

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**GLICERINA BRUTA ASSOCIADA A ADITIVOS NA  
ALIMENTAÇÃO DE BOVINOS DE CORTE**

**Márco Túlio Costa Almeida**  
Zootecnista

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**GLICERINA BRUTA ASSOCIADA A ADITIVOS NA  
ALIMENTAÇÃO DE BOVINOS DE CORTE**

**Márcio Túlio Costa Almeida**

**Orientadora: Profa. Dra. Jane Maria Bertocco Ezequiel**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia

**2014**

A447g Almeida, Marco Túlio Costa  
Glicerina bruta associada a aditivos na alimentação de bovinos de corte / Marco Túlio Costa Almeida. -- Jaboticabal, 2014  
xiii, 63 f. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014

Orientadora: Jane Maria Bertocco Ezequiel  
Banca examinadora: Mauro Dal Secco de Oliveira, Cyntia  
Ludovico Martins  
Bibliografia

1. Monensina sódica. 2. Nelore. 3. Óleos essenciais. 4.  
Parâmetros ruminais I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências  
Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.2:636.087

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –  
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
CAMPUS DE JABOTICABAL  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** GLICERINA BRUTA ASSOCIADA A ADITIVOS NA ALIMENTAÇÃO DE BOVINOS DE CORTE

**AUTOR:** MÁRCO TÚLIO COSTA ALMEIDA

**ORIENTADORA:** Profa. Dra. JANE MARIA BERTOCCO EZEQUIEL

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM ZOOTECNIA , pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. JANE MARIA BERTOCCO EZEQUIEL  
Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. MAURO DAL SECCO DE OLIVEIRA  
Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. CYNTIA LUDOVICO MARTINS  
Departamento de Produção Animal / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu

Data da realização: 26 de fevereiro de 2014.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**MÁRCO TÚLIO COSTA ALMEIDA** - nascido na cidade de Itajubá, estado de Minas Gerais em 4 de julho de 1987. Ingressou no curso de Zootecnia na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Câmpus de Botucatu no ano de 2007. Durante a graduação, fez estágios na área de produção animal, participou de projetos de pesquisa, foi bolsista de Iniciação Científica e Treinamento Técnico II da Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP), foi membro diretor da Empresa Júnior de Nutrição de Ruminantes (NUTRIR) de 2009 a 2011, e graduou-se em dezembro de 2011. Em Março de 2012, ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias / UNESP – Câmpus de Jaboticabal. Foi bolsista da FAPESP e do CNPq. Em fevereiro de 2014 obteve o Título de Mestre em Zootecnia. Em março de 2014 iniciou o curso de doutorado em zootecnia pela mesma instituição.

*“O conhecimento nos faz responsáveis”*

*(Che Guevara)*

**Dedico**

*A todos meus familiares, amigos e professores pelo apoio e incentivo, e a minha namorada pelo amor e companhia.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, que em toda minha caminhada não me deixou um só momento desamparado, por não me deixar fraquejar, por sempre estar ao meu lado e por colocar no meu caminho pessoas amigas e generosas.

Aos meus pais **Júlio Cesar de Almeida** e **Cláudia Costa de Almeida** pelo amor, carinho, ensinamentos e compreensão ao longo das minhas conquistas e pelo exemplo de pessoa que são.

As minhas irmãs **Juliana** e **Eryka** pelo amor, carinho e apoio.

Aos meus avós, **Vô Cláudio “Migué”** (*in memoriam*), **Vó Tereza**, **Vô Dito** (*in memoriam*) e **Vó Rosa** (*in memoriam*) pelo amor, carinho e incentivo aos estudos.

Aos meus **tios e primos** pelo amor e amizade.

A minha querida e adorável namorada **Josimari (Raxinha)** pela ajuda durante a condução do experimento e análises laboratoriais, pelo incentivo, carinho, companheirismo, apoio, ensinamentos, paciência, alegria e amor.

A **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina e Veterinária e Zootecnia**, pela minha formação profissional.

Ao **Programa de Pós-graduação em Zootecnia** da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da UNESP, Campus de Jaboticabal pela oportunidade de aprimoramento profissional.

A Professora **Jane Maria Bertocco Ezequiel**, pela orientação, pela confiança, pelos ensinamentos, e principalmente pela amizade e carinho a mim dedicados.

A todos **professores da UNESP** Câmpus Botucatu e Câmpus Jaboticabal, pelos ensinamentos.

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão da bolsa de estudos durante o curso de Mestrado.

A empresa **Caramuru Alimentos Ltda** por ter cedido os ingredientes casca de soja, farelo de girassol e glicerina bruta.

Ao parceiro **Marcelo Ladeira**, coordenador na empresa Caramuru Alimentos Ltda, pela disposição, amizade e colaboração.

A empresa **Oligobasics** por ter cedido o produto Essential®.



A empresa **Grupo M.Cassab** por ter cedido o produto Rumenpac®.

A todos os amigos e companheiros da **Unidade Animal de Estudos Digestivos e Metabólicos** pela amizade, ajuda, incentivos e alegrias.

Aos amigos do curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Zootecnia.

Aos prestativos **estagiários** que passaram pela Unidade Animal e pelo Laboratório de Ingredientes e Gases Poluentes (LIGAP).

Aos amigos da República **Mata Bixera**, que me acolheram e deixaram fazer parte desta família, e pelos bons momentos de descontração e festanças vividos juntos.

Ao futuro zootecnista e “braço direito” **Aníbal G. Camargo (Babak)**, pessoa indispensável na realização deste trabalho. Pela disponibilidade e pelo esforço em todos os momentos, mais que um amigo, um irmão.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS .....	iii
LISTA DE FIGURAS .....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	3
Cadeia produtiva do biodiesel.....	3
Glicerina, coproduto da produção do biodiesel.....	6
Utilização da glicerina na alimentação animal .....	8
Glicerina na dieta de ruminantes: fermentação ruminal e metabolismo animal ...	9
Aditivos na nutrição animal.....	11
Monensina sódica como aditivo alimentar .....	12
Extratos vegetais como aditivo alimentar.....	14
Óleos essenciais na nutrição de ruminantes .....	15
Essential®: composto de óleo de caju ( <i>Anacardium occidentale</i> ) e mamona ( <i>Ricinus communis</i> L) como aditivos alimentares .....	16
Objetivo geral.....	18
REFERÊNCIAS.....	19
CAPÍTULO 2 – GLICERINA ASSOCIADA A ADITIVOS NA ALIMENTAÇÃO DE BOVINOS DE CORTE .....	29
RESUMO .....	29
ABSTRACT .....	30
INTRODUÇÃO.....	31
MATERIAL E MÉTODOS.....	33
Animais e local do experimento .....	33
Delineamento e dietas experimentais.....	33
Avaliação do consumo e análises bromatológicas .....	35
Medidas de pH e concentrações ruminais de N-NH <sub>3</sub> .....	36
Produção e qualidade da massa microbiana.....	37

Produção de gases CH <sub>4</sub> e CO <sub>2</sub> das dietas .....	38
Digestibilidade <i>in vitro</i> das dietas.....	39
Análises estatísticas .....	40
RESULTADOS.....	42
Consumo de MS e nutrientes .....	42
Digestibilidade <i>in vitro</i> da MS e nutrientes das dietas.....	42
Parâmetros ruminais (pH e N-NH <sub>3</sub> ).....	45
Produção e qualidade da massa microbiana .....	48
Produção de gases metano e carbono .....	51
DISCUSSÃO .....	54
Consumo e digestibilidade da MS e nutrientes das dietas.....	54
Fermentação ruminal.....	55
Produção de gases metano e carbono .....	57
CONCLUSÃO .....	59
REFERÊNCIAS.....	60

**LISTA DE TABELAS**

	Página
Tabela 1. Porcentagem dos ingredientes e composição bromatológica das dietas experimentais. ....	34
Tabela 2. Estruturas de covariância utilizadas em cada parâmetro avaliado. ....	41
Tabela 3. Médias, erro padrão das médias e contrastes ortogonais para os valores médios do consumo de MS e nutrientes das dietas de bovinos Nelore alimentados com dietas contendo glicerina associada ou não a aditivos alimentares. ....	43
Tabela 4. Médias, erro padrão das médias e contrastes ortogonais para os valores médios da digestibilidade <i>in vitro</i> da MS e nutrientes das dietas. ....	44
Tabela 5. Médias, erro padrão das médias e contrastes ortogonais para a média dos tempos de colheita observadas para os parâmetros de pH ruminal e concentrações de nitrogênio amoniacal ruminal (N-NH <sub>3</sub> , mL/dL), obtidos de bovinos Nelore alimentados com dietas contendo glicerina associada ou não a aditivos alimentares. ....	47
Tabela 6. Médias, erro padrão das médias e contrastes ortogonais para a média dos tempos de colheita observadas para as quantidades de teores de MS e MO das frações de microrganismos, nos diferentes tempos de amostragem após alimentação, obtidos de bovinos Nelore alimentados com dietas contendo glicerina associada ou não a aditivos alimentares. ..	49
Tabela 7. Valores das quantidades totais de microrganismos, microrganismos totais das fases líquida e sólida e as porcentagens de bactérias e de protozoários, nos diferentes tempos de amostragem após alimentação. ..	50
Tabela 8. Médias, erro padrão das médias e contrastes ortogonais para os parâmetros de produção de gases metano e carbono em mL/g incubada (mL/g) e em mL/g degradada (mL/gd), desaparecimento da matéria seca (DMS) e fibra em detergente neutro (DFDN). ....	53

**LISTA DE FIGURAS**

	Página
<b>CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS</b>	
Figura 1. Evolução do marco regulatório para o biodiesel Lei 11.097/2005.....	4
Figura 2. Produção brasileira de biodiesel (Bilhões de litros). Fonte: ANP (2013) ...	5
Figura 3. Fluxograma da produção do biodiesel e da glicerina. ....	6
<b>CAPÍTULO 2 – GLICERINA ASSOCIADA A ADITIVOS NA ALIMENTAÇÃO DE BOVINOS DE CORTE</b>	
Figura 1. Esquema de separação das frações microbianas, Bactérias-sólido-aderidas (PAB), Protozoários-líquido-associados (LAP) e Bactérias-líquido-associadas (LAB). Adaptado de Martin et al., (1994). ....	38
Figura 2. Comportamento do pH ruminal em função dos tempos de colheita após alimentação. ....	45
Figura 3. Comportamento da concentração de N-NH <sub>3</sub> ruminal em função dos tempos de colheita após alimentação. ....	46
Figura 4. Produção de gases totais, metano e carbônico, em mL, das dietas experimentais. ....	51

## GLICERINA BRUTA ASSOCIADA A ADITIVOS NA ALIMENTAÇÃO DE BOVINOS DE CORTE

**RESUMO** – A utilização de resíduos agroindustriais e aditivos alimentares na dieta de bovinos de corte tem crescido nos últimos anos em decorrência da ação positiva destes na fermentação ruminal, principalmente com o intuito de melhorar a eficiência alimentar e reduzir os custos da produção. Neste sentido, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a substituição parcial do milho (50% da MS na dieta total) e da casca de soja (13,27% da MS na dieta total) pelo coproduto do processamento do biodiesel (glicerina bruta) e sua associação aos aditivos óleos essenciais (Essential<sup>®</sup>) ou a monensina sódica (Rumenpac<sup>®</sup>) na dieta de bovinos de corte. Foram utilizados cinco bovinos machos da raça Nelore, castrados, com 36 meses de idade, peso médio de 500 kg e providos de cânulas permanentes no rúmen. Dietas experimentais semelhantes nos teores de PB e EM foram fornecidas para os animais na relação volumoso:concentrado de 30:70, e denominadas: CONT - Tratamento controle (sem glicerina bruta ou aditivos); OE - Tratamento óleos essenciais (adição do produto Essential<sup>®</sup>, sem glicerina bruta); MON - Tratamento monensina sódica (adição do produto Rumenpac<sup>®</sup>, sem glicerina bruta); OEG - Tratamento óleos essenciais com introdução de glicerina bruta; MONG – Tratamento monensina sódica com introdução de glicerina bruta. A introdução de glicerina bruta nos tratamentos OEG e MONG foi de 200g/kg MS, e as inclusões de monensina sódica e óleos essenciais foram respectivamente de 0,03g/kg e 0,5g/kg de MS da dieta total. Avaliou-se o consumo e digestibilidade *in vitro* da MS e nutrientes das dietas, os parâmetros ruminais (pH e nitrogênio amoniacal), a produção e qualidade da massa microbiana e a produção de gases metano e carbônico das dietas. Os animais foram distribuídos em delineamento quadrado latino (5 x 5), em esquema fatorial 2 x 2 + 1 (monensina sódica ou óleos essenciais x ausência ou presença de glicerina + controle). Os dados foram analisados por intermédio do comando PROC MIXED do programa SAS versão 9.2, a 5% de probabilidade. A inclusão de glicerina bruta aos tratamentos (OEG e MONG) ocasionou redução no consumo de MS, MO, FDN, EE e AMIDO, e aumento na DIVMS e diminuição na DIVPB, independentemente do aditivo (P<0,05). Todos os tratamentos foram eficientes na manutenção do ambiente ruminal, com valores de pH acima de 6,2 e concentração de N-NH<sub>3</sub> acima de 10 mg/dL. Não foi encontrado nenhuma diferença (P>0,05) na produção e qualidade da massa microbiana. A associação glicerina e aditivos foi eficiente na redução da produção de gases metano *in vitro*. A glicerina bruta adicionada em 200 g/kg MS é um ingrediente energético substituto ao milho grão e a casca de soja, e, quando associada a aditivos (monensina sódica ou óleos essenciais) mostrou-se uma alternativa viável a ser utilizada em confinamento de bovinos Nelore, sem efeitos prejudiciais sobre a fermentação ruminal.

**Palavras-chave:** monensina sódica, Nelore, óleos essenciais, parâmetros ruminais

## CRUDE GLYCERIN ASSOCIATED TO ADDITIVES IN THE FEEDING OF BEEF CATTLE

**ABSTRACT** - The use of agroindustrial residues and food additives in the diet of beef cattle has increased in recent years due to positive action of these on ruminal fermentation, mainly with the aim of improve feed efficiency and reduction of production costs. Thus, this work was carried to evaluate the partial substitution of corn (50% DM in the total diet) and soybean hulls (13.27% DM in the total diet) by biodiesel coproduct (crude glycerin) and their association with essential oils (Essential ®) or sodium monensin (Rumenpac ®) in the diet of beef cattle. Were utilized five Nellore steers with 36 months of age, average weight of 500 kg and provided with permanent rumen cannulas. Similar experimental diets on the CP and EM were given for the animals in forage to concentrate ratio of 30:70, and denominated: CONT - Treatment control (no additives or crude glycerin), OE - Treatment Essential Oils (Addition of Essential® without crude glycerin); MON - Treatment sodium monensin (addition of Rumenpac® without crude glycerin); OEG - Treatment essential oils with introduction of crude glycerin; MONG - Treatment sodium monensin with introduction of crude glycerin. The introduction of the crude glycerine on the treatments OEG and MONG was 200g/kg MS, and the inclusions of sodium monensin and essential oils were respectively 0.03 g / kg and 0.5 g / kg DM in the diet. It was evaluated the intake and digestibility in vitro DM and nutrients in the diets, ruminal parameters (pH and ammonia nitrogen), and the production and quality of microbial mass, production of methane and carbon of the diets. The animals were distributed in Latin square design (5 x 5) in a factorial 2 x 2 + 1 (sodium monensin or essential oil vs absence or presence of crude glycerin + control). The data were analyzed using PROC MIXED of SAS version 9.2, a 5% probability. The inclusion of crude glycerin treatments (OEG and MONG) resulted in reduced intake of DM, OM, NDF, EE and STARCH, and increased DIVMS and decreased DIVPB, independently of the additive (P <0.05). All treatments were effective in maintaining of the rumen mat, with pH values up 6.2 and nitrogen ammonia concentration above 10 mg / dL. Not found difference (P> 0.05) on production and quality of microbial mass. Glycerin and additives association was effective in reducing methane production in vitro. The crude glycerin added to 200 g / kg DM is an ingredient substitute for corn grain and soybean hulls, and when combined with additives (sodium monensin or essential oils) proved to be a viable alternative for use in feedlot of Nellore steers without detrimental effects on ruminal fermentation.

**Keywords:** essential oils, Nellore, ruminal parameters, sodium monensin

## **CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS**

### **INTRODUÇÃO**

Por muito tempo nutricionistas tem trabalhado na modificação do ambiente ruminal com o propósito de melhorar a eficiência alimentar (BENCHAAR et al., 2008). A utilização de aditivos e ingredientes alternativos como os subprodutos da agroindústria na alimentação animal é sem dúvida uma estratégia de redução dos custos da dieta com melhoria na eficiência alimentar. Essa prática é amplamente utilizada em sistemas de terminação de bovinos em confinamento, onde os custos com alimentação e mão de obra são altamente dispendiosos. Neste sentido, a substituição de ingredientes onerosos como o milho, o qual tem grande participação na dieta total, se torna vantajosa.

A produção de biocombustíveis tem se expandido intensamente na última década, e as ramificações deste crescimento para a indústria de gado estão se tornando cada vez mais evidentes. A conversão de cereais a biocombustíveis tem aumentado a competição por matérias-primas utilizadas na alimentação animal, em contrapartida há a geração de grandes quantidades de coprodutos, que logo se tornarão alimentos comuns aos animais (DROUILLARD, 2011). Entre os principais coprodutos agroindustriais com potencial para substituição do milho na alimentação de ruminantes, atualmente, destaca-se a glicerina bruta (MACH et al., 2009, WANG et al., 2009a, LAGE et al., 2010, FARIAS et al., 2012a, FARIAS et al., 2012b). Diversos trabalhos têm demonstrado a aplicabilidade da glicerina bruta na alimentação de bovinos como fonte energética em substituição ao milho (VAN CLEEF et al., 2014, FERRARO et al., 2009, ABO EL-NOR et al., 2010, ABUGHAZALEH et al., 2011).

Outros ingredientes, classificados como aditivos alimentares e utilizados em pequenas proporções nas dietas dos animais, como os antibióticos ionóforos têm sido utilizados com sucesso na alimentação de bovinos há mais de 50 anos. No entanto, alguns grupos científicos juntamente com a mídia vêm cada vez mais questionando o uso desse antibiótico na alimentação animal por serem produtos poderiam contribuir para o desenvolvimento de organismos resistentes,



criando risco à saúde humana (SARTI, 2010). Nesse sentido, por precaução, a União Europeia banuiu o uso de antibiótico na alimentação animal e a importação de carnes de animais que receberam antibióticos como promotores de crescimento (IPHARRAGUERRE, 2003), mas a proibição do uso de ionóforos como aditivos alimentares (monensina sódica e lasalocida) somente ocorreu em 2006. A consequência imediata a esta proibição é a busca de alternativas para substituir os ionóforos, que tenham a mesma eficiência e economicidade, sem trazer possíveis riscos para saúde humana (DILorenzo, 2008). Dentre essas novas alternativas de modificadores de fermentação ruminal, estão os óleos essenciais.

Os óleos essenciais são extraídos de determinadas plantas e podem interagir com a membrana celular microbiana e inibir o desenvolvimento de algumas bactérias ruminais gram-positivas e gram-negativas.

