

Cinética ruminal de rações com diferentes níveis de glicerina bruta

Ruminal kinetics of rations with different crude glycerin levels

Viviane Villalba¹; Douglas Sampaio Henrique^{2*}; Renius de Oliveira Mello³;
Mariany da Paixão Marques⁴; Edom de Avila Fabricio⁴; Jhone Gleison de Oliveira¹

Resumo

O atual mercado consumidor de glicerol não possui demanda suficiente para consumir todo o glicerol que pode ser gerado pela alta produção de biodiesel, o que poderia ocasionar o descarte irresponsável deste resíduo no ambiente. Uma das alternativas para consumir parte do glicerol produzido é a sua utilização na alimentação de animais. Uma importante avaliação a ser feita ao se adicionar qualquer ingrediente na ração de ruminantes é se o novo ingrediente causa alguma modificação na cinética ruminal da matéria orgânica. Neste contexto, teores crescentes de glicerina bruta (0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 g kg⁻¹ de matéria seca) foram incluídos em rações isoproteicas e isoenergéticas formuladas para atender as exigências nutricionais de bovino com 300 kg de peso corporal para ganhar 1,2 kg d⁻¹, com o intuito de avaliar possíveis efeitos na cinética de degradação da matéria orgânica *in vitro*, no pH e no nível de amônia do líquido ruminal e na produção de proteína microbiana. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com nove tratamentos e três repetições. O volume máximo de gases produzidos pelas frações solúveis e insolúveis, a taxa de produção de gás pela degradação da fração solúvel, a taxa de produção de gás pela degradação da fração insolúvel, a latência, o pH ruminal, a produção de amônia e de proteína microbiana não diferiram estatisticamente dentre os teores de glicerina. Em contrapartida, a digestibilidade *in vitro* da matéria seca, da matéria orgânica e da fibra sofreram aumento linear com a inclusão de glicerina.

Palavras-chave: Glicerol, *in vitro*, parâmetros ruminais, produção de gases

Abstract

The current consumption of glycerol is not enough to use all the glycerol that can be generated by high production levels of biodiesel, which could lead to irresponsible disposal of this residue in the environment. An alternative to consuming part of the glycerol produced is its use in animal feeding. An important assessment to be made before adding any ingredient in the diet of ruminants is if the new ingredient causes some change in the kinetics of ruminal organic matter. In this context, increasing levels of crude glycerin (0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 and 240 g kg⁻¹ dry matter) were included in isonitrogen and isocaloric diets formulated to meet the nutritional requirements of a 300 kg beef cattle gaining 1.2 kg d⁻¹, in order to evaluate possible effects of glycerol on the *in vitro* kinetics of organic matter degradation, pH

¹ Discentes do Curso de Graduação em Zootecnia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, Campus Dois Vizinhos, Dois Vizinhos, PR. E-mail: viviane_villalba@hotmail.com; jhon_egleison@hotmail.com

² Prof., Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, UTFPR, Tutor do Grupo PET-Zootecnia, Campus Dois Vizinhos, Dois Vizinhos, PR. E-mail: douglas@utfpr.edu.br

³ Prof., Deptº de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, RS. E-mail: reniusmello@gmail.com

⁴ Discentes do Curso de Graduação em Zootecnia, UFSM, Santa Maria, RS. E-mail: marianypaixao@hotmail.com; edomfabricio@gmail.com

* Autor para correspondência

and ammonia ruminal levels, and microbial protein production. The experimental design was completely randomized with nine treatments and three replications. The maximum volume of gas produced by soluble and insoluble fractions, the rate of gas production by the degradation of the soluble fraction and insoluble fractions, the latency, the ruminal pH, the production of ammonia and of microbial protein did not differ among levels of glycerin. In contrast, the *in vitro* digestibility of dry matter, the organic matter and the fiber showed a linear increase with the inclusion of glycerin.

Key words: Glycerol, *in vitro*, gas production

Introdução

Os incentivos governamentais alavancaram a produção de biodiesel nos últimos anos, gerando concomitantemente um excesso de glicerol, um resíduo do processo de fabricação de biodiesel. Para cada tonelada de biodiesel são gerados, aproximadamente, 100 kg de glicerol, que é altamente poluidor. O atual mercado consumidor de glicerol (indústria de cosméticos, de resinas, farmacêutica, têxtil e alimentícia) não possui demanda suficiente para consumir todo o glicerol que pode ser gerado pela alta produção de biodiesel, o que poderia ocasionar o descarte irresponsável deste resíduo no ambiente (GONÇALVES; PEREZ; ÂNGELO, 2009).

Uma das alternativas para consumir parte do glicerol produzido é a sua utilização na alimentação de animais. Na dieta de suínos em crescimento e terminação a glicerina (denominação comercial do glicerol cujo nível de pureza é variável) está sendo utilizada como ingrediente energético que não afeta o desempenho e as características da carcaça (BERENCHTEIN et al., 2010). O glicerol na dieta das aves é utilizado como uma fonte de energia em dietas para alta produção (CERRATE et al., 2006).

Na alimentação de ruminantes utilizam-se os coprodutos da produção de biodiesel com o objetivo de elevar a produção e reduzir os custos, mas simultaneamente, diminuir a emissão de gases de efeito estufa pelos animais, o que permite obter créditos de carbono, que são interessantes para a iniciativa privada (ABDALLA et al., 2008).

Uma importante avaliação a ser feita ao se adicionar qualquer ingrediente na ração de ruminantes é se o novo ingrediente causa alguma modificação na cinética ruminal da matéria orgânica. A cinética ruminal pode ser estudada por técnicas gravimétricas e metabólicas envolvendo os métodos *in situ* (quando se incuba o material a ser estudado diretamente no rúmen do animal) ou *in vitro* (quando as incubações são feitas em laboratório usando técnicas e equipamentos que simulam o ambiente ruminal) a fim de estimar as taxas de degradação da massa incubada em um período determinado (MALAFAIA et al., 1998).

