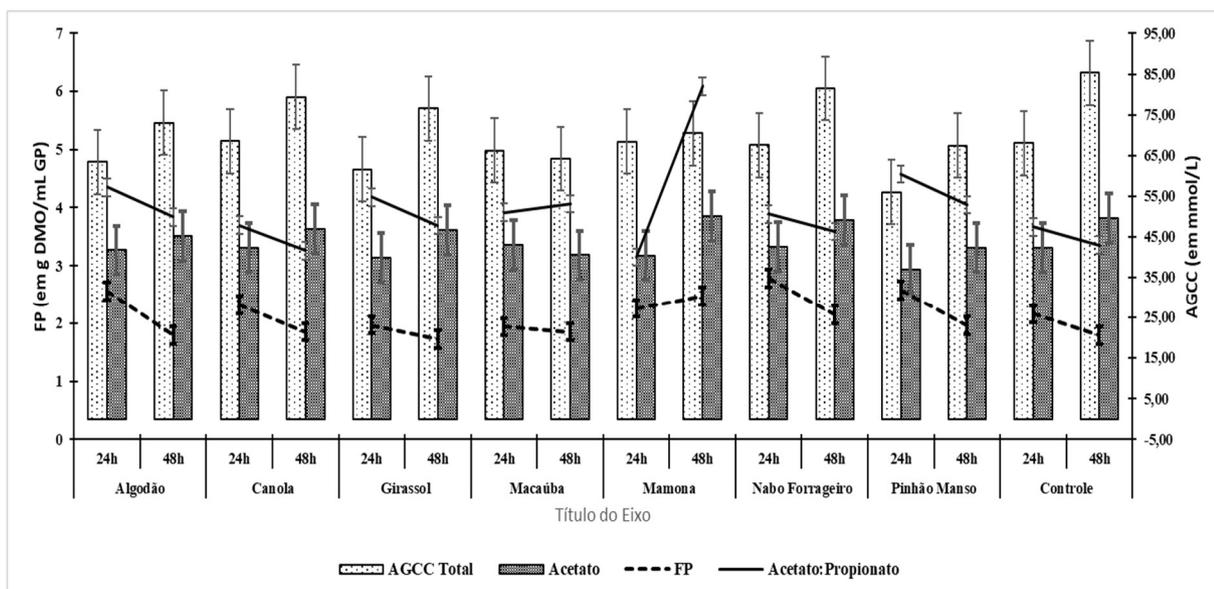
FP = fator de partição, em g DMO/mL GP; pH = potencial hidrogeniônico; N-NH₃, em mg/dL = nitrogênio amoniacal; C2 = acetato; C3 = propionato; C4 = butirato; AGCCt = total de ácidos graxos de cadeia curta; C2:C3 = relação acetato:propionato; DMO = degradabilidade da matéria orgânica; GP = gases produzidos; ALG = farelo de algodão; CAN = farelo de canola; GIR = farelo de girassol; MAC = torta de macaúba; MA = torta de mamona; NF = torta de nabo forrageiro; PM = torta de pinhão manso; COM = Controle; ¹ = farelo de soja; PI = período de incubação; Trat * PI = efeito de interação entre tratamento e período de incubação; EPM = erro padrão da média; EPM = erro padrão da média; * = P < 0,05; *** = P < 0,0001; ns = não significativo; Médias com letras diferentes na mesma linha indicam efeito significativo de tratamento pelo teste de Tukey a 5% de significância.

FP, N-NH₃ e pH, também foram avaliados segundo PI, sendo observadas diferenças significativas apenas para FP e N-NH₃ ($P < 0,001$), diferentemente do pH ($P = 0,971$) que não foi afetado pelo maior PI. Para FP o menor PI (P24) favoreceu a elevação das médias quando comparada a PG48, diferentemente de N-NH₃, onde PG48 apresentou médias superiores.

A produção de AGCC segundo efeito do PI apresentou comportamento diferente do observado para o efeito de Trat, onde a produção de C2 e AGCCt aumentou (12% e 15%, respectivamente) entre PG24 e PG48 ($P < 0,05$), enquanto os demais parâmetros, C3 ($P = 0,059$), C4 ($P = 0,173$) e C2:C3 ($P = 0,268$) não foram significativos.

A interação Trat*PI foi significativa para FP ($P < 0,001$), podendo ser observado maiores médias para os coprodutos durante a PG24, exceto para o MAM (Figura 3.1). A produção de C3 e C4 também apresentou interação significativa, com maior produção para PG48, exceto para os tratamentos MAC e MAM. A relação C2:C3 ($P < 0,05$) obteve o mesmo comportamento anteriormente citado para MAC e MAN conforme observado na Figura 3.2.

Figura 3.2 – Produção ácidos graxos de cadeia curta e relação acetato:propionato entre diferentes tratamentos e períodos de incubação



3.3.2.2 Dietas experimentais

Os parâmetros fermentativos das dietas experimentais estão dispostos na Tabela 3.6. Para o efeito de Trat não foram observadas diferenças para pH ($P = 0,276$), enquanto FP e N-NH₃ foram significativos ($P < 0,05$). A Dieta1 obteve média superior aos demais tratamentos para FP, no entanto não diferiu da Dieta2, ambas com médias próximas, enquanto a DietaCON apresentou o menor valor (diferença de 30% para Dieta1). O oposto foi observado para a produção de N-NH₃, sendo a DietaCON superior aos demais tratamentos.

Todos os parâmetros acima citados apresentaram $P < 0,05$ para o efeito de PI, onde a PG24 apresentou as maiores médias para FP e pH. Assim como citado anteriormente, apesar da diferença encontrada para o pH nenhuma das médias ficou abaixo da faixa ideal para o bom funcionamento da comunidade microbiana, sendo observado pH mais baixo para PG48. Já para a produção de N-NH₃ o comportamento foi oposto, onde a média da PG48 foi superior. Nenhum dos parâmetros avaliados apresentaram interação significativa entre Trat*PI, (FP, $P = 0,569$; pH, $P = 0,950$; N-NH₃, $P = 0,381$).

Tabela 3.6 – Parâmetros fermentativos das dietas experimentais e produção de ácidos graxos de cadeia curta

Itens	Tratamento					Período de incubação			
	Dieta1	Dieta2	Dieta CON	EPM	Valor de P	PG24	PG48	EPM	Valor de P
FP	5,42 a	5,00 ab	3,75 b	0,36	*	5,55 a	3,89 b	0,30	*
pH	6,69	6,66	6,56	0,05	ns	6,73 a	6,55 b	0,04	*
N-NH ₃	48 b	45 b	59 a	2,40	*	0,04 b	0,05 a	0,00	*

FP = fator de partição, em g DMO/mL GP; pH = potencial hidrogeniônico; N-NH₃ = nitrogênio amoniacal, em mg/dL; DMO = degradabilidade da matéria orgânica; GP = gases produzidos; DietaCON = dieta controle (60% feno de Tifton 85, 30% milho desintegrado e 10% farelo de soja); Dieta1 = dieta experimental composta por (60% feno de Tifton 85, 30% farelo de girassol e 10% milho desintegrado); Dieta2 = dieta experimental composta por (60% feno de Tifton 85, 18% farelo de girassol, 16% milho desintegrado e 6% farelo de algodão); EPM = erro padrão da média; * = $P < 0,05$; ns = não significativo; Médias com letras diferentes na mesma linha indicam efeito significativo de tratamento pelo teste de Tukey a 5% de significância.

3.4 Discussão

A técnica *in vitro* de produção de gases fornece informação sobre parâmetros fermentativos que auxiliam na seleção de alimentos com potencial utilização na nutrição de ruminantes (GETACHEW et al., 2005). A NetGP caracteriza a natureza

da produção, alimentos com baixo teor de carboidratos solúveis, assim como a presença de fatores antinutricionais (biomoléculas e metabólitos secundários) são características capazes de reduzir a produção de gases (GETACHEW et al., 2004), o que poderia explicar a baixa NetGP para PM e MAM devido a possível presença de éster de forbol (EF) e ricina (RC), respectivamente.

Tanto PM quanto MAM não passaram por processo de detoxificação neste experimento, sendo o processamento para obtenção do óleo a única intervenção realizada. O PM foi obtido por extração em prensa helicoidal, conforme descrito no tópico 3.2.1, durante este processo o coproduto sofre aquecimento (80°C), no entanto Makkar (2016) ao discutir técnicas de detoxificação por aquecimento encontra reduções da ordem de 5% somente para longos períodos de aquecimento, com temperaturas acima de 100°C. Já MAM foi obtida por prensagem a frio, o que descarta qualquer possibilidade de inativação da molécula (AKANDE; ODUNSI; AKINFALA, 2016).

Assim como PM e MAM, também é reconhecida a presença de um composto tóxico em ALG, no entanto diferentemente dos coprodutos anteriores, a complexação da molécula de gossipol na forma livre (tóxica) para a forma ligada (atóxica) tende a ocorrer durante o processo de extração do óleo (GUEDES; SOTO-BLANCO, 2010; LUQUE; MELERO, 2012), sendo reduzida a presença de gossipol livre a valores muito baixos (0,5 mg/kg) (CONCEIÇÃO et al., 2018), possibilitando maior NetGP para o ALG em comparação a PM e MAM.

Além da presença destes compostos a caracterização bromatológica revelou menor presença de carboidratos solúveis para PM (FDN = 723 g/kg MS), assim como os índices de FDA serem os maiores para PM e MAM (564 e 559 g/kg MS, respectivamente), a grande presença destes carboidratos estruturais (fibra) reduz a taxa de fermentação, o que é refletido no total de gases produzidos (VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991; JESSOP; HERRERO, 1998). A hipótese acima é reforçada quando comparada aos tratamentos que obtiveram maior NetGP, cujos tratamentos CON, CAN e NF eram os que possuíam menor FDN (348, 451 e 599 g/kg MS, respectivamente) e menor FDA (225, 305 e 281 g/kg MS, respectivamente).

Apesar do diferente período de incubação realizado por Silva et al. (2015) o comportamento na NetGP quando comparados os coprodutos ALG, GIR, PM, MAC e CON, foi o mesmo encontrado neste trabalho. Assim como descrito por Abdalla et

al. (2008), cujos tratamentos CON, ALG, MAM e PM, também obtiveram a mesma classificação na NetGP aqui descrita.

A mais baixa DMO encontrada para PM também pode ser atribuída à presença de compostos tóxicos, segundo Makkar e Becker (2009) a presença de EF pode reduzir a degradação da proteína pela comunidade microbiana do rúmen em até 50%, quando comparada a coprodutos livres de EF, o que seria refletido na menor DMO. O que é reforçado pelas baixas médias de N-NH₃ obtidas por PM, uma vez que este parâmetro tem uma relação positiva direta com a degradação da proteína do rúmen (RUSSELL et al., 1992), em oposição ao NF cujas médias indicam grande degradação da proteína. Outro fator que pode ter reduzido a DMO para PM é a provável ocorrência da reação de Maillard devido ao aquecimento ocorrido durante o processo de extração do óleo, esta reação promove a insolubilidade da proteína no ambiente ruminal devido à formação de estruturas junto a carboidratos (MARTINS; JONGEN; VAN BOEKEL, 2000; BORUCKI CASTRO et al., 2007). Este processo poderia ser comprovado através da avaliação do coproduto pós fermentação ruminal, uma vez que estas estruturas devem estar disponíveis para absorção via intestino (ADERIBIGBE et al., 1997; MAKKAR ; ADERIBIGBE; BECKER, 1998; HEIM; KREBS, 2018).