Os aditivos monensina sódica e óleos essenciais aumentam a eficiência energética no rúmen, melhorar a utilização do nitrogênio pelas bactérias ruminais e reduzir perdas por metano e amônia, pela defaunação de microrganismos indesejáveis no rúmen, fornecendo adequado ambiente ruminal. Esses aspectos são alguns dos objetivos dos nutricionistas para aumentar a eficiência e o desempenho animal, juntamente com a redução dos custos da produção com a utilização de subprodutos e coprodutos agroindustriais.

Neste sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar a substituição parcial do milho (50% da MS na dieta total) e da casca de soja (13,27% da MS na dieta total) pelo coproduto do processamento do biodiesel (glicerina bruta) e sua associação aos aditivos óleos essenciais (Essential®) oriundos da mamona (*Ricinus communis*) e do caju (*Anacardium occidentale*) ou a monensina sódica (Rumenpac®) na dieta de bovinos de corte, com a hipótese de que essas associações forneçam efeitos positivos à fermentação ruminal.

## REVISÃO DE LITERATURA

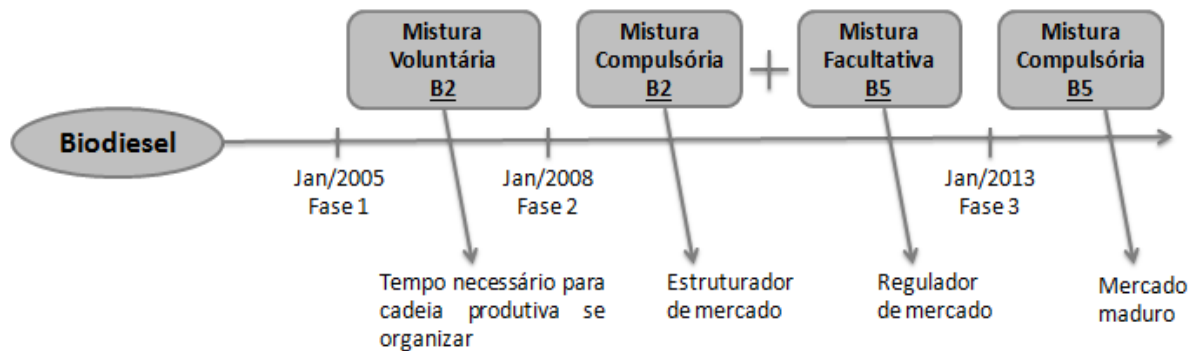
### Cadeia produtiva do biodiesel

As reservas mundiais provadas de petróleo totalizam 1,5 trilhões de barris. O Brasil ocupa a 5ª posição do ranking mundial com 25,21 bilhões de barris. O consumo mundial deste combustível fóssil está estimado em 80 milhões de barris/dia (ANP, 2013), fato que nos leva a conclusão que as reservas mundiais de petróleo se esgotarão por volta do ano de 2065. Com isso, não havendo novas descobertas de reservas, e com seu possível esgotamento, é de prever que seu preço elevará a tal ponto que sua utilização como combustível não será mais interessante, denotando uma necessidade da obtenção de alternativas de recursos energéticos que permitam a substituição do petróleo.

Assim, entra em cena a utilização de biomassa para fins energéticos, como fonte de combustível. Biomassa são todos os organismos biológicos que podem ser aproveitados como fontes de energia: a cana-de-açúcar, o eucalipto, a beterraba (dos quais se extrai álcool), o biogás (produzido pela biodegradação anaeróbica existente no lixo e dejetos orgânicos), lenha, carvão vegetal e alguns óleos vegetais (amendoim, soja, dendê, mamona), entre outros (RAMOS, 2003). Estudos apontam que, a utilização da biomassa para fins energéticos, vem tendo uma participação crescente perante a matriz energética mundial, levando as estimativas de que até o ano de 2050 deverá dobrar o uso mundial de biomassa disponível (FISCHER, 2001).

Uma alternativa que apresenta crescente interesse é a utilização de combustíveis obtidos da agricultura (etanol e biodiesel). As experiências com alternativas de combustíveis não são recentes, comprovando a preocupação com o eventual esgotamento das reservas petrolíferas. As primeiras experiências com o uso comercial do biodiesel na Europa surgiram nos anos da Segunda Guerra Mundial (Patente belga de 1937). Já no Brasil os estudos acerca de combustíveis alternativos iniciaram na década de 70, com a experiência do PROÀLCOOL (PLÀ, 2002). Os estudos sobre a utilização do biodiesel no Brasil surgiu na Universidade do Ceará, nos últimos anos da década de 70.

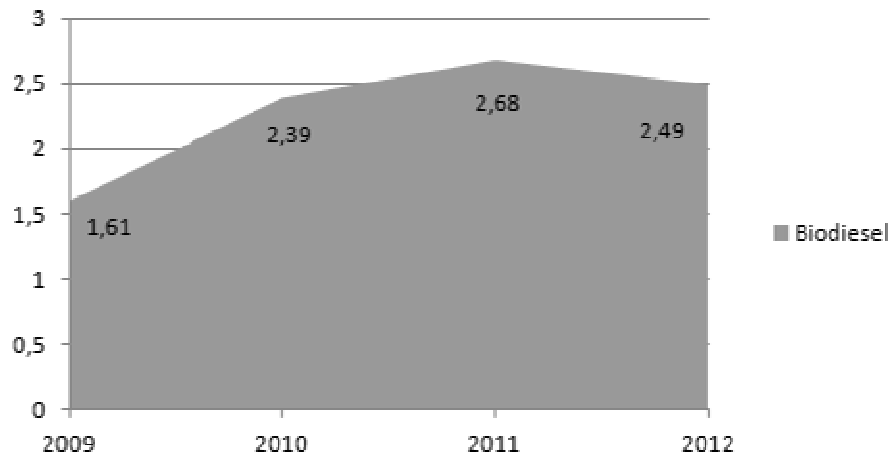
O biodiesel insere-se na matriz energética brasileira a partir da criação de seu marco regulatório, através da lei 11.097/2005, publicada no Diário Oficial da União em 13/01/2005. Na figura 1, segue uma linha histórica, a qual vai desde a criação desta lei, até a obrigatoriedade do uso do B5 (biodiesel a 5% no óleo diesel) a partir de 2013.



**Figura 1.** Evolução do marco regulatório para o biodiesel Lei 11.097/2005

A principal matéria prima utilizada na produção de biodiesel é o óleo vegetal (AJANOVIC, 2011). Entretanto, outros produtos como gorduras de origem animal ou óleos e gorduras residuais são utilizados na produção de biodiesel (ANP, 2013). Em 2010, o Brasil produziu 6.433,86 mil toneladas de óleo de soja (FAPRI, 2011). Em 2005, utilizaram 61,6 mil toneladas de óleo de soja para fabricação do biodiesel e em 2010 passaram a utilizar 1.780,85 mil toneladas. Da produção total de óleo de soja, 27,6% é destinado ao setor bioenergético.

A produção brasileira de biodiesel teve grande crescimento nos últimos anos devido à demanda do mercado por energia renovável (AJANOVIC, 2011; VISSER et al., 2011). Conforme podemos observar na Figura 2 a seguir, a produção brasileira de biodiesel teve crescimento exponencial de 2009 para 2011, porém no ano de 2012, devido às perdas provocadas pela estiagem em todo território nacional, principalmente no Rio Grande do Sul, houve queda na produção de grãos, fato que repercutiu na produção final do biodiesel. Contudo, a produção entre janeiro e outubro de 2013 já igualou a produção total de 2012 somando 2,4 bilhões de litros, segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais (Abiove) o ano de 2013 foi fechado em 3 bilhões de litros.



**Figura 2.** Produção brasileira de biodiesel (Bilhões de litros). Fonte: ANP (2013)

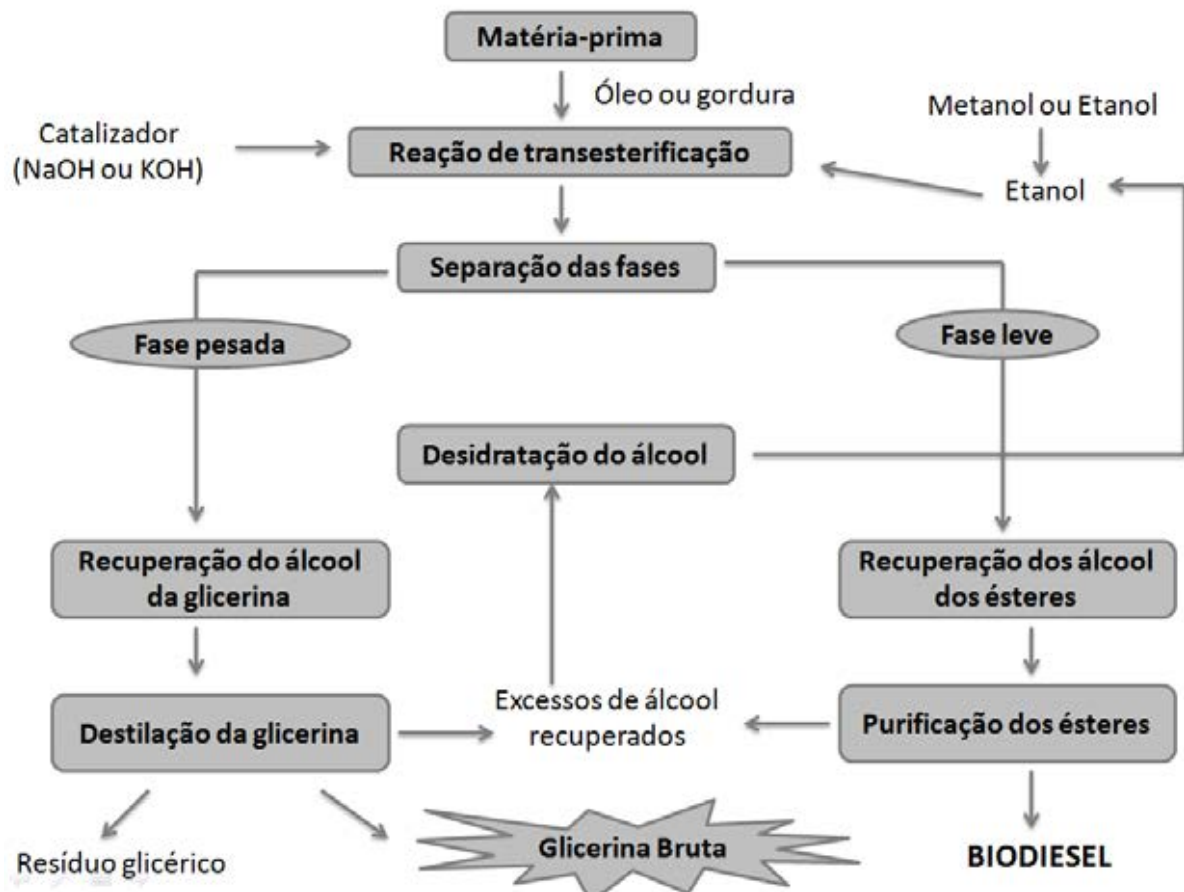
Segundo Fapri (2011), a produção mundial de biodiesel em 2010 foi de 18,7 bilhões de litros. Deste mercado 11,7 bilhões de litros são oriundos da União Europeia, 2,4 bilhões do Brasil, 2,1 bilhões da Argentina e 2,0 bilhões dos Estados Unidos. A União Europeia é responsável por 62,5 % da produção mundial de biodiesel, sendo a Alemanha responsável por 44,0 %. O Brasil ocupa a segunda colocação do ranking, sendo responsável por 20,5 % da produção total, ficando a região centro-oeste com a maior produção no país (42,9 %).

Com o processo de produção do biodiesel são gerados diversos coprodutos com alto potencial de uso em outros segmentos industriais, como por exemplo, a glicerina (pura e bruta), as tortas e os farelos. Tendo em vista que o Brasil consome aproximadamente 56 bilhões de litros de óleo diesel anualmente (ANP, 2013), e que há adição de 5% de biodiesel no óleo diesel, no ano de 2013 o setor produziu 3 bilhões de litros de biodiesel (Abiove, 2014) e colocou no mercado aproximadamente 300 milhões de litros de glicerina. Com o crescimento da produção de biodiesel, e o não acompanhamento e aproveitamento das indústrias consumidoras de glicerina (alimentícia e farmacêutica), diariamente são ofertados no mercado um grande excedente desse coproduto, deixando-o sem destino definido.

### Glicerina, coproduto da produção do biodiesel

A glicerina, também conhecida como glicerol ou 1, 2, 3 propanotriol, é o principal coproduto da produção do biodiesel. Aproximadamente 10% do volume da matéria-prima (óleo ou gordura) adicionada, inicialmente, ao processo produtivo são convertidos em glicerina (DASARI et al., 2005).

A glicerina é um produto viscoso, resultante, entre outros, do processo de transformação de um triglicerídeo em éteres de ácidos graxos (biodiesel) a partir de uma reação de transesterificação, na presença de um catalisador (normalmente básico) e de um álcool de cadeia curta, podendo ser metanol ou etanol (Figura 3).



**Figura 3.** Fluxograma da produção do biodiesel e da glicerina.

Desde 1959, o glicerol é reconhecido como substância atóxica, permitido como aditivo em alimentos, e também considerado como substância “GRAS” (Generally Regraded as Safe) pelo Food and Drug Administration dos Estados Unidos (DONKIN & DOANE, 2007). No Brasil, seu uso em produtos alimentícios é assegurado pela Resolução de Nº 386, de 5 de Agosto de 1999 (ANVISA, 1999). Porém, para ser comercializada com essa garantia de qualidade, a glicerina bruta (baixa e média pureza) tem que passar por processos de purificação, sendo tratada e refinada por filtração onde são utilizados aditivos químicos e por onerosos processos de destilação. Depois de purificada, a glicerina é utilizada em síntese de resinas (18 %), fármacos (7 %), uso alimentício (24 %), uso em cosméticos (40 %), e outros (11 %) (THOMPSON & HE, 2006).

Conforme o tipo de processamento, a composição da glicerina pode variar de acordo com seu teor de glicerol e de impurezas (metanol, sais, sabões e ácidos graxos). Segundo HIPPEN et al. (2008), a glicerina pode ser classificada em três diferentes graus de pureza: Baixa pureza - obtida logo após a separação do biodiesel e contém baixos níveis de glicerol (400 a 700 g/kg de glicerina), elevados níveis de catalizadores, álcool, água, ácidos graxos e sabões; Média pureza - é a glicerina bruta após sofrer tratamento ácido, seguido de remoção dos ácidos graxos e sabões, e possui normalmente 750 a 900 g de glicerol/kg de glicerina, sendo o restante formado por água, sais e metanol; e Alta pureza - após sofrer bidestilação a vácuo e tratamento com absorventes, contém mais de 990g de glicerol/kg de glicerina.

Porém, com o recente estímulo à produção de biodiesel e expansão das indústrias no Brasil e no mundo (FAPRI, 2012), houve aumento na disponibilidade de glicerina, gerando grande excedente no mercado. Esse fato comprometeu sua comercialização, e como as indústrias que a tinham como matéria-prima não acompanharam esse aumento da produção, e por ser relativamente caro o processo de purificação, esses coprodutos, de baixa e média pureza estão estocadas em barris ou estão sendo descartadas incorretamente na natureza (PELLEGRIN et al., 2012). Assim, uma das alternativas para evitar a destinação incorreta da glicerina, é a sua utilização na forma bruta (média pureza), na alimentação animal.

## Utilização da glicerina na alimentação animal

No Brasil a utilização de glicerina na nutrição animal foi aprovada pela Instrução Normativa N° 42 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), de 16 de dezembro de 2010, onde os parâmetros mínimos para uso são: teor mínimo de 800 g de glicerol/kg, menos de 150 ppm de metanol/kg e máximo de 120 g de água/kg.

Doppenberg & Van Der Aar (2007) destacaram que a principal preocupação sobre o uso da glicerina bruta na alimentação animal é o conteúdo de metanol que permanece após processamento. A intoxicação por metanol em animais é identificada pela excreção de ácido fórmico na urina. O metanol ingerido é oxidado no fígado a formaldeído e este a ácido fórmico, que é a substância tóxica (LAMMERS et al., 2008). Os efeitos tóxicos decorrentes de envenenamento por metanol são, na verdade, pela formação, acúmulo e metabolismo lento do ácido fórmico. As consequências clínicas do envenenamento por metanol são depressão do sistema nervoso central, vômitos, acidose metabólica grave e cegueira pela destruição do nervo óptico (SKRZYDLEWSKA, 2003). No entanto, estudos de LAMMERS et al. (2008) e KIJORA et al. (1998) não verificaram frequência de lesões histológicas nos olhos, rins e fígado causada pela toxicidade do metanol presente na glicerina.

A glicerina apresenta características energéticas semelhantes ao grão de milho, desta forma várias pesquisas foram desenvolvidas utilizando a glicerina na alimentação animal (MACH et al., 2009, WANG et al., 2009a, WANG et al., 2009b, PARSONS et al., 2009, FARIAS et al., 2012a, FARIAS et al., 2012b). A glicerina comumente utilizada é a de média pureza, e apresenta aproximadamente 812 g de glicerol, 47,6 g de cinzas, 0,3 g de metanol, 0,1 g de proteína bruta, 3,3 g de extrato etéreo, 232 g de água, 11634,4 mg/kg de sódio, 79,1 mg/kg de potássio, 35,8 mg/kg de cálcio, 16,3 mg/kg de magnésio, 239,8 mg/kg de fósforo e 3656 cal/g de energia bruta (TECPAR, 2010, Fundação-ABC, 2010, LANA, 2010).

Uma das principais deficiências desse ingrediente é o teor de proteína bruta (média de 0,1 g/kg MS) e ausência de gordura e componentes fibrosos. No entanto a glicerina de média pureza apresenta valores energéticos (3656 cal/g) semelhantes ao do milho grão, caracterizando-o como ingrediente energético. Porém, como

citado acima, ao substituir o milho grão pela glicerina, é necessário ajustar os teores de proteína e fibra.

Sendo assim, diante da comprovação de sua utilização para animais monogástricos (GROESBECK et al., 2008, LAMMERS et al., 2008, CERRATE et al., 2006, SIMON et al., 1996) e ruminantes (VAN CLEEF et al. 2014, LAGE et al., 2014 a, LAGE et al., 2014 b, CARVALHO et al., 2014, D'AUREA, 2014, FAVARO, 2014, BARTOŇ et al., 2013, WILBERT et al., 2013, PASCHOALOTO, 2012), seu uso principalmente em substituição aos ingredientes energéticos deve ser cuidadosamente estudado, com base na análise de preço de mercado, a fim de reduzir os custos da alimentação, e mantendo a eficiência produtiva.

### **Glicerina na dieta de ruminantes: fermentação ruminal e metabolismo animal**

A glicerina na nutrição de ruminantes é classificada como uma fonte energética de grande assimilação pelos microrganismos da flora ruminal, com ampla metabolização no fígado (ABO EL-NOR et al., 2010).

Segundo KREHBIEL (2008) os possíveis destinos do glicerol em ruminantes são: passagem direta (13 %), fermentação ruminal (44 %) e absorção direta (43 %). JOHNS (1953) ao avaliar a fermentação ruminal *in vitro* e *in vivo* do glicerol observou que após duas horas de incubação ruminal menos de 80 % da quantidade inicial de glicerol foi encontrada no fluído ruminal, cerca de 50% desapareceu com quatro horas de incubação e o desaparecimento total ocorreu após 24 horas de incubação.

