

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

UTILIZAÇÃO DE GLICERINA, SUBPRODUTO DO
BIODIESEL, NA ALIMENTAÇÃO DE BOVINOS

Vanessa Ruiz Fávaro

Zootecnista

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

UTILIZAÇÃO DE GLICERINA, SUBPRODUTO DO
BIODIESEL, NA ALIMENTAÇÃO DE BOVINOS

Vanessa Ruiz Fávaro

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. 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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Fevereiro de 2010

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

VANESSA RUIZ FÁVARO – nascida na cidade paranaense de Mandaguari, no dia 27 de dezembro de 1984, filha de Luís José Fávaro e Neide Ruiz Fávaro. Iniciou em 2002 o curso de graduação em Zootecnia na Faculdade Estadual de Maringá, Maringá/Pr, onde foi bolsista de iniciação científica do CNPq e defendeu trabalho de graduação sob orientação do Prof. Dr. Antonio Ferriani Branco. Obteve título de Zootecnista em fevereiro de 2007 e a partir de então trabalhou como bolsista Apoio Técnico – FAPESP em projeto coordenado pela Prof.^a Dr.^a Jane Maria Bertocco Ezequiel, da qual foi orientada, após ingressar no Programa de Pós-graduação em Zootecnia da FCAV, Unesp, campus de Jaboticabal.

Felicidade...

*Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os
desafios, incompreensões e períodos de crise.
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da
própria história.
É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis
no recôndito da sua alma...
É saber falar de si mesmo.
Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.
É ter coragem para ouvir um não.
É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta
É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida*

Aos meus pais

Luís José Fávaro e Neide Ruíz Fávaro

DEDICO...

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a Jane Maria Bertocco Ezequiel pela dedicação, orientação, ensinamentos, amizade e confiança.

Aos professores Atushi Sugohara, Mauro Dal Secco de Oliveira e Antonio Ferriani Branco pelas sugestões neste trabalho.

À minha família, pelo total apoio e incentivo.

À FCAV pela oportunidade e estrutura.

Ao CNPq pela bolsa de estudos.

Ao funcionário do setor Dejair pela ajuda em praticamente todos os dias do experimento.

Aos funcionários da Fábrica de Rações Sandra, Osvaldo e Helinho.

Ao Luizinho funcionário da Engenharia Rural pelo auxílio com as análises de cromatografia gasosa.

À Ana Paula Sader, Magali e Sr. Orlando pela atenção.

À Caramuru Alimentos pelo fornecimento da glicerina, farelo de girassol e casca de soja utilizados neste experimento

Ao meu namorado Fábio Alvarenga pelo apoio em todas as horas

Aos amigos André Pastori e Leni Rodrigues pela ajuda nos períodos de colheita.

Ao amigo Antônio Carlos Homem Junior pela ajuda com os cálculos e análises estatísticas.

As amigas de república Larissa, Andresa, Ivi, Naiara e Marcielle pelo convívio.

A todos da Unidade Animal de Estudos Digestivos e Metabólicos que de alguma forma contribuíram com a realização desse trabalho

ÍNDICE

RESUMO.....	viii
SUMMARY	ix
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
Biodiesel	3
Glicerina na alimentação animal.....	5
Consumo e digestibilidade dos nutrientes	8
Fermentação Ruminal.....	9
OBJETIVOS	12
MATERIAL E MÉTODOS.....	13
Local e animais.....	13
Tratamentos.....	13
Delineamento experimental e estatística	15
Digestibilidade aparente dos nutrientes	15
Valores de pH e concentrações ruminais de nitrogênio amoniacal	17
Produção de gás metano.....	17
Quantificação de bactérias e protozoários líquido associados e bactérias sólido aderidas	18
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
Consumo e digestibilidade aparente dos nutrientes	19
Concentração ruminal de amônia e valores de pH	25
Produção de metano.....	28
Produção e composição da massa microbiana	30
CONCLUSÕES	38
IMPLICAÇÕES.....	39
REFERÊNCIAS.....	40

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1 – Composição bromatológica dos alimentos	14
Tabela 2 – Composição percentual e nutricional das dietas experimentais (%MS) 14	
Tabela 3 – Médias e regressão para os consumos de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDNcp), fibra em detergente ácido corrigida para cinzas e proteína (FDAcp), extrato etéreo (EE) e carboidratos não fibrosos (CNF) para os tratamentos com diferentes percentuais de glicerina. 21	
Tabela 4 – Médias e regressão para digestibilidade aparente da matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDNcp), fibra em detergente ácido corrigida para cinzas e proteína (FDAcp), extrato etéreo (EE) e carboidratos não fibrosos (CNF) para os tratamentos com diferentes percentuais de glicerina.	23
Figura 1- pH ruminal dos animais alimentados com diferentes percentuais de glicerina na dieta em função dos tempos de colheita.....	26
Figura 2 - Nitrogênio amoniacal dos animais alimentados com diferentes percentuais de glicerina na dieta em função dos tempos de colheita.	27
Tabela 5 – Produção de metano proveniente da fermentação ruminal de dietas com diferentes percentuais de glicerina	29
Tabela 6 – Produção e composição de bactérias líquido-associadas do rúmen de bovinos recebendo dietas com diferentes percentuais de glicerina. .	31
Tabela 7 – Produção e composição de protozoários líquido-associados do rúmen de bovinos recebendo dietas com diferentes percentuais de glicerina.	33
Tabela 8 – Produção e composição de bactérias sólido-aderidas do rúmen de bovinos recebendo dietas com diferentes percentuais de glicerina. .	36

UTILIZAÇÃO DE GLICERINA, SUBPRODUTO DO BIODIESEL, NA ALIMENTAÇÃO DE BOVINOS

RESUMO: A crescente preocupação com o aquecimento global incentiva as discussões sobre novas fontes de energia, destacando-se o biodiesel. O processo de produção desse biocombustível gera resíduos como tortas, farelos e glicerina. Os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos da inclusão de glicerina na ração de bovinos sobre, consumo, digestibilidade aparente dos nutrientes, produção de gases, pH, amônia, quantificação e composição da massa microbiana. O trabalho foi conduzido na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-FCAV/Unesp, campus de Jaboticabal, utilizando-se cinco bovinos mestiços. As dietas foram formuladas com a inclusão de 0, 5, 10, 15 e 20 % de glicerina na MS. O delineamento experimental foi quadrado latino 5 x 5. Os resultados foram submetidos à análise de variância e regressão adotando nível de significância de 5%. As dietas com glicerina resultaram em menores concentrações de extrato etéreo e carboidratos não fibrosos, o que levou a uma redução linear no consumo desses nutrientes ($p < 0,05$) em kg/dia, %PV/dia e g/kgPV^{0,75}. A digestibilidade da fibra em detergente neutro e carboidratos não fibrosos foi influenciada ($p < 0,05$) apresentando redução linear com o aumento do porcentual de glicerina na dieta. A fermentação ruminal foi alterada apresentando decréscimo linear na concentração ruminal de N-NH₃ com a inclusão desse subproduto. A inclusão de glicerina não influenciou a produção de metano em L/dia, g/dia, g/KgMSI e g/KgFDNi nem o pH ruminal entre os tratamentos. Não foram observados efeitos das dietas ($p > 0,05$) sobre as BSA, verificou-se apenas diferenças quanto ao tempo de colheita para MO% e N%. Foram verificadas reduções na produção e composição de BLA e PLA ($p < 0,05$) com a inclusão de glicerina na dieta. A utilização de altas concentrações de glicerina na dieta de bovinos necessita de maiores estudos para a determinação do limite de inclusão desse subproduto.

Palavras-chave: biodiesel, bovinos, digestibilidade, fermentação ruminal, metabolismo, subproduto

GLYCERIN, BIODIESEL BYPRODUCT, IN CATTLE FEED

SUMMARY: The growing concern about global warming encourages new discussions about energy sources, especially biodiesel. The biodiesel production generates residues as meals and glycerin. The aim of this work was to evaluate the effects of glycerin inclusion in the cattle diet on intake, apparent digestibility, ruminal gas production, pH, ammonia, microbial mass quantification and composition. The experiment was carried out in FCAV / Unesp, Jaboticabal campus, using five crossbred cattle. The diets were formulated with 0, 5, 10, 15 and 20% glycerin inclusion in DM. Statistical design was a 5X5 Latin Square. The results were submitted to variance analysis and regression adopting 5% level significance. The glycerin inclusion in the diets affected lipids and non-fiber carbohydrates concentrations and subsequently its intake in kg/day, %BW and g/kgBW^{0.75}. The neutral detergent fiber and nonfiber carbohydrates digestibility was influenced ($p<0.05$) showing linear decrease with glycerin increase in diet. The rumen fermentation showed linear decrease in NH₃-N ruminal concentration with glycerin inclusion. Glycerin inclusion didn't influenced methane production in L/day, g/day, g/kgDMI and g/kgNDFi, or ruminal pH between treatments. There were no diet effect ($p>0.05$) in the PAB for treatments, there was differences only in the time at feeding for OM% and N%. Reductions were observed in BLA and PLA production and composition ($p<0.05$) with glycerin inclusion in diet. The high concentrations of glycerin in cattle diets needs further studies to determine the limit inclusion of this byproduct.

Keywords: biodiesel, byproducts, cattle, digestibility, metabolism, ruminal fermentation

INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com o meio ambiente, o aquecimento global, o desenvolvimento sustentável e a possibilidade do fim das reservas fósseis no mundo, têm motivado diversos estudos acerca do biodiesel.

O biodiesel é um biocombustível oriundo de óleos vegetais ou gorduras animais que foi recentemente introduzido na matriz energética brasileira. O caráter renovável torna o produto uma fonte importante de energia no longo prazo. O biodiesel não contém petróleo, mas pode ser adicionado a ele formando uma mistura. Pode ser usado em motores de ignição a compressão (diesel) sem necessidade de modificação. Como se trata de uma energia limpa, não poluente, o seu uso em motor diesel convencional resulta, quando comparado com a queima do diesel mineral, em uma redução substancial de monóxido de carbono e de hidrocarbonetos não queimados.

O biodiesel é fabricado através de um processo químico chamado transesterificação onde a glicerina é separada da gordura ou do óleo vegetal.

A produção e o uso do biodiesel no Brasil propiciam o desenvolvimento de uma fonte energética sustentável sob os aspectos ambiental, econômico e social e também traz a perspectiva da redução das importações de óleo diesel. Em 2008, o uso do biodiesel evitou a importação de 1,1 bilhões de litros de diesel de petróleo resultando numa economia de cerca de US\$ 976 milhões, gerando divisas para o país.

O Brasil está entre os maiores produtores e consumidores de biodiesel do mundo, com uma produção anual, em 2008, de 1,2 bilhões de litros e uma capacidade instalada, em 2009, para 3,7 bilhões de litros. O percentual de adição de biodiesel ao óleo diesel está em contínua elevação, em 2008 o Governo Federal definiu que o biodiesel fosse obrigatoriamente adicionado ao diesel do petróleo num percentual de 2%, o chamado B2. Desde 1º de julho de 2009 todo óleo diesel comercializado no Brasil contém 4% de biodiesel, programa B4 e atualmente a adição é de 5% (ANP, 2009).

Entretanto o grande volume de glicerina gerado através da reação de transesterificação pode prejudicar o aspecto ecológico do biodiesel. Estima-se que com a adição de 4% o excedente de glicerina no mercado foi de aproximadamente 264 mil toneladas/ano e com a adição de 5% chegará a 325 mil toneladas/ano (MOTA et al., 2009). A glicerina resultante do processo de obtenção do biodiesel não possui legislação específica para seu descarte, sendo armazenada e conseqüentemente se acumulando nas usinas de produção de biodiesel, formando grandes estoques desse subproduto.

A dificuldade de acomodação do excedente de glicerina se agrava porque a glicerina resultante da produção de biodiesel tem características diferentes da que é utilizada na indústria de higiene e cosmética. A forma obtida no processo de produção de biodiesel vem misturada a água, ácidos graxos e sabões. Só depois de purificada é que a substância pode ser utilizada na área de química fina e no setor alimentício. Mas a tecnologia exigida para extração das impurezas tem custo elevado e é dominada por apenas algumas empresas brasileiras (DINIZ, 2005).

Diante disto há necessidade de maiores pesquisas sobre outras formas de utilização da glicerina. Uma alternativa é o emprego deste subproduto na alimentação animal, podendo ser acrescentada na ração como fonte energética para os animais. Na literatura são escassos os trabalhos científicos realizados com a inclusão de glicerina na dieta de ruminantes, portanto o seu metabolismo no organismo animal não está elucidado.

O interesse dos confinadores de bovinos de corte por alternativas alimentares vem crescendo nos últimos anos, e esta tendência se acentua de forma significativa com os elevados preços do milho. A inclusão de alimentos alternativos em dietas para bovinos em confinamento tem como principal objetivo baixar os custos de alimentação, mantendo desempenho satisfatório (FONTES, 2005). O crescente aumento da inclusão de biodiesel ao óleo diesel torna a glicerina um ingrediente com potencial para utilização na alimentação animal visto o acúmulo desse subproduto nas usinas. Além disso, apresenta disponibilidade em todo o país a preços acessíveis quando comparada ao valor do milho. No período em que o experimento foi conduzido (setembro a dezembro de 2008) a glicerina era comercializada a R\$ 180,00/ton enquanto o milho era vendido a R\$ 300,00/ton.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Biodiesel

O biodiesel surgiu mundialmente como uma alternativa promissora aos combustíveis minerais, derivados do petróleo. A crescente preocupação com o meio ambiente, aliada à busca por fontes alternativas de energia renováveis, tem colocado o biodiesel no centro das atenções e interesses (ABDALLA, 2008). Por ser considerado um combustível ecológico, biodegradável, atóxico, livre de enxofre e compostos aromáticos, o biodiesel pode promover substancial redução na emissão de monóxido de carbono e hidrocarbonetos para o meio ambiente.

O biodiesel pode ser produzido a partir de gorduras animais ou por extração química ou mecânica de sementes oleaginosas, existindo dezenas de espécies vegetais no Brasil que podem ser utilizadas, tais como: mamona, dendê, girassol, babaçu, nabo forrageiro, amendoim, pinhão manso e soja (MCT, 2009).

Devido à alta viscosidade do óleo obtido, o fluxo do óleo no motor torna-se mais lento, sendo necessária a retirada da glicerina do óleo vegetal para a redução da viscosidade. A remoção da glicerina é realizada principalmente pelo processo de transesterificação, no qual o óleo vegetal reage com um álcool (metanol ou etanol) na presença de um catalisador (podendo ser ácido, básico ou biológico). O resultado dessa reação é um éster monoalquilado (biodiesel) e seu principal subproduto é a glicerina (PLÁ, 2002). Após a reação, por diferença de densidade ocorre a precipitação da glicerina permitindo a retirada do biodiesel (SOUZA, 2006). Segundo DASARI et al. (2005) para cada 90 m³ de biodiesel produzidos pela reação de transesterificação de óleos vegetais são gerados 10 m³ de glicerina.