Para a DFDN foram observadas as duas menores médias para MAM e PM, o que deve ser atribuído a maior concentração de lignina destes materiais. A lignina contribui negativamente para a degradação da fibra exercendo uma barreira física para a colonização dos microrganismos, o que resulta na redução da capacidade de degradação e produção de gases (SUSMEL et al., 1990; KAITHO et al., 1997). Assim como justificado para NetGP, a hipótese aqui descrita também pode ser reforçada quando comparado os teores de lignina para os dois tratamentos com maior DFDN, sendo eles CON e NF (26,5 e 125 g/kg MS), cujo baixo teor de lignina pode ter promovido maior acessibilidade a colonização da comunidade microbiana, responsável pela degradação da fibra (WAGHORN; MCNABB, 2003).

A produção de NetCH₄MS foi superior para os tratamentos que haviam produzido mais NetGP, segundo Lee et al. (2011) alimentos com maior degradabilidade tendem a produzir mais CH₄. Uma vez que a DMO proporciona liberação de H₂ ao meio como produto do processo fermentativo, este é utilizado para a produção de AGCC, assim como para produção de CH₄ principalmente pelas archaeas metanogênicas presentes no rúmen ao incorporar o H₂ liberado no meio,

principalmente pela via de redução do CO₂. Todo este processo faz parte do mecanismo de equilíbrio exercido no rúmen para garantir a contínua liberação de íons H⁺ (MCALLISTER; NEWBOLD, 2008; HUWS et al., 2018).

Também eram esperadas reduções na produção de CH₄ para coprodutos com maiores teores de EE, conforme descrito por Freitas et al. (2018), o que foi confirmado pelas menores médias de NetCH₄MS para MAM, PM e NF, com exceção de MAC, que mesmo obtendo o segundo maior teor de EE foi a maior produtora de CH₄ por MS. Já a menor produção de NetCH₄DMO e NetCH₄DFDN por PM dentre todos os tratamentos pode estar atrelada a presença de EF, segundo Oskoueian et al. (2014) comunidades microbianas do rúmen podem ser afetadas pela presença de EF, podendo reduzir a população de archaeas e protozoários, o que reduziria a produção de metano.

A maior produção de CH₄ também poderia estar relacionada à maior produção de C₂, e a relação C₂:C₃, porém, não houve diferença significativa para estes parâmetros quando avaliado o efeito do Trat. No entanto, para o efeito do PI foi possível avaliar maior produção de C₂ para PG48, assim como para AGCct. Este aumento está diretamente relacionado ao acúmulo ocorrido pelo maior período de exposição dos coprodutos a fermentação entérica, uma vez que o período de fermentação pode ocorrer por mais de 96 horas, havendo declínio tanto dos gases produzidos quanto da degradabilidade devido à exaustão dos nutrientes degradáveis do substrato (THEODOROU et al., 1994; GALLO et al., 2018). Alguns modelos matemáticos descrevem esta dinâmica, estabelecendo a taxa de produção ao longo do tempo, assim como o período de colonização da fibra (*lag time*) e o crescimento exponencial nas primeiras horas da fermentação (*log time*) (FRANCE et al., 2005; BANNINK; VAN SCHIJNDEL; DIJKSTRA, 2011).

A hipótese acima descrita também explica médias superiores para todos os parâmetros da Tabela 3.3, onde o efeito de PI sempre foi significativo e as médias de PG48 superiores a PG24.

Alimentos com características de concentrado (grãos e cereais) promovem maior declínio no pH do meio durante o processo de degradação (fermentação entérica) quando comparado a alimentos mais fibrosos (CALSAMIGLIA et al., 2007). No entanto, apesar de apresentar diferença para efeito de Trat para pH, nenhuma das médias ficou abaixo da faixa ideal (> 5,8) para o bom funcionamento do ambiente fermentativo (ASCHENBACH et al., 2011). Não foram observadas

diferenças para o efeito do PI para este parâmetro. Russell (1998) verificou que o declínio do pH altera a formação de AGCC, sendo os valores mais baixos responsáveis pelo declínio na formação de C3, afetando a relação C2:C3. Não terem sido encontradas diferenças para esta relação reforça a hipótese de que os valores de pH encontrados neste trabalho não foram limitantes para o processo fermentativo.

O fator de partição (FP) estabelece uma relação entre a DMO e a produção total de gases, este fator permite que seja definida a qualidade da fermentação, cujos maiores valores expressam maior degradabilidade ao custo de uma menor produção de gases, assim como a eficiência da comunidade ruminal na geração de massa microbiana, sendo predita a relação inversa entre esta e produção de AGCC (BLÜMMEL; MAKKAR; BECKER, 1997). Os valores encontrados para FP vão de encontro ao CH₄ produzido, uma vez que este parâmetro avalia o custo energético da fermentação e a produção de CH₄ representa perdas energéticas (GETACHEW et al., 1998). A maior produção de gases reduz os valores do FP, logo alimentos ricos em carboidratos solúveis tendem a produzir mais NetGP o que explica os valores de FP obtidos estarem abaixo dos valores preconizados por Makkar, Blümmel e Becker (1998) a partir de 2,75.

Com relação às dietas experimentais, foi possível observar superioridade da DietaCON para todos os parâmetros dispostos na tabela 3.4, com exceção aos parâmetros de NetCH₄, que não foram significativos. A superioridade da DietaCON assim como observado anteriormente para os coprodutos, pode estar relacionada aos menores teores de FDN, FDA e LIG. Todos estes fatores contribuem para melhor degradabilidade de fibra, o que é confirmada pela maior DMO. As médias para FP explicam o porquê, mesmo a DMO da DietaCON sendo superior as demais, não foram encontradas diferenças para NetCH₄, o que indica que houve maior gasto energético e, conseqüentemente, maior produção de gases por grama de matéria orgânica degradada (GETACHEW et al., 1998) Apesar de maior DMO pela DietaCON não foram observadas diferenças para o pH entre os tratamentos.

Para o efeito de PI os parâmetros avaliados (tabela 3.4) também confirmam as observações realizadas para os coprodutos, cujo maior período de incubação permitiu a elevação dos produtos da fermentação, conforme discutido anteriormente. Já a interação Trat*PI não foi significativa para nenhum dos parâmetros apresentados nesta mesma tabela.

O FP ter sido superior para o PG24 para as dietas, reforça a hipótese que a degradação do substrato é mais intensa nas primeiras horas, posteriormente declina e há maior acúmulo de gases, reduzindo o FP (GETACHEW et al., 1998). O mesmo é aplicável ao pH, onde as médias de PG24 serão sempre superiores, uma vez que o pH tem uma relação inversamente proporcional ao aumento da degradabilidade (LECHARTIER; PEYRAUD, 2010).

A maior produção de N-NH₃ pela DietaCON demonstra que mesmo obtendo menor PB comparadas as demais dietas, a sua degradação foi superior. Assim como para o efeito de PI onde a PG48 foi superior, reforçando a elevação da DMO para o maior período de incubação, discutido anteriormente. Não foram observadas diferenças significativas para a interação Trat*PI para todos os parâmetros avaliados na Tabela 3.6.

3.5 Conclusão

É possível a utilização de coprodutos do biodiesel como suplemento proteico e energético na dieta de ruminantes, dentre os coprodutos avaliados, a Canola e Nabo Forrageiro foram responsáveis pelos melhores resultados, obtendo ótimo desempenho no ambiente fermentativo. Diferente dos coprodutos do Pinhão Manso e Mamona, cuja presença de compostos tóxicos influenciou negativamente o ambiente fermentativo, apresentando desempenho inferior aos demais coprodutos avaliados, afirmando a necessidade de detoxificação antes de expô-los ao ambiente fermentativo. Para as dietas, a Dieta 2 (farelo de algodão (6%), girassol (18%), milho (16%) e feno de tifton (60%)) apresentou maior potencial para substituição do milho e da soja como suplemento proteico e energético, com desempenho no ambiente fermentativo mais próximo a DietaCON (farelo de soja (12%) milho (28%) e feno de tifton (60%)). As dietas experimentais avaliadas obtiveram desempenho inferior ao controle para a degradabilidade da matéria orgânica, produção total de gases e nitrogênio amoniacal, porém, obtiveram melhores resultados para fator de partição e não apresentaram incremento de metano. No entanto, a introdução destes coprodutos a dieta deve ser avaliada no ambiente biológico (*in vivo*) para que possam ser elucidados seus efeitos sob a microbiota ruminal por um longo período de exposição.

Referências

- ABAS, N.; KALAIR, A.; KHAN, N. Review of fossil fuels and future energy technologies. **Futures**, Guildford, v. 69, p. 31–49, 2015.
- ABDALLA, A. L. et al. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, p. 260–268, 2008. Suplemento especial.
- ADERIBIGBE, A. O. et al. Chemical composition and effect of heat on organic matter- and nitrogen-degradability and some antinutritional components of *Jatropha* meal. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 67, n. 2, p. 223–243, 1997.
- AKANDE, T. O.; ODUNSI, A. A.; AKINFALA, E. O. A review of nutritional and toxicological implications of castor bean (*Ricinus communis* L.) meal in animal feeding systems. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 100, n. 2, p. 201–210, 2016.
- ASCHENBACH, J. R. et al. Ruminant nutrition symposium: Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, n. 4, p. 1092–1107, 2011.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis of AOAC International**. Gaithersburg: AOAC International, 2011. 2590 p.
- AZADI, P. et al. The evolution of the biofuel science. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, London, v. 76, p. 1479–1484, 2017.
- BANNINK, A.; VAN SCHIJNDEL, M. W.; DIJKSTRA, J. A model of enteric fermentation in dairy cows to estimate methane emission for the Dutch National Inventory Report using the IPCC Tier 3 approach. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 166–167, p. 603–618, 2011.
- BLÜMMEL, M.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. *In vitro* gas production: a technique revisited. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 77, n. 1–5, p. 24–34, 1997.

BORUCKI CASTRO, S. I. et al. Ruminant Degradability and Intestinal Digestibility of Protein and Amino Acids in Treated Soybean Meal Products. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 2, p. 810–822, 2007.

BUENO, I. C. S. et al. Influence of inoculum source in a gas production method. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 123, p. 95–105, 2005.

BURNHAM, A. et al. Life-Cycle Greenhouse Gas Emissions of Shale Gas, Natural Gas, Coal, and Petroleum. **Environmental Science & Technology**, Washington, DC, v. 46, n. 2, p. 619–627, 2012.

CALSAMIGLIA, S. et al. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 6, p. 2580–2595, 2007.

CONCEIÇÃO, A. A. et al. Development of an RP-UHPLC-PDA method for quantification of free gossypol in cottonseed cake and fungal-treated cottonseed cake. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 13, n. 5, 2018.

CZÚCZ, B.; GATHMAN, J. P.; MCPHERSON, G. U. Y. R. The Impending Peak and Decline of Petroleum Production: an Underestimated Challenge for Conservation of Ecological Integrity. **Conservation Biology**, Malden, v. 24, n. 4, p. 948–956, 2010.

FRANCE, J. et al. A general compartmental model for interpreting gas production profiles. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 123–124, p. 473–485, 2005.

FREITAS, D. S. et al. Unconventional Vegetable Oils for a Reduction of Methanogenesis and Modulation of Ruminant Fermentation. **Frontiers in Veterinary Science**, Lousanne, v. 5, p. 201-1–201-9, 2018.

GAFFNEY, J. S.; MARLEY, N. A. The impacts of combustion emissions on air quality and climate – From coal to biofuels and beyond. **Atmospheric Environment**, Oxford, v. 43, n. 1, p. 23–36, 2009.

GALLO, A. et al. Short communication: In vitro rumen gas production and starch degradation of starch-based feeds depend on mean particle size. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 101, n. 7, p. 6142–6149, 2018.

GETACHEW, G. et al. In vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 72, n. 3, p. 261–281, 1998.

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

GETACHEW, G. et al. Use of an in vitro rumen gas production technique to evaluate microbial fermentation of ruminant feeds and its impact on fermentation products. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 123–124, p. 547–559, 2005.

GNANSOUNOU, E. et al. Life cycle assessment of biofuels: Energy and greenhouse gas balances. **Bioresource Technology**, Barking, v. 100, n. 21, p. 4919–4930, 2009.