No rúmen, o glicerol é rapidamente utilizado pelos microrganismos para formação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), e num prazo de 4 a 6 horas desaparece quase que totalmente (ABO EL-NOR et al., 2010, ABUGHAZALEH et al., 2011; FERRARO et al., 2009; MACH et al., 2009). Com a fermentação ruminal do glicerol observa-se uma alteração na produção de AGCC em favor do ácido propiônico. No entanto, o glicerol também pode aumentar as concentrações de butirato e valerato (DONKIN, 2008, ABUGHAZALEH et al., 2011).

ABUGHAZALEH et al. (2011) avaliaram as inclusões de 15, 30 e 45 % de glicerina purificada (0,995 g/g de glicerol) em substituição parcial ao milho (30 a 45 %), e concluíram que a glicerina reduz a concentração de acetato, enquanto que a



concentração de propionato pode perfazer 45 % do total de C2 e C4 produzidos. Além disso, as maiores inclusões (30 e 45 %) de glicerina reduziram as concentrações de DNA das bactérias fermentadoras de CHO estruturais (*Butyrivibrio fibrisovens* e *Selenomonas ruminantium*), enquanto que para as bactérias fermentadoras de CHO não estruturais (*Albus Ruminococcus* e *Dextrinosolvans Succinivibrio*) não foram observadas diferenças.

Segundo VALADARES FILHO & PINA (2006), o ácido propiônico formado pela fermentação microbiana do glicerol pode ser absorvido pelo epitélio ruminal de forma passiva, ou seja, sem gasto de energia e transportado via porta para o fígado, sendo a rota metabólica usual o ciclo de Krebs, onde o Succinil-CoA, após reações bioquímicas origina o oxaloacetato que pode ser utilizado para formar glicose pela via gliconeogênica. Assim, a glicerina apresenta grande potencial para aplicação como substrato gliconeogênico na nutrição de ruminantes.

A absorção direta do glicerol pelo epitélio do rúmen acontece de forma passiva e precisa passar pelas proteínas integrais de membrana (MIP). As MIPs podem ser classificadas em dois grandes subgrupos funcionais: aquaporinas (altamente específicas para conduzir água) e aquagliceroporinas (especializadas no transporte de glicerol) (FROGER et al., 2001).

As aquagliceroporinas AQP3, AQP7 e AQP9 são descritas como uma classe de canais de água permeáveis ao glicerol (FROGER et al., 2001). A AQP3 é encontrada nas células epidermais, nos olhos, rins, estômago, baço e eritrócito (MACDOUGALD & BURANT, 2005) e age como um canal de glicerol, mantendo a hidratação, a elasticidade e funcionamento dos órgãos. A AQP7 é encontrada em abundância no tecido adiposo e atua como um canal de glicerol para os adipócitos (HIBUSE et al., 2005). A AQP9 é específica do fígado e funciona como porta de entrada no hepatócito, regulando a entrada do glicerol na célula para ser utilizada como substrato gliconeogênico durante o jejum (FROGER et al., 2001).

O glicerol então absorvido é transportado via porta para ser metabolizado no fígado, onde com ação da enzima glicerol-quinase ocorre fosforilação do glicerol + ATP a glicerol-3-fosfato + ADP ao nível de triose fosfato (LEHNINGER, 2006), sendo então destinados a formação de triacilgliceróis, fosfolípídeos ou glicose, em conjunto com ácidos graxos livres (MOTTA, 2009, NELSON & COX, 2004), podendo entrar na

via da gliconeogênese, ou ser oxidado para a produção de energia via glicólise (JENSEN et al., 2001; BRISSON et al., 2011).

A fosforilação do glicerol é um passo inicial na síntese de glicose, triglicerídeos ou oxidação completa a CO<sub>2</sub>. A glicerol-quinase é encontrada no fígado e nos rins, mas também no cérebro, adipócitos e músculos esquelético e cardíaco (RAHIB et al., 2009). Entretanto, a remoção hepática do glicerol presente na veia porta pode ser baixa. Segundo KREHBIEL (2008), há relatos de aumento na concentração plasmática de glicerol em resposta a infusão do composto no rúmen sem ser observado aumento simultâneo na concentração de glicose plasmática.

A maioria do glicerol no organismo é encontrada na forma de triglicerídeos no tecido adiposo e é liberado para a corrente sanguínea por lípases durante a lipólise, e é normalmente assumido como sendo um substrato gliconeogênico em animais ruminantes. PEREIRA et al. (2010) relatam que a melhora na conversão alimentar obtida com a inclusão de glicerina na dieta, provavelmente é devido a uma melhora no “status” metabólico dos animais, proporcionado pelo maior aporte energético de origem gliconeogênica suprido pelo glicerol absorvido no rúmen ou intestino grosso, ou mesmo pela fermentação ruminal do glicerol a propionato.

### **Aditivos na nutrição animal**

Segundo a Instrução Normativa Nº 13 de 30 de novembro de novembro de 2004 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), em vigência, aditivos destinados a alimentação animal são substâncias ou microrganismos adicionados intencionalmente às dietas dos animais, em pequenas proporções, tendo ou não valor nutritivo, para melhorar os índices produtivos e a saúde dos animais (BRASIL, 2004).

Segundo SINDIRAÇÕES (2009) os aditivos alimentares podem ser classificados da seguinte maneira:

- I. Aditivos tecnológicos: substância adicionada ao produto com fins industriais e/ou tecnológicos;
- II. Aditivos sensoriais: substância adicionada ao produto para melhorar ou modificar suas propriedades organolépticas ou características visuais;

- III. Aditivos nutricionais: substância utilizada para manter ou melhorar as propriedades nutricionais do produto;
- IV. Aditivos zootécnicos: substância utilizada para influir positivamente na melhoria do desempenho dos animais;
- V. Anticoccidianos: substância destinada a eliminar ou inibir protozoários;
- VI. Agonistas: substâncias utilizadas como repartidores de energia.

Geralmente, os aditivos tecnológicos e sensoriais são empregados pelo setor industrial, enquanto os aditivos nutricionais, zootécnicos e anticoccidianos são utilizados por toda a cadeia de alimentação animal. Entre os aditivos mais utilizados na alimentação de ruminantes, destacam-se os ionóforos, antibióticos promotores de desempenho, leveduras, sabões de cálcio, tamponantes, enzimas, ácidos orgânicos, extratos de plantas, própolis, entre outros.

Entre os aditivos citados anteriormente, os antimicrobianos, ionóforos ou não, são as substâncias mais estudadas e que apresentam maior segurança aos pecuaristas em relação aos benefícios gerados à produção, pela melhora na saúde do rúmen e favorecimento da fermentação ruminal.

### **Monensina sódica como aditivo alimentar**

A monensina é um antibiótico ionóforo que é utilizado com o objetivo de aumentar o desempenho dos animais pela melhoria da eficiência energética, principalmente, em função do aumento da produção de ácido propiônico, da redução da relação acetato/propionato e diminuição da produção de metano, além da diminuição da produção de ácido láctico e redução nas perdas de aminoácidos que seriam potencialmente fermentados no rúmen (McGUFFEY et al., 2001). Essas mudanças são decorrentes da desnaturação da parede celular das bactérias gram-positivas do rúmen, as quais são sensíveis à ação dos ionóforos por não serem seletivas.

As bactérias são classificadas em dois grandes grupos: gram-positivas e gram-negativas. As gram-negativas possuem parede celular e uma membrana externa de proteção com canais (orifícios que ligam o meio intracelular ao extracelular) com aproximadamente 600 Dalton. Já as gram-positivas apresentam

apenas uma membrana porosa, não seletiva, sendo, portanto sensíveis à ação dos ionóforos (MORAIS et al., 2006).

O modelo desenvolvido por Russell & Strobel (1989) visa explicar os efeitos da utilização da monensina sódica sobre o desenvolvimento da bactéria ruminal gram-positiva *Streptococcus bovis*. Primeiramente, a concentração de  $K^+$  intracelular é muito superior à extracelular. Quando a monensina se liga à membrana celular, a primeira reação que ocorre é a rápida saída de  $K^+$  e entrada de  $H^+$  na célula, provocada pela mudança no gradiente iônico externo. O  $H^+$  acumulado no interior da célula ocasiona diminuição do pH. A célula responde a esta queda no pH exportando  $H^+$  para o meio externo e permitindo a entrada de  $Na^+$  para o interior da célula. Outra forma de exportar o  $H^+$  é pelo mecanismo de “bomba” próton ATPase. Grande parte da energia produzida pela célula é utilizada pelas bombas de  $Na^+/K^+$  e próton ATPase, na tentativa de manter o pH e o balanço iônico celular, de forma que com o passar do tempo, a célula se torna incapaz de manter seu metabolismo energético, diminuindo sua capacidade de crescimento e reprodução, e acaba morrendo ou assume um nicho microbiano sem expressão ruminal.

Guan et al. (2006) e Hristov et al. (2009) obtiveram resultados semelhantes com a suplementação com ionóforos, em que a produção total de AGCC não foi afetada, mas observou-se diminuição da relação acetato/propionato, uma vez que as bactérias produtoras de propionato e utilizadoras de lactato são favorecidas (gram-negativas), e as produtoras de acetato, butirato, lactato e amônia são desfavorecidas (gram-positivas).

Além do aumento da eficiência energética, também se atribui à utilização de ionóforos a melhoria da utilização de proteína pelo ruminante. Segundo Lana & Russel (1996) tal benefício se deve ao fato de que as bactérias proteolíticas e fermentadoras de aminoácidos serem sensíveis aos ionóforos, fato que diminui a concentração de  $N-NH_3$  no fluido ruminal. O acúmulo de alfa-amino-nitrogênio e peptídeos sugere que a monensina gera maior inibição de deaminação do que a proteólise propriamente dita (McGUFFEY, 2001).

Porém, apesar de todos os benefícios citados acima, o uso rotineiro de antibióticos ionóforos na alimentação animal gera preocupação a saúde pública (BENCHAAR et al., 2006). As restrições impostas à utilização têm como base

preocupações ao desenvolvimento de microrganismos resistentes pelo uso inadequado de antibióticos ionóforos, comprometendo a ação terapêutica dos antibióticos em humanos (GUZMÁN-BLANCO et al., 2000; RUSSELL & HOULIHAN, 2003; DEWULF et al., 2007; RAY et al., 2007). Assim, em 1999, baseando-se no “princípio da precaução” a União Europeia (UE) proibiu a utilização de antibióticos como promotores de crescimento na alimentação animal (IPHARRAGUERRE, 2003), mas a proibição do uso de ionóforos como aditivos alimentares (monensina sódica e lasalocida) somente ocorreu em 2006. Este princípio é uma prerrogativa para as autoridades da UE, mesmo na ausência de dados científicos conclusivos, adotarem uma “postura preventiva” em relação a uma determinada questão. Outros países, no entanto, adotam o “princípio da comprovação”, baseando-se em evidências científicas para uma tomada de decisão, como é o caso dos Estados Unidos da América e Brasil.

Sendo assim, para atender as limitações impostas por alguns mercados consumidores, e antes que apareçam provas científicas contra os antibióticos ionóforos, o foco dos nutricionistas animais de hoje esta sendo a busca por novas alternativas aos aditivos ionóforos, como é o caso dos extratos vegetais.

### **Extratos vegetais como aditivo alimentar**

Os extratos vegetais, comumente conhecidos como óleos essenciais de plantas, são uma mistura de terpenóides, líquidos e lipofílicos, obtidos a partir de diferentes partes da planta, tais como, folhas, raízes, caule, entre outros, em geral via extração a vapor ou por solventes (CALSAMIGLIA et al., 2007). São compostos secundários com finalidade de promover proteção contra predadores (insetos e animais herbívoros), microrganismos patogênicos e eventuais invasores das plantas (TAIZ & ZIEGER, 2004).

Atividades antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antiparasitária, inseticida, antiprotozoários e antioxidantes já foram observados em muitos óleos essenciais (COWAN, 1999; BURT, 2004). O timol (extraído do tomilho), carvacrol (extraído do orégano), alina e alicina (extraído do alho), citrol e citronolol (extraídos de plantas cítricas), mentol (extraído da menta) e cinamaldeído (extraído da canela) já possuem

sua funcionalidade conhecida, além dos métodos de extração para estes óleos serem de fácil operação (VELLUTI et al., 2003).

Os óleos extraídos de determinadas plantas podem interagir com a membrana celular microbiana e inibir o desenvolvimento de algumas bactérias ruminais gram-positivas e gram-negativas. A adição de alguns destes extratos de plantas no rúmen tem provocado uma diminuição da relação acetato/propionato, com a consequente redução da produção de metano no rúmen (CHAGAS, 2011).

Segundo Coneglian (2009) o modo de ação dos óleos essenciais em ruminantes ainda não está completamente elucidado. No entanto algumas hipóteses têm sido levantadas: (1) controle de patógenos pela atividade antimicrobiana, (2) atividade antioxidante, (3) melhora na digestão pelo estímulo da atividade enzimática e (4) morfometria dos órgãos.

O mecanismo pelo qual a maioria dos óleos essenciais exerce seu efeito microbiano esta relacionado à sua atividade na estrutura da parede celular bacteriana, desnaturando e coagulando as proteínas. Mais especificamente, atuam alterando a permeabilidade da membrana citoplasmática por íons de  $H^+$  e  $K^+$ , resultando em perda de controle quimiosmótico da célula afetada e, conseqüentemente, a morte bacteriana (DORMAN & DEANS, 2000).

### **Óleos essenciais na nutrição de ruminantes**

Muitos estudos utilizando extratos de plantas ricos em óleos essenciais em dietas de ruminantes foram publicados na última década, porém, a maioria das pesquisas foi realizada em incubações *in vitro* (CARDOZO et al., 2006, BUSQUET et al., 2007, PATRA et al., 2010, BHATTA et a., 2012). Comprovando estes bons resultados encontrados, estudos recentes *in vivo* têm demonstrado melhorias na fermentação ruminal, com diminuição da relação acetato/propionato, redução da produção de  $CH_4$  e lactato, tanto em bovinos de corte (YANG et al., 2010, GERACI et al., 2012) quanto em ovinos e caprinos ( CHAVES et al., 2011, ANASSORI et al., 2011) e bovinos leiteiros (TAGER & KRAUSE, 2011, TEKIPPE et al., 2011).

Segundo pesquisas de Platel & Srinivasan (1996), a adição de óleos essenciais aumenta as secreções de saliva, suco gástrico, suco pancreático, sais biliares e também enzimas do intestino delgado.

Contudo, há relatos que o uso de óleos essenciais em doses elevadas também possa reduzir a digestão dos nutrientes e a produção total dos AGCC (BEAUCHEMIN & MCGINN 2006, YANG et al., 2010).

Na literatura há relatos de centenas de extratos vegetais, não comerciais, com ação positiva na fermentação microbiana ruminal, porém, há também considerável variação no conteúdo de compostos ativos nesses extratos, por causa da variedade de planta cultivada, condições de crescimento, métodos de processamento, entre outras. Com isso, se torna difícil estabelecer uma dosagem correta de cada óleo essencial em dietas para animais, no entanto, já estão sendo lançados no mercado produtos comerciais com garantia de qualidade, os quais possuem dosagem correta para utilização.

### **Essential®: composto de óleo de caju (*Anacardium occidentale*) e mamona (*Ricinus communis L*) como aditivos alimentares**

O óleo da mamona ou de rícino pode ser extraído por prensagem mecânica ou por solventes, destaca-se economicamente pela versatilidade química no ramo industrial (MESSETTI et al., 2010). É composto basicamente de ácido ricinoléico (89,5%), apresenta destacáveis efeitos analgésicos e anti-inflamatórios e possui ação bactericida e citolítica, dissolvendo a quitina, constituinte da membrana celular de microrganismos. A ação bactericida se dá principalmente contra bactérias gram-positivas, as quais são produtoras de ácido acético, butírico, láctico e hidrogênio (MORAIS et al., 2006) e estão presentes em maiores proporções no rúmen de animais alimentados com dietas alto grão.

A mamona contém uma potente toxina (ricina) que representa o principal impedimento para sua adoção na alimentação animal (Oliveira et al., 2010b). A ricina é uma proteína solúvel encontrada principalmente no endosperma da mamona (Bandeira et al., 2004). Apesar da alta toxicidade da semente, o óleo de mamona não

é tóxico, pois a ricina não é solúvel em lipídios, permanecendo todo o componente tóxico na torta ou no farelo (Gaillard & Pepin, 1999).

O óleo da castanha de caju é extraído a partir das castanhas utilizando temperaturas elevadas, apresenta o ácido cardol (15-18%) e o cardanol (75-80%) como seus princípios ativos mais importantes. Em revisão, Coneglian (2009) comentou que o cardol possui ação antimicrobiana por ser composto fenólico, o qual também confere ao óleo características antioxidantes.

O produto Essential (Oligobasics®), utilizado nesse estudo em substituição ao ionóforo monensina sódica, é composto de óleo de mamona e caju, composto por (9%) óleo de rícino ou de mamona (ácido ricinoléico) e (36%) óleo de caju (ácido anacárdico, cardol e cardanol) associado ao veículo vermiculita expandida. É classificado como aditivo aromatizante, destinado a fabricantes de alimentos para aves e ruminantes com o objetivo de auxiliar na melhora de desempenho dos animais.

Em estudo recente, Zawadzki (2013) avaliou a associação da glicerina bruta (203 g/kg/MS) ao produto Essential® (3 g/animal/dia) em dietas para bovinos Purunã (1/4 Aberdeen Angus + 1/4 Caracu + 1/4 Canchim + 1/4 Charolês) terminados em confinamento, e constatou que a associação aumentou o peso de carcaça, e não prejudicou o consumo de ração e a conversão alimentar.

Silva (2013) avaliou a associação da glicerina bruta (150 g/kg/MS) ao produto Essential® (3 g/animal/dia) em dietas para bovinos Nelore terminados em confinamento, e não encontrou diferença na digestibilidade aparente das dietas tão quanto nas variáveis de desempenho animal.

Nunes do Prado et al. (2011), observaram que a inclusão do produto Essential® (5 g/animal/dia) na dieta de bovinos Nelore em confinamento melhorou as variáveis de desempenho, proporcionou maior peso vivo final, com ganho médio diário de 1,35 kg/dia contra 1,24 kg/dia do tratamento controle, e maior rendimento de carcaça (56,3 vs 57,9%).

Branco et al. (2008) observaram aumento na digestibilidade *in vitro* da MS do feno de Tifton (44,04 vs 54,65%) e do grão de milho (91,42 vs 95,42%) em 48 horas de incubação quando se incluiu o produto Essential® (320 mg/L).



Branco et al. (2006) ao comparar a substituição da monensina sódica (30 ppm) pelo produto Essential<sup>®</sup> (4 g/animal/dia) em dietas para bezerros, observaram que o Essential<sup>®</sup> se mostrou mais eficiente na manutenção do pH ruminal, onde se manteve acima de 6,0 em todos horários analisados.

### **Objetivo geral**

Avaliar a substituição parcial do milho (50% da MS na dieta total) e da casca de soja (13,27% da MS na dieta total) pelo coproduto do processamento do biodiesel (glicerina bruta – 200 g/kg de MS) e sua associação aos aditivos óleos essenciais (Essential<sup>®</sup>) oriundos da mamona (*Ricinus communis*) e do caju (*Anacardium occidentale*) ou a monensina sódica (Rumenpac<sup>®</sup>) na dieta de bovinos Nelore, sobre o consumo e digestibilidade *in vitro* da MS e nutrientes das dietas, os parâmetros ruminais (pH e nitrogênio amoniacal), a produção e qualidade da massa microbiana e a produção de gases metano e carbônico das dietas.