Segundo ROBRA (2004), os preços da glicerina originada da produção de biodiesel vêm sofrendo forte pressão de queda em função da elevação da oferta, especialmente nos mercados europeu e americano.

Atualmente a glicerina é utilizada principalmente na indústria química para síntese de resinas e ésteres (18%), na indústria farmacêutica (7%), em cosméticos (40%), uso alimentício como umectante e conservante, no preparo de molho para

salada, coberturas de doces e sobremesas geladas (24%) e outros (11%). Entretanto, o excesso de produção de glicerina do biodiesel extrapolará a capacidade de utilização das indústrias químicas e farmacêuticas nos próximos anos (DONKIN, 2008).

Vários tipos e designações de glicerina estão disponíveis comercialmente, diferindo quanto ao conteúdo de glicerol e outras características como: cor, odor e impurezas. O termo glicerina refere-se ao glicerol na forma comercial, com pureza acima de 95%. É conhecida também como glicerol ou 1,2,3 propanotriol é um composto orgânico pertencente à função química álcool, líquido à temperatura ambiente (25°C), higroscópico, inodoro, viscoso e de sabor adocicado (IUPAC, 1993).

A glicerina bruta é definida como a glicerina separada do biodiesel, sem sofrer qualquer tipo de purificação, apresenta-se na forma de líquido viscoso pardo escuro. As características físicas, químicas e nutricionais do glicerol bruto dependem do tipo de ácido graxo (gordura animal ou óleo vegetal) e do tipo de catálise empregada na produção de biodiesel (RIVALDI et al., 2007). A chamada glicerina loura é normalmente utilizada para designar a glicerina oriunda dos processos de produção de biodiesel, onde a fase glicerínica sofreu tratamento ácido para neutralização do catalisador e remoção de ácidos graxos eventualmente formados no processo. Em geral, essa glicerina contém cerca de 80% de glicerol, além de água, álcool e sais dissolvidos (VERONESE et al., 2009) e apresenta coloração mais clara que a glicerina bruta. Nas plantas de produção de biodiesel no Brasil, o álcool utilizado é o metanol, assim como o catalisador mais utilizado é o hidróxido de sódio.

O glicerol está presente em todos os óleos e gorduras de origem animal e vegetal em sua forma combinada ligado a ácidos graxos tais como o ácido estereárico, oléico, palmítico e láurico para formar moléculas de triacilglicerol. Sua temperatura de fusão é de 17,8 °C, é decomposto aos 290 °C e é miscível em água e álcool (PERRY & GREEN, 1997; PACHAURI & HE, 2006).

O glicerol é um componente do metabolismo normal dos animais, sendo encontrado na circulação e nas células. Ele é derivado de lipólise no tecido adiposo, hidrólise dos triglicerídeos das lipoproteínas do sangue e gordura dietética (LIN, 1977). Entretanto, existe pouca informação sobre as implicações metabólicas da

suplementação exógena de glicerol na dieta, especialmente quando a suplementação atinge grandes proporções como um ingrediente energético das rações.

Glicerina na alimentação animal

A ideia da utilização de alimentos não convencionais para ruminantes vem ganhando espaço nos últimos anos, principalmente com o objetivo de atender às dificuldades de pequenos produtores, para os quais muitas vezes o custo de alimentação dos animais é um impedimento para a criação.

Do ponto de vista nutricional, a glicerina tem surgido como uma fonte alimentar energética alternativa e promissora na produção animal, particularmente para ruminantes, pois, assemelha-se ao propilenoglicol (substância gliconeogênica), utilizado com grande eficiência na alimentação de vacas leiteiras de alta produção. De acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA, 21 C.F.R. 582.1320, 2006) a glicerina tem seu uso seguro e reconhecido na alimentação animal, no entanto, o teor de metanol presente na glicerina deverá ser levado em consideração, não devendo ultrapassar 150 mg/kg. De acordo com CHUNG et al. (2007) o interesse está no fato de ser um componente estrutural de triglicerídeos e dos fosfolípidos. Quando o organismo utiliza a reserva corporal de gordura como fonte de energia, ácidos graxos e glicerol são liberados no fluxo sanguíneo, podendo ser este convertido em glicose no fígado (KREBS et al., 1966) e rins (KREBS & LUND, 1966) para prover energia ao metabolismo celular.

Segundo DONKIN (2008), o glicerol não é um carboidrato, porém é fermentado no rúmen a ácidos graxos de cadeia curta, de modo que 50 a 70% do glicerol desaparecem do rúmen em 4 horas, levando a um aumento na produção de propionato. Outros pesquisadores reportaram aumentos nos teores de ácido acético e propiônico (WRIGHT, 1969) ou nos ácidos propiônico e butírico (CZERKAWSKI & BRECKENRIDGE, 1972). RÉMOND et al. (1993) também verificaram aumento nos teores de ácidos propiônico e butírico avaliando a fermentação *in vitro*.

De acordo com SILVA & LEÃO (1979), no rúmen o glicerol pode ser metabolizado por microorganismos como, por exemplo, *Selenomonas ruminantium*,

fornecendo como principal produto da fermentação o ácido propiônico. O propionato é um precursor de ácidos graxos com número ímpar de carbono e é precursor da glicose metabólica em ruminantes, de modo que com o uso da glicerina, poderá ser reduzida a inclusão de altas quantidades de concentrado na dieta, que poderiam prejudicar o desempenho do animal, gerando redução no pH ruminal e favorecendo distúrbios como a acidose e laminite (PALMQUIST & BEAULIEU, 1993), sem diminuir o aporte de substâncias neoglicogênicas.

A maioria dos trabalhos relacionados à inclusão de glicerina na dieta está na área de bovinocultura leiteira. A glicerina tem sido utilizada com eficiência desde 1954 (JOHNSON, 1955) na prevenção de cetose em vacas de alta produção de leite (SCHRÖDER & SÜDEKUM, 1999) por aumentar o suprimento de precursores da glicose (FISHER et al., 1971; SAUER et al., 1973). Segundo DONKIN (2008), a inclusão de glicerina na dieta de vacas leiteiras tem sido utilizada recentemente para prevenção de distúrbios metabólicos associados ao período de transição, sendo a recomendação para esta fase de 5 a 8% na matéria seca da dieta.

DRACKLEY et al. (1992), em estudos adicionando até 10% de glicerina na matéria seca da dieta em substituição aos grãos, verificou que a glicerina é um ingrediente em potencial para vacas em lactação (principalmente no pico da lactação), pois contém praticamente o mesmo teor de energia na matéria seca que o milho e essa substituição não causou impactos sobre a produção e qualidade do leite. No entanto, a pureza é uma variável a ser considerada, por conter água, metanol, fósforo e potássio em sua composição.

OGBORN (2006) verificou que a produção e composição do leite não foram alteradas quando suplementou vacas com glicerina como fonte energética no pré-parto. A utilização de glicerina como fonte energética é viável em várias fases da lactação, no pré-parto (FISHER et al., 1973; DeFRAIN et al., 2004), no início da lactação (FISHER et al., 1971) e no meio da lactação (KHALILI et al., 1997). De acordo com DONKIN (2008), há necessidade de se estudar a inclusão de glicerina na dieta de vacas em lactação após o período de transição e em concentrações mais elevadas (maior que 15% na matéria seca da dieta).

A partir do ano 2000, foram conduzidos estudos na Europa e EUA visando a utilização da glicerina, subproduto do biodiesel, na alimentação de ruminantes,

podendo ser acrescentada na ração como fonte energética para os animais, mas a disponibilidade de informações é restrita gerando a necessidade de novas pesquisas. Além disso, a maioria das pesquisas relacionadas à inclusão de glicerina com bovinos de corte está relacionada ao desempenho animal e qualidade de carne, sendo necessário, portanto estudos relacionados ao metabolismo de animais que receberam este subproduto.

PYATT et al. (2007), ao substituir 10% do milho por glicerina na dieta de terminação de novilhos cruzados, observaram redução no consumo de matéria seca de 10,1% para os animais alimentados com glicerina entretanto, verificaram maiores ganhos de peso e melhor conversão alimentar para os animais que receberam esse ingrediente. Esses resultados indicam que o fornecimento de glicerina pode melhorar a eficiência de animais alimentados com dietas com elevadas quantidades de alimentos concentrados.

PARSONS et al. (2009), utilizando dietas com alto concentrado (94%) à base de milho e farelo de soja e feno de alfafa como volumoso, forneceram 0, 2, 4, 8, 12 ou 16% de glicerina em substituição ao milho da dieta de novilhas de corte em terminação observaram redução linear no consumo de matéria seca para os animais que receberam concentrações a partir de 4% de glicerina, os animais que receberam o tratamento controle (sem glicerina) consumiram 8,84 kgMS/dia enquanto os animais que receberam 4, 8, 12 e 16% consumiram 8,66; 8,61; 8,40 e 7,80 kgMS/dia, respectivamente. A inclusão de glicerina proporcionou maior ganho de peso e melhor eficiência alimentar nos animais que consumiram dietas com até 8% de glicerina.

MACH et al. (2009) avaliaram os efeitos da glicerina nas concentrações 0, 4, 8 ou 12% em substituição aos grãos de cereais utilizados na dieta (milho e cevada), sobre a fermentação ruminal, desempenho e qualidade de carne de novilhos leiteiros confinados recebendo dietas com alto concentrado. Os autores observaram redução no pH ruminal de animais alimentados com 8% de glicerina e não observaram efeitos sobre as concentrações molares de ácidos graxos de cadeia curta. O consumo de matéria seca não foi alterado com a inclusão de glicerina apresentando valor médio de 8,27 kg/dia. Os autores concluíram que a glicerina pode ser utilizada

como fonte energética substituindo cereais nas dietas de animais em terminação em concentrações de 12%, sem afetar o desempenho e qualidade de carne.

Segundo ANONYMOUS (1995) nenhuma restrição legal foi relatada para a inclusão de glicerol na alimentação animal, quer seja considerada a espécie animal ou a quantidade a ser fornecida. O conhecimento da qualidade deste subproduto como fonte alternativa para alimentação de bovinos, assim como o seu potencial de utilização deve ser investigado.

Levando-se em consideração a escassez de pesquisas e informações acerca da utilização da glicerina na nutrição de bovinos de corte aliada à grande importância da atividade de produção de biodiesel no Brasil, acredita-se que este subproduto possa vir a ser utilizado como fonte energética alternativa em dietas para terminação de bovinos em confinamento, substituindo alimentos convencionais como o milho.

Consumo e digestibilidade dos nutrientes

O consumo de alimentos é função do animal (peso, nível de produção, tamanho), do alimento (FDN efetiva, volume, capacidade de enchimento, densidade energética, necessidade de mastigação), das condições de alimentação (disponibilidade de alimentos, espaço no cocho, tempo de acesso ao alimento, frequência de alimentação), bem como dos fatores do meio ambiente que envolvem temperatura e duração do dia (MERTENS, 1993)

O coeficiente de digestibilidade de uma dieta é importante por indicar que nutrientes realmente estão disponíveis para utilização pelo animal, constituindo um dos principais parâmetros para avaliação do valor nutritivo de alimentos consumidos por bovinos. Uma variedade de alimentos e subprodutos da agroindústria podem ser usados na alimentação de ruminantes e o seu valor nutricional é determinado por uma complexa interação de seus constituintes e pela interação com os microrganismos do trato digestivo, nos processos de digestão e absorção, no transporte e na utilização dos metabólitos, além da própria condição fisiológica do animal (PRADO et al., 2000). Frequentemente pesquisadores buscam alimentos economicamente viáveis e que atendam os requisitos de desempenho produtivo.

A utilização de subprodutos na alimentação de ruminantes substituindo ingredientes nobres da dieta como o milho e farelo de soja surge como alternativa que atende a duas demandas: maximização de lucros e redução do acúmulo destes materiais no ambiente (PRADO & MOREIRA, 2002). A utilização bem sucedida desses ingredientes é muitas vezes limitada tanto pelo escasso conhecimento de suas características nutricionais e de seu valor econômico como componentes para ração, como pela falta de dados de desempenho de animais alimentados com esse tipo de alimento.

O consumo de nutrientes pelos animais está relacionado diretamente ao aporte de nutrientes e, conseqüentemente, ao atendimento de suas exigências nutricionais. A digestibilidade está relacionada com o consumo e depende da qualidade e do balanceamento da ração (PEREIRA et al., 2006). De acordo com MERTENS (1994), 60 a 90% das variações no desempenho são explicadas pelas variações correspondentes a ingestão e apenas 10 a 40% pelas variações na digestibilidade.

O milho é considerado um alimento energético devido à sua composição predominantemente de carboidratos (amido) e lipídeos. Cerca de 70% da produção mundial de milho é destinada à alimentação animal, apresentando concorrência com a alimentação humana além do alto custo para o produtor. Dessa forma, é oportuno fazer comparações do milho com outras fontes energéticas.

De acordo com DONKIN (2008) a glicerina provinda do biodiesel será o “novo milho” para a alimentação de ruminantes, podendo-se incluir até 15% na matéria seca da dieta, sem interferir na ingestão de alimentos nem na produção animal.

Fermentação Ruminal

A fermentação ruminal é resultado das atividades físicas e microbiológicas que transformam os componentes da dieta em produtos úteis (ácidos graxos de cadeia curta, proteína microbiana e vitaminas do complexo B), inúteis (gases metano e carbônico) ou até mesmo nocivos para o hospedeiro como amônia e nitrato (OWENS & GOETSCH, 1993). Para a manutenção e desenvolvimento de uma

população microbiana ruminal ativa, os animais devem manter o ambiente ruminal em condições adequadas.

O pH ruminal está diretamente relacionado com os produtos finais da fermentação e também com a taxa de crescimento dos microrganismos ruminais. Segundo ORSKOV (1986), o abaixamento do pH ruminal ocorre, principalmente, após a ingestão de alimentos, especialmente concentrados, devido à sua rápida taxa de fermentação. O pH é um fator químico que influencia o crescimento microbiano e pode ser afetado pela dieta e por outros fatores correlacionados, como o nível de consumo, a proporção volumoso:concentrado e o manejo alimentar (TIBO et al., 2000). Segundo STROBEL & RUSSELL (1986) o pH ruminal pode variar de 5,5 a 7,2, sendo que valores abaixo de 6,0 podem ser detectados logo após a alimentação dos animais com dietas ricas em concentrado podendo inibir bactérias fermentadoras de celulose e diminuir significativamente a eficiência de síntese de proteína microbiana.