GUEDES, F. C. B.; SOTO-BLANCO, B. Sperm quality of sheep fed cottonseed cake. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 38, n. 4, p. 415–418, 2010.

HEIM, R. A. L.; KREBS, G. L. Ruminant protein digestibility of Australian produced oilseed meals. **Animal Production Science**, Melbourne, 2018. doi: 10.1071/AN18054.

HUWS, S. A. et al. Addressing Global Ruminant Agricultural Challenges Through Understanding the Rumen Microbiome: Past, Present, and Future. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 9, p. 2161-1–2161-33, 2018.

JESSOP, N. S.; HERRERO, M. Modelling fermentation in an in vitro gas production system: effects of microbial activity. **British Society of Animal Production**, Penicuik, v. 22, p. 81–84, 1998.

KAITHO, R. J. et al. Relationships between preference, rumen degradability, gas production and chemical composition of browses. **Agroforestry Systems**, Heidelberg, v. 39, n. 2, p. 129–144, 1997.

LECHARTIER, C.; PEYRAUD, J.-L. The effects of forage proportion and rapidly degradable dry matter from concentrate on ruminal digestion in dairy cows fed corn silage-based diets with fixed neutral detergent fiber and starch contents. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, n. 2, p. 666–681, 2010.

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

LIMA, P. M. T. et al. Nutritional evaluation of the legume *Macrotyloma axillare* using in vitro and in vivo bioassays in sheep. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 102, n. 2, p. 669–676, 2017.

LONGO, C. et al. The influence of head-space and inoculum dilution on in vitro ruminal methane measurements. **International Congress Series International Congress Series**, Amsterdam, v. 1293, n. 4, p. 62–65, 2006.

LUQUE, R.; MELERO, J. A. **Advances in Biodiesel Production: Processes and Technologies**. 1. ed. Cambridge: Woodhead Publishing, 2012. 304 p.

MAKKAR, H. P. S. **Biofuel co-products as livestock feed**: opportunities and challenges. Rome: FAO, 2012. 553 p.

MAKKAR, H. P. S. State-of-the-art on detoxification of *Jatropha curcas* products aimed for use as animal and fish feed: A review. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 222, p. 87–99, 2016.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. *Jatropha curcas*, a promising crop for the generation of biodiesel and value-added coproducts. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 111, n. 8, p. 773–787, 2009.

MAKKAR, H. P. S.; ADERIBIGBE, A. O.; BECKER, K. Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. **Food Chemistry**, Barking, v. 62, n. 2, p. 207–215, 1998.

MAKKAR, H. P. S.; BLÜMMEL, M.; BECKER, K. Application of an in vitro gas method to understand the effects of natural plant products on availability and partitioning of nutrients. **British Society of Animal Production**, Penicuik, v. 22, p. 147–150, 1998.

MARTINS, S. I. F. S.; JONGEN, W. M. F.; VAN BOEKEL, M. A. J. S. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 11, n. 9, p. 364–373, 2000.

MAURICIO, R. M. et al. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 79, n. 4, p. 321–330, 1999.

MCALLISTER, T. A.; NEWBOLD, C. J. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v. 48, n. 2, p. 7–13, 2008.

MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 85, n. 6, p. 1217–1240, 2002.

NIGAM, P. S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, Oxford, v. 37, n. 1, p. 52–68, 2011.

OLIVEIRA, F. C.; COELHO, S. T. History, evolution, and environmental impact of biodiesel in Brazil: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, London, v. 75, p. 168–179, 2017.

OSKOUÉIAN, E. et al. Dose-response Effects of Phorbol Esters Isolated from *Jatropha* Meal on Rumen Microbial Activities. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, Faisalabad, v. 9, n. 1, p. 37–46, 2014.

PRESTON, T. R. **Tropical animal feeding: a manual for research workers**. Rome: FAO, 1995. 126 p.

RENEWABLE ENERGY POLICY NETWORK FOR THE 21st CENTURY - REN21. **Renewables 2018 Global Status Report**. Paris: REN 21 Secretariat, 2018. 325 p.

RUSSELL, J. B. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminant fermentation. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 11, p. 3551–3561, 1992.

RUSSELL, J. B. The Importance of pH in the Regulation of Ruminal Acetate to Propionate Ratio and Methane Production In Vitro. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 12, p. 3222–3230, 1998.

SCHADER, C. et al. Impacts of feeding less food-competing feedstuffs to livestock on global food system sustainability. **Journal of the Royal Society Interface**, London, v. 12, n. 113, p. 20150891-1–20150891-12, 2015.

SILVA, A. L. et al. Simulation of rumen fermentation kinetics of by-products from the biodiesel industry with in vitro gas production technique. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 36, n. 6, p. 3851–3862, 2015.

SOUZA, S. P.; SEABRA, J. E. A.; NOGUEIRA, L. A. H. Feedstocks for biodiesel production: Brazilian and global perspectives. **Biofuels**, London, v. 9, n. 4, p. 455–478, 2018.

STATTMAN, S. L.; HOSPES, O.; MOL, A. P. J. Governing biofuels in Brazil: A comparison of ethanol and biodiesel policies. **Energy Policy**, Guildford, v. 61, p. 22–30, 2013.

SUSMEL, P. et al. Rumen degradability of organic matter, nitrogen and fibre fractions in forages. **British Society of Animal Production**, Penicuik, v. 51, n. 3, p. 515–526, 1990.

THEODOROU, M. K. et al. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 48, n. 3, p. 185–197, 1994.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 10, p. 3583–3597, 1991.

WAGHORN, G. C.; MCNABB, W. C. Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. **Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 62, n. 2, p. 383–392, 2003.

4 Digestibilidade, Balanço Energético e Produção de Metano por Ovinos Alimentados com Dieta Contendo Coprodutos do Algodão e Girassol em Substituição a Alimentos Convencionais

Resumo: Diminuir o uso de alimento humano na nutrição animal é desejável. Fontes alternativas devem ser exploradas para este fim, e a avaliação *in vivo* é indispensável para determinar seu comportamento no meio biológico. Neste trabalho objetivou-se avaliar a digestibilidade aparente de nutrientes, o balanço energético, parâmetros fermentativos e a produção de CH₄ entérico de coprodutos da cadeia do biodiesel. Foram utilizados sete carneiros da raça Santa Inês, machos e com peso corporal (PV) de 63 kg ± 7,6, em dois períodos experimentais de 21 dias cada. Os animais foram distribuídos em dois grupos, dieta controle (Dieta CON, recebendo concentrado composto por 70% milho desintegrado (MD) e 30% farelo de soja (FS)), e dieta com coproduto (Dieta CPDT, recebendo concentrado composto por 45% farelo de girassol, 40% MD e 15% farelo de algodão). Ambos os grupos receberam feno de Tifton 85 (*Cynodon ssp.*) picado como volumoso, compondo a dieta na proporção 60:40 (volumoso:concentrado, respectivamente). As dietas foram fornecidas (2% MS do PV), juntamente com o sal mineral (1% do peso total da dieta) em duas refeições diárias e a água *ad libitum*. Os animais foram alocados em baias individuais no período de adaptação (d1 a d12) e posteriormente em gaiolas metabólicas para a realização do ensaio de digestibilidade (d14 a d18) e mantidos em gaiolas respirométricas para a quantificação da produção de metano entérico (d19 a d21). Para determinação dos parâmetros fermentativos foi colhida uma amostra de líquido ruminal (d13). O consumo da dieta e a excreção de fezes e urina foram controlados diariamente e amostrados para análise dos nutrientes e posterior determinação da digestibilidade, balanço energético e produção de CH₄. Os dados foram avaliadas por análise de variância considerando as diferentes dietas como efeito do tratamento. Não foram observadas diferenças para o consumo de nutrientes ($P > 0,05$), assim como para os parâmetros fermentativos, pH, nitrogênio amoniacal (N-NH₃) e contagem de protozoários. O balanço do nitrogênio foi positivo para ambos tratamentos ($P > 0,05$), não foram observadas diferenças para a energia metabolizável (EB), energia digestível (ED) e a perda energética para produção de CH₄ ($P > 0,05$), assim como a digestibilidade da proteína. Diferentemente dos parâmetros anteriores a produção de acetato (C₂, $P < 0,05$) foi superior para a Dieta CON, o mesmo foi observado para produção de butirato (C₄) e a produção total de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCt). Apesar da maior produção de C₂ e C₄, a relação acetato:propionato (C₂:C₃) não apresentou diferença entre os tratamentos ($P > 0,05$), o mesmo acontecendo com a produção de CH₄ ($P > 0,05$). A digestibilidade da matéria seca e da matéria orgânica foi superior para Dieta CON ($P < 0,05$). Os resultados obtidos para as condições e proporções aqui avaliados foram positivos para a substituição total do FS e parcial do MD, podendo os coprodutos aqui avaliados serem utilizados na substituição destas fontes alimentares sem efeitos negativos à fermentação entérica e sem alterações nas emissões de CH₄, contribuindo diretamente para a segurança alimentar e a sustentabilidade da cadeia produtiva de ambos os setores.

Palavras-chave: segurança alimentar, sustentabilidade, ruminantes, biodiesel.

Nutrients Digestibility, Energy Balance and Enteric Methane Production by Sheep Fed with Diet Containing Cottonseed and Sunflower Coproducts in Replacement of Edible Food

Abstract: Decrease the use of human edible food as feed is desirable. Alternative sources may be explored for this purpose and in vivo assays are important to determine their behavior in the biological environment. This work aimed to evaluate apparent nutrients digestibility, energy balance, fermentative parameters and enteric CH₄ production of coproducts from the biodiesel production chain. Seven Santa Ines breed, male, with body weight (BW) average of 63 kg ± 7.6 were used in two experimental periods of 21 days each. The animals were distributed in two groups, control diet (Diet CON, receiving concentrate composed by 70% of disintegrated corn (DC) and 30% of soybean meal (SM)), and coproduct diet (Diet CPDT, receiving concentrate composed by 45% of sunflower meal, 40% of DC and 15% of cottonseed meal). Both groups were fed with Tifton 85 hay (*Cynodon ssp.*) chopped as roughage, at the proportion 60:40 (roughage:concentrate, respectively). The diets were offered (2% DM of BW), along with mineral salt (1% of total diet weight) twice a day and water *ad libitum*. The animals were kept in individual pens for the adaptation period (d1 to d12) then moved to metabolism cage for the apparent digestibility essay (d14 to d18) and then kept in individual methane-collect chambers to quantify enteric CH₄ production (d19 to d21). To determine fermentative parameters, samples of ruminal liquid of each animal were collected (d13). Diet intake and the feces and urine excretions were controlled daily and sampled for nutrients analyses and further determination of digestibility, energy balance and CH₄ production. The data were evaluated by analyses of variance considering the different diets as treatment effect. No differences were observed for nutrients intake ($P > 0,05$), as well as fermentative parameters, pH, ammonia-nitrogen (N-NH₃) and protozoa count. Nitrogen balance was positive for both treatments ($P > 0,05$), no differences were observed for metabolizable energy (ME), digestible energy (DE) nor energy loss for CH₄ production ($P > 0,05$), as well as apparent digestibility of protein. Differently from previous parameters described, acetate (C₂, $P < 0,05$) production was superior for Diet CON, the same was observed for butyrate (C₄) and total short fatty chain acids (SCFAt) production. Despite higher C₂ and C₄ production by Diet CON, acetate:propionate ratio (C₂:C₃) was not different ($P > 0,05$), as well as CH₄ production. Apparent digestibility of dry matter and organic matter was greater for Diet CON ($P < 0,05$). The present findings at the conditions and diet proportions evaluated showed that both food sources (SM and DC) may be replaced by biodiesel coproducts without negative effect upon ruminal fermentation and without increments on CH₄ production, playing an import role to promote food security and sustainability to the productive chains of both sectors.