O objetivo da condução do presente trabalho foi avaliar o efeito da inclusão de glicerina bruta, oriunda da produção de biodiesel com óleo de soja (*Glycine max* (L.) Merrill), na cinética de degradação ruminal *in vitro* nas rações para bovinos.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Núcleo Integrado de Desenvolvimento em Análises Laboratoriais (NIDAL) do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos (DTCA) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Rio Grande do Sul, durante os meses de fevereiro a julho de 2011. O trabalho foi executado obedecendo às normas técnicas de biosegurança e ética e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (parecer número: 022/2012).

Os tratamentos foram constituídos pelos níveis 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 g kg⁻¹ de glicerina bruta na matéria seca de dietas para ruminantes.

As rações foram formuladas de acordo com Henrique et al. (2011) para atender às exigências de um bovino mestiço com 300 kg de peso corporal e ganho de 1,2 kg dia⁻¹. Todas as rações eram isonitrogenadas e isocalóricas, com extrato etéreo em torno de 30 g kg⁻¹ e fibra acima de 200 g kg⁻¹ (Tabela 1).

A glicerina bruta adicionada nas rações experimentais foi cedida pela empresa Granol S/A (Cachoeira do Sul/RS), tendo sido obtida a partir da produção de biodiesel utilizando como matéria-prima o óleo da semente de *Glycine max* (Merrill). As análises físico-químicas da glicerina bruta foram efetuadas na Divisão de Biocombustíveis da TECPAR (DBIO-TECPAR) e no Núcleo Integrado de Desenvolvimento em Análises Laboratoriais da UFSM (NIDAL-UFSM) utilizando os princípios da AOAC (1995), AOCS (2009) e ASTM (2010), os resultados nas análises estão descritos na Tabela 2.

Tabela 1. Dietas formuladas com aproximadamente 400 g kg⁻¹ de volumoso e 600 g kg⁻¹ de concentrado com inclusão de 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 g kg⁻¹ de glicérol substituindo parte do concentrado.

Ingrediente ¹	0	30	60	90	120	150	180	210	240
Milho Moído	237	251	267	284	289	252	203	172	184
Farelo de soja	160	166	172	179	179	184	192	199	205
Silagem de milho	578	531	478	425	398	400	404	399	350
Glicerina	0	30	60	90	120	150	180	210	240
Cloreto de sódio	2,3	1,4	0,4	0	0	0	0	0	0
Mistura mineral	14,4	11,8	11,8	11,8	3,8	2,4	11,8	11,8	11,7
Calcário calcítico	8,9	9,6	10,4	11,1	11,5	10,6	9,2	8,4	9,0
Composição da dieta ¹									
Matéria seca ²	566	592	621	650	664	663	662	664	691
Cinzas	58,9	56,8	57,3	58,3	51,6	50,9	60,5	61,1	62,4
Proteína bruta	133	135	137	139	139	138	138	138	139
Fibra	360	337	310	284	270	268	266	261	236
Gordura	30,0	30,6	31,2	31,8	32,1	31,4	30,1	29,4	29,9

¹Expressos em g kg⁻¹ de matéria seca;

²Expresso em g kg⁻¹ de matéria natural.

Fonte: Elaboração dos autores.

Tabela 2. Composição da glicerina bruta adicionada às dietas experimentais, em base natural.

	Valores ¹	Método analítico
Densidade, g/mL	1,248	Massa:Volume
Potencial hidrogeniônico (pH), escalar	5,67	Potenciômetro digital
Umidade (água), g kg ⁻¹	110	ASTM ² D 6304:2007 - (<i>Karl Fischer</i>)
Álcool (metanol), g kg ⁻¹	0,0	EN 14110:2003 (cromatografia gasosa <i>headspace</i>)
Glicerol total (pureza), g kg ⁻¹	848	Farmacopéia Brasileira, 4 ^a edição, parte II, fascículo 2, pág. 95-2
Lipídios totais, g kg ⁻¹	21	Bligh & Dyer (1959)
Proteína bruta, g kg ⁻¹	0,6	AOAC ⁴ 984.13
Cinzas, g kg ⁻¹	51	ABNT ⁵ NBR ⁶ 9842:2006
Potássio, mg kg ⁻¹	247	
Sódio, mg kg ⁻¹	22.945	
Cálcio, mg kg ⁻¹	44,9	ASTM D 5708:2005 (ICP OES ⁷)
Fósforo, mg kg ⁻¹	548	
Magnésio, mg kg ⁻¹	19,5	

¹ Valores médios de ensaios realizados em duplicata; ² ASTM - *American Society for Testing and Materials*; ³ IUPAC - *International Union Pure Applied Chemistry* = União Internacional de Química Pura e Aplicada (UIQPA); ⁴ AOAC - *Association of Official Analytical Chemists*; ⁵ ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas; ⁶ NBR - Normas Brasileiras; ⁷ ICP OES - *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy* = Espectroscopia de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente

Fonte: Elaboração dos autores.

As análises químicas das rações totais foram executadas conforme as técnicas descritas por Campos, Nussio e Nussio (2004) e Silva e Queiroz (2002). Para as análises de matéria seca (967.03), cinzas (942.05), proteína bruta (984.13), e extrato etéreo (920.29) utilizaram-se os protocolos analíticos da AOAC (1995). Os teores de fibra em detergente neutro - FDN (AOAC 2002.04) foram quantificados de acordo com Mertens (2002), de fibra em detergente ácido - FDA (AOAC 973.18) e lignina em detergente ácido - LDA (H₂SO₄ 72%) segundo Goering e Van Soest (1970). Para a determinação das digestibilidades *in vitro* verdadeiras da matéria seca (DIVVMS), da matéria orgânica (DIVVMO) e da fibra em detergente neutro (DFDN) utilizaram-se os princípios de Goering e Van Soest (1970) com adaptação para a utilização do fermentador Daisy^{II} Incubator (Ankom Technology, Macedon - NY, USA).