A amônia ruminal é originária da degradação da proteína verdadeira da ração, do nitrogênio não protéico (NNP) da ração, do nitrogênio (N) reciclado para o rúmen na forma de uréia e da degradação das células microbianas mortas no rúmen. A concentração ruminal de amônia é função de sua produção e remoção, MEHREZ et al. (1977) afirmaram que o máximo de atividade fermentativa ruminal é obtida quando o nitrogênio amoniacal alcança valores entre 19 e 23 mg de $\text{N-NH}_3/\text{dL}$ de líquido ruminal. SATTER & SLYTER (1974) consideram 5 mg $\text{N-NH}_3/\text{dL}$ como a concentração mínima para adequada fermentação ruminal, contudo, faz-se a ressalva de que essa concentração seria o mínimo para manter a síntese microbiana. Já VAN SOEST (1994) citou como nível ótimo 10 mg de $\text{N-NH}_3/\text{dL}$. Todavia, este valor não deve ser considerado como um número fixo, devido à capacidade de síntese de proteína e captação de amônia pelas bactérias depender da taxa de fermentação dos carboidratos. Concentrações muito elevadas podem indicar acúmulo de amônia no rúmen, o que pode ser prejudicial ao animal.

A eficiência da utilização da amônia pelos microrganismos para a síntese microbiana depende, entre outros fatores, principalmente da disponibilidade de energia no rúmen (SANTOS, 2006). A otimização da fermentação ruminal, juntamente com a maximização da eficiência de síntese de proteína microbiana, tem

sido o foco de várias pesquisas. De acordo com o NRC (1996), 50 a 100% da proteína metabolizável exigida pelo bovino de corte pode ser atendida pela proteína de origem microbiana. Segundo KOZLOSKI (2002), o suprimento de proteína para o duodeno consiste da proteína microbiana sintetizada no rúmen, proteína dietética não-degradada e proteína endógena. A produção diária de proteína microbiana pode ser obtida como produto da eficiência microbiana, que usualmente é definida como g de nitrogênio microbiano sintetizado por kg de matéria orgânica (MO) fermentada no rúmen pelo consumo de MO degradável. Segundo HOOVER & STOKES (1991), o crescimento microbiano no rúmen é influenciado pela interação de fatores químicos, fisiológicos e nutricionais.

A quantidade de N exigida pelos microrganismos é função da quantidade de energia disponível no rúmen, porque os protozoários e bactérias precisam de nitrogênio e energia, simultaneamente, para que ocorra uma proliferação desejável (LUCCI, 1997).

Segundo CLARK et al. (1992), 59% da proteína que chega ao intestino delgado é de origem microbiana. Desta forma, a determinação da proteína microbiana tem sido área de interesse para o estudo da nutrição de ruminantes e a estimativa da contribuição da proteína microbiana no fluxo de proteína no intestino já está incorporada aos sistemas de avaliação de proteína em diversos países.

A fermentação de alimentos ingeridos pelos animais ruminantes produz ácidos de cadeia curta (AGCC), amônia, gases (CO_2 e CH_4) e células microbianas. Os AGCC são responsáveis pela a maior fonte de energia (65 a 75% da energia metabolizável ingerida). Contudo, a produção de dióxido de carbono e metano pelas bactérias ruminais e intestinais (*Methanobrevibacter* spp. e *Methanomicrobium mobile*) pode variar de 2% a 12% da energia bruta do alimento ingerido, com uma perda média de 6% (JOHNSON et al., 1993).

Além da representativa perda energética o metano é caracterizado como um importante gás de efeito estufa, e sua emissão contribui com aproximadamente 15% do aquecimento global (COTTON & PIELKE, 1995). De acordo com o USEPA (2000), a emissão global de metano de origem entérica é estimada em 80 milhões de toneladas ao ano, correspondendo a cerca de 22% das emissões totais de

metano gerada por fontes antrópicas, representando 3,3% do total dos gases de efeito estufa.

O metano é produzido em condições anaeróbias por microrganismos metanogênicos presentes no ambiente ruminal (LASSEY et al., 1997), sendo influenciado pela idade e nível produtivo do animal. A sua produção é modulada principalmente pela presença de dióxido de carbono e de hidrogênio livres no ambiente ruminal, onde, a partir do hidrogênio livre, ocorre a redução do dióxido de carbono por microrganismos metanogênicos, com consequente formação de metano. Atualmente, as pressões ambientais indicam ser a redução da emissão de metano de origem pecuária, um dos principais fatores para nortear as pesquisas com a produção de ruminantes (MACHMÜLLER, 2006).

O aumento na utilização da energia no rúmen, a maximização do uso do nitrogênio pelas bactérias ruminais e a redução das perdas por metano e amônia são alguns objetivos dos nutricionistas para aumentar com eficiência o desempenho animal. Uma das alternativas para atingir esses objetivos envolve a manipulação da fermentação ruminal, onde o complexo ecossistema hidrolisa e fermenta a fibra e demais nutrientes até produtos úteis e disponíveis ao hospedeiro que habita (EUGÈNE et al., 2004).

OBJETIVOS

Objetivou-se com esse trabalho avaliar a substituição do milho pela glicerina “loura” obtida do processo de produção do biodiesel sobre o metabolismo animal quanto aos parâmetros:

- Consumo e digestibilidade aparente da matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido, extrato etéreo e carboidratos não fibrosos;
- pH e concentrações ruminais de nitrogênio amoniacal;
- Quantificação e composição das bactérias e protozoários líquido associados e bactérias sólido aderidas;

- Produção de gás metano através do processo de fermentação ruminal.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e animais

Este trabalho foi desenvolvido na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-FCAV/Unesp, campus de Jaboticabal. A fase de campo foi realizada na Unidade Animal de Estudos Digestivos e Metabólicos e as análises laboratoriais no Laboratório de Ingredientes e Gases Poluentes (LIGAP).

Foram utilizados cinco bovinos mestiços, castrados, com idade aproximada de dois anos com peso médio de 500 kg, providos de cânulas permanentes no rúmen. Os animais ficaram alojados em baias individuais com livre acesso a bebedouros e cochos. Além disso, foi mantido manejo higiênico/sanitário rigoroso dos animais, sendo as baias e bebedouros higienizados diariamente.

Tratamentos

As dietas foram formuladas com cinco percentuais de glicerina (ausência, 5, 10, 15 e 20% da MS, respectivamente G0, G5, G10, G15 e G20) segundo o NRC (1996) para serem isoprotéicas e isoenergéticas, estabelecendo a relação volumoso:concentrado de 40:60. Os ingredientes utilizados foram: silagem de milho, milho moído, casca de soja, farelo de girassol, sal comum, suplemento mineral e glicerina. A glicerina foi obtida do óleo de soja e apresentou 83% de glicerol, 11% de água, 6% de sais (dos quais 99% é NaCl) e 0,01% de metanol (Caramuru Alimentos Ltda.). A composição bromatológica dos alimentos é observada na Tabela 1 e a composição percentual e nutricional das dietas experimentais é apresentada na Tabela 2.

Tabela 1 – Composição bromatológica dos alimentos

Alimentos	MS	PB ¹	FDN ¹	EM ²	EE ¹
Silagem de Milho	30,4	8,4	43,1	2,6	4,0
Milho moído	88,5	10,0	10,5	3,2	5,9
Casca de Soja	90,8	11,5	67,0	2,4	2,3
Farelo de Girassol	91,2	30,9	45,1	2,3	1,7
Glicerina	89,0	-	-	3,2 ³	-

¹%MS; ²Energia metabolizável (Mcal/kg MS), Fonte: NRC,1996. MS= matéria seca, PB= proteína bruta, FDN= fibra em detergente neutro, EE= extrato etéreo. ³Donkin, 2008

Tabela 2 – Composição percentual e nutricional das dietas experimentais (%MS)

Alimentos (%)	Dietas Experimentais				
	G0 ²	G5 ³	G10 ⁴	G15 ⁵	G20 ⁶
Silagem de milho	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0
Milho moído	39,2	33,0	27,3	21,9	15,6
Casca de soja	7,3	8,1	8,5	8,7	7,9
Farelo de girassol	12,5	12,9	13,2	13,4	15,5
Suplemento mineral ¹	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Sal comum	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Glicerina	0,0	5,0	10,0	15,0	20,0
Nutrientes (%)					
Proteína bruta	12,4	12,3	12,1	12,0	11,9
Energia metabolizável (Mcal/kg)	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6
Fibra em detergente neutro	33,6	33,5	32,8	32,7	32,5
Extrato etéreo	4,6	4,3	3,9	3,5	3,1

¹Suplemento 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; ²G0= ração com ausência de glicerina; ³G5= ração com inclusão de 5% de glicerina; ⁴G10= ração com inclusão de 10% de glicerina; ⁵G15= ração com inclusão de 15% de glicerina; ⁶G20= ração com inclusão de 20% de glicerina.

Os animais foram alimentados duas vezes ao dia, às 08h e 16h e receberam água limpa à vontade. Para o fornecimento da ração, diariamente a glicerina era pesada separadamente, misturada ao concentrado e misturada à silagem no momento da alimentação.

O período experimental teve duração de 125 dias e foi composto de cinco períodos de 25 dias, sendo os 14 primeiros para adaptação dos animais às dietas e os últimos 11 para coleta de dados.

Delineamento experimental e estatística

O delineamento experimental foi o quadrado latino 5 x 5. As pressuposições de normalidade dos dados e homogeneidade das variâncias foram testadas através do comando *proc univariate* opção *normal* e do teste de Levene, respectivamente, ao nível de significância de 5%. Os dados foram analisados por meio de análise de variância e regressão.

As análises de variância para o consumo, digestibilidade e produção de gases foram realizadas adotando o PROC GLM adotando nível de significância de 5%.

As análises de variância para o pH, amônia e massa microbiana foram realizadas adotando o PROC GLM. O esquema de análise foi em parcelas subdivididas, sendo a parcela principal as concentrações de glicerina e as sub-parcelas os tempos de colheita adotando nível de significância de 5%.

Como ferramenta de auxílio às análises utilizou-se o sistema de análises estatísticas (SAS 9.1, SAS Institute, Carry, NC, USA).

Digestibilidade aparente dos nutrientes

As rações foram fornecidas para que as sobras não ultrapassassem 10% do oferecido sendo as sobras recolhidas e pesadas diariamente. As amostras das sobras foram colhidas do 15º ao 18º dia do período experimental, totalizando quatro amostras/animal/período. Os alimentos foram amostrados no início de cada período. As amostras fecais (aproximadamente 100g) foram colhidas duas vezes ao dia diretamente do chão após a defecação, do 17º ao 20º dia do período experimental, no 17º dia às 9h e às 15h, havendo um incremento de uma hora das coletas de um dia para o outro, perfazendo um total de oito amostragens/animal/período. Posteriormente as amostras foram secas em estufa de circulação forçada de ar em

temperatura de 55 °C por 72 horas, moídas individualmente em moinho de faca a 1mm e misturadas, para formar amostras compostas de fezes e sobras.

As amostras de fezes, sobras e alimentos foram analisadas para teores de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), segundo AOAC (1995), fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDNcp) e fibra em detergente ácido corrigida para cinzas e proteína (FDAcp) utilizando as soluções propostas por VAN SOEST & WINE (1967) e a digestão realizada em autoclave (0,5 Kgf/cm², 111° C por 50 minutos) de acordo com o procedimento adaptado de PELL & SCHOFIELD (1992).

Os carboidratos não fibrosos foram calculados pela seguinte equação (SNIFFEN et al., 1992):

$$\%CNF = 100 - (\%PB + \%FDNcp + \%EE + \%MM)$$

Em que:

PB = Proteína bruta

FDN = Fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína

EE = Extrato etéreo

MM = Matéria mineral

O coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca e dos demais nutrientes foi determinada utilizando-se a fibra em detergente ácido indigestível (FDAi) como indicador interno, a qual foi determinada pela técnica de incubação *in situ* dos alimentos, das sobras e das fezes durante 264 horas segundo a técnica descrita por CASALI et al. (2008).

O cálculo dos coeficientes de digestibilidade aparente da MS e demais nutrientes foi realizado conforme descrito abaixo:

Coeficiente de Digestibilidade Aparente da Matéria Seca (CDMS)

$$CDMS = 1 - \frac{(\% \text{ indicador no ingerido})}{(\% \text{ indicador nas fezes})} \times 100$$

Coeficiente de Digestibilidade dos Nutrientes (CDN)

$$CDN = 1 - \frac{(\% \text{ indicador no ingerido})}{(\% \text{ indicador nas fezes})} \times \frac{(\% \text{ nutriente nas fezes})}{(\% \text{ do nutriente no ingerido})} \times 100$$

Valores de pH e concentrações ruminiais de nitrogênio amoniacal

Para determinar o pH e a concentração de amônia no líquido ruminal, foram colhidas amostras do fluido ruminal (cerca de 100 mL) no 16º dia, via cânula ruminal, nos tempos -1, 0, 1, 2, 4, 6 e 8 horas, em cada período experimental. O tempo 0 corresponde à amostra colhida imediatamente antes da primeira refeição (8h).

O pH foi medido imediatamente após a colheita com auxílio de peagâmetro digital. Em seguida foi determinada a concentração de nitrogênio amoniacal segundo a técnica de VIEIRA (1980). O processo é 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, adicionou-se de 5 mL de KOH à amostra na concentração de 2 mol/L. O destilado foi recebido em um recipiente contendo 10 mL de ácido bórico 2%, utilizado com indicador, até completar o volume de 50 mL. Finalmente a titulação foi realizada com HCl na concentração de 0,005 mol/L e calculada a concentração de amônia ruminal.

Produção de gás metano

A determinação da produção de gás metano foi realizada segundo GASTALDI (2003). As amostras de conteúdo ruminal foram colhidas no 21º dia do período experimental. O conteúdo foi filtrado obtendo-se o líquido de rúmen. Este líquido foi colocado em garrafas de vidro âmbar de 1L de capacidade, contendo 10 g da ração, na proporção de 80 mL de líquido para 1g de amostra de ração. Em uma das garrafas não foi adicionado substrato, sendo utilizada como “controle”. As garrafas foram seladas por um sistema de roscas, que possui apenas um orifício por onde fluiu o gás produzido para coletores individuais. As garrafas foram colocadas em banho-maria a 39 °C em ambiente escuro e, decorridas 12h de fermentação, foi feita a medição do volume de gás através do deslocamento do coletor causado pelo volume de gás produzido. Em seguida o gás foi colhido com uma seringa e a leitura de CO₂, CH₄, O₂ e N₂ foi feita por cromatógrafo de fase gasosa FINIGAN GC – 2001,

equipado com as colunas Porapak Q, peneira molecular e detector de condutividade.