## REFERÊNCIAS

ABO EL-NOR, S.; ABUGHAZALEH, A. A.; POTU, R. B.; HASTINGS, D.; KHATTAB, M. S. A. Effects of differing levels of glycerol on rumen fermentation and bacteria. **Animal Feed Science and Technology**, v. 162, n. 3- 4, 2010. Disponível em: doi:10.1016/j.anifeedsci.2010.09.012.

ABUGHAZALEH, A. A.; ABO EL NOR, S.; IBRAHIM, S. A. The effect of replacing corn with glycerol on ruminal bacteria in continuous culture fermenters. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 95, p. 313-319, 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/biodiesel.asp>>, Acesso em: 23/11/2013.

AJANOVIC, A. Biofuels versus food production: Does biofuels production increase food prices? *Energy*, v.36, n.4, p.2070-2076, 2010. Disponível em: DOI: 10.1016/j.livsci.2011.08.003.

ANASSORI, E., DALIR-NAGHADEH, B., PIRMOHAMMADI, R., TAGHIZADEH, A., ASRI-REZAEI, S., MAHAM, M., FARAHMAND-AZAR, S., FARHOOMAND, P. Garlic: a potencial alternative for monensina as rumen modifier. **Livestock Science**, v. 142, p. 142-276-287, 2011.

ANVISA. Resolução/386. **Regulamento técnico sobre aditivos utilizados segundo as boas práticas de fabricação e suas funções**. ANVISA - Agência Nacional de vigilância Sanitária, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Apoio Rural e Cooperativismo. **Instrução Normativa no 13, de 30 de novembro de 2004**. Sistema de Legislação Agrícola Federal. Brasília: MAPA, 2004. Disponível em: <HTTP://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=10195>. Acesso em: 15 dez. 2013.

BARTOÑ, L., BURES, D., HOMOLKA, P., JANCÍK, F., MAROUNEK, M., REHÁK, D. Effects of long-term feeding of crude glycerine on performance, carcass traits, meat quality, and blood and rumen metabolites of finishing bulls. **Livestock Science**. v.155, n.1, p.53-59, 2013.

BEAUCHEMIN, K. A., MCGINN, S.M. Methane emissions from beef cattle: effects of fumaric acid, essential oils, and canola oil. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 1489-1496, 2006.

BENCHAAR, C.; CASALMIGLIA, S.; CHAVES, A. V.; FRASER, G. R.; COLOMBATTO, D.; MCALLISTER, T. A.; BEUCHEMIN, K. A. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p. 209-228, 2008.

BENCHAAR, C.; PETIT, H.V.; BERTHIAUME, R.; WHYTE, T.D.; CHOUINARD, P.Y. Effects of addition of essential oils and monensin premix on digestion, ruminal fermentation, milk production, and milk composition in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.4352–4364, 2006.

BHATTA, R.; BARUAH, L.; SARAVANAN, M.; SURESH, K.P.; SAMPATH, K.T. Effect of medicinal and aromatic plants on rumen fermentation, protozoa population and methanogenesis in vitro. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 97, n. 3, p 446-456, 2012. DOI: 10.1111/j.1439-0396.2012.01285.x.

BRISSON, D.; VOHL, M.C.; ST-PIERRE, J.; HUDSON, T. J.; GAUDET, D. Glycerol: a neglected variable in metabolic processes? **Bioessays**, v. 23, n. 6, p. 534-542, 2011.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

BUSQUET, M., CASALMIGLIA, S., FERRET, A., KAMEL, C. Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 761-771, 2006.

CALSAMIGLIA, S.; BUSQUET, M.; CARDOZO, P.W.; et al. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 2580-2595, 2007.

CARVALHO, J.R.R., CHIZZOTTI, M.L., RAMOS, E.M., MACHADO NETO, O.R., LANNA, D.P.D., LOPES, L.S., TEIXEIRA, P.D., LADEIRA, M.M. Qualitative characteristics of meat from young bulls fed different levels of crude glycerin. **Meat Science**. v. 96, n. 2, p. 977-983, 2014.

CERRATE, S.; YAN, F.; WANG, Z. et al. Evaluation of glycerine from biodiesel production as a feed ingredient for broilers. **International Journal of Poultry Science**, v. 5, n. 11, p. 1001-1007, 2006.

CHAGAS, L. J. **Óleos funcionais como alternativa a ionóforos na alimentação de bovinos de corte**. Disponível em: <<http://www.beefpoint.com.br>>, Acesso em: 17/02/2012.

CHAVES, A. V., STANFORD, K., DUGAN, M. E. R., GIBSON, L. L., MCALLISTER, T. A., VAN HERK, F., BENCHAAR, C. Effects of cinnamaldehyde, garlic and juniper

berry essential oils on rumen fermentation, blood metabolites, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs. **Livestock Science**. v. 117, p. 215-224, 2008.

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

CONEGLIAN, S.M. **Uso de óleos essenciais de mamona e caju em dietas de bovinos**. 2009. 100 f. Tese (Doutorado em Zootecnia). – Universidade Estadual de Maringá, 2009.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

DASARI, M.A.; KIATSIMKUL, P.P.; SUTTERLIN, W.R.; SUPPES, G.J.. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. **Applied Catalysis A: General**, v. 281, n.1-2, p. 225-231, 2005.

DEWULF, J.; CATRY, B.; TIMMERMAN, T.; OPSOMER, G.; DE KRUIF, A.; MAES, D. Tetracycline-resistance in actosepositive enteric coliforms originating from Belgian fattening pigs: degree of resistance, multiple resistance and risk factors. **Preventive Veterinary Medicine**, v.78, p.339-351, 2007.

DICOSTANZO, A.; CASSADY, J. M.; ZEHNDER, C. M. 1996. Utilization of approved feed additives in growing, finishing and replacement beef cattle diets. In: **Proc. 57th Minnesota Nutrition Conference and Alltech, Inc. Technical Symposium**. p. 81-96, Bloomington, MN, 1996.

DILORENZO, N.; DIEZ-GONZALEZ, F.; DICOSTANZO. A. Effects of feeding polyclonal antibody preparations on rumen fermentation patterns, performance, and carcass characteristics of feedlot steers. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 3023-3032, 2008.

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

DONKIN, S.S., DOANE, P., 2007. Glycerol as a feed ingredient in dairy rations. In: **Proceeding from the 2007 Tri-State Dairy Nutrition Conference**, Fort Wayne, IN. The Ohio State University, Columbus, p. 97–103, 2007.

DOPPENBERG, J.; VAN DER A.A.R.P. The nutrition value of biodiesel by-products (Part2: Glycerine). **Feed Business Asia**, p.42-43, 2007.

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**. Oxford, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.

DROUILLARD, J.S. Utilization of biofuels byproducts as feedstocks for ruminantes. In: **8th International symposium on the nutrition of herbivores (ISNH8)**, Aberystwyth University, v. 8. p. 579, 2011.

FAPRI - Food and Agricultural Policy Research Institute. World Biofuels: **FAPRI-ISU 2011 Agricultural Outlook**. Ames, Iowa: FAPRI, 2011. Disponível em: <[http://www.fapri.iastate.edu/outlook/2011/tables/5\\_biofuels.pdf](http://www.fapri.iastate.edu/outlook/2011/tables/5_biofuels.pdf)> Acesso em: 19 de fevereiro de 2012.

FARIAS, M. S., PRADO, I. N., VALERO, M. V., ZAWADZKI, F., SILVA, R. R., EIRAS, C. E., RIVAROLI, D. C. & LIMA, B. S. Glycerin levels for crossbred heifers growing in pasture: Performance, feed intake, feed efficiency and digestibility. **Acta Scientiarum - Animal Sciences**, 33, 1177-1188, 2012a.

FARIAS, M. S., SILVA, R. R., ZAWADZKI, F., EIRAS, C. E., LIMA, B. S. & PRADO, I. N. Glycerin levels for crossbred heifers supplemented in pasture: intake behavior. **Acta Scientiarum - Animal Sciences**, n. 34, p. 63-69, 2012b.

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

FISCHER, G.; SCHRATTENHOLZER, L. Global bioenergy potentials through 2050. **Biomass & Bioenergy, Pergamon**, v. 20, n. 3, p.151-159, 2001.

FROGER, A.; ROLLAND, J.P.; BRON, P.; LAGREE, V.; LE CAHEREC, F.; DESCHAMPS, S.; HUBERT, J.F.; PELLERIN, I.; THOMAS, D.; DELAMARCHE, C. Functional characterization of a microbial aquaglyceporin. **Microbiology**, New York, v. 147, n. 5, p. 1129-1135, 2001.

FUNDAÇÃO-ABC. **Relatório técnico - Análises laboratoriais**. Fundação abc - Pesquisa e Desenvolvimento Agropecuário, Castro, Paraná, 2010.

GERACI, J.L., GARCIARENA, A.D., GAGLIOSTRO, G.A., BEAUCHEMIN, K.A., COLOMBATTO, D. Plant extracts containing cinnamaldehyde, eugenol and capsicum oleoresin added to feedlot cattle diets: Ruminal environment, short term intake pattern and animal performance. **Animal Feed Science Technology**. v. 176, p. 123-130, 2012.

GROESBECK, C.N.; MCKINNEY, L.J.; DEROUCHAY, J.M.; TOKACH, M. D.; GOODBAND, R. D.; DRITZ, S. S.; NELSEN, J. L. ; DUTTLINGER, A. W. ; FAHRENHOLZ, A. C.; K. C. BEHNKE. Effect of crude glycerol on pellet mill

production and nursery pig growth performance. **Journal of Animal Science**, v. 85, suppl.1, p. 201-202, 2008.

GUAN, H.; WITTENBERG, K.M.; OMINSKI, K.H.; KRAUSE, D.O. Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. **Journal of Animal Science**, Albany. v. 84, p.1896-1906, 2006.

GUZMÁN-BLANCO, M.; CASELLAS, J.M.; SADER, H.S. Bacterial resistance to antimicrobial agents in Latin America. **Infectious Disease Clinical North America**, v.14, p.67-81, 2000.

HIBUSE, T.; MAEDA, N.; FUNAHASHI, T.; YAMAMOTO, K.; NAGASAWA, A.; MIZUNOYA, W.; KISHIDA, K.; INOUE, K.; KURIYAMA, H.; NAKAMURA, T.; FUSHIKI, T.; KIHARA, S.; SHIMOMURA, L. Aquaporin 7 deficiency is associated with development of obesity through activation of adipose glycerol kinase. **Proceedings of the National Academy Science of the United States of America**, Washington, v. 102, n.2, p. 10993-10998, Aug. 2005.

HIPPEN, A., DEFRAIN, J.M.; LINKE, P.L. et al. Glycerol and Other Energy Sources for Metabolism and Production of Transition Dairy Cows. In: **FLORIDA RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM – Best Western Gateway Grand Gainesville**, Flórida, 2008.

HOLANDA, A. **Biodiesel e Inclusão Social**. Brasília: Câmara dos Deputados, Coordenação de Publicações, Série cadernos de altos estudos. p. 200, n. 1, 2004.

HRISTOV, A.N.; VANDER POL, M.; AGLE, M. et al. Effect of lauric acid and coconut oil on ruminal fermentation, digestion, ammonia losses from manure, and milk fatty acid composition in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.5561-5582, 2009.

IPHARRAGUERRE, I.R.; CLARK, J.H. Usefulness of ionophores for lactating dairy cows: A review. **Animal Feed Science and Technology**. v. 106, p.39-57, 2003.

JENSEN, M. D.; CHANDRAMOLULI, V.; SCHUMANN, W. C. et al. Sources of blood glycerol during fasting. **Animal Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolic**, v. 281, n. 5, p. 998-1004, 2001.

JOHNS, A.T. Fermentation of glycerol in the rumen of sheep. New Zealand, **Journal of Science and Technology**, v. 35, p. 262-269, 1953.

KIJORA, C., BERGNER, H., GÖTZ, K.P., BARTELT, J., SZAKACS, J., SOMMER, A. Investigation on the metabolism of glycerol in the rumen of bulls. **Arch Tieremahr**, v. 51, p. 341-348, 1998.

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

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

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

LAGE, J. F., BERCHIELLI, T. T., SAN VITO, E., SILVA, R. A., RIBEIRO, A. F., REIS, R. A., DALLANTONIA, E. E., SIMONETTI, L. R., DELEVATTI, L. M., MACHADO, M. Fatty acid profile, carcass and meat quality traits of young Nellore bulls fed crude glycerin replacing energy sources in the concentrate. **Meat Science**. v. 96, n.3, p 1158-1164, 2014b.

LAGE, J.F., PAULINO, P.V.R, PEREIRA, L.G.R., DUARTE, M.S., VALADARES FILHO, S.C., OLIVEIRA, A.S., SOUZA, N.K.P., LIMA, J.C.M. Carcass characteristics of feedlot lambs fed crude glycerin contaminated with high concentrations of crude fat. **Meat Science**. v.96, n.1, p.108-113, 2014a.

LAMMERS, P.J.; KERR, B.J.; WEBER, T.E. et al. Digestible and metabolizable energy of crude glycerol for growing pigs. **Journal of Animal Science**, v.86, p.602-608, 2008.

LANA, R.P.; RUSSELL, J.B. Use of potassium depletion to assess adaptation of ruminal bacteria to ionophores. **Applied and Environmental Microbiology**, Bultimore, v. 62, p. 4499-4503, 1996.

LANA. **Relatório técnico - Análises laboratoriais**. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, 2010.

LEE, S. Y., LEE, S. M., CHO, Y. B., KAM, D. K., LEE, S. C., KIM, C. H., & SEO, S. Glycerol as a feed supplement for ruminants: *In vitro* fermentation characteristics and methane production. **Animal Feed Science and Technology**, 166, 269-274, 2011.

LEHNINGER, ALBERT L.; **Princípios de bioquímica**. 4 ed: São Paulo. Sarvier, 2006.

LI, Y.; YANG, W.; BEAUCHEMIN, K.; DIAO, Q.; ZHANG, N. Effects of Crina and monensina on fermentation pattern and digestibility of high-concentrate diet in rumen simulation technique. In: **8th International symposium on the nutrition of herbivores (ISNH8)**, Aberystwyth University, v.8, p.319, 2011.

MACDOUGALD, O.A.; BURANT, C.F. Obesity and metabolic perturbations after loss of aquaporin 7, the adipose glycerol transporter. **Proceedings of the National Academy Science of the United States of America**, Washington, v.102, n.2, p. 10759-10760, Aug. 2005.

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

MANH, N.S., WANAPAT, M., URIYAPONGSON, S., KHEJORNART, P., CHANTHAKHOUN, V. Effect of eucalyptus (*camaldulensis*) leaf meal powder on rumen fermentation characteristics in cattle fed on rice straw. **African Journal of Agricultural Research**. v. 7, p. 1997-2003, 2012.

McGUFFEY, R.K.; RICHARDSON, L.F.; WILKINSON, J.I.D. Ionophores for dairy cattle: Current status and future outlook. **Journal of Dairy Science**, v. 84, E.194, 2001.

MESSETTI, M.A.; SANTOS, A.M.; ANGELIS, D.F. CHIERICE, G.O.; CLARO NETO, S. Estudo do derivado do óleo de ricinus communis L. (mamona) como agente biocida e redutor da viscosidade produzida por *Leuconostoc mesenteroides* em indústrias sucroalcooleiras. **Arquivos do Instituto Bológico**, v. 77, n. 2, p. 301-308, 2010.

MINNESOTA NUTRITION CONFERENCE, 57., 1996, Bloomington, MN. **Proceedings...** Bloomington: University of Minnesota, p. 81-96. 1996.

MORAIS, J.A.S., BERCHIELLI, T.T., REIS, A.R. Aditivos. In: Berchielli, T.T.; Pires A.V.; Oliveira, S.G. (Eds) **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, p.539-561, 2006.

MORAIS, J.A.S., BERCHIELLI, T.T., REIS, A.R. Aditivos. In: Berchielli, T.T.; PIRES A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Eds) **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, p.539-561, 2006.

MOREIRA, F.B., PRADO, I.N., CECATO, U., WADA, F.Y., NASCIMENTO, W.G., SOUZA, N.E. Suplementação com sal mineral proteinado para bovinos de corte, em crescimento e terminação, mantidos em pastagem de grama estrela roxa (*Cynodon plectostachyus* Pilger) no inverno. **Revista Brasileira de Zootecnia** 32, 449-455, 2003.

MOTTA, V. T. **Bioquímica Clínica: Princípios e Interpretação**, 5 ed, 419, 2009.

NELSON, D. L. & COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**, 4 ed. Freeman and Company, New York: W.H. 1119, 2004.



- PARSONS, G.L., SHELOR, M.K., DROUILLARD, J.S., Performance and carcass traits of finishing heifers fed crude glycerin. **Journal Animal Science**. 87, 653-657, 2009.
- PATRA, A.K., KAMRA, D.N., AGARWAL, N. Effects of extracts of spices on rumen methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feeds in vitro. **Journal Science Food Agricultural**. v.90, p. 511-520, 2010.
- PELLEGRIN, A.C.R.S.; PIRES, C.C.; CARVALHO, S.; PACHECO, P.S.; PELEGRINI, L.F.V.; GRIEBLER, L. VENTURINI, R.S. Glicerina bruta no suplemento para cordeiros lactentes em pastejo de azevém. **Ciência Rural**, v.42, n.8, 1477-1482, 2012.
- PEREIRA, L.G.R.; LAGE, J.F.; PAULINO, P.V.R.; VALADARES FILHO, S.C.; OLIVEIRA, A.S.; DETMANN, E. Consumo e desempenho de cordeiros alimentados com glicerina bruta. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 47, 2010, Salvador, BA. **Anais...**, Salvador, BA: SBZ, 2010. CD-ROM.
- PLÁ, J. A. **Perspectivas do biodiesel no Brasil**. Indicadores Econômicos FEE, Porto Alegre, v.30, n.2, p.179-190, set. 2002
- PLATEL, K. & SRINIVASAN, K. Influence of dietary spices or their active principles on digestive enzymes of small intestinal mucosa in rats. **International Journal Food Sciences and Nutrition**, v.47, p.55-59, 1996.
- RAHIB, L.; SRIRAM, G.; HARADA, M. K.; LIAO, J.C.; DIPLE, K.M. Transcriptomic and network component analysis of glycerol kinase in skeletal muscle using a mouse model of glycerol kinase deficiency. **Molecular Genetics and Metabolism**, Amsterdam, v.3, n.1, p.106-112, Feb.2009.
- RAMOS, L.P. et al. Biodiesel: Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. **Revista biotecnologia & desenvolvimento**, São Paulo, v.31, jul./dez., 2003.
- RAY, K.A.; WARNICK, L.D.; MITCHELL, R.M. et al. Prevalence of antimicrobial resistance among *Salmonella* on Midwest and northeast USA dairy farms. **Preventive Veterinary Medicine**, n.79, p.204-223, 2007.
- RÉMOND, B., SOUDAY, E., JOUANY, J.P. In vitro and in vivo fermentation of glycerol by rumen microbes. **Animal Feed Science Technology**, v. 41, p. 121–132, 1993.
- RUSSEL, J.B.; STROBEL, H.J. effect of ionophores on ruminal fermentation. Applied and Environmental microbiology. **Journal of Animal Science**. v . 55, n.1, p.1-6, 1989.