A coleta do líquido ruminal para a determinação da digestibilidade por meio da produção de gases, *in vitro* foi feita em um bovino fistulado no rúmen, mantido em pastagem de azevém consorciada com trevo branco. Para a coleta utilizou-se uma garrafa térmica de 4000 mL pré-aquecida com água a 39°C, sendo esvaziada somente no momento da coleta. A coleta do líquido ruminal foi feita na parte da manhã, manualmente com auxílio de luvas descartáveis. Foi retirada uma amostra da digesta ruminal, da qual se extraía o líquido ruminal pressionando com as mãos. O líquido assim obtido foi filtrado usando quatro camadas de gaze acondicionadas sobre um funil que foi colocado no gargalo da garrafa térmica.

As soluções tampão A e B (Tabela 3) foram aquecidas a 39°C e em seguida adicionadas a um novo recipiente com a proporção 5:1. A quantia de A para B é ajustada para obter pH final de 6,8 a 6,9 à 39°C.

Tabela 3. Reagentes utilizados nos tampões.

Solução tampão A:	g/1000 mL
KH ₂ PO ₄	10
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
NaCl	0.5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1
Uréia	0.5
Solução tampão B:	g/100 mL
Na ₂ CO ₃	15
Na ₂ S ₉ H ₂ O	1.0

Fonte: Elaboração dos autores.

Foram adicionados 1000 mL de água destilada quente em um balão volumétrico de 2000 mL e em seguida colocados na ordem em que são descritos os reagentes nas devidas proporções. Depois da solubilização foi acrescentada água destilada suficiente para completar o volume do balão.

A cinética de degradação ruminal foi avaliada pela técnica *in vitro* de produção de gases. Aproximadamente 1g de cada um dos nove substratos dietéticos e uma amostra sem substrato (branco) foram incubados em dez garrafas de vidro de 250 mL, contendo 20 mL de líquido ruminal e 80 mL de tampão (MARTEN; BARNES, 1980) cada, ou seja, em uma relação inóculo:meio de cultura (v/v) de 1:4. Os jarros foram vedados com dez módulos de digestão *Ankom^{RF} Gas Production System (Ankom Technology, Macedon - NY, USA)*, em sistema acoplado a um computador equipado com aplicativo *Gas Pressure Monitor (Ankom Technology, Macedon - NY, USA)* e dispositivo de medição automatizada dos gases metabólicos por sinal de radiofrequência sem fio (*wireless*), e mantidos em banho-maria a 39 ± 1°C durante 72 horas. Cada incubação contendo todos os tratamentos foi repetida por três vezes em momentos distintos.

As pressões de gases foram mensuradas em intervalos de 15 minutos durante 72 h de incubação, totalizando n = 289 por curva. As leituras de pressão (psi) foram convertidas para moles de gases usando a lei do gás ‘ideal’, e então para mililitros (mL) de

gases através da Lei de Avogadro. Posteriormente, os resultados foram expressos em mL de gases produzidos por grama de matéria orgânica degradada (mL g⁻¹ MO degradada).

Decorrida as 72 h de incubação, as amostras de cada unidade experimental foram centrifugadas a 10.000 × g por 20 minutos à temperatura de 5°C. O sobrenadante foi coletado para análise de nitrogênio amoniacal (N-NH₃). Os *pellets* foram ressuspensos em solução salina (0,8% NaCl), homogeneizados e recentrifugados. O sobrenadante foi desprezado e os *pellets* novamente ressuspensos em solução salina e congelados a -10°C para posterior análise de proteína microbiana.

O potencial hidrogeniônico (pH) foi determinado imediatamente após a amostragem com potenciômetro digital. As análises de N-NH₃ foram realizadas pelo método colorimétrico de Chaney e Marbach (1962) em densidade ótica de 550 nm; e a quantificação de proteína microbiana pelo método de Bradford (1976) em densidade ótica de 595 nm empregando soroalbumina bovina – BSA (Sigma-Aldrich A4378) como padrão.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com nove tratamentos e três repetições, conforme o modelo estatístico:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

em que, Y_{ij} = valor observado no i -ésimo tratamento e j -ésima repetição; μ = média geral da variável resposta; α_i = efeito fixo do i -ésimo nível de adição de glicerina bruta na dieta; ε_{ij} = efeito aleatório associado a observação ij pressuposto $\varepsilon_{ij} \sim \text{iid} NID(0; \sigma^2)$.

Todas as análises estatísticas foram realizadas no aplicativo SAS® *System for Windows™* versão 9.0 (SAS Institute Inc., Cary - NC, USA), ao nível de significância de 0,05. Os dados foram submetidos à análise de variância univariada pelo procedimento GLM (*General Linear Models Procedures*), e suas médias ajustadas pelo método dos quadrados mínimos ordinários com o comando LSMEANS

(*Least Squares Means*). Além disso, foi efetuada análise de regressão linear simples e polinomial para investigar as alterações nas variáveis dependentes em função dos teores de adição de glicerina bruta. Os parâmetros do modelo de regressão linear foram estimados pelo procedimento REG.

As curvas de produção acumulativa de gases observadas *in vitro* foram ajustadas pelo modelo logístico bicompartimental (SCHOFIELD; PITT; PELL, 1994), dado por:

$$V = \frac{V_1}{1 + e^{[2-4k_1(t-\lambda)]}} + \frac{V_2}{1 + e^{[2-4k_2(t-\lambda)]}} + \varepsilon$$

em que, V = volume de gases (mL g⁻¹ MO degradada) no tempo t ; V_1 = volume máximo de gases produzidos pela degradação da fração solúvel de rápida digestão; V_2 = volume máximo de gases produzidos pela degradação da fração insolúvel potencialmente degradável de lenta digestão; V_T ($V_1 + V_2$) = volume total de gases produzidos; k_1 = taxa específica de produção de gases pela degradação da fração solúvel de rápida digestão; k_2 = taxa específica de produção de gases pela degradação da fração insolúvel potencialmente degradável de lenta digestão; t = tempo de incubação; e = exponencial; λ = fase de latência (*lag time*); ε = erro experimental associado a cada observação, suposto \sim NIID ($0; \sigma^2$). Os parâmetros do modelo considerado foram estimados pelo algoritmo de Gauss-Newton

modificado inserido no procedimento NLIN do aplicativo SAS®.