Keywords: food security, sustainability, ruminants, biodiesel.

4.1 Introdução

Reduzir o uso de alimentos voltados à nutrição humana em diferentes setores que não à indústria alimentícia é indispensável para atender à crescente demanda por alimentos (WEST et al., 2014). Até a metade do século XXI a população mundial deverá atingir um total de 9 bilhões de habitantes (ERICKSEN; INGRAM; LIVERMAN, 2010).

A capacidade de ruminantes em metabolizar alimentos de baixo valor nutritivo não utilizados na nutrição de humanos tem sido apontada como uma das alternativas a serem exploradas para elevar a oferta de alimentos pelos próximos anos (GILL; SMITH; WILKINSON, 2010; MOTTET et al., 2018), beneficiando a promoção da segurança alimentar diretamente ao reduzir a competição entre os diferentes setores, e também pelo fornecimento de proteína de alta qualidade, fundamental para o desenvolvimento humano (ABBASPOUR; HURRELL; KELISHADI, 2014; PERIGNON et al., 2018).

Como consequência à elevação da população mundial, a demanda energética também irá aumentar, sendo necessário o uso de diferentes fontes energéticas para que a demanda possa ser atendida (GUO; SONG; BUHAIN, 2015). A exploração de culturas renováveis para a produção de energia pode oferecer uma fonte alimentícia alternativa para a produção animal; segundo Makkar (2012), os coprodutos do biodiesel, por exemplo, apresentam características que possibilitam seu uso como fonte proteica e energética para ruminantes.

No entanto, além da crescente demanda por alimentos predita, há também a preocupação com a sustentabilidade do planeta. A elevação dos níveis dos gases de efeito estufa na atmosfera e o aumento na ocorrência de distúrbios ambientais atribuídos a intervenção do homem ao longo do desenvolvimento da sociedade moderna, também são desafios para o século XXI (GODFRAY et al., 2010; MOTTET et al., 2018).

A fermentação entérica, responsável pela degradação dos alimentos no sistema metabólico dos ruminantes, tem como um de seus produtos a produção de metano (CH₄), um importante gás de efeito estufa (MCDONALD et al., 2010; BERCHIELLI, 2011; GODFRAY et al., 2018). Buscando reduzir os impactos da pecuária, é indispensável que os alimentos alternativos a serem explorados não promovam maiores elevações nas emissões deste gás, uma vez que o setor

pecuário é responsável por 14,5 % das emissões antropogênicas totais (FAO, 2018), cuja fermentação entérica foi responsável por 46,2 % do metano emitido pelo setor (FAO, 2019).

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos nutricionais ao uso do farelo de girassol e farelo de algodão como suplemento energético e proteico em substituição parcial ao milho e total ao farelo de soja, utilizando o ensaio in vivo de digestibilidade aparente para avaliação dos produtos da fermentação, a emissão de CH₄ e o balanço energético e proteico.

4.2 Material e Métodos

O ensaio foi realizado no município de Piracicaba, estado de São Paulo, nas Instalações para Animais em Experimentação do Laboratório de Nutrição Animal (LANA) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo (USP), entre os meses de julho e setembro de 2018. Todos os procedimentos experimentais envolvendo os animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (Protocolo N° 004/2018).

Foram utilizados sete carneiros, machos, adultos canulados no rúmen, com peso corporal médio de 63 kg \pm 7,6. O ensaio foi realizado em dois períodos experimentais de vinte e um dias, sendo cada um dividido entre adaptação (d1 a d12), ensaio de digestibilidade (d14 a d18) e quantificação da produção de metano entérico (CH₄ – d19 a d21).

Os tratamentos consistiam em concentrado controle (Dieta CON), formulado a partir de milho desintegrado (MD) e farelo de soja (FS) na proporção de 70:30, respectivamente), e concentrado com coproduto (CPDT), formulado a partir de MD, farelo de algodão (FA) e farelo de girassol (FG) na proporção de 40:15:45, respectivamente. As dietas (Tabela 4.1) possuíam a mesma fonte de volumoso (feno de Tifton 85, *Cynodon ssp.*) picado com granulometria de 3 cm, com relação volumoso/concentrado na proporção de 60:40.

As dietas foram formuladas em acordo as exigências nutricionais para ovinos adultos em manutenção (NRC, 2007), considerando o consumo diário de 2% do peso vivo. Devido à introdução de farelo de algodão à dieta CPDT, foram determinadas as concentrações de gossipol livre (GL) e gossipol total (GT) no farelo integral por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) como método de

separação para detecção e quantificação e calculada a exposição dos animais ao gossipol durante o período experimental em função do consumo médio diário, distribuição por peso corpóreo e ingestão total.

4.2.1 Distribuição das Parcelas e Período de Adaptação

Os animais foram distribuídos ao acaso entre os tratamentos, assim como o número de parcelas (repetições) de cada tratamento, para os dois períodos experimentais. Para o primeiro período o tratamento CTRL foi composto por 3 carneiros com peso médio de 62 kg \pm 5,3, enquanto o tratamento CPDT foi composto por 4 animais, com peso médio de 70 kg \pm 7,7. Para o segundo período o número de parcelas foi o inverso, ficando CTRL com peso médio de 71kg \pm 6,0 e CPDT com peso médio de 65 kg \pm 4,5.

Tabela 4.1 – Composição centesimal e bromatológica do feno e dietas experimentais

Alimentos	Feno	Concentrado	
		Coproduto	Controle
<i>Composição centesimal (%)</i>			
Feno de Tifton 85	-	60	60
Milho desintegrado	-	16	28
Farelo de Soja	-	-	12
Farelo de Algodão	-	6	-
Farelo de Girassol	-	18	-
Total	-	100	100
<i>Composição química</i>			
MS (g/kg MF)	947	908	890
MO (g/kg MS)	932	953	972
PB (g/kg MS)	68	263	211
EE (g/kg MS)	13	24	38
EB (kcal/kg MS)	3800	3956	3622

MF = matéria fresca; MS = matéria seca; PB = proteína bruta; EE = extrato etéreo; EB = energia bruta;

Os animais foram alojados em baias individuais (1,0 x 1,5 m) providos com comedouros e bebedouros em galpão coberto. A dieta foi fornecida as 8h30 e as 16h30, com oferta de volumoso e concentrado em comedouros separados. O concentrado era distribuído duas vezes ao dia em proporções iguais, enquanto o feno era fornecido em até 4 vezes. A oferta de água foi *ad libitum* e o sal mineral

correspondeu a 1% do peso total da dieta, sendo fornecido no período da tarde junto à segunda oferta do concentrado.

As baias eram limpas todas as manhãs, assim como os comedouros e bebedouros; os animais eram manejados a cada dois dias (8:00) para a limpeza da cânula e manutenção preventiva das cânulas. O período total de adaptação à dieta foi de doze dias.

Diariamente durante o período de adaptação as sobras de feno e concentrado foram recolhidas e pesadas individualmente. O reajuste da oferta foi realizado diariamente em função do volume das sobras, sendo adicionado 10% para sobras inferiores a 10% (em relação a oferta do dia anterior), e redução de 10% para sobras superiores a 10%.

4.2.2 Digestibilidade Aparente

Ao 13° dia os animais foram pesados individualmente (8:00) e alojados em gaiolas metabólicas (0,8 x 1,20 m) equipadas com coletor separador de fezes e urina, permanecendo pelo período de seis dias, sendo o primeiro deles para adaptação e os demais para quantificação da dieta oferecida e sobras, excreção de fezes e urina e consumo de água para posterior e determinação da digestibilidade aparente dos nutrientes.

O concentrado e o feno eram fornecidos duas vezes ao dia, as 8h00 e as 16h30, ambos no mesmo comedouro, o concentrado era ofertado primeiro e posteriormente o feno; para oferta de água eram mensurados 6 L em proveta de vidro e vertido nos respectivos baldes para posterior distribuição.

Para coleta das fezes foram utilizados sacos plásticos fixados na saída do coletor de excretas. Vasilhas contendo 100 mL de solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4 10%) foram alocadas abaixo da saída do coletor para acidificação da urina, evitando a volatilização do nitrogênio.

Entre o 14° e 18° dia, foram colhidas pela manhã as sobras da dieta ofertada e das fezes, ambas foram pesadas e uma alíquota representativa de 10% do volume total foi amostrada a cada dia, formando uma amostra composta dos 5 dias para cada animal. O volume de urina excretado era mensurado diariamente com auxílio de proveta de vidro; uma alíquota representativa de 10% do volume total foi amostrada a cada dia, formando uma amostra composta dos 5 dias para cada

animal. As amostras de fezes e urina foram mantidas em *freezer* (-4°C) para posterior análises laboratoriais.

Após o fim do período experimental as amostras de fezes e sobras foram descongeladas em temperatura ambiente, posteriormente amostradas (≈200 g), alocadas em bandejas de alumínio e secas em estufa de circulação de ar forçado a 55°C por 72 horas. Depois de secas as amostras foram pesadas, moídas em moinho do tipo Wiley (Marconi, Piracicaba, Brasil) equipadas com peneiras de crivo a 1,0 mm, e armazenadas em sacos plásticos para posterior análise bromatológica e determinação de energia bruta.

A caracterização bromatológica foi realizada para as amostras da dieta oferecida, das sobras e das fezes; foram determinados os teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB) segundo a metodologia descrita pela AOAC (2011). A digestibilidade destes nutrientes foi determinada pela equação 1 conforme descrita por McDonald et al. (2010).

$$d (\%) = [(C - E) \cdot C^{-1}] \cdot 100 \quad (1)$$

onde, d = digestibilidade aparente do nutriente avaliado, C = consumo do nutriente, e E = quantidade do nutriente excretado;

Assim como as amostras de fezes e oferta, as amostras de urina foram descongeladas em temperatura ambiente, homogeneizadas e colhidas duas alíquotas de 100 mL de cada amostra, armazenadas em frasco de vidro individuais, sendo o primeiro destinado a determinação dos derivados de purinas (DP) para a estimativa da síntese de proteína microbiana, e a segunda para determinação de nitrogênio total (N-Total) e nitrogênio amoniacal (N-NH₃) excretados.

O balanço de nitrogênio foi calculado a partir da determinação do nitrogênio (AOAC, 2011) nas frações dieta ofertada, sobras e excretas (fezes e urina). O nitrogênio retido foi determinado conforme a equação 2.

$$N_{\text{retido}} (\text{g/dia}) = N_{\text{ingerido}} - N_{\text{fezes}} - N_{\text{urina}} \quad (2)$$

onde, N_{retido} = nitrogênio absorvido (g/dia), N_{ingerido} = nitrogênio consumido (g/dia), N_{fezes} = nitrogênio nas fezes (g/dia), N_{urina} = nitrogênio na urina (g/dia).

A proteína microbiana foi determinada segundo descrito por Makkar e Chen (2004) após quantificação dos DP na urina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) conforme descrito por Abdalla Filho et al. (2016). As amostras de urina foram descongeladas, sonicadas (Kerry Ultrasonics, modelo PUL 250, Hitchin, Reino Unido) e centrifugadas (582g a 4°C) por 20 minutos. Foi utilizado cromatógrafo (Agilent, modelo 1100, Santa Clara, Estados Unidos da América) equipado com coluna Zorbax de fase reversa (Agilent, modelo C18, Santa Clara, Estados Unidos da América) e detector de arranjo de fotodiodos (Diode Array Detector - DAD).

Para determinação do nitrogênio microbiano absorvido foi utilizada a equação descrita por Makkar e Chen (2004):

$$N_{\text{MICRO}} \text{ (g N/dia)} = (\text{MetaDP} * \text{TeorNP}) / (y * \text{DPM} * 1000)^{-1} \quad (3)$$

onde, N_{micro} = nitrogênio microbiano, M_{etaDP} = metabólitos de derivados de purinas (mmol/dia/kg^{0,75}), T_{eorNP} = teor de nitrogênio em purinas (= 70 mg N mmmol⁻¹), y = constante da razão entre nitrogênio de purinas para nitrogênio total do complexo de microrganismos do rúmen (= 0,116), DPM = digestibilidade de das purinas microbianas (= 0,83).