RUSSELL, J.B.; HOULIHAN, A.J. Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.27, p.65-74, 2003.

SARTI, L.M.N. **Efeito da suplementação com anticorpos policlonais e/ou monensina sódica sobre a saúde ruminal de bovinos jovens confinados**. 2010, 103p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

SIMON, A.; BERGNER, H.; SCHWABE, M. Glycerol as a feed ingredient for broiler chickens. **Archives of Animal Nutrition**, v.49, n.2, p.103-112, 1996.

SINDIRAÇÕES. **Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal: Guia de aditivos**. p. 66, 2009.

SKRZYDLEWSKA, E. Toxicological and metabolic consequences of methanol poisoning. **Toxicology Mechanisms Methods**, v.13, p.277-293, 2003.

TAGER, L.R., KRAUSE, K.M. Effects of essential oils on rumen fermentation, milk production, and feeding behavior in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 94, p. 2455-2464, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Metabólitos secundários e defesa vegetal. In: **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. Cap. 13, p.309-334.

TECPAR. 2010. **Relatório de ensaio - produto glicerina**. Instituto de Tecnologia do Paraná, Curitiba, Pr.

TEKIPPE, J.A., HRISTOV, A.N., HEYLER, K.S., CASSIDY, T.W., ZHELJAZKOV, V.D., FERREIRA, J.F.S., KARNATI, S.K., VARGA, G.A. 2011. Rumen fermentation and protozoal effects of *Origanum vulgare* L. leaves in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 94:5065-5079.

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

VALADARES FILHO, S.C.; PINA, D.S. Fermentação ruminal. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Ed.). **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006. p.151-179.

VELLUTI, A.; SANCHES, V.; RAMOS, A.J. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Furarium proliferatum* in maize grain. **Food Microbiology**, v.89, p.145-154, 2003.

VENEMAN, J.; NEWBOLD, J. R.; PERDOK, H.; GERRITS, W.; DIJKSTRA, J.; VAN ZIJDERVELD, S. The effect of incremental levels of Sandalwood oil on methane emissions and animal performance in sheep. In: 8th **International symposium on the nutrition of herbivores (ISNH8)**. Aberystwyth : Aberystwyth University, v. 8. p. 513, 2011.

VISSER, E.M.; FILHHO OLIVEIRA, D.; MARTINS, M.A.; STEWARD, B. Bioethanol production potential from Brazilian biodiesel co-products. **Biomass and Bioenergy**, v.35, p.489-494, 2011.

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

WANG, C., LIU, Q., YANG, W. Z., HUO, W. J., DONG, K. H., HUANG, Y. X., YANG, X. M. & HE, D. C. Effects of glycerol on lactation performance, energy balance and metabolites in early lactation Holstein dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, 151, 12-20, 2009b.

WILBERT, C.A., PRATES, E.R., BARCELLOS, J.O.J, SCHAFHAUSER, J. Crude glycerin as an alternative energy feedstuff for dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**. v183, n.3-4, p. 116-123, 2013.

YANG, W.Z., BENCHAAR, C., AMETAJ, B.N., BEAUCHEMIN, K.A. Dose response to eugenol supplementation in growing beef cattle: Ruminal fermentation and intestinal digestion. **Animal Feed Science and Technology**. v. 158, p. 57-64, 2010.

ZAWADZKI, F. **Glicerina, antioxidantes e carotenóides sobre a qualidade e traçabilidade da carne de bovinos e ovinos**. Tese (Doutorado em Zootecnia). 2013. 202 f. Universidade Estadual de Maringá Centro de Ciências Agrárias, Maringá, 2013.

## CAPÍTULO 2 – GLICERINA ASSOCIADA A ADITIVOS NA ALIMENTAÇÃO DE BOVINOS DE CORTE

**RESUMO** – A intenção deste estudo foi demonstrar o potencial da glicerina bruta (830 g de glicerol por kg MS), coproduto da produção do biodiesel, como alternativa energética em dietas para bovinos de corte, associada a aditivos alimentares, modificadores da fermentação ruminal. Os aditivos estudados foram os óleos essenciais (Essential - Oligobasics®) oriundos da mamona (*Ricinus communis L*) e da castanha de caju (*Anacardium occidentale*) e a monensina sódica (Rumenpac - MCassab®), adicionados nas dietas, respectivamente na quantidade de 0,50 e 0,03 g/kg de matéria seca. A inclusão de glicerina bruta na dieta total em substituição ao grão de milho e a casca de soja foi de 200 g/kg de matéria seca. Cinco bovinos machos da raça Nelore, castrados, e providos de cânulas permanentes no rúmen foram utilizados, e distribuídos em delineamento quadrado latino (5 x 5) em esquema fatorial 2 x 2 + 1 (Monensina Sódica ou Óleos Essenciais x ausência ou presença de glicerina bruta + controle). As dietas experimentais continham teores semelhantes de proteína e energia. Os tratamentos foram os seguintes: CONT - Controle (sem adição de glicerina bruta ou aditivos); OE - Óleos Essenciais (adição do aditivo Essential®, sem glicerina bruta); MON – Monensina Sódica (adição do aditivo Rumenpac®, sem glicerina bruta); OEG - Óleos Essenciais com glicerina bruta; MONG – Monensina Sódica com glicerina bruta. Avaliou-se o consumo e digestibilidade *in vitro* da MS e nutrientes das dietas, os parâmetros ruminiais (pH e nitrogênio amoniacal), a produção e qualidade da massa microbiana e a produção de gases metano e carbônico das dietas. A inclusão de glicerina bruta aos tratamentos (OEG e MONG) ocasionou redução no consumo de MS, MO, FDN, EE e AMIDO, e aumento na DIVMS e diminuição na DIVPB, independentemente do aditivo (P<0,05). Todos os tratamentos foram eficientes na manutenção do ambiente ruminal, com valores de pH acima de 6,2 e concentração de N-NH<sub>3</sub> acima de 10 mg/dL. Não foi encontrado nenhuma diferença (P>0,05) na produção e qualidade da massa microbiana. A associação glicerina e aditivos foi eficiente na redução da produção de gases metano *in vitro*. A glicerina bruta adicionada em 200 g/kg MS é um ingrediente energético substituto ao milho grão e a casca de soja, e, quando associada a aditivos (monensina sódica ou óleos essenciais) mostrou-se uma alternativa alimentar a ser utilizada em confinamento de bovinos Nelore, sem efeitos prejudiciais na fermentação ruminal.

**Palavras-chave:** monensina sódica, óleos essenciais, Nelore, parâmetros ruminiais

## CAPÍTULO 2 – GLYCERIN ASSOCIATED TO ADDITIVES IN THE FEEDING OF BEEF CATTLE

**ABSTRACT** – The intent of this study was to demonstrate the potential of glycerin (glycerol 830 g per kg), coproduct of biodiesel as energetic alternative in diets for beef cattle, associated with food additives, modifiers of ruminal fermentation. The additives were essential oils (Essential - Oligobasics<sup>®</sup>) derived from the castor bean (*Ricinus communis* L.) and cashew (*Anacardium occidentale*) and sodium monensin (Rumenpac - MCassab<sup>®</sup>), added on diets, respectively, in the amount of 0.50 and 0.03 g / kg of dry matter. The inclusion of crude glycerin in the total diet replacing corn grain and soybean hulls was 200 g / kg of dry matter. Five Nellore steers, provided with permanent rumen cannulas were used and distributed in Latin square design (5 x 5) in factorial 2 x 2 + 1 (Monensin Sodium or Essential Oils vs absence or presence of crude glycerin + control). The experimental diets contained similar levels of protein and metabolizable energy. The treatments were: CONT - Control (without crude glycerine or additives), EO - Essential Oils (Addition of Essential<sup>®</sup> without crude glycerin); MON - Monensin Sodium (Addition of Rumenpac<sup>®</sup> without crude glycerin); OEG - Essential oils with crude glycerin; MONG - Monensin Sodium with crude glycerin. It was evaluated the intake and digestibility in vitro DM and nutrients of the diets, ruminal parameters (pH and ammonia nitrogen), the production and quality of the microbial mass, and production of methane and carbon of the diets. The inclusion of crude glycerin treatments (OEG and MONG) resulted in reduced intake of DM, OM, NDF, EE and STARCH, and increased DIVMS and decreased DIVPB, independently of the additive (P <0.05). All treatments were effective in maintaining of the rumen mat, with pH values up 6.2 and nitrogen ammonia concentration above 10 mg / dL. Not found difference (P > 0.05) on production and quality of microbial mass. Glycerin and additives association was effective in reducing methane production in vitro. The crude glycerin added to 200 g / kg DM is an ingredient substitute for corn grain and soybean hulls, and when combined with additives (sodium monensin or essential oils) proved to be a viable alternative for use in feedlot of Nellore steers without detrimental effects on ruminal fermentation.

**Keywords:** essential oils, Nellore, ruminal parameters, sodium monensin

## INTRODUÇÃO

A glicerina é o principal coproduto da conversão de óleos vegetais e gorduras em biodiesel. Após a reação de transesterificação, aproximadamente 10% do volume da matéria-prima adicionada, inicialmente, ao processo produtivo são convertidos em glicerina (LUQUE et al., 2008, DASARI et al., 2005, THOMPSON & HE, 2006).

A produção brasileira de biodiesel teve grande crescimento nos últimos anos devido à demanda do mercado por energia renovável (AJANOVIC, 2011; VISSER et al., 2011). Contudo, o não acompanhamento das indústrias consumidoras de glicerina (farmacêutica e alimentícia) causou aumento repentino desta nos estoques das indústrias, tornando-a um resíduo sem destino definido. No Brasil, aproximadamente 300 milhões de litros de glicerina são colocados no mercado anualmente (ANP, 2013).

A glicerina bruta apresenta características energéticas semelhantes ao grão de milho, e seu potencial energético já está comprovado tanto para animais monogástricos (GROESBECK et al., 2008, LAMMERS et al., 2008, CERRATE et al., 2006, KIJORA et al., 1995, SIMON et al., 1996) quanto para animais ruminantes (LAGE et al., 2014 a, VAN CLEEF et al., 2014, CARVALHO et al., 2014, WILBERT et al., 2013, BARTOŇ et al., 2013), não havendo prejuízo a saúde dos animais e/ou à produção, além de ser um ingrediente de baixo custo, atualmente.

Em paralelo, para maximizar a eficiência alimentar devido ao melhor aproveitamento dos nutrientes da dieta, são incluídos em pequenas quantidades os aditivos alimentares, sendo eles não nutritivos, com a finalidade de melhorar a saúde ruminal e conseqüentemente a produtividade animal.

O aditivo monensina sódica é um antibiótico ionóforo utilizado com o objetivo de aumentar o desempenho dos animais pela melhoria da eficiência energética, principalmente, em função do aumento da produção de ácido propiônico, da redução da relação acetato/propionato e da produção de metano, além da diminuição da produção de ácido láctico e redução nas perdas de aminoácidos que seriam potencialmente fermentados no rúmen (McGUFFEY et al., 2001).

Porém, o uso rotineiro de antibióticos na alimentação animal tem preocupado a saúde pública (BENCHAAR et al., 2006). As restrições impostas à utilização

destes aditivos têm como base preocupações ao desenvolvimento de microrganismos resistentes pelo uso inadequado de antibióticos ionóforos, comprometendo a ação terapêutica dos antibióticos em humanos (GUZMÁN-BLANCO et al., 2000; RUSSELL & HOULIHAN, 2003; DEWULF et al., 2007; RAY et al., 2007). Sendo assim, para atender as limitações impostas por alguns mercados consumidores, e antes que apareçam provas científicas contra os antibióticos ionóforos, o foco dos nutricionistas de animais está sendo a busca por novas alternativas aos aditivos ionóforos, como é o caso dos extratos vegetais.

Os extratos vegetais, comumente conhecidos como óleos essenciais de plantas, são uma mistura de terpenóides, líquidos e lipofílicos, obtidos a partir de diferentes partes das plantas (CALSAMIGLIA et al., 2007). Atividades antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antiparasitária, inseticida, antiprotzoários e antioxidantes já foram observados em muitos óleos essenciais (COWAN, 1999; BURT, 2004, SHIN et al., 2004, NARASIMHAN et al., 2007).

Os óleos extraídos de determinadas plantas podem interagir com a membrana celular microbiana e inibir o desenvolvimento de algumas bactérias ruminais gram-positivas e gram-negativas. A adição de alguns destes extratos de plantas no rúmen tem provocado uma diminuição da relação acetato/propionato, com a conseqüente redução da produção de metano no rúmen (CHAGAS, 2011).

Neste sentido, este trabalho foi conduzido para avaliar a associação da glicerina bruta (200 g/kg MS da dieta total) ao aditivo óleos essenciais (Essential - Oligobasics<sup>®</sup>) ou a monensina sódica (Rumenpac – Grupo MCassab<sup>®</sup>) na dieta de bovinos de corte sobre o consumo e digestibilidade da MS e de nutrientes das dietas, parâmetros ruminais (pH e nitrogênio amoniacal), produção e qualidade da massa microbiana, e produção de gases metano e carbônico.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Animais e local do experimento**

O experimento foi conduzido na Unidade Animal de Estudos Digestivos e Metabólicos e no Laboratório de Ingredientes e Gases Poluentes, ambos pertencentes do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Jaboticabal.

Para as avaliações dos parâmetros ruminais, e colheita de amostras para análises laboratoriais foram utilizados cinco bovinos da raça Nelore, com 36 meses de idade, peso aproximado de 500 kg e providos de cânulas permanentes no rúmen. Os animais foram alojados em baias individuais de 16 m<sup>2</sup>, com piso concretado e parcialmente cobertas, providas de bebedouros e cochos individuais.

### **Delineamento e dietas experimentais**

O delineamento experimental utilizado foi o quadrado latino 5 × 5, em esquema fatorial 2 × 2 + 1 (Monensina Sódica ou Óleos Essenciais × ausência ou presença de glicerina bruta + controle). Os períodos experimentais tiveram duração de 25 dias sendo 15 dias para adaptação dos animais às dietas e 10 dias para colheita de dados.

As dietas foram formuladas utilizando o sistema Cornell Net Carbohydrate and Protein System 5.0.40, nível 2 (CNCPS, 2000), com auxílio do software LRNS versão 1.0.29, respeitando as exigências nutricionais dos animais segundo NRC (1996), cujos níveis estão apresentados na Tabela 1.

Cinco dietas semelhantes nos teores de proteína e energia metabolizável foram formuladas na proporção volumoso:concentrado de 30:70, sendo a silagem da planta de milho o volumoso, e o concentrado composto por milho grão moído, casca de soja, farelo de girassol, calcário calcítico e suplemento mineral.

As dietas experimentais foram denominadas de: CONT- Tratamento controle (sem adição de glicerina bruta ou aditivos); OE- Tratamento óleos



essenciais (inclusão do aditivo Essential<sup>®</sup>, sem adição de glicerina bruta); MON- Tratamento monensina sódica (inclusão do aditivo Rumenpac<sup>®</sup>, sem adição de glicerina bruta); OEG- Tratamento óleos essenciais com adição de glicerina bruta; MONG- Tratamento monensina sódica com adição de glicerina bruta.

**Tabela 1.** Porcentagem dos ingredientes e composição bromatológica das dietas experimentais.

Item	Tratamentos				
	CONT	OE	OEG	MON	MONG
<b>Ingredientes (g/kg MS)</b>					
Silagem da planta de milho	300,0	300,0	300,0	300,0	300,0
Glicerina bruta	-	-	200,0	-	200,0
Milho grão moído seco	348,0	348,0	174,0	348,0	174,0
Casca de soja	260,0	260,0	225,5	260,0	225,5
Farelo de girassol	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0
Calcário calcítico	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Suplemento mineral*	4,0	4,0	6,0	4,0	6,0
Sal comum	2,0	2,0	1,5	2,0	1,5
Ureia	3,0	3,0	10,0	3,0	10,0
<b>Nutrientes</b>					
MS (g/kg)	549,2	542,2	511,2	546,7	522,5
EM (Mcal/kg MS)**	2,60	2,60	2,58	2,60	2,58
ELg (Mcal/kg MS)**	1,08	1,08	1,06	1,08	1,06
PB (g/kg MS)	147,8	147,8	143,4	144,3	148,4
PDR (%)**	73,0	73,0	77,0	73,0	77,0
FDNcp (g/kg MS) <sup>1</sup>	433,7	430,1	385,2	426,6	394,4
FDNfe (g/kg MS) <sup>2,**</sup>	240,0	240,6	220,0	238,7	220,6
FDA (g/kg MS)	263,7	263,7	240,1	263,7	240,1
EE (g/kg MS)	27,8	29,7	27,1	26,8	28,4
CNFcp (g/kg MS)	345,4	342,0	374,8	354,0	379,2
AMIDO (g/kg MS)	30,0	28,5	19,1	29,9	20,3
Ca (g/kg MS)	3,9	4,0	3,8	3,9	3,9
P (g/kg MS)	2,7	2,6	2,3	2,7	2,3

\* Suplemento mineral para bovinos - níveis de garantia por 1000g do produto: Fósforo 40g, Cálcio 80g, Sódio 195g, Cloro 300g, Magnésio 5g, Enxofre 26g, Zinco 2000mg, Cobre 1000mg, Manganês 500mg, Cobalto 100mg, Iodo 100mg, Selênio 5mg, Flúor (máx.) 400mg, veículo q.s.p. 1000g, mais os aditivos Essential<sup>®</sup> ou Rumenpac<sup>®</sup> na dosagem recomendada, com excessão do tratamento controle;

\*\* Estimado segundo equações do CNCPS (2000);

<sup>1</sup>FDNcp= Fibra em detergente neutro utilizando alfa-amilase estável e corrigida para cinzas e proteína; <sup>2</sup>FDNfe= FDN fisicamente efetivo;

A inclusão de glicerina bruta foi de 200 g/kg MS da dieta total. Com a inclusão foram substituídos 50% do milho grão moído e 13,27% da casca de soja nos tratamentos OEG e MONG (Tabela 2). A glicerina bruta continha, aproximadamente, 830,0 g/kg de glicerol, 109,9 g/kg de água, 60 g/kg de sais e 0,1 g/kg de metanol.

O produto comercial Essential<sup>®</sup> utilizado para fornecer óleos essenciais era composto por princípios ativos oriundos do óleo da mamona e da castanha de caju, e continha, aproximadamente, 9% de óleo de rícino (ácido ricinoléico) e 36% de óleo de caju (ácido anacárdico, cardol e cardanol).

Os animais foram alimentados duas vezes ao dia, as 08h e 16h, e receberam água a vontade. Os óleos essenciais ou a monensina sódica foram homogeneizados com o suplemento mineral e misturados juntamente com os demais ingredientes no momento da fabricação da ração, respeitando as seguintes dosagens:

**OE** = 0,5 g/kg MS de Óleos Essenciais (Essential<sup>®</sup> - Oligobasics)

**OEG** = 0,5 g/kg MS de Óleos Essenciais (Essential<sup>®</sup> - Oligobasics)

**MON** = 0,03 g/kg MS de Monensina Sódica (Rumenpac<sup>®</sup> - GrupoMCassab)

**MONG** = 0,03 g/kg MS de Monensina Sódica (Rumenpac<sup>®</sup> - GrupoMCassab)

### **Avaliação do consumo e análises bromatológicas**

Após o período de adaptação, o consumo voluntário foi determinado pela pesagem diária da ração fornecida e das sobras. As amostras de sobras e alimentos foram colhidas durante seis dias, sendo do 16<sup>o</sup> ao 21<sup>o</sup> dia, totalizando seis amostras/animal/período. Os ingredientes foram amostrados no início de cada período.