Com o intuito de verificar a igualdade dos parâmetros e a identidade das equações de regressão não-linear ajustadas para as diferentes rações, aplicou-se o teste da razão de verossimilhança com aproximações dadas pelas estatísticas χ^2 e F (REGAZZI; SILVA, 2004). As hipóteses testadas foram:

$H_0^{(1)}: V_{11} = \dots = V_{1H}$, isto é, as “H” equações têm V_1 iguais;

$H_0^{(2)}: V_{21} = \dots = V_{2H}$, isto é, as “H” equações têm V_2 iguais;

$H_0^{(3)}: k_{11} = \dots = k_{1H}$, isto é, as “H” equações têm k_1 iguais;

$H_0^{(4)}: k_{21} = \dots = k_{2H}$, isto é, as “H” equações têm k_2 iguais;

$H_0^{(5)}: \lambda_1 = \dots = \lambda_H$, isto é, as “H” equações têm λ comum;

$H_0^{(6)}: \tilde{\theta}_1 = \dots = \tilde{\theta}_H$, isto é, as “H” equações

são idênticas, em que $\tilde{\theta}_h = \begin{bmatrix} V_{1h} \\ V_{2h} \\ k_{1h} \\ k_{2h} \\ \lambda_h \end{bmatrix}$.

A estatística do teste da razão de verossimilhança com aproximação pela distribuição χ^2 é dada por:

$$\chi_{calc}^2(H_0) = -N \ln \left(\frac{\hat{\sigma}_\Omega^2}{\hat{\sigma}_\omega^2} \right) = -N \ln \left(\frac{SQRR_\Omega}{SQRR_\omega} \right) \underset{\sim H_0}{\overset{sob H_0}{\sim}} \chi_{tab}^2(\alpha; \nu)$$

em que, $\chi_{calc}^2 = \chi^2$ calculado; N = número total de observações; \ln = logaritmo natural; $\hat{\sigma}_\Omega^2$ = estimativa de máxima verossimilhança de σ^2 sob nenhuma restrição no espaço paramétrico Ω (modelo completo); $\hat{\sigma}_\omega^2$ = estimativa de máxima verossimilhança de σ^2 sob as restrições lineares definidas em H_0 (modelo reduzido); $SQRR_\Omega$ = soma de quadrados do resíduo da regressão no modelo completo; $SQRR_\omega$ = soma de quadrados do

resíduo da regressão no modelo reduzido; $\chi_{tab}^2 = \chi^2$ tabelado; α = nível de significância; ν = número de graus de liberdade, sendo $\nu = p_\Omega - p_\omega$, ou seja, o número de parâmetros estimados nos modelos completo e reduzido, respectivamente.

A estatística do teste da razão de verossimilhança com aproximação pela distribuição F é dada por:

$$F_{calc}(H_0) = \frac{(S_p - S_f)/\nu_e}{S_f/\nu_f} \underset{\sim H_0}{\overset{sob H_0}{\sim}} F_{tab}(\alpha; \nu_e; \nu_f)$$

em que, $F_{calc} = F$ calculado; S_p = soma de quadrados residuais do modelo reduzido (sob restrição); S_f = soma de quadrados residuais do modelo completo; ν_f = número de graus de liberdade do resíduo do modelo completo; ν_e = número de graus de liberdade do resíduo do modelo reduzido menos o número de graus de liberdade do resíduo do modelo completo; $F_{tab} = F$ tabelado; α = como definido anteriormente.

Tanto nos modelos de regressão linear e não-linear, o coeficiente de determinação (r^2) foi expresso em relação à fonte tratamentos (regressão + falta de ajuste).

Resultados e Discussões

O padrão de qualidade estabelecido pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) exige concentração de glicerol mínima de 800 g kg⁻¹, de metanol máxima de 150 ppm e umidade menor ou igual a 120 g kg⁻¹ (MAPA, 2010). O nível de pureza do glicerol fornecido na ração de animais pode influenciar o consumo de matéria seca (CHUNG et al., 2007) ou, dependendo dos níveis de metanol, gerar uma intoxicação, principalmente em não ruminantes (LEÃO et al., 2012). No rúmen o metanol tende a ser reduzido a metano pela microbiota evitando maiores implicações na saúde do hospedeiro (POL; DEMEYER, 1988). Entretanto, a glicerina bruta utilizada no presente trabalho está dentro dos padrões do Ministério e continha nível zero de metanol (Tabela 2).

Nos animais, o glicerol é um componente do metabolismo normal que se encontra na circulação e nas células, sendo derivado da lipólise no tecido adiposo, da hidrólise dos triglicerídeos das lipoproteínas do sangue e da gordura dietética (NELSON; COX, 2011). Na célula o glicerol é metabolizado a glicerol-3-fosfato e posteriormente a dihidroxiacetona fosfato e gliceraldeído-3-fosfato, os dois últimos são intermediários da via glicolítica e

da gliconeogênese. O destino metabólico do glicerol pode variar de acordo com o tecido e o estado nutricional do animal. Assim, ele poderá fornecer esqueleto carbônico para a gliconeogênese, ser oxidado para gerar ATP, ou servir como precursor da síntese de triacilglicerol (NELSON; KOX, 2011).

O glicerol pode ser fermentado a propionato ou a butirato no rúmen (RÉMOND; SOUDAY; JOUANY, 1993; WANG et al., 2009). O propionato é absorvido pelo epitélio ruminal e posteriormente é metabolizado a oxaloacetato no fígado (FAHEY; BERGER, 1998). Em situações de balanço energético negativo, o oxaloacetato é transformado em glicose via gliconeogênese (NELSON; KOX, 2011). Por isso, a glicerina bruta é utilizada como um substrato gliconeogênico para ruminantes (CHUNG et al., 2007). Entretanto, o nível de glicerol na dieta total pode afetar, em certas circunstâncias, a digestibilidade dos alimentos no trato gastrointestinal (WANG et al., 2009).