4.2.3 Metano entérico

Ao final do 18° dia, os animais foram transferidos para as câmaras respirométricas para quantificação do metano entérico conforme descrito por Abdalla et al. (2012). O período de adaptação dos animais às câmaras foi de 24 horas, seguidos de 2 dias de mensuração dos gases emitidos.

A partir do 19° e 20° dia, foram amostrados os gases produzidos pelo período de ≈ 23 horas/dia. Foram utilizadas 10 câmaras, sendo 7 contendo os animais em avaliação e três câmaras vazias (branco). Além das câmaras, também foram amostrados os gases do galpão onde os animais estavam alojados para determinação da concentração de metano externo as câmaras (ambiente).

As câmaras possuíam comedouros, bebedouros e coletores para urina e fezes; para sucção dos gases produzidos foi utilizada uma bomba de exaustão cuja taxa do fluxo de remoção dos gases (máxima e mínima, em m/s) foi determinada com auxílio de anemômetro (Instrutherm, modelo AD-250, São Paulo, São Paulo), eram realizadas leituras diárias (ao menos 3 vezes). Em conjunto também foram

colhidos dados relativos à temperatura interna das câmaras e teor de umidade (%), registrados por termo higrômetros alocados na parte interna das câmaras.

Para amostragem dos gases produzidos foi utilizada bomba peristáltica (Ismatec, modelo IPC, Wertheim, Alemanha), cujo fluxo amostral era diariamente calibrado (8:00). Os gases eram colhidos em balões metálicos com capacidade para 5 litros. Após o período de coleta o sistema de amostragem era desligado e os balões vedados (válvula *three way*).

Para cada balão foram colhidas três alíquotas de 10 mL armazenadas em tubos com vácuo de 12 mL para determinação da concentração de CH₄ por cromatografia gasosa, utilizado cromatógrafo gasoso (Shimadzu, modelo CG-2010, Quioto, Japão), equipado com coluna capilar (megabore) com diâmetro interno de 0,530 mm e espessura do filme de 25 µm (Agilent, modelo J&W HP-PLOT Molsieve, Santa Clara, USA), e detector por ionização de chama (FID). Foram realizadas curvas de calibração com o uso de metano (99,5%, Praxair Industrial Gases, Osasco, São Paulo) em concentrações de 0,1, 1,0, 2,0 e 5,0%. As amostras foram injetadas manualmente (500 µL) utilizando nitrogênio (N₂ 4.6 FID) como gás de arraste (25 mL/minuto) sob diferentes temperaturas para coluna (50°C), injetor (47°C), e detector (280°C).

4.2.4 Colheita de Líquido Ruminal

Após o fim do período de adaptação, foi realizada uma colheita do líquido ruminal dos animais três horas após a primeira oferta do dia, com objetivo de determinar a composição dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e caracterizar os parâmetros da cinética fermentativa do rúmen, tais quais pH e nitrogênio amoniacal (N-NH₃).

Foram realizadas as leituras do pH logo após a colheita, utilizando pHmetro eletrônico (Gehaka, modelo PG 2000, São Paulo, Brasil). Após a leitura do pH foram colhidos 2 mL do líquido ruminal de cada amostra e colocados junto a solução de verde de metila e formol salino (MFS) para determinação da população de protozoários. Todas as amostras foram separadas individualmente por animal e armazenadas em *freezer* (-4°C) para posterior determinação de N-NH₃ e AGCC.

4.2.4.1 Parâmetros fermentativo no líquido ruminal

Todas as amostras do conteúdo ruminal foram descongeladas em temperatura ambiente, homogeneizadas e colhidas respectivas alíquotas para determinações de N-NH₃ (1 mL) e AGCC (1,6 mL) seguindo os protocolos abaixo descritos.

A determinação de AGCC foi realizada segundo a metodologia descrita por Palmquist e Conrad (1971) e Nocek, Hart e Polan (1987) com adaptações de Lima et al. (2017) por meio de cromatografia gasosa (Shimadzu, modelo CG-2014, Quioto, Japão), e detecção por ionização de chama em coluna empacotada de aço inox (Supelco, modelo 11965, Bellefonte, USA).

As determinações de N-NH₃ foram realizadas por meio do método de micro Kjeldahlj, volatilizando o nitrogênio em destilador (Tecnal, modelo TE-036/1, Piracicaba, Brasil) por meio de fluxo de vapor e solução de Tetraborato 5% (10 mL), capturado em solução de ácido bórico, e determinado através por titulação colorimétrica em ácido sulfúrico (0,01 N), conforme descrito por Preston (1995).

4.2.4.2 População de protozoários

A população de protozoários foi estimada por meio da metodologia descrita por Dehority, Damron e McLaren (1983); alíquotas de 2 mL foram colocadas em presença de (4 mL) solução formaldeído 40% e cloreto de sódio (MFS, na proporção 1:1). As amostras foram então hominizadas e pipetadas (0,01 mL) em câmaras de contagem Neubauer (Optik Labor, modelo Brightline Improved, Görlitz, Alemanha) composta por quadrantes de 0,0025 m² com profundidade de 0,100 mm.

As contagens foram realizadas em duplicata (2 quadrantes por vez, total 4 contagens por amostra) com auxílio de microscópio (Olympus, modelo CX31RBSFA, Tóquio, Japão) com lente objetiva (10x). A população de protozoários foi então determinada conforme a equação 4.

$$P = (N * x * 10.000) \quad (4)$$

onde, N = Média das contagens, x = diluição do inóculo, e 10.000 é o volume da câmara; os resultados foram expressos em unidades por mL.

4.2.5 Balanço de energia

Para a determinação do conteúdo energético das dietas foi utilizada bomba calorimétrica (Parr Instrument, modelo, Moline, USA) para determinação da energia bruta (EB, em cal/kg MS). Todos os constituintes das dietas experimentais foram avaliados separadamente.

As amostras foram pesadas individualmente ($\approx 1,0100$ g) em capsulas metálicas isentas de gordura (queima prévia em forno mufla a 550° por 6 horas). A energia das sobras e fezes foi avaliada individualmente por animal e período para determinar energia digestível (ED) e energia metabolizável (EM) conforme as equações 5 e 6 respectivamente (NRC, 2000). Todos os valores foram atribuídos em função do consumo e excreções diárias.

Para determinação de EM foram aplicadas as perdas energéticas por eructação de gases utilizando os dados obtidos no ensaio anteriormente descrito. As amostras colhidas da urina foram quantificadas por meio da equação (7) proposta por McDonald et al. (2010), considerando como energia excretada via urina 23 kJ/g nitrogênio total na urina. A perda de energia digestível via produção de metano (equação 8) e a energia bruta do metano produzido (equação 9) foram determinados conforme descrito por Trotta, Klotz e Harmon (2018).

$$ED = EBC - E_{\text{Fezes}} \quad (5)$$

onde, ED = energia digestível (kcal/animal dia), EBC = energia bruta consumida (kcal/dia), E_{Fezes} = energia excretada nas fezes (kcal/dia).

$$EM = ED - E_{\text{Urina}} - EBCH_4 \quad (6)$$

onde, EM = energia metabolizável (kcal/animal dia), ED = energia digestível, E_{Urina} = energia excretada na urina (kcal/dia), EBCH₄ = energia bruta do metano produzido (kcal/dia).

$$E_{\text{Urina}} = N\% * 23 \quad (7)$$

onde, E_{Urina} = energia excretada na urina (kcal/dia), N% = excreção total de nitrogênio na urina (g/dia).

$$\text{Perda ED} = (EBCH_4/ED) * 100 \quad (8)$$

onde, Perda ED = energia digestível perdida via produção de metano entérico (kcal/dia), EBCH₄ = energia bruta do metano produzido, ED = energia digestível.

$$EBCH_4 = CH_4 \text{ mol} \times 890,8 \quad (9)$$

onde, EBCH₄ = energia bruta do metano produzido, CH₄ mol = número de mols de metano, 890,8 = energia bruta por mol de metano.

4.2.6 Extração de Gossipol livre em Farelo de Algodão

Para extração de gossipol livre foram utilizados 300 miligramas de farelo de algodão com adição de 10 mL de acetona. Após 16 horas o conteúdo foi filtrado sob vácuo com auxílio de papel filtro, com quántupla lavagem do residual aplicando 2 mL de acetona a cada lavagem conforme descrito por Wang (1987) adaptado por Romero (2013). Após a filtração foi realizada a secagem em rotavapor (Buchi, modelo R-215, Valinhos, Brasil), posteriormente foi realizada a dissolução em 10 mL de solução composta por clorofórmio e ácido acético para CLAE nas proporções 99:1 (volume/volume). Foi então realizada a filtração em membrana PTFE (45 µm) e coleta de 1 mL para posterior quantificação em CLAE.

4.2.7 Extração de Gossipol total em Farelo de Algodão

Para extração de gossipol total foi realizada por meio de hidrólise ácida (3-amino-1-propanol) conforme descrito por Hron, Kuk e Abraham (1990) e adaptado por Romero e Abdalla (2018)¹. O conteúdo foi filtrado sob vácuo com auxílio de papel filtro, com quántupla lavagem. Após a filtração foi realizada a secagem em rotavapor (Buchi, modelo R-215, Valinhos, Brasil), e posterior filtração em membrana PTFE (45 µm) e coleta de 1 mL para posterior quantificação em CLAE.

4.2.8 Detecção e Quantificação de Gossipol em Farelo de Algodão

Para detecção e quantificação foi utilizado CLAE (Agilent, modelo 1100, Santa Clara, USA) equipado com conjunto quartenário de bombas, coluna Zorbax de fase reversa (Agilente, modelo C18, Santa Clara, USA) de 250 x 4,6 mm e partícula de 5 µm e detector de arranjo de fotodiodos. A eluição por gradiente da fase móvel foi realizada em acordo com o descrito por Wang (1987) adaptado por Romero (2013),

¹ Romero, A.C.; Abdalla, A.L. Profile of free and bound gossypol in cottonseed from the main producer regions of Brazil and gossypol residues in meat. – Journal of Agricultural and Food Chemistry - artigo submetido a publicação

utilizando solução composta por metanol acidificado por ácido ortofosfórico (0,1%) e água na proporção 70:30 volume/volume, junto a clorofórmio (CHCl₃) nas proporções 80:20, respectivamente. A vazão aplicada foi de 1,1 mL/minuto com coluna sob temperatura constante de 23° C.

4.2.9 Cálculo de ingestão de Gossipol

A partir dos resultados colhidos para a presença de GL, e GT foi calculada (equação 10) a ingestão média diária (IMD) pelos animais que receberam a dieta com inclusão de farelo de algodão durante o período (21 dias por período) de ensaio in vivo, foram utilizados os dados de consumo médio diário (CMD, em gramas). A ingestão total foi calculada (equação 11) considerando a IMD pelo período experimental. O peso vivo (PV) dos animais foi utilizado para determinar a distribuição dos níveis ingeridos, a exposição total corpórea (ETC, em gramas/kg PV) foi determinada segundo a equação 12.

$$IMD = TG * CMD \quad (10)$$

onde, IMD = ingestão média diária (mg/dia), TG = teor de gossipol (livre ou total, mg/g), CMD = consumo médio diário (gramas/dia).

$$IT = IMD * DE \quad (11)$$

onde, IT = ingestão total (g), IMD = ingestão média diária (mg/dia), DE = dias de exposição.

$$ETC = IT \times PV^{-1} \quad (12)$$

onde, ETC = exposição total corpórea (g/kg PV), IT = ingestão total, PV = peso vivo (kg).