Posteriormente as amostras foram secas em estufa de circulação forçada de ar em temperatura de 55 °C por 72 horas. Após a secagem, as amostras foram moídas em moinho tipo Wiley, com peneira de crivo de 1mm e posteriormente misturadas para formar amostras compostas de sobras e fornecidos.

As amostras foram analisadas quanto aos teores de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), segundo AOAC

(1995), amido conforme HENDRIX (1993), fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDN<sub>cp</sub>) e fibra em detergente ácido (FDA) utilizando as soluções propostas por Van Soest & Wine (1967) e a digestão realizada em autoclave (0,5 Kgf/cm<sup>2</sup>, 111 ° C por 50 minutos) de acordo com o procedimento adaptado de Pell & Schofield (1992).

Os carboidratos não fibrosos corrigido pra cinzas e proteína (CNF<sub>cp</sub>) foram calculados pela seguinte equação (adaptado de SNIFFEN et al., 1992):

$$CNF_{cp} = 100 - (\%FDN_{cp} + \%PB + \%EE + \%MM)$$

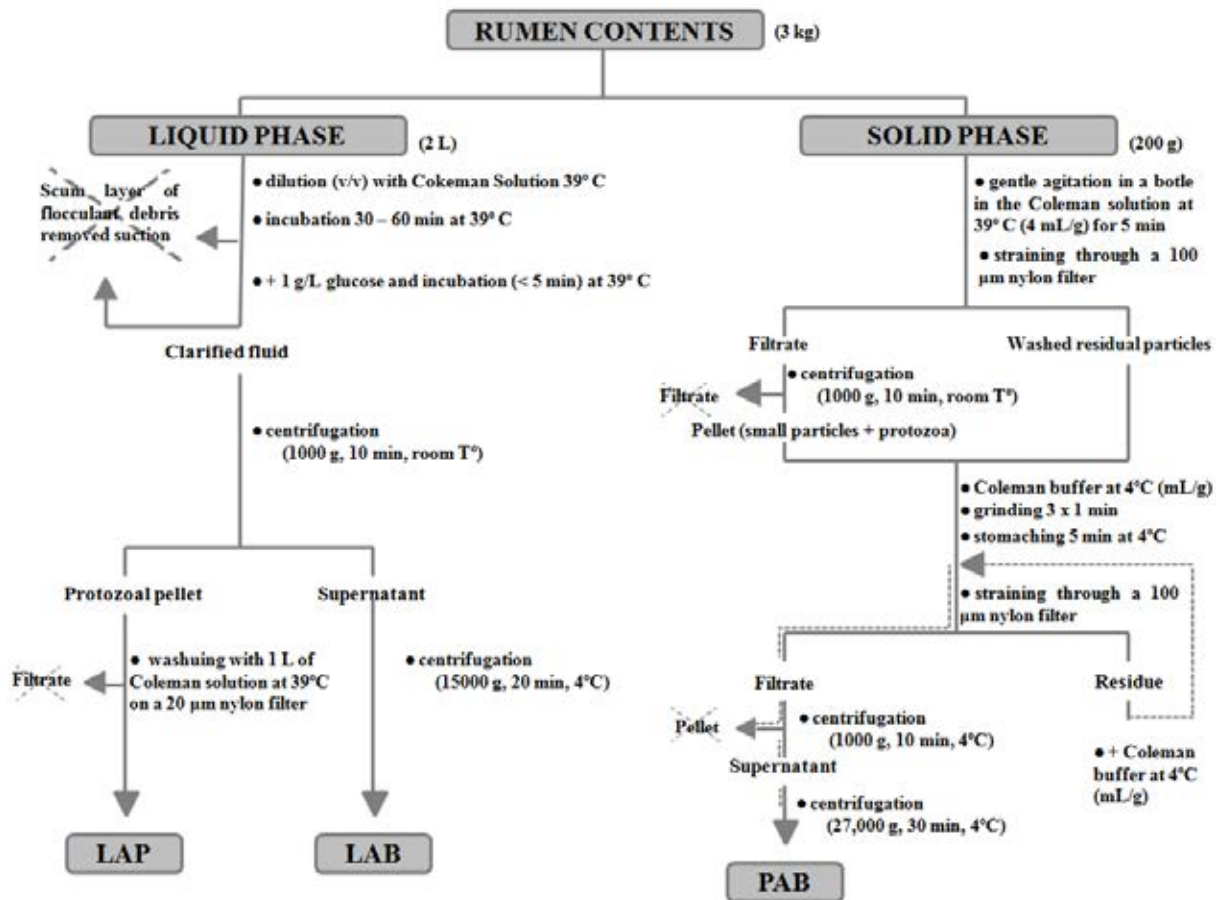
### **Medidas de pH e concentrações ruminais de N-NH<sub>3</sub>**

Para determinar o pH e a concentração de amônia ruminal, foram colhidas amostras do conteúdo ruminal (cerca de 100 mL), via cânula ruminal, filtrados em filtro de náilon com porosidade de 100 µm, no momento da alimentação, 1, 2, 4, 6 e 8 horas após alimentação, no 18<sup>o</sup> dia de cada período experimental.

O pH foi medido imediatamente após a filtragem do líquido com auxílio de peagômetro digital (Digimed DM-20). Em seguida, foi determinada a concentração de nitrogênio amoniacal segundo a técnica de VIEIRA (1980). O processo foi dividido em duas etapas: a destilação da amostra em aparelho tipo micro-Kjeldhal e a titulação ácida; - Para a realização da destilação foi utilizada uma alíquota de 2 mL de líquido ruminal por amostra. Posteriormente, a amostra foi colocada em tubos de proteína e acoplada ao aparelho para a realização da destilação, em seguida, foram adicionados 5 mL de Hidróxido de Potássio à amostra na concentração de 2 mol/L. O destilado foi recebido em recipiente contendo 10 mL de ácido bórico 2%, utilizado com indicador, até completar o volume de 50 mL; - A titulação foi realizada com HCl na concentração de 0,005 mol/L e calculada a concentração de amônia ruminal.

## **Produção e qualidade da massa microbiana**

Para determinar a massa microbiana foi colhido manualmente pela cânula ruminal, na parte dorsal do rúmen, aproximadamente 3 kg de conteúdo ruminal, no momento da alimentação, 2, 5 e 8 horas após a alimentação. A colheita foi dividida em dois dias, no 19º e 20º dia de cada período experimental, sendo no primeiro as colheitas realizadas nos tempos 0 e 5 horas e no segundo dia nos tempos 2 e 8 horas após a alimentação. Esse procedimento foi realizado para evitar a retirada de grande quantidade de conteúdo ruminal em apenas um dia, o que poderia prejudicar o crescimento microbiano. Para separar a fase líquida da fase sólida o conteúdo ruminal foi filtrado em filtro de náilon com porosidade de 100 µm para separação e quantificação de bactérias e protozoários associados ao líquido e bactérias sólido-aderidas (Figura 1). As amostras foram congeladas (-20 °C) para posterior avaliação da quantidade e qualidade da massa microbiana através da determinação dos teores de MS e MM, estimando-se os teores de MO, nas diferentes fases, das bactérias sólido-aderidas (BSA), bactérias líquido-associadas (BLA) e protozoários líquido-associados (PLA), de acordo com a técnica de Martin et al., (1994).



**Figura 1.** Esquema de separação das frações microbianas, Bactérias-sólido-aderidas (PAB), Protozoários-líquido-associados (LAP) e Bactérias-líquido-associadas (LAB). Adaptado de Martin et al., (1994).

### Produção de gases CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> das dietas

A produção de metano e dióxido de carbono foi estimada pela técnica *in vitro* adaptada de Gastaldi (2003). Foram colhidos aproximadamente 500 mL do conteúdo ruminal de cada animal, no 21º dia de cada período experimental. Cerca de 150 mL de líquido ruminal filtrado de cada animal foi colocado em “erlenmeyer”, contendo 2,1 g de amostra pré-seca da dieta total, moída a 1 mm, mantendo a relação de 1,25 g de MS para 100 mL de líquido ruminal. Os “erlenmeyer” contendo as amostras e o líquido ruminal foram mantidos por 12 horas em incubadora “Shaker” de bancada com agitação constante à 39°C, em sala escura, e os gases produzidos armazenados em recipiente plástico (garrafa “pet”). Foi colhido uma alíquota

diretamente do “erlenmeyer” com o auxílio de uma seringa com capacidade de 1 mL, sendo imediatamente injetada em cromatógrafo gasoso (Trace GC Ultra da Thermo Scientific). Foi gerado em relatório as porcentagens de gases CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> de cada amostra. A quantidade total de gás produzido foi mensurada pela determinação do volume ocupado pelo gás produzido nas garrafas após 12 horas de fermentação.

A taxa de desaparecimento da MS (DMS) e fibra em detergente neutro (DFDN) das dietas foi realizada segundo técnica de degradação ruminal *in situ* (Ørskov e McDonald, 1979), utilizando sacos de náilon 100% poliamida, com poros de 50 µm, contendo 5 g MS de amostra, incubados por um período de 12 horas em bovinos Nelore canulados ruminalmente. O teor de MS das amostras e resíduos incubadas foi obtido segundo AOAC (1995), e o teor FDN utilizando as soluções propostas por Van Soest & Wine (1967) e a digestão realizada em autoclave (0,5 Kgf/cm<sup>2</sup>, 111 ° C por 50 minutos) de acordo com o procedimento adaptado de Pell & Schofield (1992).

### **Digestibilidade *in vitro* das dietas**

A incubação das amostras das dietas para a determinação da digestibilidade *in vitro* foi feita pela técnica de ANKOM<sup>®</sup>, no 22<sup>o</sup> ao 24<sup>o</sup> dia de cada período experimental. As amostras das dietas foram moídas previamente a 1,0 mm, colocados aproximadamente 0,5 g MS de cada dieta em sacos F57 ANKOM<sup>®</sup> e acondicionado em jarros, no aparelho DAISY<sup>II</sup> Incubator. Em cada jarro foi adicionado 1.332 mL de solução tampão A (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 10,0; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O - 0,5; NaCl - 0,5; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O - 0,1; Ureia - 0,5 em g/L) e solução tampão B (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> - 15,0; Na<sub>2</sub>S.9H<sub>2</sub>O - 1,0 em g/L), de maneira a obter pH final de 6,8 a 39°C, sempre purgando CO<sub>2</sub> dentro dos jarros no momento da incubação para manter o meio anaeróbio. Após 30 minutos foram adicionados 400 mL do líquido ruminal filtrado. O jarro permaneceu na incubadora por 48 horas, aquecido a 39°C e em agitação constante. Completando-se o tempo de incubação adicionou a cada jarro 8 g de pepsina (1:10.000) e 40 mL de HCl 6N e os jarros mantidos aquecidos a 39°C por mais 24 horas, conforme descrito por Holden (1999), afim de simular a digestibilidade total (ruminal + intestinal). Após isso, os jarros foram drenados e os

sacos secos em estufa a 55°C por 72 horas. Os conteúdos foram analisados quanto aos teores de MS, MO, FDN, FDA, PB, EE e CNF, e as digestibilidades calculadas de acordo com as equações abaixo:

$$\%DIVMS = ((100 - (P3 - (P1 * C))) / P2) * 100$$

$$\%DIVnutriente (base MS) = ((100 - (N3 - (P1 * C1))) / N2) * 100$$

Onde: P1 = tara do saco F57;

P2 = peso da amostra;

P3 = peso final do saco F57 + resíduo depois da incubação;

C = correção do saco F57 branco (peso final seco em estufa / peso inicial);

N2 = peso equivalente ao nutriente;

N3 = peso final do saco F57 + resíduo do nutriente depois da incubação;

### Análises estatísticas

Os dados foram analisados por intermédio do comando PROC MIXED do programa estatístico SAS, conforme o modelo matamático:

$$Y = \mu + A_i + P_j + D_k + e_{ijkl},$$

em que  $\mu$  = média geral,  $A_i$  = efeito aleatório do animal ( $i = 1$  a 5),  $P_j$  = efeito aleatório do período ( $j = 1$  a 5),  $D_k$  = efeito fixo da dieta ( $k = 1$  a 5) e  $e_{ijkl}$  = erro residual.

Para os dados de pH, N-NH<sub>3</sub> e população microbiana (BSA, BLA e PLA) foi utilizado medidas repetidas no tempo. Antes, porém, foi selecionada uma matriz de estrutura de covariâncias que melhor representasse os parâmetros avaliados (Tabela 2). As diferenças estatísticas dos parâmetros no tempo foram determinadas utilizando-se o seguinte modelo matemático:

$$Y = \mu + A_i + P_j + D_k + e_{ijk} + T_l + (D \times T)_{kl} + E_{ijkl},$$

em que  $\mu$  = média geral,  $A_i$  = efeito aleatório do animal ( $i = 1$  a 5),  $P_j$  = efeito aleatório do período ( $j = 1$  a 5),  $D_k$  = efeito fixo da dieta ( $k = 1$  a 5),  $e_{ijk}$  = erro residual da parcela,  $T_l$  = efeito fixo do tempo de colheita,  $(D \times T)_{kl}$  = interação entre dieta e tempo de colheita e  $E_{ijkl}$  = erro residual da subparcela.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste Tukey e verificadas as interações entre tempo vs tratamento a 5% de probabilidade, desdobrando as interações quando necessário ( $P < 0,05$ ). Quando não encontrado interação tempo vs tratamento, contrastes ortogonais foram utilizados para definir os efeitos de tratamentos. Os contrastes incluem o efeito dos aditivos (Monensina sódica vs Óleos Essenciais), os efeitos da associação dos aditivos a glicerina bruta (Aditivo + Glicerina bruta vs Aditivo) e os efeitos da inclusão dos aditivos (controle vs aditivos).

Todos os procedimentos estatísticos foram conduzidos por meio do programa SAS versão 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, EUA), a 5% de probabilidade.

**Tabela 2.** Estruturas de covariância utilizadas em cada parâmetro avaliado.

Variável	Estrutura de covariância
pH ruminal	TOEPH
N-NH <sub>3</sub> ruminal	TOEPH
BSA <sup>1</sup> , gMS/kg CR	SIMPLE
BLA <sup>2</sup> , gMS/L LR	TOEPH
PLA <sup>3</sup> , gMS/L LR	TOEPH
BSA, gMO/kg CR	FA(1)
BLA, gMO/L LR	CSH
PLA, gMO/L LR	FA(1)

<sup>1</sup>Bactérias sólido-aderidas; <sup>2</sup>Bactérias líquido-associadas; <sup>3</sup>Protozoários líquido-associados.



## RESULTADOS

### Consumo de MS e nutrientes

Houve diferença ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos estudados em relação ao consumo de MS e nutrientes avaliados (Tabela 3). A adição de aditivos proporcionou redução no consumo de FDN ( $P = 0,0486$ ) e AMIDO ( $P < 0,0001$ ) e aumento no consumo de FDA ( $P = 0,0099$ ) e PB ( $P = 0,0093$ ). A inclusão de glicerina bruta aos tratamentos (OEG e MONG) ocasionou redução no consumo de MS, MO, FDN, EE e AMIDO, independentemente do aditivo ( $P < 0,05$ ). Porém, para as variáveis consumo de FDA e CNF houve aumento para o tratamento Óleos essenciais, e diminuição para o tratamento Monensina Sódica, com a inclusão de glicerina bruta ( $P < 0,05$ ). O grupo Monensina Sódica (MON e MONG) diferiu ( $P < 0,05$ ) do grupo Óleos essenciais (OE e OEG) em todas variáveis de consumo analisadas, exceto para o consumo de PB.

### Digestibilidade in vitro da MS e nutrientes das dietas

Houve diferença ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos estudados em relação à digestibilidade da MS e nutrientes avaliados, exceto para a DIVFDN e DIVFDA (Tabela 4). A adição de aditivos proporcionou aumento na DIVMS ( $P = 0,0099$ ) e DIVEE ( $P = 0,0119$ ) e redução na DIVCNF ( $P = 0,0042$ ). A inclusão de glicerina bruta aos tratamentos (OEG e MONG) ocasionou aumento na DIVMS e diminuição na DIVPB para ambos aditivos avaliados ( $P < 0,05$ ). Porém, para a variável DIVMO a introdução de glicerina bruta proporcionou aumento apenas para o tratamento Óleos essenciais, e para a variável DIVCNF apenas para o tratamento Monensina Sódica ( $P < 0,05$ ). Ocorreu diferença entre os grupos de aditivos (OE e OEG vs MON e MONG) apenas para a variável DIVCNF ( $P < 0,0001$ ).

**Tabela 3.** Médias, erro padrão das médias e contrastes ortogonais para os valores médios do consumo de MS e nutrientes das dietas de bovinos Nelore alimentados com dietas contendo glicerina associada ou não a aditivos alimentares.

Parâmetros	Dietas					Contrastes <sup>7</sup>				
	CONT <sup>1</sup>	OE <sup>2</sup>	OEG <sup>3</sup>	MON <sup>4</sup>	MONG <sup>5</sup>	EPM <sup>6</sup>	1	2	3	4
Consumo, kg/dia										
MS	7,81	8,75	7,63	8,15	6,65	0,20	0,9481	0,0013	0,0001	0,0013
MO	6,86	7,60	6,14	7,11	5,45	0,19	0,1514	<0,0001	<0,0001	0,0036
FDN	3,41	4,08	2,83	3,48	2,36	0,13	0,0486	<0,0001	<0,0001	<0,0001
FDA	1,54	1,58	1,89	1,87	1,34	0,05	0,0099	0,0001	<0,0001	0,0071
PB	1,23	1,36	1,37	1,31	1,34	0,02	0,0093	0,7265	0,4452	0,2167
EE	0,20	0,26	0,17	0,22	0,16	0,01	0,2529	<0,0001	<0,0001	0,0007
CNF	1,98	1,79	2,16	1,90	1,62	0,05	0,0523	0,0001	0,0016	0,0008
AMIDO	2,70	2,22	1,44	2,42	1,54	0,11	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0472

<sup>1</sup> CONT= Tratamento controle sem adição de Glicerina e aditivos; <sup>2</sup> OE= Óleos Essenciais sem adição de Glicerina; <sup>3</sup> OEG= Óleos Essenciais com adição de Glicerina; <sup>4</sup> MON= Monensina Sódica sem adição de Glicerina; <sup>5</sup> MONG= Monensina Sódica com adição de Glicerina;

<sup>6</sup> EPM= erro padrão da média;

<sup>7</sup> Contrastes: 1= CONT versus ADITIVOS (OE, OEG, MON, MONG); 2= Dieta OE versus OEG; 3= Dieta MON versus MONG; 4= Óleos essenciais (OE e OEG) versus Monensina Sódica (MON e MONG);

**Tabela 4.** Médias, erro padrão das médias e contrastes ortogonais para os valores médios da digestibilidade *in vitro* da MS e nutrientes das dietas.