A mensuração quantitativa e qualitativa dos gases produzidos pela fermentação *in vitro* do líquido ruminal dos bovinos foi transformada para condições normais de temperatura e pressão (CNTP). Para expressar os resultados em número de mols de metano, foi utilizada a equação universal dos gases descrita por METCALF & EDDY (2003).

Quantificação de bactérias e protozoários líquido associados e bactérias sólido aderidas

As amostras de conteúdo ruminal foram colhidas manualmente, aproximadamente 3 kg, nos tempos 0, 2, 5 e 8 horas após a alimentação no 25º dia do período experimental, entre o 22º e 24º dias não houve colheita de dados para que a microbiota ruminal fosse recuperada. Para separar a fase líquida da fase sólida o conteúdo ruminal foi filtrado em filtro de nylon com porosidade de 100 µm para separação e quantificação de bactérias e protozoários associados ao líquido e bactérias sólido aderidas de acordo com metodologia de MARTIN et al. (1994).

Para a identificação da fase líquida, o líquido ruminal (1 L) foi diluído com igual volume de solução tampão (COLEMAN, 1978), pré-aquecida a 39 °C. O líquido ruminal juntamente com a solução tampão foram incubados por 30 a 60 minutos a 39 °C. Nos últimos cinco minutos de incubação, foi adicionada glicose (1 g/L), para separar os protozoários do restante do conteúdo ruminal e otimizar a floculação. O pélete de protozoário (PLA) foi recuperado por centrifugação do fluido clarificado, a 1000 x g, por 10 minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente, este pélete foi lavado com solução tampão em filtro de nylon, com porosidade de 20 µm (1litro a 39 °C), para minimizar a contaminação por bactérias e resíduos de alimento. As bactérias líquido-associadas (BLA) foram obtidas pela centrifugação do fluido sobrenadante livre de protozoário a 15.000 x g, por 20 minutos a 4 °C.

A fase sólida foi identificada utilizando-se 200 g de amostra sólida ruminal a qual foi lavada e agitada manualmente, por cinco minutos, em um frasco com solução tampão, pré-aquecida a 39 °C (1 g de material fresco/4 mL de solução),

para remover a população não aderente associada à fase sólida. Após esse processo, foi realizada uma filtração em filtro de náilon de 100 µm. O filtrado foi centrifugado a 1.000 x g, por 10 minutos, à temperatura ambiente, para recuperar o pélete de pequenas partículas de sólido que estavam associadas às grandes partículas que ficaram retidas no filtro. As partículas grandes e pequenas foram combinadas e suspensas em solução tampão (1 g de sólido/4 mL) pré-resfriado a 4 °C e, posteriormente, foram processadas por cinco minutos em “Stomacher® 400 circulator”. Este processo mecânico tem como objetivo separar a bactéria associada e algum fungo ou protozoário aderidos nas partículas, através da homogeneização por combinação de forças mecânicas, esmagando e agitando o material. O homogeneizado foi filtrado em um filtro de náilon com porosidade de 100 µm. O resíduo sobre o filtro foi lavado com a solução tampão (1 g de sólido/4 mL) e filtrado novamente. Os filtrados que continham a população aderente foram agrupados e centrifugados a 1.000 x g por 10 minutos, a 4 °C, para descartar o resíduo de alimento. A fração sobrenadante foi centrifugada a 27.000 x g por 30 minutos, a 4 °C. O sedimento resultante corresponde às BSA. Em seguida as amostras foram liofilizadas e analisadas quanto aos teores de N, MS e MM, estimando-se os teores de MO.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Consumo e digestibilidade aparente dos nutrientes

Os consumos de MS, MO, PB, FDNcp e FDAcp (kg/dia, %PV/dia e g/kgPV^{0,75}), não foram influenciados pelo o aumento no percentual de glicerina da dieta (Tabela 3). O baixo valor de consumo obtido no tratamento G20 pode estar relacionado com a presença de NaCl (6% de sais dos quais 99% é NaCl) na glicerina utilizada, sendo que no tratamento com 20% de glicerina o consumo de sal pode ter limitado a ingestão de MS.

Os consumos de EE e CNF em kg/dia, %PV/dia e g/kgPV^{0,75} sofreram redução linear com o aumento da concentração de glicerina na dieta. A redução nas ingestões de EE e CNF está relacionada à concentração desses nutrientes na dieta. Pode-se observar na Tabela 2 que a substituição do milho pela glicerina proporcionou a redução na porcentagem de EE na dieta de 4,6% para 3,1% comparando-se às dietas G0 e G20 respectivamente.

Em relação aos CNF a principal fonte quantitativa na dieta é o milho e ao substituir o milho pela glicerina, que não apresenta carboidratos em sua composição, a concentração desse nutriente na dieta decresce causando a diminuição no consumo desses nutrientes com o aumento na concentração de glicerina. A diminuição do percentual de CNF da dieta e consequentemente a redução de seu consumo pode reduzir a energia necessária para o adequado crescimento microbiano.

Reduções no consumo de MS tem sido verificadas em bovinos que receberam glicerina e a literatura aponta possíveis razões para esse efeito, variando desde efeitos sobre o metabolismo ruminal até efeitos sobre o metabolismo intermediário dos animais que a ingerem. ROGER et al. (1992) observaram que a adição de 5% de glicerina na dieta inibe o crescimento e atividade celulolítica das bactérias ruminais e concluíram que pequenas inclusões desse subproduto na dieta pode ser benéfica, entretanto concentrações acima de 5% podem alterar a fermentação ruminal resultando em queda na ingestão de matéria seca. Segundo TRABUE et al. (2007) o acúmulo de ácido láctico no rúmen pode reduzir a fermentação do glicerol alterando o consumo.

PARSONS et al. (2009) utilizando 0, 2, 4, 8, 12 ou 16% de glicerina na dieta de novilhas em terminação observaram redução significativa de consumo de matéria seca a partir de 4% de inclusão de glicerina na dieta. Os autores concluem que inclusões de até 8% de glicerina na dieta de novilhas em terminação proporcionam melhor eficiência alimentar e maior de ganho de peso. Com isso, pode-se observar que mesmo havendo redução no consumo de matéria seca com o aumento na concentração de glicerina na dieta a utilização desse ingrediente não afeta o desempenho animal.

Tabela 3 – Médias e regressão para os consumos de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDNcp), fibra em detergente ácido corrigida para cinzas e proteína (FDAcp), extrato etéreo (EE) e carboidratos não fibrosos (CNF) para os tratamentos com diferentes percentuais de glicerina.

Item	Tratamentos					Regressão	r ²	CV%
	G0	G5	G10	G15	G20			
	kg/dia							
MS	10,2	10,4	10,4	10,0	9,3	$\hat{Y}=10,0$		8,2
MO	8,8	8,9	9,0	8,6	8,1	$\hat{Y}=8,7$		7,7
PB	1,2	1,2	1,2	1,1	1,0	$\hat{Y}=1,2$		4,1
FDNcp	3,5	3,5	3,5	3,4	3,1	$\hat{Y}=3,4$		7,5
FDAcp	2,1	2,2	2,1	2,1	2,0	$\hat{Y}=2,1$		7,2
EE	0,5	0,5	0,4	0,4	0,3	$\hat{Y}=0,517-0,008X^{**}$	0,94	7,7
CNF	5,2	4,9	4,5	3,8	3,1	$\hat{Y}=5,651-0,105X^{**}$	0,93	9,7
	%PV/dia							
MS	1,7	1,7	1,7	1,7	1,6	$\hat{Y}=1,7$		6,9
MO	1,5	1,5	1,5	1,4	1,4	$\hat{Y}=1,5$		6,4
PB	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	$\hat{Y}=0,2$		7,1
FDNcp	0,6	0,6	0,6	0,6	0,5	$\hat{Y}=0,6$		6,3
FDAcp	0,3	0,4	0,4	0,3	0,3	$\hat{Y}=0,3$		6,3
EE	0,08	0,08	0,07	0,06	0,05	$\hat{Y}=0,086-0,001X^{**}$	0,94	7,6
CNF	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	$\hat{Y}=0,945-0,019X^{**}$	0,94	7,9
	g/ kgPV ^{0,75}							
MS	83,5	85,0	85,1	82,2	77,3	$\hat{Y}=82,6$		7,2
MO	72,2	73,5	73,6	71,1	67,2	$\hat{Y}=71,5$		6,7
PB	9,9	9,9	9,7	9,3	8,6	$\hat{Y}=9,5$		7,6
FDNcp	28,6	28,9	28,5	27,6	26,1	$\hat{Y}=27,9$		6,5
FDAcp	17,3	17,7	17,6	17,1	16,3	$\hat{Y}=17,2$		6,3
EE	3,4	3,7	3,5	3,1	2,6	$\hat{Y}=4,262-0,066X^{**}$	0,95	6,3
CNF	42,7	40,2	36,7	31,3	25,4	$\hat{Y}=46,634-0,874X^{**}$	0,94	8,3

**Significativo a 1% de probabilidade, r²= coeficiente de correlação, CV%= coeficiente de variação.

Resultados semelhantes foram obtidos por PYATT et al. (2007), que observaram redução no consumo de MS de 10,1% ao substituir 10% do milho da dieta para novilhos cruzados em terminação por glicerina; também verificaram que os animais que receberam esse ingrediente apresentaram maiores ganhos de peso e melhor conversão alimentar, indicando que o fornecimento de glicerina pode melhorar a eficiência de animais alimentados com dietas com elevadas quantidades de alimentos concentrados.

MACH et al. (2009) avaliaram o desempenho de novilhos leiteiros confinados recebendo glicerina em dietas com alto concentrado com inclusões de 0, 4, 8 e 12% de glicerina na matéria seca da dieta. A glicerina utilizada foi semelhante a desse experimento, sendo obtida do processo de produção do biodiesel a partir do grão de soja com 85,7% de glicerol, 8,6% de água, 5,5% de sais e 0,09% de metanol. Os autores não encontraram diferença no consumo de matéria seca e indicando que a glicerina pode ser utilizada como fonte energética na ração, mas ressaltam que a presença de sal e metanol pode interferir no consumo de MS e desempenho animal.

As diferenças encontradas em relação aos resultados de consumo de matéria seca entre os trabalhos podem ser causadas tanto pela composição da glicerina que varia de acordo com o método de obtenção, quanto por seus efeitos intrínsecos ao glicerol no metabolismo ruminal e do animal. Substâncias como sais e metanol, que são utilizados no processo de transesterificação, podem influenciar a palatabilidade da glicerina obtida (CHUNG et al., 2007). Além disso, a pureza da glicerina utilizada também pode influenciar a aceitabilidade pelos animais.

SCHRÖDER & SÜDEKUM (1999), em estudos de digestibilidade *in vivo* e *in vitro*, avaliaram a adição de 10, 15 ou 20% de glicerol combinado com dietas com alto e baixo amido e diferentes purezas do glicerol, alta (2,5% de água e 99,8% de glicerol), média (1,1% de água, 85,3% de glicerol e 0,04% de metanol) e baixa (26,8% de água, 63,3% de glicerol e 26,7% de metanol), as porcentagens de glicerol e metanol estão expressos em %MS. Foi verificado por esses autores que a inclusão de 10% de glicerina na matéria seca da dieta não causou efeito sobre a ingestão de alimento e de água, sobre a degradação ruminal e a digestibilidade dos nutrientes por todo trato digestivo. Também não evidenciaram efeito sobre a microbiota ruminal.

Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da MS, MO, PB, FDAcp e EE não foram influenciados pelos tratamentos, com valores médios de 61,2%; 62,7%; 68,5%; 39,1% e 86,3%, respectivamente (Tabela 4). Pode-se verificar que o tratamento G5 apresentou numericamente os maiores valores de digestibilidade.

A inclusão de 5% de glicerina não alterou os coeficientes de digestibilidade da FDNcp e CNF. Observa-se redução linear na digestibilidade desses nutrientes a partir de 10% de inclusão de glicerina na dieta ($p < 0,05$).

Tabela 4 – Médias e regressão para digestibilidade aparente da matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDNcp), fibra em detergente ácido corrigida para cinzas e proteína (FDAcp), extrato etéreo (EE) e carboidratos não fibrosos (CNF) para os tratamentos com diferentes percentuais de glicerina.

Item	Tratamentos					Regressão	r^2	CV%
	G0	G5	G10	G15	G20			
			%					
MS	62,7	65,6	61,4	58,8	57,6	$\hat{Y}=61,2$		8,6
MO	64,1	66,7	62,9	60,2	59,6	$\hat{Y}=62,7$		8,4
PB	70,5	73,4	68,9	67,8	61,9	$\hat{Y}=68,5$		15,8
FDNcp	46,8	52,4	41,5	34,9	31,5	$\hat{Y}=53,373-0,841X^*$	0,69	22,9
FDAcp	42,6	45,1	39,1	34,2	34,3	$\hat{Y}=39,1$		25,8
EE	89,1	87,6	86,9	84,1	83,8	$\hat{Y}=86,3$	0,69	3,6
CNF	82,0	82,2	80,7	80,3	77,0	$\hat{Y}=83,3-0,221X^*$	0,80	2,6

*Significativo a 5% de probabilidade, r^2 = coeficiente de correlação, CV%= coeficiente de variação.

A casca de soja e o farelo de girassol foram as principais fontes de fibra da dieta. A casca de soja é o resíduo proveniente do preparo do farelo, constituído principalmente de cascas, apresentando teores elevados de FDN (67,0% e 60,3%) e FDA (50,2% e 50,5%) (CUNNINGHAM et al., 1993 e SMET et al., 1995, respectivamente). No entanto essa fibra é considerada altamente degradável, pela menor porcentagem e arranjo da lignina da casca de soja (MacGREGOR et al., 1976), portanto esse ingrediente não prejudicou a digestibilidade da fibra da dieta.

O farelo de girassol é uma fonte protéica de alta qualidade com ampla possibilidade de utilização (GALATI, 2004 e MENDES et al., 2005) entretanto seu

uso em dietas de bovinos deve ser cuidadoso quanto à concentração de fibras na dieta, pois esta apresenta elevado teor de lignina e baixa degradabilidade ruminal. Inclusões de até 20% de farelo de girassol nas dietas pode não prejudicar o desempenho produtivo, embora se tenha observado algum efeito sobre a digestibilidade (GARCIA et al., 2004) o que se atribui ao arranjo complexo da fibra desse ingrediente. Nesse trabalho a inclusão foi de 12 a 15% de farelo de girassol. Os valores inferiores de digestibilidade podem estar relacionados à maior quantidade de fibra proveniente do farelo de girassol que apresenta teor médio de lignina de 11,5% e degradabilidade efetiva ruminal da FDN de 15,0% com kd de 6,7%/h de acordo com GALATI (2004).