4.2.10 Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) utilizando o software estatístico SAS® versão 9.4 (Statistical Analysis System Institute, Cary – NC, USA), e o procedimento Generalized Linear Model (PROC GLM). Foram comparados os parâmetros da digestibilidade aparente de nutrientes, digestibilidade da energia, balanço de nitrogênio e emissão de metano entre as dietas

experimentais; sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

4.3 Resultados

Os resultados referentes ao consumo e digestibilidade de nutrientes das diferentes dietas, estão dispostos na Tabela 4.2. Não foram observadas diferenças para o consumo dos nutrientes avaliados: consumo da matéria seca (CMS, $P = 0,868$), consumo da matéria orgânica (DgMO, $P = 0,889$), consumo da proteína bruta (CPB, $P = 0,267$) e também o consumo de matéria seca em % do peso vivo ($P = 0,387$).

Além dos nutrientes, também foi avaliado o consumo de água em litros por animal dia (L/d, $P = 0,798$), consumo em % de peso vivo ($P = 0,212$), todos não significativos.

A digestibilidade da matéria seca (DMS) e da matéria orgânica (DgMO) foram significativas ($P = 0,039$ e $P = 0,009$, respectivamente), com a dieta controle (Dieta CON) responsável pelas maiores médias em comparação a dieta coproduto (Dieta CPDT). Já a digestibilidade da proteína bruta não apresentou diferença (DPB, $P = 0,09$).

Tabela 4.2 – Consumo e digestibilidade aparente de nutrientes, e ingestão de água para ovinos suplementados com dieta composta por coprodutos do biodiesel e controle

Itens	Dieta CPDT	Dieta CON	EPM	Valor de P
CMS (g/d)	1321	1347	107	ns
CMS (% PV)	1,90	2,14	0,19	ns
CMO(g/d)	1421	1438	87,9	ns
CPB (g/d)	238	215	13,6	ns
DMS(%)	55,7 b	65,1 a	2,88	*
DgMO(%)	64,5 b	71,4 a	1,56	*
DPB(%)	72,2	70,2	0,77	ns
CH ₂ O (L/d)	3,11	3,22	0,28	ns
CH ₂ O (% PV)	1,47	2,02	0,29	ns

Dieta CPDT = dieta coproduto composta por (60% feno de Tifton 85, 18% farelo de girassol, 16% milho desintegrado e 6% farelo de algodão); Dieta CON composta por (60% feno de Tifton 85, 30% milho desintegrado e 10% farelo de soja); CMS = consumo de matéria seca; CMO = consumo de matéria orgânica; CPB = consumo de proteína bruta; CH₂O = consumo de água; DMS = digestibilidade da matéria seca; DgMO = digestibilidade da matéria orgânica; DPB = digestibilidade da proteína bruta; d = dia; PV = peso vivo; EPM = erro padrão da média; ns = não significativo; A ausência de médias seguidas de letras indica que não houve diferença estatística ($P > 0,05$); Médias com letras diferentes na mesma linha indicam efeito significativo de tratamento pelo teste de Tukey a 5% de significância;

A ingestão de nitrogênio (N, Tabela 4.3) não foi significativa (N_{ingerido} , $P = 0,399$), assim as excreções totais de N ($N_{\text{excretado}}$, $P = 0,178$), excreção de N nas fezes ($P = 0,8810$) e excreção de N na Urina ($P = 0,187$). A retenção de N (N_{retido} , $P = 0,933$) e a razão retido:ingerido ($P = 0,593$) também não foram significativas.

Tabela 4.3 – Balanço do nitrogênio disponível na dieta por ovinos suplementados com dieta composta por coprodutos do biodiesel e controle

Itens	Dieta CPDT	Dieta CON	EPM	Valor de P
N_{ingerido} (g/d)	37,7	34,9	2,29	ns
$N_{\text{excretado}}$ (g/d)	22,5	19,3	1,55	ns
N_{fezes} (g/d)	10,2	10,4	0,62	ns
N_{urina} (g/d)	12,0	9,07	1,52	ns
N_{retido} (g/d)	15,2	15,5	2,51	ns
$N_{\text{retido}}/N_{\text{ingerido}}$ (g/d)	0,39	0,43	0,05	ns

Dieta CPDT = dieta coproduto composta por (60% feno de Tifton 85, 18% farelo de girassol, 16% milho desintegrado e 6% farelo de algodão); Dieta CON composta por (60% feno de Tifton 85, 30% milho desintegrado e 10% farelo de soja); N_{ingerido} = consumo de nitrogênio da dieta; $N_{\text{excretado}}$ = nitrogênio excretado via fezes e urina; N_{fezes} = nitrogênio excretado nas fezes; N_{urina} = nitrogênio excretado na urina; N_{retido} = nitrogênio absorvido; $N_{\text{retido}}/N_{\text{ingerido}}$ = razão de absorção do nitrogênio; d = dia; EPM = erro padrão da média; ns = não significativo; A ausência de médias seguidas de letras indica que não houve diferença estatística ($P > 0,05$)

O mesmo ocorreu para a absorção (PM_{abs} , $P = 0,595$), fornecimento de proteína microbiana (NM_{forn} , $P = 0,586$) (Tabela 4.4), e excreção de derivados de purinas na urina ($P = 0,137$). O total de nitrogênio fornecido não diferiu entre os tratamentos (Total N_{forn} , $P = 0,906$), assim como a razão entre o NM_{forn} e Total N_{forn} (NM/N_{total} , $P = 0,917$).

Tabela 4.4 – Excreção de derivados de purina na urina e absorção de nitrogênio microbiano por ovinos suplementados com dieta composta por coprodutos do biodiesel e controle

Itens	Dieta CPDT	Dieta CON	EPM	Valor de P
DP (mmol/d)	34,7	65,4	13,6	ns
PMabs (mmol/d/kg ^{0,75})	12,1	12,3	0,22	ns
Total Nforn (g/d)	24,1	24,5	2,56	ns
NMforn (g nitrogênio/d)	8,82	8,94	0,16	ns
NM/Ntotal (g nitrogênio/d)	2,71	2,75	0,91	ns

Dieta CPDT = dieta coproduto composta por (60% feno de Tifton 85, 18% farelo de girassol, 16% milho desintegrado e 6% farelo de algodão); Dieta CON composta por (60% feno de Tifton 85, 30% milho desintegrado e 10% farelo de soja); DP = derivados de purina; PMabs = proteína microbiana absorvida; Total Nforn = total de nitrogênio fornecido (nitrogênio da dieta + nitrogênio microbiano); NMforn = nitrogênio microbiano fornecido; NM/Ntotal = relação nitrogênio microbiano:nitrogênio total d = dia; N = nitrogênio; EPM = erro padrão da média; ns = não significativo; A ausência de médias seguidas de letras indica que não houve diferença estatística ($P > 0,05$);

Os dados referentes ao balanço energético das dietas estão dispostos na Tabela 4.5. Embora as médias da Dieta CON tenham sido superiores as da Dieta CPDT, não foram observadas diferenças para energia digestível ($P = 0,714$), e energia metabolizável ($P = 0,708$). Para a produção de metano por kg de matéria seca consumida ($P = 0,363$), por kg de matéria orgânica consumida ($P = 0,150$), emissão total (CH₄, $P = 0,480$) e a respectiva perda energética para sua produção (Perda ED, $P = 0,296$), o tratamento Dieta CPDT foi responsável pelas maiores médias, no entanto estes parâmetros não foram significativos ($P > 0,05$). A energia bruta consumida (EBC, $P = 0,702$), a digestibilidade da energia (DE, $P = 0,064$), e a energia bruta do metano produzido em vinte e quatro horas (EBCH₄, $P = 0,479$) não diferiram entre os tratamentos.

Tabela 4.5 – Balanço energético e emissão de metano por ovinos suplementados com dieta composta por coprodutos do biodiesel e controle

Itens	Dieta CPDT	Dieta CON	EPM	Valor de P
EBC (kcal/d)	5836	5637	357	ns
DE (%)	60,9	66,0	1,77	ns
EBCH ₄ (kcal/d)	162	149	11,8	ns
ED (kcal/d)	3582	3737	292	ns
EM (kcal/d)	3365	3524	293	ns
CH ₄ (L/d)	17,0	15,7	1,24	ns
CH ₄ (L/kg MSC d)	14,0	11,8	1,61	ns
CH ₄ (L/kg MOC d)	19,4	15,3	1,88	ns
Perda ED (%)	4,78	4,06	0,49	ns

Dieta CPDT = dieta coproduto composta por (60% feno de Tifton 85, 18% farelo de girassol, 16% milho desintegrado e 6% farelo de algodão); Dieta CON composta por (60% feno de Tifton 85, 30% milho desintegrado e 10% farelo de soja); EBC = energia bruta consumida; DE = digestibilidade da energia; EBCH₄ = energia bruta do metano produzido; ED = energia digestível; EM = energia metabolizável; Perda ED = energia digestível perdida via produção de metano entérico; CH₄ = produção de metano entérico; MSC = matéria seca consumida; MOC = matéria orgânica consumida; d = dia; EPM = erro padrão da média; ns = não significativo; A ausência de médias seguidas de letras indica que não houve diferença estatística ($P > 0,05$);

Dentre os parâmetros fermentativos avaliados (Tabela 4.6) houve diferença significativa para a produção de acetato (C₂, $P = 0,019$), butirato (C₄) e a produção total de ácidos graxos ($P = 0,004$ e $P = 0,009$, respectivamente), onde as médias da Dieta CON foram superiores. A produção de propionato (C₃, $P = 0,308$) e a relação acetato:propionato (C₂:C₃, $P = 0,669$) não foi afetada. A população de protozoários ($P = 0,298$), nitrogênio amoniacal (N-NH₃, $P = 0,137$) e o pH ruminal ($P = 0,384$) não apresentaram diferença entre os tratamentos.

Tabela 4.6 – Parâmetros fermentativos no líquido ruminal de ovinos suplementados com dieta composta por coprodutos do biodiesel e controle

Itens	Dieta CPDT	Dieta CON	EPM	Valor de P
N-NH ₃ (mg/dL)	34,0	31,4	1,14	ns
Protozoários (unidade/mL)	433929	514286	52324	ns
pH	6,11	5,98	0,10	ns
<i>Ácidos graxos de cadeia curta (em mmol/L)</i>				
C2	57,5 b	62,1 a	1,21	*
C3	13,4	14,2	0,51	ns
C4	8,36	12,3	0,80	*
AGCCt	83,0 b	93,0 a	2,31	*
C2:C3	4,29	4,37	0,12	ns

Dieta CPDT = dieta coproduto composta por (60% feno de Tifton 85, 18% farelo de girassol, 16% milho desintegrado e 6% farelo de algodão); Dieta CON composta por (60% feno de Tifton 85, 30% milho desintegrado e 10% farelo de soja); N-NH₃ = nitrogênio amoniacal; pH = potencial hidrogeniônico; C2 = acetato; C3 = propionato; C4 = butirato; AGCCt = total de ácidos graxos de cadeia curta; C2:C3 = relação acetato:propionato; EPM = erro padrão da média; * = P < 0,05; ns = não significativo; A ausência de médias seguidas de letras indica que não houve diferença estatística (P > 0,05); Médias com letras diferentes na mesma linha indicam efeito significativo de tratamento pelo teste de Tukey a 5% de significância;

Não foi detectado GL no farelo de algodão utilizado neste experimento. Já para gossipol total foram encontrados 11,92 mg/g, a partir destes dados foi calculada a exposição dos ovinos suplementados com a dieta que continha farelo de algodão em sua composição. Obtida a concentração de gossipol total foram aplicadas as fórmulas descrita no tópico 4.2.9. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 4.7.