DIV	Dietas					Contrastes <sup>7</sup>				
	CONT <sup>1</sup>	OE <sup>2</sup>	OEG <sup>3</sup>	MON <sup>4</sup>	MONG <sup>5</sup>	EPM <sup>6</sup>	1	2	3	4
MS	58,90	60,67	69,93	61,08	69,14	1,22	0,0099	0,0039	0,0093	0,9211
MO	53,66	54,61	62,01	55,15	61,92	1,44	0,0894	0,0423	0,0597	0,9236
FDN	46,85	50,91	51,19	49,52	54,08	1,68	0,1812	0,9475	0,2852	0,7990
FDA	33,84	34,21	35,96	38,05	41,07	1,53	0,2891	0,6621	0,4526	0,1310
PB	57,29	60,40	40,72	56,61	44,05	2,22	0,0872	0,0012	0,0193	0,9444
EE	81,69	85,01	84,2	83,89	85,31	0,54	0,0119	0,527	0,2741	0,9975
CNF	90,64	90,95	89,24	83,91	89,37	0,61	0,0042	0,0577	<0,0001	<0,0001

<sup>1</sup> CONT= Tratamento controle sem adição de Glicerina e aditivos; <sup>2</sup> OE= Óleos Essenciais sem adição de Glicerina; <sup>3</sup> OEG= Óleos Essenciais com adição de Glicerina; <sup>4</sup> MON= Monensina Sódica sem adição de Glicerina; <sup>5</sup> MONG= Monensina Sódica com adição de Glicerina;

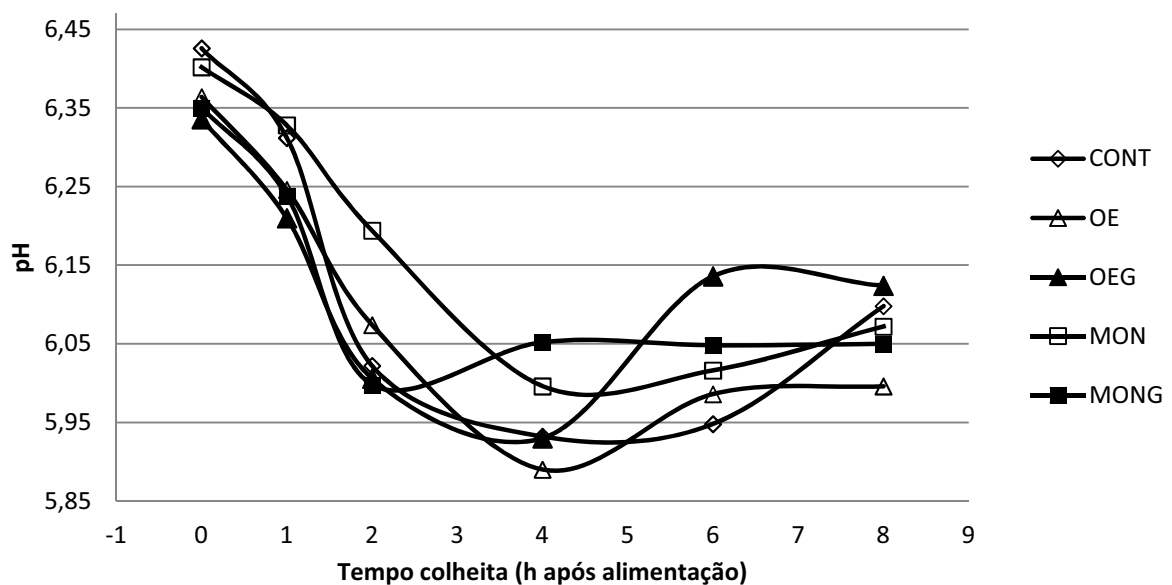
<sup>6</sup> EPM= erro padrão da média;

<sup>7</sup> Contrastes: 1= CONT versus ADITIVOS (OE, OEG, MON, MONG); 2= Dieta OE versus OEG; 3= Dieta MON versus MONG; 4= Óleos essenciais (OE e OEG) versus Monensina Sódica (MON e MONG);

### Parâmetros ruminais (pH e N-NH<sub>3</sub>)

Houve efeito do horário de colheita de conteúdo ruminal tanto para os valores de pH ( $P < 0,001$ ) quanto para as concentrações de N-NH<sub>3</sub> ( $P < 0,001$ ). Não houve efeito da interação tempos de colheita vs tratamento para a variável pH ( $P = 0,7587$ ) e nem para as concentrações de N-NH<sub>3</sub> ( $P = 0,9636$ ). Porém, ao analisar os contrastes ortogonais (Tabela 5) obtidos das médias dos tempos de colheita (0, 1, 2, 4, 6 e 8 horas após alimentação) para os valores de concentração de N-NH<sub>3</sub>, houve efeito significativo ( $P = 0,0306$ ), em que os tratamentos contendo Monensina Sódica (MON e MONG) diferiram dos tratamentos com Óleos essenciais (OE e OEG), apresentando redução de 4,85 mg de N-NH<sub>3</sub>/dL.

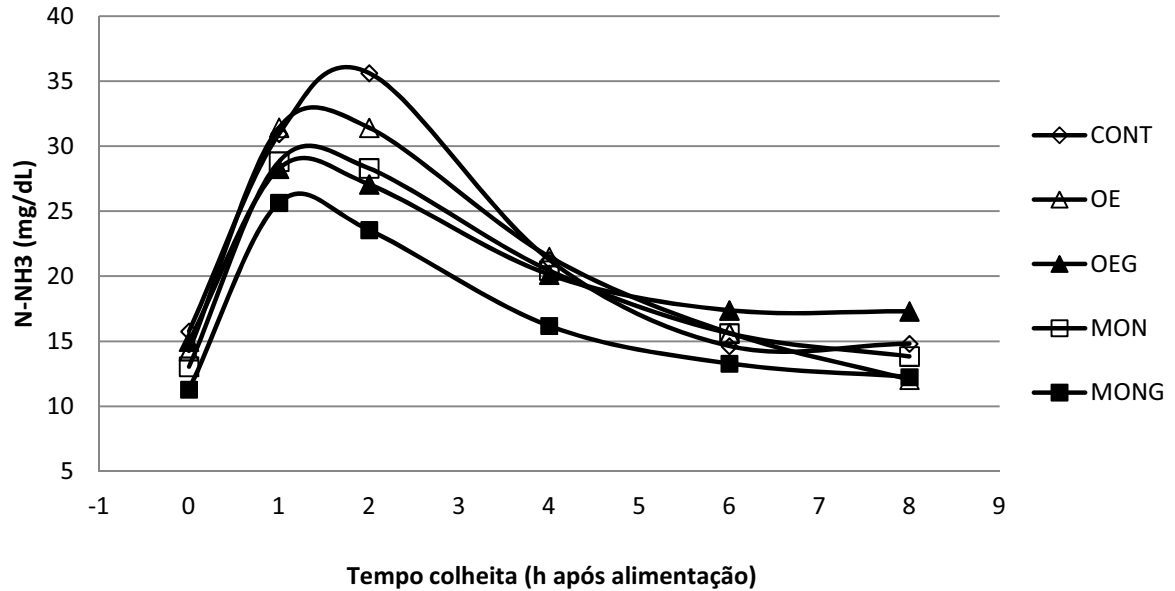
Na figura 2 encontra-se o comportamento médio do pH ruminal em função dos tempos de colheita (momento alimentação (0 hora), 1, 2, 4, 6 e 8 horas após).



**Figura 2.** Comportamento do pH ruminal em função dos tempos de colheita após alimentação.

Os maiores valores médios de pH (6,38), para todas as dietas, foram obtidos no tempo zero (antes da alimentação) e os menores (5,96) 4 horas após a alimentação, porém os valores médios de pH dentre todos os horários de colheita, independente do tratamento, foram maiores que 6,09.

Na figura 3 a seguir encontra-se o comportamento médio das concentrações de N-NH<sub>3</sub> ruminal em função dos tempos de colheita (momento alimentação (0 hora), 1, 2, 4, 6 e 8 horas após).



**Figura 3.** Comportamento da concentração de N-NH<sub>3</sub> ruminal em função dos tempos de colheita após alimentação.

Os maiores valores médios de concentração de N-NH<sub>3</sub> (29,19 mg/dL), para todas as dietas, foram obtidos no tempo 2 horas após a alimentação e os menores (13,87 mg/dL) no tempo zero horas (momento da alimentação).

**Tabela 5.** Médias, erro padrão das médias e contrastes ortogonais para a média dos tempos de colheita observadas para os parâmetros de pH ruminal e concentrações de nitrogênio amoniacal ruminal (N-NH<sub>3</sub>, mL/dL), obtidos de bovinos Nelore alimentados com dietas contendo glicerina associada ou não a aditivos alimentares.

Parâmetros	Tratamentos				EPM <sup>6</sup>	Contrastes <sup>7</sup> , P-valor				
	CONT <sup>1</sup>	OE <sup>2</sup>	OEG <sup>3</sup>	MON <sup>4</sup>		MONG <sup>5</sup>	1	2	3	4
pH	6,12	6,09	6,12	6,17	6,12	0,03	0,9049	0,4355	0,2550	0,1874
N-NH <sub>3</sub>	22,17	21,05	20,85	20,01	17,04	0,77	0,0525	0,9011	0,0604	0,0306

<sup>1</sup> CONT= Tratamento controle sem adição de Glicerina e aditivos; <sup>2</sup> OE= Óleos Essenciais sem adição de Glicerina; <sup>3</sup>OEG= Óleos Essenciais com adição de Glicerina; <sup>4</sup> MON= Monensina Sódica sem adição de Glicerina; <sup>5</sup> MONG= Monensina Sódica com adição de Glicerina;

<sup>6</sup> EPM= erro padrão da média;

<sup>7</sup> Contrastes: 1= CONT versus ADITIVOS (OE, OEG, MON, MONG); 2= Dieta OE versus OEG; 3= Dieta MON versus MONG; 4= Óleos essenciais (OE e OEG) versus Monensina Sódica (MON e MONG);

## **Produção e qualidade da massa microbiana**

Houve efeito do horário de colheita de conteúdo ruminal somente para as médias das quantidades de MS ( $P=0,0003$ ) e MO ( $P<0,0001$ ) das BLA em mg/L de líquido ruminal. Não houve interação tempos de colheita vs tratamento para nenhuma das quantidades das frações de microrganismos analisadas ( $P>0,05$ ). Ao analisar os contrastes ortogonais (Tabela 6) obtidos das médias dos tempos de colheita (0, 2, 5 e 8 horas após alimentação) para as quantidades de MS e MO das BLA em mg/L LR, houve efeito significativo ( $P<0,05$ ), em que a inclusão de glicerina bruta reduziu as quantidades das frações de microrganismos, respectivamente em 146,51 mg MS e 105,94 mg MO/L de LR.

Foram calculadas as quantidades totais de microrganismos, resultantes do somatório das quantidades em mg de MS/kg CR e mg MS/L LR das frações da microbiota ruminal, dos microrganismos totais das fases líquida (BLA + PLA) e sólida (BSA) e as porcentagens de bactérias e de protozoários. Esses resultados são apresentados na Tabela 7. Houve diferença ( $P<0,05$ ) dos tempos de colheita em relação à quantidade de microrganismos totais da fase sólida e na quantidade total de microrganismos. Foi observado redução na quantidade de microrganismos da fase sólida ( $P<0,05$ ) 2 e 5 horas após alimentação. Em relação à quantidade total de microrganismos, a redução ocorreu somente 2 horas após alimentação ( $P<0,05$ ), com aumento na quantidade após esse horário.

**Tabela 6.** Médias, erro padrão das médias e contrastes ortogonais para a média dos tempos de colheita observadas para as quantidades de teores de MS e MO das frações de microrganismos, nos diferentes tempos de amostragem após alimentação, obtidos de bovinos Nelore alimentados com dietas contendo glicerina associada ou não a aditivos alimentares.

Parâmetros	Dietas					Contrastes <sup>7</sup>				
	CONT <sup>1</sup>	OE <sup>2</sup>	OEG <sup>3</sup>	MON <sup>4</sup>	MONG <sup>5</sup>	EPM <sup>6</sup>	1	2	3	4
BSA*, mg MS/kg CR	4756,33	4649,44	4523,44	4931,39	4447,61	186,13	0,6786	0,9820	0,3637	0,6150
BLA**, mg MS/L LR	587,97	641,34	494,83	625,08	540,77	26,14	0,9784	0,0094	0,5673	0,5324
PLA***, mg MS/ L LR	1101,48	1250,92	1387,13	1099,93	1375,46	93,61	0,5925	0,9254	0,7366	0,9263
	<b>% MS</b>									
BSA, mg MO/kg CR	4033,19	3926,773	3902,7	4076,44	3754,85	165,72	0,5557	0,5128	0,425	0,6047
BLA, mg MO/L LR	460,40	486,54	380,60	485,62	424,24	20,47	0,8725	0,0190	0,4911	0,2305
PLA, mg MO/L LR	662,01	745,698	718,79	593,54	764,85	46,92	0,9151	0,6454	0,5123	0,7916

\*BSA= Bactérias sólido-aderidas; \*\*BLA= Bactérias líquido-associadas; \*\*\*PLA= Protozoários líquido-associados;

<sup>1</sup> CONT= Tratamento controle sem adição de Glicerina e aditivos; <sup>2</sup> OE= Óleos Essenciais sem adição de Glicerina; <sup>3</sup>OEG= Óleos Essenciais com adição de Glicerina; <sup>4</sup> MON= Monensina Sódica sem adição de Glicerina; <sup>5</sup> MONG= Monensina Sódica com adição de Glicerina;

<sup>6</sup> EPM= erro padrão da média;

<sup>7</sup> Contrastes: 1= CONT versus ADITIVOS (OE, OEG, MON, MONG); 2= Dieta OE versus OEG; 3= Dieta MON versus MONG; 4= Óleos essenciais (OE e OEG) versus Monensina Sódica (MON e MONG);



**Tabela 7.** Valores das quantidades totais de microrganismos, microrganismos totais das fases líquida e sólida e as porcentagens de bactérias e de protozoários, nos diferentes tempos de amostragem após alimentação.

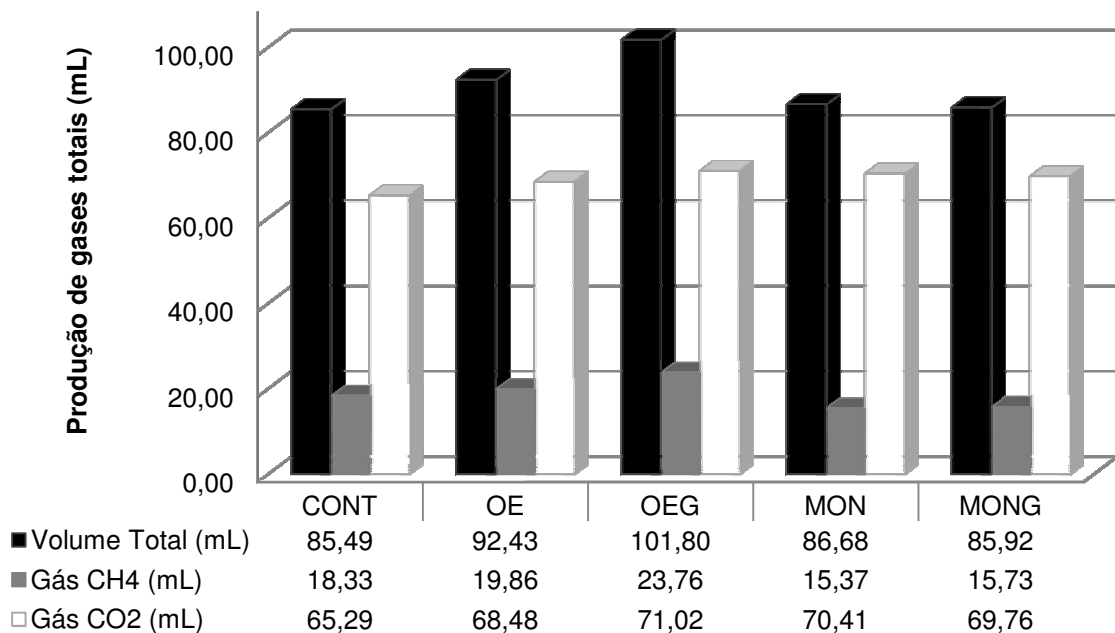
Parâmetros	Tempos de amostragem após alimentação				Média	EPM <sup>1</sup>
	0	2	5	8		
	<b>mg MS/kg CR</b>					
Microrg. Fase Líquida	1751,12	1512,00	1767,22	1958,24	1747,14	84,91
Microrg. Fase Sólida	5576,43 a	3683,04 b	4095,12 b	4691,77 ab	4511,59	177,58
Quantidade Total de Microrganismos	7327,55 a	5195,03 b	5862,34 a	6650,01 a	6258,73	218,28
	<b>% de Microrganismos</b>					
Bactéria	79,80	77,89	77,10	76,12	78,31	1,66
Protozoário	20,20	22,11	22,90	23,88	21,68	1,65

Médias seguidas por letras distintas na linha diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,05);

<sup>1</sup>EPM= erro padrão da média;

## Produção de gases metano e carbono

Na figura 4 a seguir encontram-se a produção de gases totais, metano e carbônico em mL, das dietas experimentais, em 12 horas de incubação *in vitro*. Houve diferença ( $P < 0,05$ ) dos tratamentos estudados em relação à produção de gases totais (mL), e produção de  $\text{CH}_4$  (mL). Analisando os contrastes ortogonais, constatou-se que os tratamentos com monensina sódica proporcionaram redução na produção de gases totais ( $P = 0,0005$ ) e gás  $\text{CH}_4$  ( $P = 0,0010$ ) em relação aos tratamentos com óleos essenciais (MON e MONG vs OE e OEG). A inclusão de glicerina bruta proporcionou redução na produção de gases totais apenas para o aditivo óleos essenciais ( $P = 0,0123$ ).



**Figura 4.** Produção de gases totais, metano e carbônico, em mL, das dietas experimentais.

Na tabela 8 encontram-se as produção de  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$  em mL/g incubada (mL/g) e mL/g degradada (mL/gd), desaparecimento da MS e FDN (DMS e DFDN) das dietas experimentais. Houve diferença ( $P < 0,05$ ) dos tratamentos estudados em relação à produção de  $\text{CH}_4$  em mL/g e mL/gd, produção de  $\text{CO}_2$  em mL/gd, DMS e

DFDN. A adição de aditivos proporcionou aumento no DMS ( $P=0,0306$ ) e redução na produção de  $\text{CH}_4$  ( $P<0,0001$ ) e  $\text{CO}_2$  ( $P=0,0067$ ) mL/gd, respectivamente em 45,30 e 12,91%.

O grupo Monensina Sódica (MON e MONG) diferiu do grupo Óleos essenciais (OE e OEG), tanto para a produção de  $\text{CH}_4$ , em mL/g ( $P=0,0133$ ), quanto para as produções de  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$ , em mL/gd (respectivamente,  $P=0,0016$  e  $P=0,0405$ ). Quando se incluiu glicerina bruta nos tratamentos houve aumento no DMS ( $P<0,05$ ) para os tratamentos OEG e MONG, e redução no DFDN para o tratamento OEG. A inclusão de glicerina no tratamento Monensina Sódica reduziu ( $P<0,05$ ) a produção de  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$  respectivamente em 6,31 e 25,99 mL/gd, e quando incluída no tratamento Óleos essenciais reduziu a produção de  $\text{CO}_2$  em 13,08 mL/gd.