As variações na digestão da fibra também são atribuídas a quedas no pH ruminal, em função do acúmulo de ácidos graxos de cadeia curta oriundos da fermentação de fontes rapidamente degradáveis (RUSSELL & WILSON, 1996). Segundo VALADARES FILHO & PINA (2006), o pH ruminal pode variar de 5,5 a 7,2, com valores baixos detectados em intervalos de tempos curtos após alimentação dos animais com dietas ricas em concentrado, sendo que valores de pH abaixo de 6,0 podem inibir as bactérias fermentadoras de celulose. Foram detectados valores de pH de 5,9 para os tratamentos G15 e G20 após 2h de alimentação (Figura 1). Sabe-se que as bactérias celulolíticas necessitam de amônia para seu crescimento e, conseqüentemente, possibilitar maiores taxas de degradação da fração fibrosa. Observando os dados de N-NH₃ obtidos nesse trabalho (Figura 2), verifica-se redução linear na concentração de N-NH₃ com o aumento do porcentual de glicerina na dieta, conseqüentemente, a redução na disponibilidade de amônia poderia estar relacionada com a diminuição da digestibilidade da FDN.

O principal carboidrato correspondente aos CNF nessa dieta foi o amido e, segundo VAN SOEST (1994), o amido tem alta digestibilidade. Entretanto compostos fenólicos, que estão presentes em alguns ingredientes são fatores antinutricionais que afetam a digestão do amido. Segundo DORREL (1976), o ácido clorogênico é o principal composto fenólico presente nas sementes de girassol e de acordo com MANDARINO (1997) o ácido clorogênico corresponde a mais de 70% do total dos vários compostos fenólicos presentes no farelo de girassol. No farelo de girassol pode-se encontrar de 2 a 4 g de ácido clorogênico em 100 g. A inclusão em

alta concentração de farelo de girassol na dieta animal acarreta em maiores quantidades desse ácido causando diminuição das enzimas hidrolíticas e interferindo na utilização de vários nutrientes, incluindo proteínas, aminoácidos e minerais (HARINDER et al. , 2007). A presença dessa substância antinutricional pode ter afetado a digestibilidade dos CNF.

A redução na digestibilidade e consumo dos CNF pode diminuir a energia rapidamente fermentável no rúmen e consequentemente reduzir as produções de proteína microbiana e ácidos graxos de cadeia curta totais.

Concentração ruminal de amônia e valores de pH

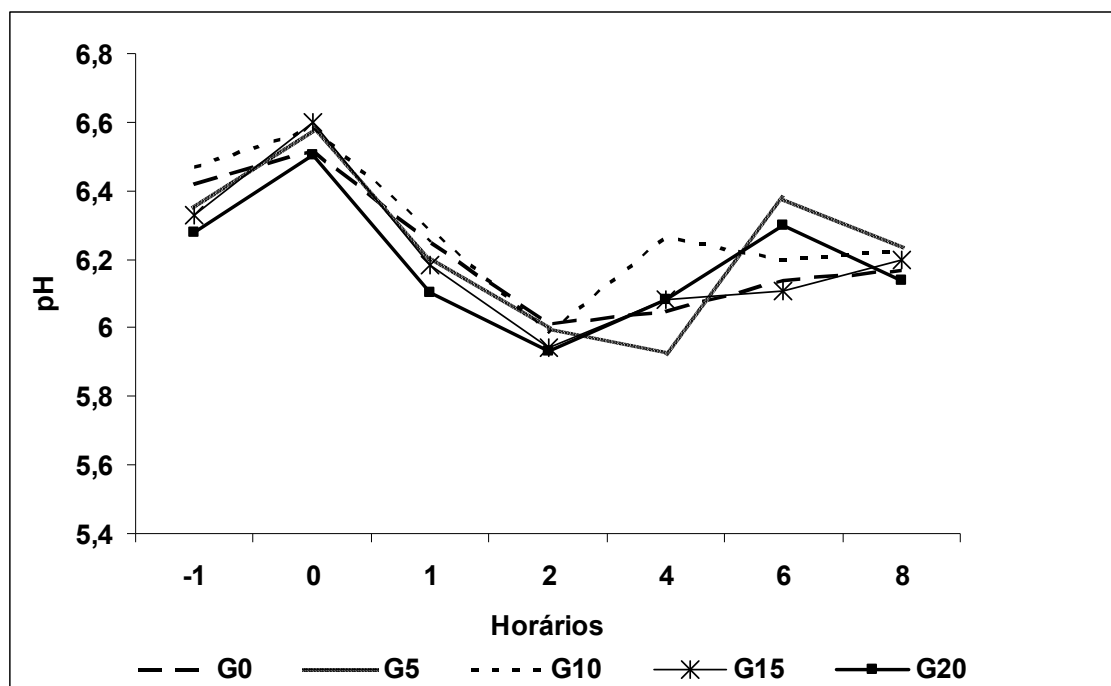
Não foram detectados efeitos da interação tempo x tratamento para os valores de pH e concentração de amônia ruminal ($p>0,05$). O pH ruminal, parâmetro indicativo da fermentação ruminal não foi afetado pela inclusão de glicerina na dieta ($p>0,05$) apresentando valor médio de 6,2 (Figura 1). A variação média de pH em função dos tempos de colheita apresentou comportamento quadrático ($p<0,01$) definido pela equação: $Y=6,33-0,116X+0,013X^2$; $r^2=0,79$. Os valores mínimos de pH foram encontrados entre 2 e 4 h após a alimentação (5,9 e 6,1 respectivamente) esses valores ficaram abaixo de 6,2; considerado limite mínimo para adequada fermentação da fibra (VAN SOEST, 1994).

Foram detectados valores de pH de 5,9 para os tratamentos G15 e G20 duas horas após a alimentação. Segundo HOOVER (1986), o pH ruminal abaixo de 6,0 diminui a digestão da fibra. Essas observações parecem indicar que a glicerina da dieta tenha efeito entre 2 e 4h pós-prandial, concordando com DONKIN (2008) que relata que cerca de 50 a 70% do glicerol ingerido desaparece do rúmen em até 4h, levando a um aumento na produção de propionato. O decréscimo no pH é resultante do intenso processo de fermentação e ao consequente aumento da produção dos ácidos graxos de cadeia curta e lactato (DONKIN, 2008). Se isso for, G15 e G20 provavelmente estariam produzindo quantidades de ácidos graxos de cadeia curta maiores que os demais tratamentos.

MACH et al. (2009) encontraram valor de pH de 5,68 em bovinos alimentados com 8% de glicerina, valor esse menor que os encontrados nos animais que não receberam glicerina ou alimentados com 4 ou 12% de glicerina (6,07; 6,06; 6,08;

respectivamente). Segundo os autores esse resultado pode estar relacionado ao maior consumo de concentrado pelos animais na dieta com 8% de glicerina quando comparado aos demais tratamentos.

Figura 1- pH ruminal dos animais alimentados com diferentes percentuais de glicerina na dieta em função dos tempos de colheita.



Média dos valores de pH em função dos tratamentos $\hat{Y}=6,2$

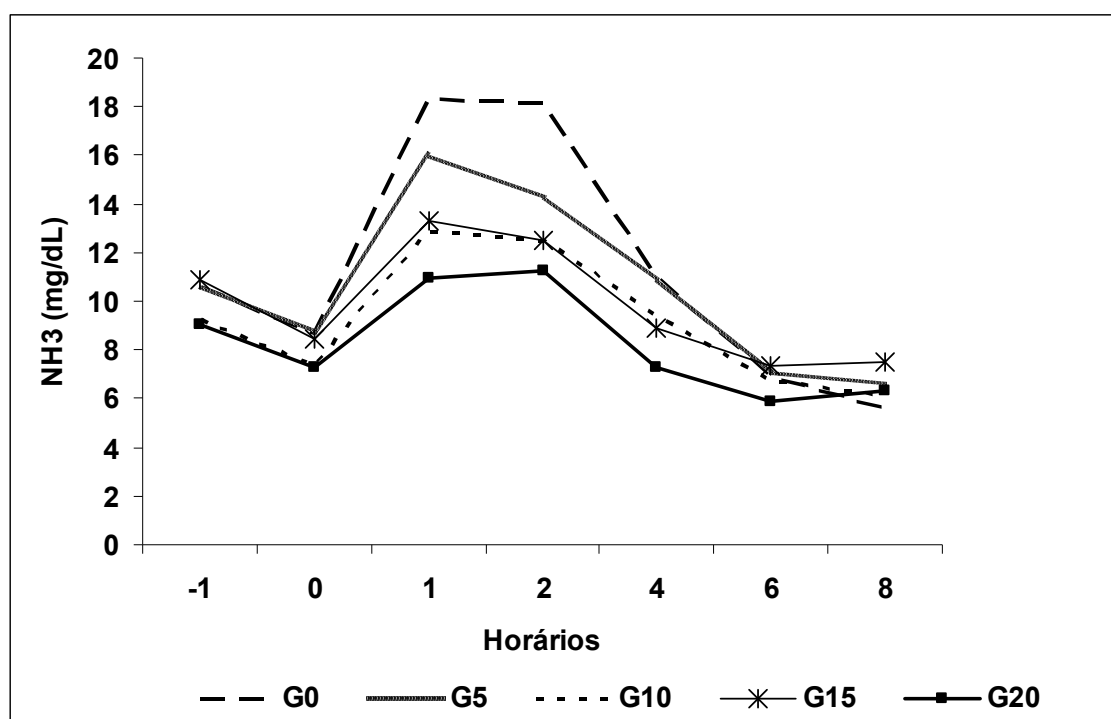
Equação de regressão em função dos tempos de colheita $\hat{Y}=6,33+0,013X^2-0,116X^{**}$; $r^2=0,79$

** Significativo a 1% de probabilidade. r^2 = coeficiente de correlação.

Na Figura 2 são demonstradas as concentrações ruminiais de nitrogênio amoniacal em função dos tempos de colheita dos animais que receberam os tratamentos com diferentes percentuais de glicerina. A inclusão de glicerina na dieta proporcionou decréscimo linear na concentração de amônia ruminal ($\hat{Y}=11,143-0,019X$; $r^2=0,73$; $p<0,01$). A concentração de $N-NH_3$ para o tratamento sem inclusão de glicerina apresentou superioridade média de 26,5% em relação ao tratamento G20. Devido ao fato de a maioria das bactérias celulolíticas exigirem amônia para o seu crescimento, baixas concentrações de NH_3 podem limitar a atividade microbiana e diminuir a taxa e a extensão da digestão da parede celular.

Houve efeito do tempo sobre as concentrações ruminais de amônia ($p>0,01$), a curva apresentou comportamento cúbico sendo que, os valores máximos foram encontrados entre 1 e 2h após a alimentação, com posterior queda no tempo 4 e ligeiro acréscimo 6h após a alimentação. Esse aumento está relacionado à disponibilidade de alimento no cocho no qual os animais se alimentavam durante esse período.

Figura 2 - Nitrogênio amoniacal dos animais alimentados com diferentes percentuais de glicerina na dieta em função dos tempos de colheita.



Equação de regressão em função dos tratamentos $\hat{Y}=11,143-0,019X^{**}$; $r^2=0,73$;

Equação de regressão em função dos tempos de colheita; $\hat{Y}=11,441+0,066X^3-0,871X^2+2,093X^{**}$; $r^2=0,62$

** Significativo a 1% de probabilidade. r^2 = coeficiente de correlação.

Verificou-se em todos os tratamentos, que a concentração de amônia ruminal ficou acima de 5 mg/dL (SATTER & SLYTER, 1974), considerada como mínima para adequada fermentação ruminal, contudo, faz-se a ressalva de que 5 mg de NH_3 /dL seria o mínimo para manter a síntese microbiana, enquanto que para otimizar efetivamente a fermentação, principalmente da fibra, seriam necessários de 15 a 29 mg de $N-NH_3$ /dL (PRESTON, 1986). As concentrações máximas obtidas foram de 18,3; 15,9; 12,9; 13,3 e 11,3 mg NNH_3 /dL, para os tratamentos G0, G5, G10, G15 e

G20, respectivamente. Pode-se evidenciar que os tratamentos com inclusões de glicerina a partir de 10% apresentaram concentrações abaixo do recomendado por PRESTON (1986), podendo comprometer o adequado crescimento microbiano.

Produção de metano

Não foram verificados efeitos da utilização de glicerina sobre a produção de metano ($p>0,05$). A produção de gases provenientes da fermentação ruminal pode variar de acordo com a dieta utilizada. Os valores médios de produção de metano foram de 161,3; 115,2; 11,5 e 34,0 expressos em L/dia, g/dia, g/KgMSI e g/KgFDNi, respectivamente (Tabela 5).

O'MARA (2004) descreveu que a proporção de concentrado na dieta apresenta correlação negativa com a emissão de metano, nesse experimento a relação volumoso:concentrado foi a mesma para todos os tratamentos.

Os resultados estão relacionados ao volume e concentração do gás produzido durante as 12h de incubação na metodologia *in vitro*. A concentração de metano nas amostras de gás colhidas foram próximas em todos os tratamentos, a maior variação foi obtida para o volume médio de cada tratamento, que expressos em mL nas condições normais de temperatura e pressão apresentaram os seguintes valores: 434,9; 416,3; 436,0; 488,6 e 351,3 respectivamente para G0, G5, G10, G15 e G20. Observa-se que o tratamento G5 e G20 produziram os menores volumes de gás enquanto o tratamento G15 apresentou o maior volume de gás não havendo portanto comportamento linear nem quadrático.

O método *in vitro* de produção de metano é comumente utilizado pela rapidez, ou quando é requerido grande número de análises em uma determinada avaliação. Entretanto, o acúmulo dos produtos finais da fermentação, assim como a dieta a que o animal doador do líquido ruminal é submetido, podem afetar os resultados (CHERNEY et al., 1993). Nessa pesquisa, o animal doador recebeu exatamente a mesma dieta incubada. BUENO et al. (2005), avaliaram o efeito da espécie do animal doador (bovino *versus* ovino) do líquido ruminal na produção de gases utilizando forrageiras tropicais e os resultados determinaram maior taxa de fermentação com líquido ruminal proveniente de bovinos.