A curva de degradação dos alimentos no rúmen possui fases distintas compostas pela fase de latência, que é o período em que não há degradação, mas apenas o preparo da matéria a ser degradada (hidratação, colonização pelas bactérias) e a síntese de enzimas microbianas; a fase exponencial de degradação, na qual há um rápido aumento da taxa de degradação; e a fase estacionária em que a degradação se altera minimamente em função do tempo apresentando um comportamento assintótico. Essas três fases formam uma curva sigmóide que pode ser obtida pelos perfis de produção de gás em função do tempo (HARVEY; CHAMPE; FISHER, 2008). Em todas as dietas experimentais observou-se o mesmo padrão sigmoidal para a curva de produção de gás (Figura 1).

A partir dos perfis de degradação das frações solúvel (V_1) e insolúvel (V_2), (Figura 1), pode-se observar claramente que a fração solúvel da matéria seca (V_1) é degradada mais rápido do que a fração insolúvel (V_2).

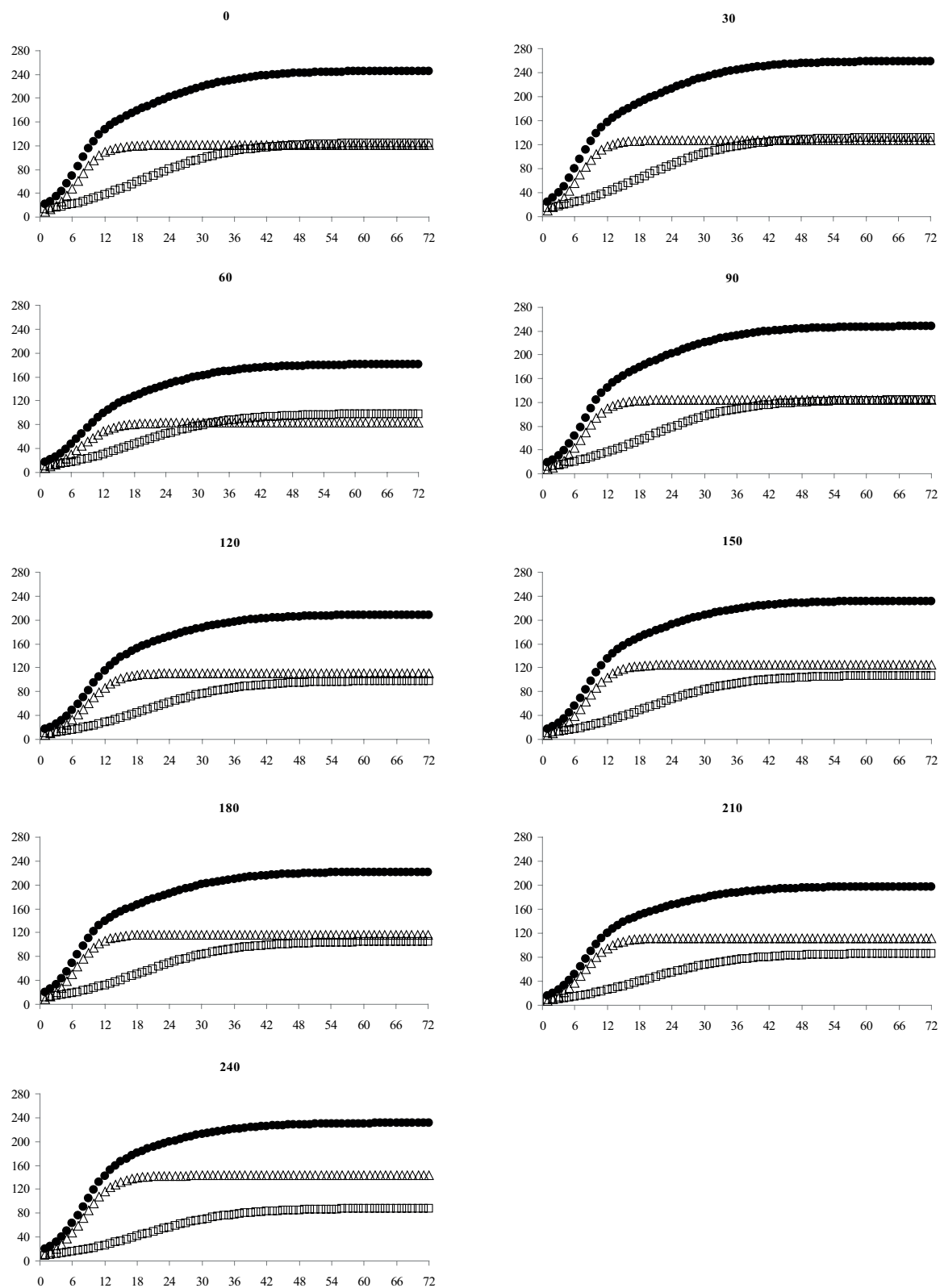
A soma do gás produzido pelas frações V_1 e V_2 resulta na produção acumulativa de gases da matéria orgânica ($V_T = V_1 + V_2$). Independente do nível de adição de glicerina bruta na dieta, a produção de gás aumentou nas primeiras horas de incubação pela alta degradação da matéria orgânica (MO) até esta se tornar constante e atingir uma assíntota (Figura 2).