**Tabela 8.** Médias, erro padrão das médias e contrastes ortogonais para os parâmetros de produção de gases metano e carbono em mL/g incubada (mL/g) e em mL/g degradada (mL/gd), desaparecimento da matéria seca (DMS) e fibra em detergente neutro (DFDN).

Parâmetros	Tratamentos				EPM <sup>6</sup>	Contrastes <sup>7</sup> , P-valor			
	CONT <sup>1</sup>	OE <sup>2</sup>	OEG <sup>3</sup>	MON <sup>4</sup>		MONG <sup>5</sup>	1	2	3
CH <sub>4</sub> , mL/g	8,93	9,14	9,19	7,80	6,17	0,0785	0,9832	0,1239	0,0133
CO <sub>2</sub> , mL/g	29,43	31,45	30,06	30,71	28,57	0,8462	0,8037	0,2475	0,1485
DMS, %	35,27	37,94	44,57	34,27	46,19	0,0306	0,0376	0,0002	0,8027
DFDN, %	21,48	25,52	20,93	22,92	21,38	0,2149	0,0004	0,2107	0,2157
CH <sub>4</sub> , mL/gd	30,87	19,63	17,14	18,54	12,23	<0,0001	0,2365	0,0002	0,0016
CO <sub>2</sub> , mL/gd	87,05	85,83	72,75	85,33	59,34	0,0067	0,0146	<0,0001	0,0405

<sup>1</sup> CONT= Tratamento controle sem adição de Glicerina e aditivos; <sup>2</sup> OE= Óleos Essenciais sem adição de Glicerina; <sup>3</sup>OEG= Óleos Essenciais com adição de Glicerina; <sup>4</sup> MON= Monensina Sódica sem adição de Glicerina; <sup>5</sup> MONG= Monensina Sódica com adição de Glicerina;

<sup>6</sup> EPM= erro padrão da média; <sup>7</sup> CV= Coeficiente de Variação;

<sup>8</sup> Contrastes: 1= CONT versus ADITIVOS (OE, OEG, MON, MONG); 2= Dieta OE versus OEG; 3= Dieta MON versus MONG; 4= Óleos essenciais (OE e OEG) versus Monensina Sódica (MON e MONG);

## **DISCUSSÃO**

### **Consumo e digestibilidade da MS e nutrientes das dietas**

Conforme apresentado na Tabela 1, as dietas oferecidas aos animais continham níveis semelhantes de energia metabolizável e proteína bruta. Contudo, as diferenças encontradas no consumo e digestibilidade da MS e nutrientes podem ser explicadas pela associação dos ingredientes das dietas a uma fermentação adequada, ou seja, melhor sincronismo de degradação ruminal de fontes energéticas e proteicas, já que não foram encontrados fatores que prejudicassem a fermentação ruminal (Tabelas 5 e 6).

A glicerina bruta apresenta baixo teor de proteína em sua composição (0,1 g/kg de MS). Assim, quando se inclui glicerina bruta na dieta, a substituição de uma fonte de proteína verdadeira por ureia se faz necessário, a fim de balancear a dieta de acordo com as exigências do animal.

A maior quantidade de ureia nas dietas com inclusão de glicerina bruta (7 g/kg MS a mais) pode explicar o aumento da digestibilidade da MS, MO, FDA e CNF (Tabela 3), pelo fato de ser uma fonte de nitrogênio não proteico de rápida liberação no rúmen, sincronizando com a fonte de energia prontamente disponível da glicerina bruta, fornecendo rapidamente substratos para a manutenção e crescimento microbiano, mesmo com o baixo consumo destes nutrientes com a inclusão da glicerina bruta (Tabela 3). Da mesma forma, Parsons et al. (2009) e Pyatt et al. (2007), ao incluírem glicerina bruta nas dietas observaram diminuição no consumo de nutrientes. Por outro lado, o excesso de proteína prontamente disponível pode diminuir a formação de proteína microbiana no rúmen ao longo do dia, e facilitar o escape de proteína alimentar do rúmen, prejudicando a digestibilidade dos nutrientes, possivelmente como ocorreu no presente trabalho para DIVPB e DIVCNF (Tabela 4).

A inclusão de aditivos não afetou o consumo de MS, e aumentou a digestibilidade da MS das dietas, provavelmente pela modulação do consumo ao longo do dia, em que houve várias ingestões em poucas quantidades, fornecendo

ambiente adequado à fermentação ruminal, e conseqüentemente maior aproveitamento da dieta.

A inclusão de glicerina bruta (200 g/kg MS da dieta total) não prejudicou a digestibilidade da FDN e FDA (Tabela 4), possivelmente pela associação aos aditivos Monensina Sódica e Óleo Essenciais, os quais forneceram adequados níveis de pH e concentrações de N-NH<sub>3</sub> ruminal (Tabela 5) durante o dia para o crescimento microbiano, possivelmente pela defaunação de microrganismos indesejáveis ao rúmen, em que a digestão da fibra não foi afetada. O pH ruminal é uma característica importante associada à degradação da fração fibrosa dos volumosos utilizados na alimentação de ruminantes. Esse parece ser o principal impacto para redução na degradação da fibra, pois, quando o pH atinge valores de 5,5 ou 5,0, há inibição dos microrganismos celulolíticos (Hoover, 1986), o que não ocorreu no presente estudo, onde os valores médios de pH foram superiores a 6,09 (Tabela 5).

O aditivo Monensina Sódica se mostrou mais eficiente em termos de digestão ruminal em relação aos Óleos essenciais com ou sem inclusão de glicerina, pois apesar de apresentar menor consumo em quase todos os nutrientes, não reduziu a digestibilidade dos nutrientes (Tabelas 3 e 4). Este fato pode ter ocorrido porque a monensina sódica aumenta a eficiência energética, principalmente, em função do aumento da produção de ácido propiônico, da redução da relação acetato/propionato (McGUFFEY et al., 2001) e diminuição da produção de metano (Tabela 8). Os óleos essenciais ainda não têm ação totalmente elucidada.

### **Fermentação ruminal**

A inclusão da glicerina bruta, em substituição aos ingredientes energéticos (Tabela 1), associada ou não aos aditivos monensina sódica ou óleos essenciais, não prejudicou nenhuma das variáveis avaliadas para a fermentação ruminal (Tabela 5). O pH ruminal no presente estudo se manteve dentro da faixa ótima para a atividade de bactérias, principalmente as celulolíticas (RUSSELL;WILSON, 1996; VAN SOEST, 1994). Da mesma forma, Wang et al. (2009) e Schröder e Südekum

(1999) observaram, apesar da alta porcentagem de concentrado na dieta e independentemente do tratamento dietético, valores de pH superiores a 6,0.

As concentrações de N-NH<sub>3</sub> ruminal foram suficientes para o crescimento bacteriano, conforme o valor mínimo citado por Preston (1986), de 5 mg N-NH<sub>3</sub>/dL. No entanto, o valor deve ser superior a 10 mg/dL para que haja aumento da digestão ruminal da MS e superior a 20 mg/dL para que ocorra aumento da ingestão de MS (LENG, 1990). Levando em consideração que as exigências proteicas do animal são atendidas mediante a absorção intestinal de aminoácidos provenientes da proteína microbiana sintetizada no rúmen e da proteína não degradada no rúmen (Valadares Filho, 1995), a adequada concentração de N-NH<sub>3</sub> ruminal é indispensável para o crescimento bacteriano, onde cerca de 40 a 100% do nitrogênio exigido pelos microrganismos poderiam ser derivados do N-NH<sub>3</sub> (STERN & HOOVER, 1979).

Neste sentido, diante do sinergismo encontrado entre os valores de acidez (pH) e concentrações de N-NH<sub>3</sub> no rúmen para manter adequado ambiente ruminal, não foi encontrada diferenças significativas entre as quantidades de microrganismos (BSA, PLA e BLA) nos diferentes tempos de amostragem, exceto quando houve inclusão de glicerina bruta ao tratamento óleos essenciais, em que as BLA tiveram reduções nas quantidades de MS e MO em mg/L de líquido ruminal (Tabela 6). Essa redução pode ser explicada pela rápida fermentação da glicerina bruta a propionato e não a lactato, não gerando reduções drásticas no pH ruminal, e fornecendo ambiente propício para colonização de novos substratos dietéticos (Wang et al. 2009; Donkin, 2008).

A rápida elevação das concentrações de N-NH<sub>3</sub> nos tempos uma e 2 horas, e as reduções no pH ruminal nos tempos 2 e 4 horas após alimentação, podem explicar a diminuição na quantidade total de microrganismos e na quantidade de microrganismos aderidos na parte sólida do conteúdo ruminal neste mesmo intervalo de tempo (Tabela 7), por não fornecer adequado ambiente ruminal como já referenciado acima.

A redução na concentração de N-NH<sub>3</sub> obtido pelo grupo Monensina Sódica em relação ao grupo Óleos essenciais (Tabela 5), pode ser atribuído à melhora da utilização de proteína pelos microrganismos, ou simplesmente pelas bactérias

proteolíticas e fermentadoras de aminoácidos serem sensíveis aos ionóforos (Lana & Russel 1996), havendo maior escape de proteína pelo rúmen.

### **Produção de gases metano e carbono**

As reduções nas produções totais de gases em mL, CH<sub>4</sub> em mL (Figura 4), e CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> em mL/gd (Tabela 8) quando se incluiu aditivo nas dietas, podem ser explicadas pela melhoria da eficiência energética, provavelmente, em função do aumento da produção de ácido propiônico, e da redução da relação acetato/propionato no rúmen (McGUFFEY et al., 2001), e quando incluído a glicerina bruta nas dietas ocorreu maior redução da produção de gases. Segundo Stradiotti Júnior et al. (2004), no ecossistema ruminal, há relação inversa entre a produção de metano e de ácido propiônico.

O mecanismo pelo qual se justifica essa relação inversa é no direcionamento dos H<sup>+</sup> e CO<sub>2</sub> que estariam disponíveis para a metanogênese, excedentes da produção de acetato, para a produção de propionato, e levando em consideração que o glicerol é fermentado principalmente a propionato, há redução da produção de gases, principalmente o CH<sub>4</sub> (Lee et al., 2011).

Vale ressaltar que em 12 horas de incubação a presença da glicerina pode ter influenciado as digestibilidades das dietas, pois por ser prontamente disponível a digestão ruminal, sendo consumida quase que totalmente num prazo de 4 a 6 (Donkin, 2008), há aumento no DMS, e por não conter fibra em sua composição e não gerar acetato pode desfavorecer o crescimento dos microrganismos celulolíticos, diminuindo o DFDN. Talvez, se a produção de gases fosse analisada num prazo de 24 horas, não haveria redução do DFDN, como ocorrido no tratamento óleo essencial.

A associação glicerina e monensina sódica se mostrou mais eficiente em termos de aproveitamento da energia bruta dos alimentos, pois reduziu a produção de gases estufa em mais da metade quando comparado ao tratamento controle (Tabela 8). Segundo Pedreira e Primavesi (2006) a produção do CH<sub>4</sub> entérico é responsável pela perda de 6% a 18% da energia bruta da dieta durante o processo fermentativo.



Extrapolando a produção de CH<sub>4</sub> em mL/gd, pelo consumo de MS obtido pelos animais, por um ano, teríamos produções de 87,99; 62,69; 47,73; 55,15 e 29,65 litros/ano, respectivamente para os tratamentos CONT, OE, OEG, MON e MONG. Segundo Berchielli et al. (2003) e Primavesi et al. (2004), a produção média de CH<sub>4</sub> de um animal Nelore em confinamento é de 51 litros/ano. Sendo assim, somente o tratamento controle excedeu em muito o valor médio referenciado acima. Nas condições do experimento, a associação monensina sódica e glicerina bruta poderia proporcionar redução de 66,3% da produção de CH<sub>4</sub> em um ano, ou diminuição de 58,34 L/animal/ano, de animais Nelore em confinamento.

## CONCLUSÃO

A glicerina bruta adicionada em 200 g/kg MS é um ingrediente energético substituto ao milho grão e a casca de soja, e, quando associada a aditivos (monensina sódica ou óleos essenciais) mostrou-se uma alternativa alimentar a ser utilizada em confinamento de bovinos Nelore, sem efeitos prejudiciais sobre a fermentação ruminal, consumo e digestibilidade da MS e nutrientes, e com redução na produção dos gases do efeito estufa.

A associação glicerina bruta e monensina sódica tem alto potencial de redução da produção de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>.

## REFERÊNCIAS

- HOLDEN, L. A. Comparison of methods of in vitro matter digestibility for ten feeds. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 8, p 1791-1794, 1999.
- ABO EL-NOR, S.; ABUGHAZALEH, A.A.; POTU, R.B.; HASTINGS, D.; KHATTAB, M.S. A. Effects of differing levels of glycerol on rumen fermentation and bacteria. **Animal Feed Science and Technology**, v. 162, n. 3- 4, 2010. Disponível em: doi:10.1016/j.anifeedsci.2010.09.012.
- ABUGHAZALEH, A. A., ABO EL NOR, S. & IBRAHIM, S. A. The effect of replacing corn with glycerol on ruminal bacteria in continuous culture fermenters. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 95, p. 313-319, 2011.
- BARTOŇ, L., BURES, D., HOMOLKA, P., JANCÍK, F., MAROUNEK, M., REHÁK, D. Effects of long-term feeding of crude glycerine on performance, carcass traits, meat quality, and blood and rumen metabolites of finishing bulls. **Livestock Science**. v.155, n.1, p.53-59, 2013.
- BENCHAAR, C.; PETIT, H. V; BERTHIAUME, R; WHYTE, T. D.; CHOUINARD, P. Y. Effects of addition of essential oils and monensin premix on digestion, ruminal fermentation, milk production, and milk composition in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.4352–4364, 2006.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potencial applications in foods- a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.94, n.3, p.223-253, 2004.
- CALSAMIGLIA, S.; BUSQUET, M.; CARDOZO, P. W.; CASTILLEJOS L, FERRET A. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 2580-2595, 2007.
- CARVALHO, J.R.R., CHIZZOTTI, M.L., RAMOS, E.M., MACHADO NETO, O.R., LANNA, D.P.D., LOPES, L.S., TEIXEIRA, P.D., LADEIRA, M.M. Qualitative characteristics of meat from young bulls fed different levels of crude glycerin. **Meat Science**. v. 96, n.2, p.977-983, 2014.
- CERRATE, S.; YAN, F.; WANG, Z. et al. Evaluation of glycerine from biodiesel production as a feed ingredient for broilers. **International Journal of Poultry Science**, v.5, n.11, p.1001-1007, 2006.
- CHAGAS, L.J. Óleos funcionais como alternativa a ionóforos na alimentação de bovinos de corte. Disponível em: <<http://www.beefpoint.com.br>>, Acesso em: 17/02/2012.

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

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.12, n.4, p.564-582, 1999.

DASARI, M.A.; KIATSIMKUL, P.P.; SUTTERLIN, W.R.; SUPPES, G.J.. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. **Applied Catalysis A: General**, EUA, v. 281, n.1, p. 225-231, jan. 2005.

DEWULF, J.; CATRY, B.; TIMMERMAN, T.; OPSOMER, G.; DE KRUIF, A.; MAES, D. Tetracycline-resistance in actosepositive enteric coliforms originating from Belgian fattening pigs: degree of resistance, multiple resistance and risk factors. **Preventive Veterinary Medicine**, v.78, p.339-351, 2007.

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

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

GROESBECK, C.N.; MCKINNEY, L.J.; DEROUCHÉY, J.M.; TOKACH, M. D.; GOODBAND, R. D.; DRITZ, S. S.; NELSEN, J. L. ; DUTTLINGER, A. W. ; FAHRENHOLZ, A. C.; K. C. BEHNKE. Effect of crude glycerol on pellet mill production and nursery pig growth performance. **Journal of Animal Science**, v. 85, suppl.1, p. 201-202, 2008.

GUZMÁN-BLANCO, M.; CASELLAS, J.M.; SADER, H.S. Bacterial resistance to antimicrobial agents in Latin America. **Infectious Disease Clinical North America**, v.14, p.67-81, 2000.

KIJORA, C., BERGNER, H., GÖTZ, K.P., BARTELT, J., SZAKACS, J., SOMMER, A. Investigation on the metabolism of glycerol in the rumen of bulls. **Arch Tieremahr**, v. 51, p. 341-348, 1998.

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

LAGE, J.F., BERCHIELLI, T.T., SAN VITO, E., SILVA, R.A., RIBEIRO, A.F., REIS, R.A., DALLANTONIA, E.E., SIMONETTI, L.R., DELEVATTI, L.M., MACHADO, M. Fatty acid profile, carcass and meat quality traits of young Nelore bulls fed crude

glycerin replacing energy sources in the concentrate. **Meat Science**. v. 96, n.3, p. 1158-1164, 2014b.

LAGE, J.F., PAULINO, P.V.R., PEREIRA, L.G.R., DUARTE, M.S., VALADARES FILHO, S.C., OLIVEIRA, A.S., SOUZA, N.K.P., LIMA, J.C.M. Carcass characteristics of feedlot lambs fed crude glycerin contaminated with high concentrations of crude fat. **Meat Science**. v.96, n.1, p.108-113, 2014a.

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

LEE, S. Y., LEE, S. M., CHO, Y. B., KAM, D. K., LEE, S. C., KIM, C. H., & SEO, S. Glycerol as a feed supplement for ruminants: *In vitro* fermentation characteristics and methane production. **Animal Feed Science and Technology**, 166, 269-274, 2011.

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

McGUFFEY, R.K.; RICHARDSON, L.F.; WILKINSON, J.I.D. Ionophores for dairy cattle: Current status and future outlook. **Journal of Dairy Science**, 84:E194, 2001.

MOREIRA, F.B., PRADO, I.N., CECATO, U., WADA, F.Y., NASCIMENTO, W.G., SOUZA, N.E., Suplementação com sal mineral proteinado para bovinos de corte, em crescimento e terminação, mantidos em pastagem de grama estrela roxa (*Cynodon plectostachyus* Pilger) no inverno. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 449-455, 2003.

PEREIRA, L.G.R.; LAGE, J.F.; PAULINO, P.V.R.; VALADARES FILHO, S.C.; OLIVEIRA, A.S.; DETMANN, E. Consumo e desempenho de cordeiros alimentados com glicerina bruta. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 47, 2010, Salvador, BA. **Anais...**, Salvador, BA: SBZ, 2010. CD-ROM.

RAY, K.A.; WARNICK, L.D.; MITCHELL, R.M. et al. Prevalence of antimicrobial resistance among *Salmonella* on Midwest and northeast USA dairy farms. **Preventive Veterinary Medicine**, n.79, p.204-223, 2007.

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

RUSSELL, J.B.; HOULIHAN, A.J. Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.27, p.65-74, 2003.

SIMON, A.; BERGNER, H.; SCHWABE, M. Glycerol as a feed ingredient for broiler chickens. **Archives of Animal Nutrition**, v.49, n.2, p.103-112, 1996.

THOMPSON, J.C.; HE, B.B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. *Applied Eng. Agric.*, v. 22, p. 261-265,

VISSER, E.M.; FILHHO OLIVEIRA, D.; MARTINS, M.A.; STEWARD, B. Bioethanol production potential from Brazilian biodiesel co-products. **Biomass and Bioenergy**, v.35, p.489-494, 2011.

WILBERT, C.A., PRATES, E.R., BARCELLOS, J.O.J, SCHAFHAUSER, J. Crude glycerin as an alternative energy feedstuff for dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**. v183, n.3-4, p. 116-123, 2013.