CANESIN (2009) encontrou valores de produção de metano *in vitro* em g/dia para bovinos mantidos em pastagem de *Brachiaria brizantha* de 176,8 g/dia para o mês de setembro e 311,0 g/dia para o mês de novembro. Esses valores são mais elevados aos encontrados nesse trabalho (84,4 a 139,2 g/dia) por se tratar de animais mantidos sob pastejo.

Tabela 5 – Produção de metano proveniente da fermentação ruminal de dietas com diferentes percentuais de glicerina

Item	Tratamentos					Média	CV %
	G0	G5	G10	G15	G20		
CH ₄ L/dia	151,2	188,5	153,7	194,9	118,2	Ŷ=161,3	27,9
CH ₄ g/dia	108,0	134,6	109,8	139,2	84,4	Ŷ=115,2	27,9
CH ₄ g/kg MSi	10,8	12,9	10,8	13,7	9,4	Ŷ=11,5	25,1
CH ₄ g/kgFDNi	31,3	38,1	32,2	40,9	27,7	Ŷ=34,0	24,8

MSi= matéria seca ingerida, FDNi= fibra em detergente neutro ingerida, CV%= coeficiente de variação

A intensidade da emissão de metano proveniente da fermentação ruminal depende principalmente do tipo de animal, do consumo de alimentos e do grau de digestibilidade da dieta ingerida. Na Tabela 3 verifica-se que o tratamento G20 apresentou menor valor numérico para consumo de MS e FDN e, conseqüentemente proporcionou baixa produção de metano.

THEODOROU et al. (1994) sugeriram que, à medida que o tempo de incubação aumenta, o volume de gases produzidos é maior devido à fermentação de carboidratos estruturais na dieta. Em geral, dietas que proporcionam alta taxa de digestão reduzem a emissão de CH₄ já que o alimento não permanece por tempo prolongado no rúmen. De acordo com CHAI et al. (2004), os gases produzidos nas três primeiras horas de incubação correspondem à fermentação dos carboidratos solúveis.

As alterações na digestibilidade da FDN e CNF verificadas nesse trabalho também podem ter influenciado a produção de CH₄. BLÜMMEL et al. (1997) verificaram que a produção de gases de 200 mg de fibra em detergente neutro é maior do que de 200 mg da forragem integral. Eles sugeriram que a eficiência com que o material fermentável é incorporado às células microbianas é uma explicação

para a maior produção de gases da FDN. A proporção de cada produto final (AGCC, CO₂ e CH₄) depende do tipo de carboidrato fermentado e das espécies bacterianas que estiverem no ambiente ruminal durante a fermentação (NUSSIO et al., 2006).

De acordo com JOHNSON & JOHNSON (1995), o tipo de fermentação resultante pode variar de alta emissão de metano, caracterizado por uma alta relação acetato:propionato, a uma baixa emissão de metano caracterizado por uma menor relação acetato:propionato. No rúmen o glicerol é metabolizado a propionato. Portanto, com o aumento da concentração de glicerina no rúmen, esperava-se decréscimo na produção de metano e isso só foi observado no tratamento G20.

Produção e composição da massa microbiana

Não foram observados efeitos da interação tempo x tratamento ($p>0,05$) para a produção e composição das bactérias líquido associadas (BLA), protozoários líquido associados (PLA) e bactérias sólido aderidas (BSA).

A produção de matéria seca e matéria orgânica (mg/L) e o teor de MO (%MS) das frações bacterianas associadas ao líquido (Tabela 6) foram influenciadas pelos tratamentos ($p<0,05$), apresentando reduções lineares com o acréscimo do porcentual de glicerina na dieta, sendo que, as produções de MS e MO foram, respectivamente, 27,8 e 32,2% superiores para o tratamento sem adição de glicerina quando comparado ao tratamento G20. Houve aumento linear para o teor de N (%MO) conforme aumentou-se a inclusão de glicerina na dieta enquanto a produção de nitrogênio (mg/L) apresentou comportamento cúbico. Os teores de MO e N das frações bacterianas associadas ao líquido ruminal obtidas neste trabalho situaram-se entre 52,1% e 62,1% de MO (%MS) e 8,8% e 11,5% de N (%MO). CECAVA et al. (1990) constataram valores médios de MO de 83% e de N/MO de 9,7% para bactérias da fase líquida e EZEQUIEL et al. (2002) relataram teores de MO de 81,6% e 6,7% de N/MO para as frações líquido-associadas, pode-se verificar que os teores de MO encontrados por esses autores foram superiores aos obtidos nesse trabalho. No entanto, MARTIN et al. (1994) relataram teores de MO para bactérias da fase líquida na faixa de 60 a 65% e MENDES (2003) encontrou valores de 57% de MO e 8,7% de N (g de microorganismos/L de líquido ruminal) que são mais próximos aos valores obtidos neste trabalho.

Tabela 6 – Produção e composição de bactérias líquido-associadas do rúmen de bovinos recebendo dietas com diferentes percentuais de glicerina.

Trat	Tempo de colheita (h)				CV%
	0	2	5	8	
	Matéria seca (mg/L)				Média ¹
G0	1069,9	1029,6	997,5	1097,1	1048,5
G5	929,5	837,1	819,3	896,3	870,5
G10	1035,8	736,2	891,2	838,8	875,5
G15	1027,4	950,7	802,1	952,1	933,1
G20	805,8	876,7	823,5	521,6	756,9
Média ^{ns}	973,7	886,1	866,7	861,2	
	Matéria orgânica (%MS)				Média ²
G0	61,9	59,5	59,9	57,2	59,6
G5	58,8	56,1	58,9	56,7	57,6
G10	62,1	53,6	54,8	54,9	56,3
G15	57,5	55,7	52,1	57,8	55,8
G20	58,0	55,4	55,0	54,0	55,6
Média ⁶	59,7	56,0	56,1	56,1	
	Matéria orgânica (mg/L)				Média ³
G0	646,2	614,7	598,5	640,3	626,5
G5	547,9	474,7	478,8	513,4	503,7
G10	642,7	399,8	487,2	463,6	498,3
G15	598,8	518,2	419,5	553,8	522,6
G20	467,9	483,7	459,6	287,4	424,6
Média ^{ns}	581,9	498,2	488,7	491,7	
	Nitrogênio (%MO)				Média ⁴
G0	8,8	9,8	9,1	10,2	9,5
G5	9,9	10,3	9,7	9,9	10,0
G10	8,9	11,4	10,1	10,2	10,2
G15	9,8	10,8	11,2	9,6	10,4
G20	10,6	10,8	10,8	11,5	10,9
Média ^{ns}	9,6	10,6	10,2	10,3	
	Nitrogênio (mg/L)				Média ⁵
G0	57,5	58,8	54,8	64,3	58,9
G5	52,5	47,2	46,6	49,2	48,9
G10	55,4	43,4	48,5	46,7	48,5
G15	58,0	55,5	46,7	53,8	53,5
G20	48,9	50,8	48,2	32,1	45,9
Média ^{ns}	54,5	51,1	48,9	49,9	

^{ns} não significativo (p>0,05); CV(%): Coeficiente de variação; *Significativo a 5% de probabilidade; **Significativo a 1% de probabilidade.

Equações de regressão em função dos tratamentos:

¹ $\hat{Y}=1053,1-52,06X^{**}$, $r^2=0,60$; ² $\hat{Y}=59,92-0,98X^{**}$, $r^2=0,87$; ³ $\hat{Y}=630,29-38,41X^{**}$, $r^2=0,70$;

⁴ $\hat{Y}=9,24+0,32X^{**}$, $r^2=0,96$; ⁵ $\hat{Y}=93,74-1,85X^3+17,379X^2-50,171X^*$, $r^2=0,97$

Equações de regressão em função dos tempos de colheita:

⁶ $\hat{Y}=64,275+0,925X^2-5,695X^*$, $r^2=0,92$

Os valores de porcentagem de MO foram baixos, possivelmente pela adição de solução de Coleman durante o processo de separação das frações BLA, PLA, e BSA, levando a um aumento no valor de matéria mineral das amostras. Essa hipótese também foi apontada por VALADARES FILHO (1995) e MENDES (2003) como causa da grande variação dos teores de MO encontrados na literatura. Segundo MARTIN et al. (1994) a matéria mineral contida nas amostras das frações isoladas é função da concentração da solução salina utilizada e ao número de lavagens em solução salina que a amostra foi submetida.

Segundo CECAVA et al. (1990) as mudanças na disponibilidade de matéria orgânica fermentável podem afetar a composição das bactérias ruminais por afetar a taxa de crescimento, as espécies presentes ou a associação das bactérias com as frações específicas (líquido e sólido) do rúmen. A produção microbiana total no rúmen, geralmente aumenta com o aumento da quantidade de matéria orgânica fermentada no rúmen.

Em relação aos horários de amostragem pode-se observar que a produção de MS, MO e N (mg/L) das bactérias foi inalterada ($p>0,05$). CECAVA et al. (1990) avaliando tempos de colheita de 3, 6, 9 e 12h após a alimentação encontraram efeito quadrático para a produção de MO com maior valor 6h após a alimentação e quadrático para o N com aumento nos tempos 6 e 9h após a alimentação. O aumento na porcentagem de N após a alimentação provavelmente representa síntese de material celular (CRAIG et al., 1987). Esse comportamento não foi verificado nesse trabalho, no qual a produção não foi alterada em função dos tempos de colheita e os teores de MO apresentaram comportamento quadrático, com decréscimo 2h após alimentação e ligeiro aumento nos tempos 5 e 8h, não havendo efeito dos tempos de colheita para os teores de N ($p>0,05$).

A produção de MS, MO e N (mg/L) dos protozoários líquido associados (Tabela 7) apresentou comportamento semelhante ao das BLA para matéria seca e matéria orgânica, apresentando reduções lineares com o aumento na concentração de glicerina na dieta ($p<0,05$). As produções de MS, MO e N foram superiores para o tratamento G0 em relação ao tratamento G20 em 28,1%; 28,7% e 30,7%; respectivamente.

Tabela 7 – Produção e composição de protozoários líquido-associados do rúmen de bovinos recebendo dietas com diferentes percentuais de glicerina.

Trat	Tempo de Colheita (h)				Média ¹	CV%
	0	2	5	8		
	Matéria seca (mg/L)					
G0	2779,1	1986,9	1962,4	2069,8	2199,5	4,1
G5	2233,0	1719,6	1433,4	1964,4	1837,6	
G10	2350,4	1649,1	2291,2	1456,6	1936,8	
G15	1487,1	1801,9	1276,9	1893,7	1614,9	
G20	2240,1	1623,4	1361,1	1122,8	1586,8	
Média ⁵	2217,9	1756,2	1665,0	1701,5		
	Matéria Orgânica (%MS)				Média ²	
G0	52,8	51,3	50,7	44,1	49,7	10,6
G5	49,8	43,7	48,0	41,4	45,7	
G10	49,3	46,7	44,3	47,1	46,9	
G15	48,6	43,4	44,9	44,7	45,4	
G20	52,3	46,9	45,8	51,1	49,0	
Média ⁶	50,6	46,4	46,7	45,7		
	Matéria Orgânica (mg/L)				Média ³	
G0	1206,2	875,2	823,9	738,1	910,9	5,0
G5	929,3	626,7	565,4	680,9	700,6	
G10	1001,4	639,6	891,3	568,0	775,1	
G15	595,7	650,1	469,5	701,7	604,3	
G20	978,5	634,0	507,0	475,8	648,8	
Média ⁷	942,2	685,1	651,4	632,9		
	Nitrogênio (%MO)				Média ^{ns}	
G0	7,6	7,3	7,3	6,7	7,2	5,3
G5	7,4	7,0	7,2	8,0	7,4	
G10	7,5	7,5	6,6	7,3	7,2	
G15	8,0	7,0	7,0	6,5	7,1	
G20	7,6	6,9	6,8	7,7	7,2	
Média ^{ns}	7,6	7,1	7,0	7,2		
	Nitrogênio (mg/L)				Média ⁴	
G0	92,0	65,5	58,5	49,7	66,4	8,2
G5	68,8	44,3	41,0	56,7	52,7	
G10	70,0	49,3	57,3	42,1	54,7	
G15	47,3	44,3	32,1	45,2	42,2	
G20	71,4	43,6	33,1	35,8	46,0	
Média ⁸	69,9	49,4	44,4	45,9		

^{ns} não significativo (p>0,05); CV(%): Coeficiente de variação; *Significativo a 5% de probabilidade; *Significativo a 1% de probabilidade.

Equações de regressão em função dos tratamentos:

¹ $\hat{Y}=2269,6-144,81X^{**}$, $r^2=0,83$; ² $\hat{Y}=54,1+0,893X^2-5,527X^*$, $r^2=0,76$; ³ $\hat{Y}=914,09-62,05X^*$, $r^2=0,66$;

⁴ $\hat{Y}=67,79-5,13X^{**}$, $r^2=0,74$

Equações de regressão em função dos tempos de colheita:

⁵ $\hat{Y}=2245,3-164,4X^*$, $r^2=0,67$; ⁶ $\hat{Y}=50,95-1,44X^*$, $r^2=0,71$; ⁷ $\hat{Y}=968,3-96,16X^{**}$, $r^2=0,74$; ⁸ $\hat{Y}=71,65-7,7X^*$, $r^2=0,70$

O teor de MO (%MS) apresentou comportamento quadrático ($p < 0,05$) os maiores valores foram obtidos com 0% e 20% de glicerina os tratamentos G5, G10 e G15 apresentaram valores intermediários. A inclusão de glicerina não afetou o teor de N dos PLA ($p > 0,05$).

MARTIN et al. (1994), estudando o isolamento e características das frações de protozoários e bactérias do conteúdo ruminal de bovinos, relataram que, independentemente da dieta (no caso feno ou feno + cevada peletizada), o teor de MO de protozoários foi superior ao obtido para as frações bacterianas. Isto não foi verificado neste trabalho. STORM & ORSKOV (1983), citados por OLUBOBOKUN et al. (1988), reportaram que o teor de MO da fração de protozoários foi menor que a fração de bactéria obtida no rúmen. EZEQUIEL et al. (2002) encontraram teores de MO de 81,6% e 75,2% para bactérias e protozoários respectivamente.

O conteúdo de N (%MO) da fração de protozoários (6,5 a 8,0%) foi mais baixo que aquele das bactérias líquido associadas (8,8 a 11,5%), concordando com os resultados obtidos por MARTIN et al. (1994), MELÍCIO (2000) e STOKES et al. (1991).

Em relação aos tempos de colheita verificou-se redução linear ($p < 0,05$) após alimentação para a produção de MS, MO e N (mg/L), e redução linear também para os teores de MO (%MS). Não foi verificado efeito do tempo sobre os teores de N (%MO).