Tabela 4.7 – Ingestão de gossipol total por ovinos suplementados com dieta contendo farelo de algodão

Itens	IMD	IT	ETC
Maior exposição	1893	40	0,58
Menor exposição	990	21	0,25

IMD = ingestão média diária (mg/g); IT = ingestão total (g); ETC = exposição total corpórea (g/kg PV); PV = peso vivo (kg);

4.4 Discussão

O uso do farelo de girassol e farelo de algodão em substituição parcial ao milho desintegrado (redução 42,9%) e total ao farelo de soja, não exerceu efeito negativo ao consumo de nutrientes, sendo observadas médias similares ao tratamento controle para todas as variáveis de consumo avaliadas. O CMS obtido esteve próximo ao recomendado pelo NRC (2007) em 2% do PV para carneiros adultos em manutenção.

Para Nardone et al. (2010) encontrar alimentos alternativos que possibilitem a redução no emprego de alimentos destinados a humanos, e que não promovam maior consumo de água são aspectos desejáveis, principalmente em regiões tropicais onde a elevação da temperatura deverá exigir maior consumo para manutenção do sistema biológico. Não elevar o consumo de água também é apontado por Thornton (2010) e Foley et al. (2011) como uma medida importante para favorecer a sustentabilidade na pecuária, uma vez que a demanda por este recurso deverá aumentar com o crescimento populacional.

Sabe-se que durante o processo de degradação no rúmen, há quebra de proteína solúveis em peptídeos e aminoácidos; as interações deste processo são refletidas pela produção de NH_3 (RUSSELL et al., 1992; WALLACE, 1996; ESCHENLAUER et al., 2002). A degradação de proteínas no rúmen pode ser observada por meio do N-NH_3 ; segundo McDonald et al. (2010) concentrações próximas à 30 mg/dL indicam condições ótimas para o bom funcionamento da degradação proteica no rúmen. As médias encontradas no presente trabalho se adequam a esta premissa (34,0 e 31,4 mg/dL, para Dieta CPDT e Dieta CON, respectivamente). No entanto, o mesmo autor também afirma que valores muito superiores a 30 mg/dL podem ser uma resposta a proteínas de rápida degradação no rúmen. Nestas condições grandes perdas de N são observadas na urina em função do ciclo realizado pela amônia no sistema biológico, o qual depois de formada como produto da degradação, é transformado em ureia no fígado, e excretado via urina (BACH; CALSAMIGLIA; STERN, 2005; MCDONALD et al., 2010). Para o presente estudo, as excreções de N tanto nas fezes quanto na urina foram similares entre os tratamentos, e a retenção de N também apresenta médias similares, refutando a possibilidade de rápida degradação e perdas excessivas de N. As médias encontradas por Lima et al. (2018) para retenção de N em dieta com inclusão de 30% de girassol são próximas, sendo as encontradas neste trabalho

pouco superior, assim como descrito por Costa et al. (2013), onde a retenção de N para dietas recomendadas pela NRC variam entre 15 e 22 g/d.

Elevadas excreções de N representam não só perdas para o sistema biológico (BACH; CALSAMIGLIA; STERN, 2005; CALSAMIGLIA et al., 2010), mas influenciam o crescimento microbiano, o qual é limitado como consequência pela baixa disponibilidade de N (baixa retenção), reduzindo a absorção de proteína microbiana (TAMMINGA, 1996). Neste sentido, a menor absorção de proteína microbiana afetaria a produção DP, reduzindo a produção destes metabólitos (CHEN; GOMES, 1992). Não terem sido observadas diferenças na produção total de DP, na PMabs e o NMforn, reforçam as condições satisfatórias obtidas, e reiteram que Dieta CPDT não influenciou negativamente o crescimento e absorção de proteína microbiana, o que também justifica a ausência de diferença para a DPB.

Já para a DMS e DgMO foram encontradas médias superiores para o tratamento Dieta CON, cuja diferença para DMS entre os dois tratamentos foi de, aproximadamente, 9,4%, enquanto para DgMO a diferença foi de 9,6%. A menor digestibilidade para estes dois parâmetros pode ser justificada pela maior presença de carboidratos estruturais, conforme a composição bromatológica apresentada no capítulo anterior, tanto na comparação entre os componentes da dieta isolados, onde o FDN do farelo de algodão (ALG, 701,8 g/kg MS) e girassol (GIR, 671,9 g/kg MS) são superiores aos descrito para farelo de soja (SJ, 348,7 g/kg MS), assim como FDA, ALG (460,6 g/kg MS), GIR (517,7 g/kg MS) e SJ (225,9 g/kg MS).

Estas observações também foram encontradas por Lima et al. (2018), cuja redução na digestibilidade está diretamente associada ao aumento na inclusão do coproduto do girassol (maior nível de inclusão = 30%) a dieta; a mesma relação relatada por Lima Junior et al. (2011) para maiores inclusões de farelo de algodão, sendo atribuídas também a maior presença de carboidratos estruturais. Também pode ser atribuída a esta, a maior presença de material lignificado, o que dificulta a degradação no rúmen e reduz a digestibilidade (SUSMEL et al., 1990). A degradação de nutrientes no rúmen está diretamente ligada ao mecanismo de regulação do pH (DIJKSTRA et al., 2012), e apesar das diferenças obtidas para a DMS e DgMO, estas não influenciaram o pH ruminal entre os tratamentos.

O outro produto da fermentação entérica amplamente discutido é o CH₄, cuja produção representa perdas energéticas (BEAUCHEMIN; MCGINN, 2006), sendo gerado principalmente pelas archaeas metanogênicas devido à presença de H₂

resultante do processo de degradação de carboidratos (HUWS et al., 2018). A produção de AGCC influencia indiretamente a produção de CH₄. A produção de C2 utiliza menos H₂ em sua formação o que torna mais moléculas de H₂ disponíveis para o metabolismo das archaeas metanogênicas, em sentido oposto à produção de C3, a qual utiliza mais H₂ em sua formação, e reduz esta disponibilidade (JANSSEN, 2010).

Diferentemente dos parâmetros até então descritos, a produção de AGCC obteve diferença significativa para C2, C4 e AGCCt, sendo a Dieta CON responsável pela maior produção destes, onde a produção de C2 foi superior em 7,2% comparada à Dieta CPDT. Apesar da diferença obtida para produção de C2, a relação C2:C3 não diferiu entre os tratamentos. É de conhecimento que as emissões de CH₄ são proporcionais a relação C2:C3 (BLÜMMEL; MAKKAR; BECKER, 1997; GETACHEW et al., 1998).

A produção de AGCC é ditada pela disponibilidade de H₂ no meio durante o processo de degradação ruminal; A produção de C3 é favorecida quando há maior disponibilidade de H₂, enquanto C2 e C4 são favorecidos em condição oposta. A produção de CH₄ só é reduzida pela elevação de C4 quando este é produzido sobre a redução na concentração de C2 (JANSSEN, 2010), no entanto ambos obtiveram maior produção na Dieta CON, não afetando, portanto, a produção de CH₄.

Diferenças na produção de CH₄ também deveriam ser observadas por meio da população de protozoários, uma vez que as archaeas metanogênicas estão associadas a estes microrganismos (OHENE-ADJEI et al., 2007). Reduzir as emissões de metano é fundamental para mitigar os impactos da pecuária ao ambiente, uma vez que grande parte das emissões antropogênicas de CH₄ são atribuídas ao setor (RIPPLE et al., 2013; HERRERO et al., 2016). Neste sentido, não terem sido observadas diferenças na produção de CH₄ entre os tratamentos, possibilita a substituição de fontes tradicionais pelos coprodutos na proporção aqui formulada, sem que sejam elevadas as emissões de CH₄.

Não terem sido observadas diferenças para os parâmetros do balanço energético pode ser suportado pelos parâmetros fermentativos anteriormente discutidos, pois em condições de baixa disponibilidade energética fontes alternativas aos carboidratos passam a ser utilizadas como substrato para fornecer a energia demandada pelo sistema biológico, sendo a proteína uma das fontes utilizadas (MCDONALD et al., 2010). Outro reflexo da baixa disponibilidade energética é a

redução da atividade microbiana, uma vez que os carboidratos atuam como a principal fonte energética para estes microrganismos (HOOVER; STOKES, 1991; CALSAMIGLIA et al., 2010), portanto, o crescimento microbiano seria reduzido, assim como as atividades fermentativas (BACH; CALSAMIGLIA; STERN, 2005). Neste contexto, não terem sido observados distúrbios no crescimento microbiano, nos parâmetros da síntese proteica e também na atividade fermentativas de ambos os tratamentos, demonstram terem sido satisfatórios os níveis de energia obtidos em ambas as dietas.

Os valores encontrados neste trabalho para ED, EM e EBC estão dentro dos valores obtidos por Costa et al. (2013) ao avaliar em dietas recomendadas pelos manuais da NRC de 1985 e 2007 para o fornecimento mínimo de energia, obtendo valores entre 2500 e 3000 kcal/d para ED, e 2000 e 2500 kcal/d para EM, e 3300 e 4400 kcal/d para EBC. Todos os valores obtidos para as dietas CON e CPDT foram superiores aos descritos por Costa et al. (2013), corroborando para o fornecimento do mínimo recomendado pelos manuais.

A emissão de CH₄ (em L), e CH₄ (em L/kg MSC), foram inferiores aos valores descritos por Aemiro et al. (2019), assim como a EBCH₄ perdida pelas emissões diárias. Os médias obtidas para emissão de CH₄ (em L) e CH₄ (em L/kg MSC), assim como Perda ED, foram próximas (entre 3 e 6%) as descritas por Woodward et al. (2001), enquanto as médias descritas por Aemiro et al. (2019) apresentaram perdas superiores, da ordem de 14%. A EBCH₄ também foi próxima à obtida por Wang et al. (2018). As perdas energéticas por emissão de metano aqui descritas também estão dentro do previsto por Blaxter e Clapperton (1965) podendo atingir até 9% da EBC. Para carneiros adultos Pelchen e Peters (1998) encontraram perdas de até 7%.

Diferentemente dos parâmetros até então discutidos, as avaliações realizadas para a ingestão de gossipol trazem informações para a sanidade dos animais de forma quantitativa, comparando aos níveis de segurança preconizados pela *European Food Safety Authority* (EFSA) para adição de farelo de algodão (FA) a dieta de ruminantes, e para IMD. Segundo publicado em seu mais recente boletim, é possível a inclusão de até 40% de FA sobre a dieta total de ruminantes, no entanto, é recomendada a inclusão de até 20% (KNUTSEN et al., 2017). No presente trabalho a inclusão sobre a dieta total foi de 6%, bem abaixo do nível recomendado.

O mesmo boletim também aponta que a IMD de GL, sem que sejam notados efeitos adversos (NOAEL) é de 200 mg/kg MS, e até 5 mg/kg PV, porém não foi detectada a presença de GL no FA utilizado. Apesar de apresentados os dados para IMD, IT e ETC, na tabela 4.7, não são definidas doses mínimas para GT, pois segundo EFSA (2009) o GT implica em GL, gossipol ligado e substâncias análogas hidrolisadas por solução ácida, sendo GL a única forma tóxica entre as frações correspondentes ao GT.

4.5 Conclusão

A dieta formulada utilizando farelo de algodão (6%) e girassol (18%) em substituição total ao farelo de soja e parcial (- 42,9%) ao milho, foi satisfatória para os parâmetros fermentativos avaliados, fornecendo condições similares à Dieta CON, tanto para o balanço energético quanto proteico, sem elevar as emissões de CH₄.

Referências

ABBASPOUR, N.; HURRELL, R.; KELISHADI, R. Review on iron and its importance for human health. **Journal of Research in Medical Sciences**, Mumbai, v. 19, n. 2, p. 164–174, 2014.

ABDALLA, A. L. et al. In vitro evaluation, in vivo quantification, and microbial diversity studies of nutritional strategies for reducing enteric methane production. **Tropical Animal Health and Production**, Viçosa, v. 44, n. 5, p. 953–964, 2012.

ABDALLA FILHO, A. L. et al. Performance, metabolic variables and enteric methane production of Santa Inês hair lambs fed *Orbignya phalerata* and *Combretum leprosum*. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 101, n. 3, p. 457–465, 2016.