O volume máximo de gases produzidos pelas frações solúveis (V_1) e insolúveis (V_2) não diferiram estatisticamente (Tabela 4) dentre os teores de glicerina. O mesmo foi observado para os outros parâmetros da curva de degradação como taxa de produção de gás pela degradação da fração solúvel (k_1), a taxa de produção de gás pela degradação da fração insolúvel (k_2) e a taxa de latência λ (Tabela 4). Esses resultados demonstram que o acréscimo de glicerina nas dietas não interferiu na produção de gás originada pela incubação da matéria orgânica. Entretanto, a DIVVMS, a DIVVMO e DFDN sofreram aumento linear com a inclusão de glicerina (Tabela 6). Efeito semelhante foi encontrado na produção total de ácidos graxos no rúmen por Wang et al. (2009) ao fornecer 0, 100, 200 e 300 g d⁻¹ de glicerol para novilhos Simental. Donkin et al. (2009) também relataram acréscimo da digestibilidade aparente da matéria orgânica no trato gastrointestinal total ao aumentar o teor de glicerol de 0 até 150 g kg⁻¹ em dietas de vacas em lactação. Ambos os autores utilizaram técnicas diferentes da realizada neste trabalho para mensurar a digestibilidade. Enquanto averiguamos a digestibilidade *in vitro*, Wang et al. (2009) usaram a técnica *in situ* e Donkin et al (2009) o método *in vivo*.

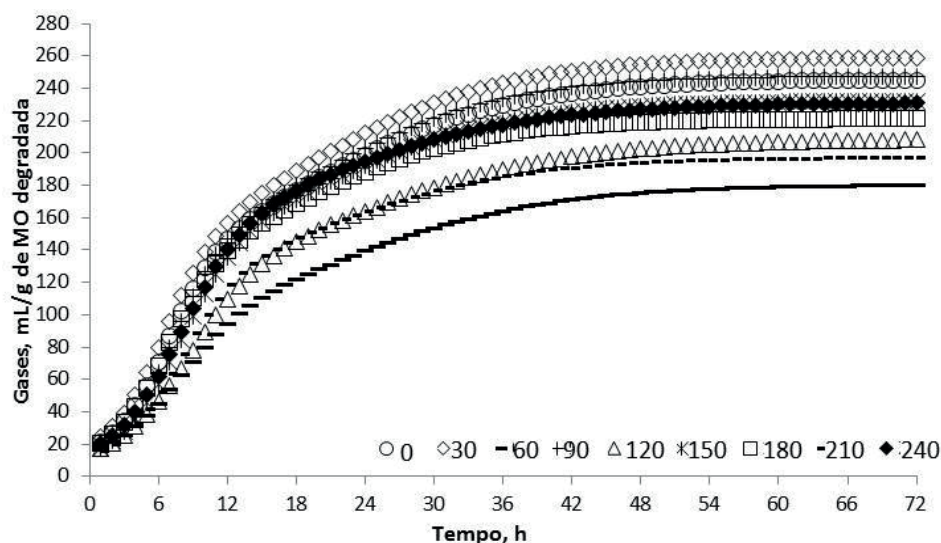
Foi realizado o teste de identidade de modelos não-lineares (REGAZZI; SILVA, 2004) para avaliar se poderíamos usar apenas uma curva de degradação para todas as dietas experimentais, ao invés de uma curva para cada nível de glicerina, conforme representado na Figura 2. A hipótese de que os parâmetros V_1 , V_2 , k_1 , k_2 e λ não seriam diferentes para as diferentes dietas, não foi rejeitada quando testados individualmente (Tabela 5). No entanto, a hipótese geral, que testa a probabilidade de que o conjunto completo de parâmetros de todas as curvas seria igual, foi rejeitada (Tabela 5). Ou seja, cada parâmetro isolado pode ser considerado semelhante para todos os tratamentos, mas as curvas completas (com todos os parâmetros) foram consideradas diferentes entre si. Este resultado, provavelmente se deve à alta correlação entre os parâmetros do modelo que quando analisados em conjunto influenciam nos resultados do teste de identidade (Tabela 4).

A proteína microbiana não sofreu efeito do teor de glicerina na ração (Tabela 6). Donkin et al. (2009), também não encontraram variação significativa na proteína microbiana em função do teor de glicerol na ração. Contudo, nossos resultados diferem dos obtidos por Wang et al. (2009) em cujo trabalho o aumento do teor de glicerol na ração causou decréscimo linear no conteúdo de NH₃ e no pH ruminal. Mesmo havendo efeito da glicerina no pH, os autores afirmaram que os valores se mantiveram dentro do nível ideal para a atividade das bactérias celulolíticas (WANG et al., 2009) e sugerem que a queda no pH com o aumento do teor de glicerol na ração se deve, provavelmente, à maior taxa de degradação do glicerol em comparação com o amido.

Figura 1. Eixo x - Tempo de incubação (h); Eixo y – Volume de gás produzido (mL/g de MO) pela degradação da matéria orgânica (●), fração solúvel (Δ) e fração insolúvel potencialmente degradável (□) em dietas com 0 a 240 g kg⁻¹ de glicerina bruta na matéria seca.



Fonte: Elaboração dos autores.

Figura 2. Perfis de produção acumulativa de gases em dietas com 0 a 240 g kg⁻¹ de glicerina bruta na matéria seca.

Fonte: Elaboração dos autores.

Tabela 4. Estimativas dos parâmetros das curvas de produção gases em dietas com 0 a 240 g kg⁻¹ de glicerina bruta, e seus respectivos desvio-padrão assintótico (DPA) e coeficiente de determinação (r²).