Os dados referentes à composição e produção das bactérias sólido aderidas estão apresentados na Tabela 8. A inclusão de glicerina na dieta não alterou ($p > 0,05$) a produção de MS, MO e N (mg/L) nem o percentual de MO e N.

A média da quantidade de MS em mg/kg de conteúdo ruminal das BSA foi superior quando comparada com a dos demais microrganismos BLA e PLA, sendo os valores médios de 3131,0 mg/kg; 896,9 mg/L e 1835,1 mg/L; respectivamente para BSA, BLA e PLA. Isso pode evidenciar que, com o passar do tempo, as bactérias se aderem à fase sólida ou para se reproduzir ou para garantir o substrato. As quantidades de MO e N (mg/kg) também foram superiores para as BSA comparados aos microorganismos da fase líquida.

A substituição do milho pela glicerina proporcionou redução de substrato sólido para as bactérias e conseqüentemente a concentração dessas aumentou na

fase sólida do conteúdo ruminal. Isso é evidenciado pelo fato que a produção de MS, MO e N (mg/L) das bactérias da fase líquida foi reduzida com a inclusão de glicerina, comportamento não verificado nas bactérias aderidas à fase sólida, no qual os tratamentos não afetaram a produção de MS, MO e N (mg/kg).

CECAVA et al. (1990) e OLUBOBOKUN & CRAIG (1990) verificaram teores superiores de N (%MO) para as BLA em relação às BSA. Os valores obtidos por CECAVA et al. (1990) foram 9,7% para BLA e 9,3% para BSA, o que não foi verificado nesse trabalho, onde os teores N (%MO) de BLA ficaram entre 8,8% e 11,5%, e de BSA entre 10,1% e 12,1%.

STORM & ORSKOV (1983) citados por OLUBOBOKUN et al. (1988) reportaram que o conteúdo de MO da fração de protozoários foi menor do que aquele da fração de bactérias do rúmen e que a concentração de MO das BSA foi maior do que a das BLA, concordando com os resultados de MERRY & MCALLAN (1983). Essas observações estão de acordo com os resultados de obtidos nesse trabalho, no qual o teor médio de MO (%MS) para as BSA foi de 63% e de 57% para as BLA. Na literatura são descritas grandes variações na composição química dos microrganismos ruminais. Essas variações, provavelmente, são atribuídas às diferenças entre as técnicas utilizadas para isolar os microrganismos e/ou, medir sua composição, além de diferença entre espécies de microrganismos relacionados ao perfil da dieta.

As composições em MO (%MS) e N (%MO) sofreram alterações em relação ao tempo após alimentação, o teor de MO apresentou redução linear ($p < 0,05$) com o passar do tempo sendo que 8h após alimentação verifica-se o menor valor de MO. Observou-se comportamento inverso em relação à porcentagem de N com incremento linear nos teores de N em função dos tempos de colheita ($p > 0,05$). As produções de MS, MO e N (mg/L) para BSA foram semelhantes entre os tempos de colheita. CECAVA et al. (1990) observaram aumento linear na produção de nitrogênio após a alimentação e efeito quadrático para a produção de MO sendo o maior valor encontrado 9h após a alimentação, para as bactérias aderidas a fase sólida.

Tabela 8 – Produção e composição de bactérias sólido-aderidas do rúmen de bovinos recebendo dietas com diferentes porcentuais de glicerina.

Trat	Tempo de Colheita (h)				Média ^{ns}	CV%
	0	2	5	8		
	Matéria seca (mg/kg)					
G0	4592,2	3828,2	4015,5	3970,5	4101,6	12,2
G5	3997,2	3740,5	4216,1	3774,6	3932,1	
G10	4151,1	3736,7	3593,2	3979,9	3865,2	
G15	3999,0	3590,0	3704,8	3806,4	3775,1	
G20	3716,8	4042,7	3771,1	3848,1	3846,2	
Média ^{ns}	4093,1	3787,6	3861,3	3875,9		
	Matéria Orgânica (%MS)				Média ^{ns}	
G0	65,7	63,6	62,6	60,3	63,0	4,3
G5	64,2	63,6	65,2	63,9	64,2	
G10	64,3	62,7	61,5	61,1	62,4	
G15	64,0	62,6	61,6	62,4	62,7	
G20	61,8	63,1	63,7	62,2	62,7	
Média ¹	64,0	63,1	62,9	62,0		
	Matéria Orgânica (mg/kg)				Média ^{ns}	
G0	3022,5	2436,1	2523,1	2384,8	2591,6	14,0
G5	2567,0	2368,9	2749,1	2414,3	2524,8	
G10	2672,6	2343,8	2214,3	2442,0	2418,2	
G15	2555,3	2252,8	2281,8	2385,9	2368,9	
G20	2299,4	2543,1	2406,6	2398,6	2412,0	
Média ^{ns}	2623,3	2388,9	2435,0	2405,1		
	Nitrogênio (%MO)				Média ^{ns}	
G0	10,1	10,4	10,9	12,0	10,8	11,5
G5	10,3	10,7	10,6	11,0	10,7	
G10	10,5	10,9	12,1	11,8	11,3	
G15	10,5	10,9	12,0	12,0	11,4	
G20	11,3	10,8	11,4	11,7	11,3	
Média ²	10,5	10,8	11,4	11,7		
	Nitrogênio (mg/kg)				Média ^{ns}	
G0	336,5	283,7	289,7	299,3	302,3	12,2
G5	296,2	277,9	308,7	277,9	290,2	
G10	315,5	286,1	280,0	300,5	295,0	
G15	299,0	275,6	286,1	296,4	289,3	
G20	288,2	306,4	291,3	291,1	294,3	
Média ^{ns}	306,7	285,9	291,2	293,0		

^{ns} não significativo (p>0,05); CV(%): Coeficiente de variação; *Significativo a 5% de probabilidade.

Equações de regressão em função dos tempos de colheita:

¹ $\hat{Y}=64,55-0,62X^*$, $r^2=0,95$; ² $\hat{Y}=10,05+0,42X^*$, $r^2=0,98$

CRAIG et al. (1987) detectaram diferença entre a composição das bactérias do líquido e do sólido, com maiores concentrações de nitrogênio para as do líquido (7,5%) em relação as do sólido (6,4%), e também detectaram variação no teor nitrogenado em função do tempo após alimentação, com valores superiores para a primeira coleta, reduzindo de 9,2 para 7,7% (líquido) e de 9,2 para 6,7% (sólido) nas primeiras horas e retomando a concentração às 6 horas após alimentação. No entanto, OLUBOBOKUM & CRAIG (1990) não verificaram alterações na concentração de nitrogênio em função do tempo de coleta do conteúdo (2 e 23 horas após alimentação). Mas também relataram maiores concentrações de nitrogênio nas bactérias do líquido (8,8%). Estes autores relataram que as produções de matéria orgânica e nitrogênio não diferiram em função do tempo de coleta.

Os resultados são dependentes das metodologias de isolamento utilizadas e das inúmeras dietas que podem ser formuladas e modificam o suprimento de substrato fermentável, consequentemente, o crescimento microbiano e sua composição. Diversos fatores afetam a composição das células microbianas, entre eles, o tipo de microrganismos, a fase de crescimento e a disponibilidade de nutrientes. Menores valores de digestibilidade da FDN e CNF indicam que a fermentação ruminal e o crescimento microbiano foram menos adequados nas dietas com concentração de glicerina acima de 10%.

O balanço de carboidratos estruturais e não estruturais na dieta é importante para a otimização da fermentação ruminal. O excesso de carboidratos não estruturais pode provocar queda no pH ruminal e diminuir a eficiência de síntese microbiana, por outro lado, a falta de carboidratos com taxas de fermentação mais rápida, pode diminuir a energia disponível para o crescimento bacteriano (CLARK, 1992). A substituição do milho da dieta pela glicerina pode ter causado deficiência de carboidratos rapidamente fermentáveis e consequentemente reduzido a energia necessária para um adequado crescimento das bactérias.

CONCLUSÕES

A substituição do milho pela glicerina proporcionou redução nos percentuais de extrato etéreo e carboidratos não fibrosos da dieta e consequentemente foram reduzidos os consumos desses nutrientes, também foram verificadas reduções na digestibilidade da fibra em detergente neutro e carboidratos não fibrosos.

Em relação a fermentação ruminal houve decréscimo nas concentrações de nitrogênio amoniacal e também foram verificados efeitos sobre as bactérias e protozoários associados ao líquido ruminal com redução na produção e composição desses com o aumento do percentual de glicerina na dieta. A utilização de glicerina não influenciou a produção nem a composição das bactérias aderidas a fase sólida do rúmen.

Ainda são necessários mais estudos com a finalidade de elucidar o metabolismo do glicerol no organismo animal.

IMPLICAÇÕES

A ideia de utilização de alimentos não convencionais para ruminantes vem ganhando espaço nos últimos anos, principalmente com o objetivo de atender às dificuldades relacionadas ao custo de alimentação dos animais. Considerando ser a alimentação responsável por uma grande parcela no custo variável de produção, chegando a 60 a 80% no confinamento de bovinos, tal prática além de maximizar os lucros contribui na redução do acúmulo desses materiais, diminuindo o impacto ambiental.

É necessário encontrar rapidamente uma destinação economicamente viável e ecologicamente correta para a glicerina obtida do processo de produção do biodiesel e, a sua real utilização na alimentação de ruminantes está na dependência dos resultados de pesquisas que visam encontrar o balanceamento ideal dos nutrientes da dieta e consequentemente determinar o limite de inclusão deste subproduto na dieta de ruminantes.

A composição da glicerina varia de acordo com o processo de obtenção e a fonte de produção que pode ser de origem vegetal ou animal, portanto são necessárias especificações desse subproduto para que possa ser comercializado com a finalidade de emprego na alimentação animal. Estudos relacionados à sincronização do fornecimento energia e proteína no rúmen, fontes de carboidratos com diferentes taxas de degradação também são necessários. Além disso, as formulações de dietas com inclusão de glicerina devem levar em consideração a presença de cloreto de sódio nesse subproduto e portanto reduzir a inclusão de sal comum da dieta.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, A.L.; SILVA FILHO, J.C.; GODOI, A.R.; et al. Utilização de subprodutos da indústria do biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, suplemento especial, p. 260-268, 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/biodiesel.asp>>. Acesso em: 03 nov.2009

ANONYMOUS. **Futtermittelrecht mit einschlägigen Bestimmungen, Bundesgesetzen, Verordnungen**, Erlassen und recht der Eruopäischen Union, 2nd edition, supplement 6, F-4, appendix I, 12a, Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin. 1995.

AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis**. 16.ed. Arlington: Patricia Cunniff, 1995. 1025p.

BLÜMMEL, M.; STEINGASS, H.; BECKEN, K. “In vitro” gas production: a technique revisited. **Journal Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v.77, p.24-34, 1997.

BUENO, I.C.S.; CABRAL FILHO, S.L.S.; GOBBO, S.P.; et al. Influence of inoculum source in a gas production method. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.123, n.1, p.95-105, 2005.

CANESIN, R.C. **Frequência da suplementação de bovinos da raça Nelore mantidos em pastagens**. Tese (Doutorado em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal – SP, 2009. 119p.

CASALI, A.O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C.; et al. Influência do tempo de incubação e do tamanho de partículas sobre os teores de compostos indigestíveis em alimentos e fezes bovinas obtidos por procedimentos *in situ*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.2, p.335-342, 2008.

CECAVA, M.J.; MERCHEN, N.R.; GAY, L.C. et al. Composition of ruminal bacteria harvested from steers as influenced by dietary energy level, feeding frequency, and isolation techniques. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 2480-2888, 1990.

CHAI, W.Z.; GELDER, A.H.; CONE, J.W. Relationship between gas production and starch degradation in feed samples. **Animal Feed Science and Technology**, v.114, n.2, p. 195-204, 2004.

CHERNEY, D. J. R.; SICILIANO, J. J.; PELL, A. N. Technical note: forage "in vitro" dry matter digestibility as influenced by fiber source in the donor cow diet. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.71, p.1335-1338, 1993.

CHUNG, Y.H.; RICO, D.E.; MARTINEZ, C.M.; et al. Effect of feeding dry glycerin to early postpartum Holstein dairy cows on milk production and metabolic profiles. **Journal of Dairy Science**, v.90, n.12, p.5682-5691, 2007.

CLARK, J.H.; KLUSMEYER, T.H.; CAMERON, M.R. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 8, p. 2304-2323, 1992.

COLEMAN, G.S. Rumen entodiniomorph protozoa. In: TAYLOR, A.E.R.; BAKER, J.R. (Eds.) **The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion**. Armidale: Penambul Books, 1978. p.13.

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

CRAIG, W.M.; BROWN, D.R.; BRODERICK, G.A.; RICKER, D.B. Post-prandial compositional changes of fluid-and particle-associated ruminal microorganisms. **Journal of Animal Science**, v. 65, p. 1042-1048, 1987.

CUNNINGHAM, K.D.; CECAVA, M.J.; JOHNSON, T.R. Nutrient digestion, nitrogen, amino acid flow in lactating cows fed soybean hulls in place of forage or concentrate. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.76, n.11, p.3523-3535, 1993.

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

DASARI, M.A.P. ; KIATSIMKUL, P.P.; SUTTERLIN, W.R.; SUPPES, G.J., Low pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. **Appl. Catal. Gen.** 281 :225-231, 2005

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

DINIZ, G. De coadjuvante a protagonista: Glicerina bruta obtida na produção de biodiesel pode ter muitas aplicações. **Ciência Hoje Online**, 19/10/05. disponível em <<http://cienciahoje.uol.com.br/controlPanel/materia/view/3973>>, Acesso em 24 mar 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.

DORREL, D.G. Chlorogenic acid content of meal from cultivated sunflowers. **Crop Science**. v.16, n.3, p.422-424, 1976

DRACKLEY, J. K.; RICHARD, M. J.; BEITZ, D.C, YOUNG J. W. Metabolic Changes in Dairy Cows with Ketonemia in Response to Feed Restriction and Dietary 1,3-Butanediol. **Journal of Dairy Science**, 75:1622-1634, 1992.

EUGÈNE, M.; ARCHIMÈDE, H.; SAUVANT, D. Quantitative meta analysis on the effects of defaunation of the rumen on growth, intake and digestion in ruminants. **Livestock Production Science**, v.85, p.81-97, 2004.

EZEQUIEL, J.M.B.; MELÍCIO, S.P.L.; SANCANARI, J.B.D. et al. Quantificação das bactérias sólido-aderidas, bactérias e protozoários líquido-associados do rúmen de bovinos jovens alimentados com amiréia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p.707-715, 2002.