AEMIRO, A. et al. Effect of substituting soybean meal with euglena (*Euglena gracilis*) on methane emission and nitrogen efficiency in sheep. **Animal Science Journal**, Melbourne, v. 90, n. 1, p. 71–80, 2019.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis of AOAC International**. Gaithersburg: AOAC International, 2011. 2590 p.

BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M. D. Nitrogen Metabolism in the Rumen. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, p. 9–21, 2005.

BEAUCHEMIN, K. A.; MCGINN, S. M. Methane emissions from beef cattle: Effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, n. 6, p. 1489–1496, 2006.

BERCHIELLI, T. T. **Nutrição de ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2011. 616 p.

BLAXTER, K. L.; CLAPPERTON, J. L. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 19, n. 1, p. 511–522, 1965.

BLÜMMEL, M.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. *In vitro* gas production: a technique revisited. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 77, n. 1–5, p. 24–34, 1997.

CALSAMIGLIA, S. et al. Strategies for optimizing nitrogen use by ruminants. **Animal**, Cambridge, v. 4, n. 7, p. 1184–1196, 2010.

CHEN, X. B.; GOMES, M. J. **Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives**. An overview of the technical details. Aberdeen: International Feed Research Unit, 1992. 21 p. (Occasional Publication).

COSTA, H. H. A. et al. Nutritional evaluation of lamb diets in a tropical setting formulated according to NRC (1985) and NRC (2007) specifications. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 113, n. 1, p. 20–29, 2013.

DEHORITY, B. A.; DAMRON, W. S.; MCLAREN, J. B. Occurrence of the Rumen Ciliate *Oligoisotricha bubali* in Domestic Cattle (*Bos taurus*). **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 45, n. 4, p. 1394–1397, 1983.

DIJKSTRA, J. et al. Ruminal pH regulation and nutritional consequences of low pH. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 172, n. 1, p. 22–33, 2012.

ERICKSEN, P.; INGRAM, J. S. I.; LIVERMAN, D. M. Food security and global environmental change. **Environmental Science & Policy**, Exeter, v. 12, n. 4, p. 373–377, 2009.

ESCHENLAUER, S. C. P. et al. Ammonia Production by Ruminal Microorganisms and Enumeration, Isolation, and Characterization of Bacteria Capable of Growth on Peptides and Amino Acids from the Sheep Rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 10, p. 4925–4931, 2002.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - EFSA. Gossypol as undesirable substance in animal feed. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. **EFSA Journal**, Parma, v. 7, n. 1, p. 1–55, 2009.

FOLEY, J. A. et al. Solutions for a cultivated planet. **Nature**, London, v. 478, p. 337–342, 2011.

FAO. **Fao'S Work on Climate Change**. Rome, 2018. 40 p.

FAO. **FAOSTAT statistics database**: Emissions - Agriculture. Rome, 2019. Disponível em: <<https://search.library.wisc.edu/catalog/999882363002121>> Acesso em: 28 jan. 2019.

GETACHEW, G. et al. In vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 72, n. 3, p. 261–281, 1998.

GILL, M.; SMITH, P.; WILKINSON, J. M. Mitigating climate change: The role of domestic livestock. **Animal**, Cambridge, v. 4, n. 3, p. 323–333, 2010.

GODFRAY, H. C. J. et al. Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. **Science**, New York, v. 327, n. 5967, p. 812–818, 2010.

GODFRAY, H. C. J. et al. Meat consumption, health, and the environment. **Science**, New York, v. 361, n. 6399, p. 5324-1–5324-8, 2018.

GUO, M.; SONG, W.; BUHAIN, J. Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, London, v. 42, p. 712–725, 2015.

HERRERO, M. et al. Greenhouse gas mitigation potentials in the livestock sector. **Nature Climate Change**, London, v. 6, p. 452–461, 2016.

HOOVER, W. H.; STOKES, S. R. Balancing Carbohydrates and Proteins for Optimum Rumen Microbial Yield. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 10, p. 3630–3644, 1991.

HRON, R. J.; KUK, M. S.; ABRAHAM, G. Determination of free and total gossypol by high performance liquid chromatography. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 67, n. 3, p. 182–187, 1990.

HUWS, S. A. et al. Addressing Global Ruminant Agricultural Challenges Through Understanding the Rumen Microbiome: Past, Present, and Future. **Frontiers in Microbiology**, Lousanne, v. 9, p. 2161-1–2161-33, 2018.

JANSSEN, P. H. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 160, n. 1, p. 1–22, 2010.

KNUTSEN, H. K. et al. Presence of free gossypol in whole cottonseed. **EFSA Journal**, Parma, v. 15, n. 7, p. 4850-1–4850-15, 2017.

LIMA, A. G. V. O. et al. Intake, digestibility, nitrogen balance, performance and carcass traits of Santa Ines lamb fed with sunflower cake from biodiesel production. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 168, p. 19–24, 2018.

LIMA, P. M. T. et al. Nutritional evaluation of the legume *Macrotyloma axillare* using in vitro and in vivo bioassays in sheep. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 102, n. 2, p. 669–676, 2017.

LIMA JUNIOR, D. M. et al. Extruded cottonseed meal (*Gossypium* spp.) in the diet of ruminants: Intake and digestibility . **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 5, n. 1, p. 68–75, 2011.

MAKKAR, H. P. S.; CHEN, X. B. **Estimation of microbial protein supply in ruminants using urinary purine derivatives**. Heidelberg: Springer, 2004. 212 p.

MAKKAR, H. P. S. **Biofuel co-products as livestock feed**: opportunities and challenges. Rome: FAO, 2012. 553 p.

MCDONALD, P. et al. **Animal nutrition**. Harlow: Pearson, 2010. 692 p.

MOTTET, A. et al. Review: Domestic herbivores and food security: current contribution, trends and challenges for a sustainable development. **Animal**, Cambridge, v. 12, n. 2, p. 188–198, 2018.

MU-ZOU, W. Analysis of gossypol by high performance liquid chromatography. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 20, n. 1, p. 1–11, 1987.

NARDONE, A. et al. Effects of climate changes on animal production and sustainability of livestock systems. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 130, n. 1, p. 57–69, 2010.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of small ruminants**: sheep, goats, cervids, and New World camelids. Washington, DC: National Academies Press, 2007. 362 p.

NOCEK, J. E.; HART, S. P.; POLAN, C. E. Rumen Ammonia Concentration as Influenced by Storage Time, Freezing and Thawing, Acid Preservative, and Method of Ammonia Determination. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 70, n. 3, p. 601–607, 1987.

OHENE-ADJEI, S. et al. Postinoculation Protozoan Establishment and Association Patterns of Methanogenic Archaea in the Ovine Rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 14, p. 4609-4618, 2007.

PALMQUIST, D. L.; CONRAD, H. R. Origin of Plasma Fatty Acids in Lactating Cows Fed High Grain or High Fat Diets. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 54, n. 7, p. 1025–1033, 1971.

PELCHEN, A.; PETERS, K. J. Methane emissions from sheep. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 27, n. 2, p. 137–150, 1998.

PERIGNON, M. et al. The bioavailability of iron, zinc, protein and vitamin A is highly variable in French individual diets: Impact on nutrient inadequacy assessment and relation with the animal-to-plant ratio of diets. **Food Chemistry**, Barking, v. 238, p. 73–81, 2018.

PRESTON, T. R. **Tropical animal feeding**: a manual for research workers. Rome: FAO, 1995. 126 p.

RIPPLE, W. J. et al. Ruminants, climate change and climate policy. **Nature Climate Change**, London, v. 4, p. 2, 2013.

ROMERO, A. DE C. **Resíduo da produção de biodiesel**: Avaliação de moléculas bioativas e potencial de aplicação na alimentação animal. 2013. 113 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

RUSSELL, J. B. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 11, p. 3551–3561, 1992.

SUSMEL, P. et al. Rumen degradability of organic matter, nitrogen and fibre fractions in forages. **British Society of Animal Production**, Penicuik, v. 51, n. 3, p. 515–526, 1990.

TAMMINGA, S. A review on environmental impacts of nutritional strategies in ruminants. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, n. 12, p. 3112–3124, 1996.

THORNTON, P. K. Livestock production: Recent trends, future prospects. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 365, n. 1554, p. 2853–2867, 2010.

TROTTA, R. J.; KLOTZ, J. L.; HARMON, D. L. Effects of source and level of dietary energy supplementation on in vitro digestibility and methane production from tall fescue-based diets. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 242, p. 41–47, 2018.

WALLACE, R. J. Ruminal Microbial Metabolism of Peptides and Amino Acids. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 126, p. 1326–1334, 1996. Suppl. 4.

WANG, S. et al. Supplementation of Pelleted Hazel (*Corylus avellana*) Leaves Decreases Methane and Urinary Nitrogen Emissions by Sheep at Unchanged Forage Intake. **Scientific Reports**, London, v. 8, n. 1, p. 5427-1–5427-10, 2018.

WEST, P. C. et al. Leverage points for improving global food security and the environment. **Science**, New York, v. 345, n. 6194, p. 325–328, 2014.

WOODWARD, S. L. et al. Early indications that feeding Lotus will reduce methane emissions from ruminants. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, Christchurch, v.61, p. 23–26, 2001.

5 Considerações finais

Os resultados encontrados neste trabalho demonstram que coprodutos do biodiesel podem fornecer uma fonte nutricional adequada para substituir alimentos utilizados na formulação de concentrados proteicos e energéticos. Não foram notados efeitos negativos para sua inclusão, cujos parâmetros fermentativos não diferiram da dieta controle. No entanto, não foram avaliados diferentes níveis de inclusão, o que não permite assegurar que resultados semelhantes poderiam ser obtidos caso diferentes níveis fossem avaliados. Também a realização de estudos sobre as alterações na microbiota ruminal, poderiam fornecer informações importantes para auxiliar sua manipulação explorando alternativas que reduzam as emissões de gases de efeito estufa pelo setor pecuário.

A exploração de um ensaio sobre a degradabilidade da proteína poderia facilitar a compreensão de alguns resultados obtidos para culturas com a presença de compostos antinutricionais, assim como estudar a provável formação de complexos entre proteínas e carboidratos (reação de Maillard) para o coproduto obtido do pinhão manso devido ao aquecimento gerado durante a extração, o que traria maior peso para o entendimento dos parâmetros fermentativos com baixas médias obtidas por este estudo.

Coprodutos cuja presença de compostos tóxicos ou outros fatores antinutricionais demonstraram que sem a aplicação de mecanismos de detoxificação, apresentam rendimento inferior, e podem trazer efeitos deletérios insatisfatório caso sejam fornecidos diretamente ao animal. Assim como determinar os níveis destes compostos nas culturas avaliadas para facilitar a comparação com diferentes trabalhos na literatura. Realizar um ensaio com animais em crescimento também deverá trazer novas informações, uma vez que durante esta fase há maior exigência nutricional, o que traria maior peso científico para futuros trabalhos, assim como a realização de uma análise de custos, poderia trazer características atrativas para facilitar o processo de extensão entre a academia e a aplicação a campo.

O emprego dos coprodutos do biodiesel na produção animal traz não só como benefício à redução ao uso de alimento humano como suplemento, mas também reduz o impacto ao ambiente, cujo descarte incorreto pode trazer consequências negativas a sustentabilidade do planeta. Para as unidades produtoras de biodiesel, cuja competitividade é constantemente questionada quando comparada ao preço do

diesel, há a possibilidade de agregar valor aos coprodutos gerados contribuindo para redução dos custos com transporte para o correto descarte e tratamento sanitário, o que transforma o que seria considerado resíduo em coproduto de valor agregado. Também há a possibilidade da obtenção de incentivos fiscais devido ao abatimento das pegadas de carbono do setor. Todos estes fatores podem contribuir para maior competitividade do biodiesel brasileiro.