Parâmetros	Glicerina bruta, g kg ⁻¹ MS									Equação ou Média	r ²
	0	30	60	90	120	150	180	210	240		
\widehat{V}_1 , mL g ⁻¹	121	127	83	124	111	125	117	112	143	$\bar{y}_i = 118$	-
\widehat{V}_2 , mL g ⁻¹	125	132	98	124	98	107	105	86	88	$\bar{y}_i = 107$	-
\widehat{k}_1 , h ⁻¹	0,11	0,11	0,09	0,11	0,09	0,10	0,11	0,10	0,09	$\bar{y}_i = 0,10$	-
\widehat{k}_2 , h ⁻¹	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	$\bar{y}_i = 0,03$	-
$\widehat{\lambda}$, h	2,4	2,0	2,1	2,9	2,9	3,0	2,1	2,7	2,4	$\bar{y}_i = 2,5$	-
DPA	13,3	20,8	67,0	14,8	28,8	45,9	14,5	50,5	17,6		
r ²	0,96	0,91	0,34	0,95	0,80	0,65	0,94	0,52	0,92		

\widehat{V}_1 = volume máximo de gases produzidos pela degradação da fração solúvel de rápida digestão;

\widehat{V}_2 = volume máximo de gases produzidos pela degradação da fração insolúvel potencialmente degradável de lenta digestão;

\widehat{k}_1 = taxa específica de produção de gases pela degradação da fração solúvel;

\widehat{k}_2 = taxa específica de produção de gases pela degradação da fração insolúvel potencialmente degradável;

$\widehat{\lambda}$ = fase de latência ou tempo de hidratação, aderência e colonização microbiana (*lag time*).

Fonte: Elaboração dos autores.

Tabela 5. Resultados do teste de igualdade dos parâmetros e identidade dos modelos ajustados às curvas de produção de gases, com aproximação dada por estatística qui-quadrado e F.

Hipóteses (H_0 H_0)	Qui-quadrado			F			
	GL ¹	$\chi^2_{\text{calc.}}$ ²	P ³	GL _n ⁴	GL _d ⁵	F _{calc.} ⁶	P ³
$H_0^{(1)}$: $V_{11} = \dots = V_{1H}$	8	6,04	0,6427	8	7.758	0,75	0,6462
$H_0^{(2)}$: $V_{21} = \dots = V_{2H}$	8	9,25	0,3215	8	7.758	1,15	0,3255
$H_0^{(3)}$: $k_{11} = \dots = k_{1H}$	8	2,45	0,9639	8	7.758	0,30	0,9644
$H_0^{(4)}$: $k_{21} = \dots = k_{2H}$	8	1,96	0,9823	8	7.758	0,24	0,9826
$H_0^{(5)}$: $\lambda_1 = \dots = \lambda_H$	8	3,72	0,8817	8	7.758	0,46	0,8833
$H_0^{(6)}$: $\tilde{\theta}_1 = \dots = \tilde{\theta}_H$	40	2541,61	0,0000	40	7.758	74,68	0,0000

¹ GL = número de graus de liberdade.² $\chi^2_{\text{calc.}}$ = qui-quadrado calculado.³ P = valor probabilístico (Pr > χ^2 ou Pr > F).⁴ GL_n = número de graus de liberdade do numerador.⁵ GL_d = número de graus de liberdade do denominador.⁶ F_{calc.} = F calculado.**Fonte:** Elaboração dos autores.**Tabela 6.** Resultados da análise de variância univariada, médias e equações de regressão ajustadas para as variáveis analisadas em dietas com 0 a 240 g kg⁻¹ de glicerina bruta.

Variáveis	Glicerina bruta, g kg ⁻¹									P ¹	CV ²	EPM ³
	0	30	60	90	120	150	180	210	240			
pH ⁴ (escala)	6,97	7,00	6,97	6,99	7,00	6,97	7,02	7,01	6,98	0,9108	4,62	0,0621
N-NH ₃ ⁵ (mg L ⁻¹) ¹	466	474	426	499	404	464	525	449	441	0,9924	43,74	16,565
PTN ⁶ (mg L ⁻¹)	407	513	350	391	404	422	727	557	459	0,4123	63,83	57,725
DIVVMS ⁷ (g kg ⁻¹)	746	768	789	799	823	828	859	830	856	0,0000	4,62	7,3243
DIVVMO ⁸ (g kg ⁻¹)	730	754	777	787	814	819	850	819	847	0,0000	4,96	7,7637
DFDN ⁹ (g kg ⁻¹)	294	310	322	291	344	357	469	348	392	0,0004	16,15	10,860

¹P= Valor probabilístico (Pr > F); ²CV (%)= Coeficiente de variação; ³EPM= Erro Padrão da Média; ⁴pH=potencial hidrogeniônico após 72h de incubação: $\bar{y}_{pH(\text{escala})} = 6,99$; ⁵N-NH₃=nitrogênio amoniacal após 72h de incubação: $\bar{y}_{N-NH_3(\text{mg/L})} = 461$; ⁶PTN= proteína microbiana após 72h de incubação: $\bar{y}_{PTN(\text{mg/L})} = 470$; ⁷DIVVMS= digestibilidade *in vitro* verdadeira da matéria seca: $\hat{y}_{DIVVMS(\text{g/kg})} = 757,92 - 0,4347x$ ($r^2 = 0,8576$); ⁸DIVVMO= digestibilidade *in vitro* verdadeira da matéria orgânica: $\hat{y}_{DIVVMO(\text{g/kg})} = 743,45 - 0,4591x$ ($r^2 = 0,8513$); ⁹DFDN= digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro: $\hat{y}_{DFDN(\text{g/kg})} = 290,61 + 4,4421x$ ($r^2 = 0,4074$).

Fonte: Elaboração dos autores.

Conclusão

A adição de glicerina bruta nas rações não alterou significativamente a degradação *in vitro* da matéria orgânica incubada, a concentração de amônia, a proteína microbiana e o pH do líquido ruminal. A glicerina é uma fonte alternativa de energia, que pode ser um potencial substituto do milho na ração animal. Entretanto, são necessários mais estudos com adição da glicerina na alimentação de ruminantes para avaliar sua aceitação pelos animais e possíveis efeitos metabólicos.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pela concessão de auxílio financeiro; a GRANOL pela doação da glicerina bruta; e aos laboratoristas Giuliano Fernandes Zagonel, Elisa Maria Suchek e Ludianne Toporowicz da DBIO-TECPAR pela ajuda com os ensaios de caracterização da glicerina bruta.