FISHER, L.J. ERFLE, J.D.; LODGE, G.A.; SAUER, F.D. Effects of propylene glycol or glycerol supplementation of the diet of dairy cows on feed intake, milk yield and composition, and incidence of ketosis. **Canadian Journal of Animal Science**, v.53, p.289-296, 1973.

FISHER, L.J; ERFLE. J.D.; SAUER, F.D. Preliminary evaluation of the addition of glucogenic materials to the rations of lactating cows. **Canadian Journal of Animal Science**, v.51, p.721-727, 1971.

FONTES, N.A. **Milho, casca de soja e polpa cítrica associados ao farelo de girassol ou uréia em dietas para bovinos**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal – SP, 2005. 60p

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), **Code of Federal Regulations**, 21CFR582.1320, Title21, v.6, 2006.

GALATI, R.L. **Co-produtos do milho, soja e girasol para bovinos de corte**. Tese (Doutorado em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal – SP, 2004. 168p.

GARCIA, J.A.; VIEIRA, P.F.; CECON, P.R.; et al. Digestibilidade aparente do farelo de girassol na alimentação de bovinos leiteiros em fase de crescimento. **Ciência Animal Brasileira**, v.5, n.3, p.123-129, 2004.

GASTALDI, K.A. **Produção in vitro de metano, dióxido de carbono e oxigênio utilizando líquido ruminal de bovinos alimentados com diferentes rações**. Tese (Doutorado em Produção Animal). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal. Unesp, 2003. 104p.

HARINDER, P.; MAKKAR, S.; SIDDHURAJU, P.; et al. **Plant Secondary Metabolites**, Springer, 2007. 130p.

HOOVER, W.H. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.89, n.6, p.2755-2766, 1986

HOOVER, W.H.; STOKES, S.R. Balancing carbohydrates and protein for optimum rumen microbial yield. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.10, p.3360-3371, 1991.

IUPAC. **International Union of Pure and Applied Chemistry**. A Guide to IUPAC Nomenclature of Organic Compounds – Recommendations, 1993.

JOHNSON, D.E.; HILL, T.M.; WARD, G.M.; et al. Principle factors varying methane emissions from ruminants and other animals. In: KHALIL, M.A.K. (Ed.). **Atmospheric Methane: Sources, Sinks, and Role in Global Change**. v. 113, Springer-Verlag, Berlin, 1993.

JOHNSON, K.A.; JOHNSON, D.E. Methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, p. 2483-2492, 1995.

JOHNSON, R.B. The treatment of ketosis with glycerol and propylene glycol. **Cornell Veterinarian**, v.44, p.6-21, 1955.

KHALILI, H.; VARVIKKO, T.; TOIVONEN, V.; et al. The effects of added glycerol or unprotected free fatty acids or a combination of the two on silage intake, milk production, rumen fermentation and diet digestibility in cows given grass silage based diets. **Agriculture Food Science**, v.6, p.349-362, 1997.

KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica dos ruminantes**. 1.ed. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2002. 140p.

KREBS, H. A.; LUND, P. Formation of glycose from hexoses, pentoses, polyols and related substances in kidney cortex. **Biochemistry Journal**, v.98, p.210-214, 1966.

KREBS, H. A.; NOTTON, B.M.; HEMS, R. Gluconeogenesis in mouse liver slices. **Biochemistry Journal**, v.101, p.607-617, 1966.

LASSEY, K.R.; ULYATT, M.J. Methane emissions measured directly from grazing livestock in New Zealand. **Atmospheric Environment**, v. 31, p. 2905-2914, 1997.

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

LUCCI, C.S. **Nutrição e manejo de bovinos leiteiros**. São Paulo: Manole, 1997.

MacGREGOR, C.A.; OWEN, F.G.; MCGILL, L.D. Effect of increasing ration fiber with soybean mill run on digestibility and lactation performance. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.59, n.4, p.682-689, 1976.

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

MACHMÜLLER, A. Medium-chain fatty acids and their potential to reduce methanogenesis in domestic ruminants. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v.112, p.107-114, 2006.

MANDARINO, J.M.G. Derivados protéicos do girassol. In: REUNIAO NACIONAL DE PESQUISA DE GIRASSOL, **Resumos...** Campinas: Fundação Cargill, 1997

MARTIN, C.; WILLIAMS, A.G.; MICHALET-DOREAU, B. Isolation and characteristics of the protozoal and bacterial fractions from bovine ruminal contents. **Journal of Animal Science**, v.72, n.11, p.2962-2968, 1994.

MCT - PROGRAMA NACIONAL DE PRODUÇÃO E USO DE BIODIESEL. O biodiesel. Ministério da Ciência e Tecnologia – MCT. Disponível em: **<<http://www.biodiesel.gov.br>>**. Acesso em: 16 Nov. 2009.

MEHREZ, A.Z.; ORSKOV, E.R.; McDONALD, I. Rate of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. **British Journal of Nutrition**, v. 38, p. 437- 443, 1977.

MELÍCIO, S.P.L. **Quantificação das bactérias sólido aderidas, bactérias e protozoários líquido associados do rúmen de bovinos jovens alimentados com uréia.** Trabalho de graduação (Graduação em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal. Unesp, 2000. 52p.

MENDES, A.R. **Fontes energéticas associadas ao farelo de girassol em dietas para bovinos em confinamento.** Tese (Doutorado em Produção Animal). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal. Unesp, 2003. 103p

MENDES, A.R.; EZEQUIEL, J.M.B.; GALATI, R.L.; et al. Consumo e digestibilidade aparente total e parcial de dietas utilizando farelo de girassol e três fontes de energia em novilhos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.2, p.611-23, 2005

MERRY, R.J.; MCALLAN, A.B. A comparison of the chemical composition of mixed bacteria harvested from the liquid and solid fractions of rumen digesta. **British Journal of Nutrition**, v.50, p.701-709, 1983.

MERTENS, D.R. Rate and extent of digestion. In: FORBES, J.M.; FRANCE, J. **Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism.** 2ed. Wallingford: CAB International, 1993. p.13-51.

MERTENS, D.R. Regulation of forage intake. In: **Forage quality, evaluation and utilization.** FAHEY JR. (Ed.). Madison: American Society of Agronomy, 1994. p.450-493.

METCALF & EDDY. **Wastewater Engineering: Treatment and Reuse**. Fourth Edition, Mc Graw Hill, New York. 2003. 1819p.

MOTA, C.J.A.; DA SILVA, C.X.A.; GONÇALVES, V.L.C. **Química Nova**. v.32, n.3, p.639, 2009

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of beef cattle**. 7.ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 1996. 242p.

NUSSIO, L.G.; CAMPOS, F.P.; LIMA, M.L.M. Metabolismo de carboidratos estruturais. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Eds). **Nutrição de Ruminantes**. 1 ed., p. 183-228, 2006.

OGBORN, K.L. Effects of method of delivery of glycerol on performance and metabolism of dairy cows during the transition period. **Cornell University**, Ithaca, NY, 2006.

OLUBOBOKUM, J.A.; CRAIG, W.M. Quantity and characteristics of microorganisms associated with fluid or particles. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 3360-3370, 1990.

OLUBOBOKUN, J.A.; GRAIG, W.M.; NIPPER, W.A. Characteristics of protozoal and bacterial fractions from microorganisms associated whit ruminal fluid or particles. **Journal of Animal Science**, v.66, n.10, p.2701, 1988.

O'MARA, F. Greenhouse gas production from dairying: reduction methane production. **Advances in Dairy Technology**, v.16, p.295-309, 2004.

ORSKOV, E.R. Starch digestion and utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 63, p. 1624-1633, 1986.

OWENS, F.N.; GOETSCH, A.L.; Ruminal fermentation. In: CHURCH, D.C. (Ed.) **The Ruminant Animal Digestive Physiology and Nutrition**, 1993. p.145-171.

PACHAURI, N; HE, B. "Value-added Utilization of Crude Glycerol from Biodiesel Production: A Survey of Current Research Activities", 2006 **ASABE Annual International Meeting**, 9 - 12 July 2006.

PALMQUIST, D. L.; BEAULIEU, D. Milk fat synthesis and modification. Feed and animal factors influencing milk fat composition. **Journal of Dairy Science**, v.76, n.6, p.1753-1771, 1993.

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

PELL, A. N.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. **Journal of Dairy Science**, v.76, n.4, p.1063-73, 1992.

PEREIRA, D.H.; PEREIRA, O.G.; VALADARES FILHO, S.C; et al. Consumo, digestibilidade dos nutrientes e desempenho de bovinos de corte recebendo silagem de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) e diferentes proporções de concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.1, p.282-291, 2006.

PERRY, R.H.; GREEN, D.W. **Perry's Chemical Engineers' Handbook**. pp2-39. McGraw-Hill: New York. 1997.

PLÁ, J. A. Perspectivas do biodiesel no Brasil. **Indicadores Econômicos FEE**, Porto Alegre, v.30, n.2, p.179-190, set. 2002.

PRADO, I.N.; MARTINS, S.A.; ALCALDE, C.R.; et al. Desempenho de Novilhas Alimentadas com Rações Contendo Milho ou Casca de Mandioca como Fonte Energética e Farelo de Algodão ou Levedura como Fonte Protéica. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.1, p.278-287, 2000.

PRADO, I.N. & MOREIRA, F.B. **Suplementação de Bovinos no Pasto e Alimentos Alternativos Usados na Bovinocultura**. Maringá – PR. EDUEM – UEM, 2002. 162p.

PRESTON, T.R. Analytical methods for characterizing In: FEEDD RESOURCES FOR RUMINANTS. Better utilization of crop residues and by products in animal feeding: research guidelines. **A practical manual for research workers**. Rome: FAO, 1986. p.106.

PYATT, N.A. ; DOANE, P.H. ; CECAVA, M.J. Effect of crude glycerin in finishing cattle diets. **Journal of Animal Science**, v.85, Suppl. 1: 412 (Abstract 530), 2007

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

RIVALDI, J.D.; SARROUB, B.F.; FIORILO, R.; et al. Glicerol de biodiesel: Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. **Biotecnologia, Ciência e Tecnologia**, v.37, p.44-51, 2007

ROBRA, S.; TEIXEIRA, J.C.; ALMEIDA NETO, J.A. Utilização da glicerina para a produção de biogás. Disponível em: <www.uesc.br/ecodiesel/resumos/Resumosabine.pdf>, 2004. Acesso em 10 jan. 2008.

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

RUSSELL, J.B.; D.B. WILSON. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH?. **Journal Dairy Science**. v.79, p.1503-1509, 1996.

SANTOS, F.A.P. Metabolismo de proteínas. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Eds). **Nutrição de Ruminantes**. 1 ed., p. 255-286, 2006.

SATTER, L.D., SLYTER, L.L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. **British Journal of Nutrition**, v.32, n.1, p.199-208, 1974.

SAUER, F.D.; ERFLE, J.D.; FISHER, L.J. Propylene glycol and glycerol as a feed additive for lactating dairy cows: an evaluation of blood metabolite parameters. **Canadian Journal of Animal Science**, v.53, p.265-271, 1973.

SCHRÖDER, A; SÜDEKUM, K. H. **Glycerol as a by-product of biodiesel production in Diets for ruminants**. 10 international rapeseed congress, Canberra/Austrália, 1999.

SILVA, J.F.C.; LEÃO, M.I. **Fundamentos de nutrição de ruminantes**. Piracicaba, SP, Livroceres, 1979. 380p.

SMET, A.M. et al. Investigation of dry matter degradation and acidotic effect of some feedstuffs by means of *in sacco* and *in vitro* incubations. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.51, n.3-4, p.297-315, 1995

SNIFFEN, C.J., O'CONNOR, J.D., VAN SOEST, P.J., FOX, D.J.; RUSSEL, J.B. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 11, p. 3562-3577, Nov. 1992.

SOUZA, C. A. Sistemas catalíticos na produção de biodiesel por meio de óleo residual. In: 6º CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE GERAÇÃO DISTRIBUÍDA E ENERGIA NO MEIO RURAL, **Anais...** Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2006.

STOKES, S.R.; MILLER, T.K.; BLAUWEIKEL, R. Ruminal digestion and microbial utilization of diets varying in type of carbohydrate and protein. **Journal of Dairy Science**. v.74, p.871, 1991

STROBEL, H.J.; RUSSELL, J.B. Effects of pH and energy spilling on bacteria protein synthesis by carbohydrate-limited cultures of mixed rumen bacteria. **Journal of Dairy Science**, v.69, p.2941, 1986.

THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, et al. Simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminants feeds. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.48, n.1, p. 185-197, 1994.

TIBO, G.C.; VALADARES FILHO, S.C.; SILVA, J.F.C. et al. Níveis de concentrado em dietas de novilhos mestiços F1 Simental x Nelore. 2. Balanço nitrogenado, eficiência microbiana e parâmetros ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.3, p.921-929, 2000.

TRABUE, S.; SCOGGIN, K.; TJANDRAKUSUMA, S. et al., Ruminal fermentation of propyleneglicol and glycerol. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.50, p.7043-7051, 2007.

UNITED STATES ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY – USEPA. Evaluating Ruminant Livestock Efficiency Projects and Programs. In: **Peer Review Draft**. Washington, D. C., 2000, 48p.

VALADARES FILHO, S.C. Eficiência de síntese de proteína microbiana, degradação ruminal e digestibilidade intestinal da proteína bruta em bovinos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE EXIGÊNCIAS NUTRICIONAIS DE RUMINANTES. 1, VIÇOSA, 1995. **Anais...** Viçosa: UFV, 1995, p.354-388.

VALADARES FILHO, S.C.; PINA, D.S. Fermentação Ruminal. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Eds). **Nutrição de Ruminantes**. 1 ed., p. 151-182, 2006

Van SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2.ed. London: Constock Publishing Associates, 1994. 476p.

Van SOEST, P. J.; WINE, R.H. Use of detergents in analysis of fibrous feeds. IV. Determinations of plant cell-wall constituents. **Journal of the Association Official Anaytical Chemists**, v.50, 1967.

VERONESE, V.B.; BARRIOS, S.B.; DALL’ALBA, K.; et al. Glicerina: matéria-prima para preparação de adesivos e espumas poliuretânicas a resinas aquídicas. In: III CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DO BIODIESEL. **Anais...** Brasília-DF, 2009

VIEIRA, P. F. **Efeito do formaldeído na proteção de proteína e lipídeos em rações para ruminantes**. 1980. 98f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 1980.

WRIGHT, D.E. Fermentation of glycerol by rumen microorganisms. **New Zeland Journal of Agriculture Research**, v.12, p.281-286, 1969.