Referências

ABDALLA, A. L.; SILVA FILHO, J. C.; GODOI, A. R.; CARMO, C. A.; EDUARDO, J. L. P. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, MG, v. 37, p. 260-258, 2008. Suplemento Especial.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. Official methods of analysis. 16th ed. Arlington: AOAC International, 1995. 2000 p.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY - AOCS. Official methods and recommended practices of the AOCS. 6th ed. Champaign: AOCS, 2009. 1200 p.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS - ASTM. Annual Book of ASTM Standards. West Conshohocken: ASTM International, Petroleum Products and Lubricants (I - IV): D56 - 6973, v. 05.01 - 05.04, 2010.

BERENCHTEIN, B.; COSTA, L. B.; BRAZ, D. B.; ALMEIDA, V. V.; TSE, M. L. P.; MIYADA, V. S. Utilização de glicerol na dieta de suínos em crescimento

e terminação. *Revista Brasileira Zootecnia*, Viçosa, MG, v. 39, n. 7, p. 1491-1496, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochemical*, local, v. 72, n. 7, p. 248-254, 1976.

CAMPOS, F. P.; NUSSIO, C. M.; NUSSIO, L. G. *Métodos de análise de alimentos*. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 2004. 135 p.

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

CHANEY, A. L.; MARBACH, E. P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical Chemistry*, v. 8, n. 2, p. 130-132, 1962.

CHUNG, Y. H.; RICO, D. E.; MARTINEZ, C. M.; CASSIDY, T. W.; NOIROT, V.; AMES, A.; VARGA, G. A. Effects of feeding dry glycerin to early postpartum Holstein cows on lactational performance and metabolic profiles. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 90, n. 8, p. 5682-5691, 2007.

DONKIN, S. S.; KOSER, S. L.; WHITE, H. M.; DOANE, P. H.; CECAVA, M. J. Feeding value of glycerol as a replacement for corn grain in rations fed to lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 92, n. 10, p. 5111-5119, 2009.

FAHEY, G. C.; BERGER, L. L. Carbohydrate nutrition of ruminants. In: CHURCH, D. C. *The ruminant animal digestive physiology and nutrition*. Englewoods Cliffs, New Jersey: Waveland Press, 1998. p. 269-297.

GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. *Forage fiber analysis: apparatus, reagents, procedures and some applications*. Washington, D.C.: United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, 1970. 20 p. (USDA, Agricultural Handbook, 379).

GONÇALVES, B. R. L.; PEREZ, L.; ÂNGELO, A. C. D. Glicerol: uma inovadora fonte de energia proveniente da produção de biodiesel. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ADVANCES IN CLEANER PRODUCTION, São Paulo. *Anais...* São Paulo: Universidade Paulista, 2009. p. 1-6.

HARVEY, R. A.; CHAMPE, P. C.; FISHER, B. D. *Microbiologia ilustrada*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 448 p.

HENRIQUE, D. S.; LANA, R. P.; VIEIRA, R. A. M.; FONTES, C. A.; BOTELHO, M. F. A model for evaluating beef cattle rations considering effects of

- ruminal fiber mass. *Revista Brasileira Zootecnia*, Viçosa, MG, v. 40, n. 11, p. 2538-2547, 2011.
- LEÃO, J. P.; RAMOS, A. T.; MARUO, V. M. SOUZA, D. P. M.; NEIVA, J. N. M.; RESTLE, J.; MORON, S. E. Anatomopatologia de amostras de bovinos alimentados com glicerol. *Ciência Rural*, Santa Maria, RS, v. 42, n. 7, p. 1253-1256, 2012.
- MALAFAIA, P. A. M.; FILHO VALADARES, S. de C.; VIEIRA, R. A. M.; SILVA, J. F. C.; PEREIRA, J. C. Cinética ruminal de alguns alimentos investigada por técnicas gravimétricas e metabólicas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, MG, v. 27, n. 2, p. 370-380, 1998.
- MARTEN, G. C.; BARNES, R. F. Prediction of energy digestibility of forages with in vitro rumen fermentation and fungal enzyme systems. In: STANDARDIZATION OF ANALYTICAL METHODOLOGY FOR FEEDS WORKSHOP, Ottawa. *Proceeding...* Ottawa: International Development Research. Center, 1980. p. 61-128.
- MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. *Journal of AOAC International*, Gaithersburg, v. 85, n. 6, p. 1217-1240, 2002.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. PAULE, B. J. A. Glicerina, subproduto da indústria do biodiesel, perspectivas de uso na alimentação animal. Piracicaba: BeefPoint, 02 set. 2010. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Oleaginosas_e_biodiesel/10_reuniao/Apresentacao_Glicerina.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2012.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger: princípios de bioquímica*. 5. ed. São Paulo: SALVIER, 1011. 1304 p.
- POL, A.; DEMEYER, D. I. Fermentation of metanol in the sheep rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 54, n. 3, p. 832-834, mar. 1988.
- REGAZZI, A. J.; SILVA, C. H. O. Teste para verificar a igualdade de parâmetros e a identidade de modelos de regressão não-linear. I. dados no delineamento inteiramente casualizado. *Revista de Matemática e Estatística*, São Paulo, v. 22, n. 3, p. 33-45, 2004.
- RÉMOND, B.; SOUDAY, E.; JOUANY, J. P. In vitro and in vivo fermentation of glycerol by rumen microbes. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, v. 41, n. 2, p. 121-132, apr. 1993.
- SILVA, D. J. da; QUEIROZ, A. C. de. *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. 3. ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2002. 235 p.
- SCHOFIELD, P.; PITT, R. E.; PELL, A. N. Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 72, n. 11, p. 2980-2991, nov. 1994.
- WANG, C.; LIU, Q.; HUO, W. J.; YANG, W. Z.; DONG, K. H.; HUANG, Y. X.; GUO, G. Effects of glycerol on rumen fermentation, urinary excretion of purine derivatives and feed digestibility in steers. *Livestock Science*, Amsterdam, v. 121, n. 1, p. 15-20, mar. 2009.

