

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**IMPACTO NUTRICIONAL DA INFUSÃO RUMINAL DE  
NÍVEIS DE GLICERINA BRUTA EM OVINOS  
ALIMENTADOS COM FORRAGEM**

**TESE DE DOUTORADO**

**Diego Zeni**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2013**

# **IMPACTO NUTRICIONAL DA INFUSÃO RUMINAL DE NÍVEIS DE GLICERINA BRUTA EM OVINOS ALIMENTADOS COM FORRAGEM**

Diego Zeni

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal/Nutrição de Ruminantes, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Zootecnia**

**Orientador: Gilberto Vilmar Kozloski**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2013**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a  
Tese de Doutorado

**IMPACTO NUTRICIONAL DA INFUSÃO RUMINAL DE NÍVEIS DE  
GLICERINA BRUTA EM OVINOS ALIMENTADOS COM FORRAGEM**

elaborada por  
**Diego Zeni**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Zootecnia**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

  
Gilberto Vilmar Kozloski, Dr. (Presidente/Orientador)

  
Adriano Rudi Maixner, Dr. (UFSM)

  
Lisandre de Oliveira, Dr. (UNIJUI)

  
Maria Cecilia Cajarville, Dr. (UdelaR, Uruguay)

  
Fernando Luiz Ferreira de Quadros, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 05 de Agosto de 2013.

## Dedicatória

Para

Meus pais, Elivio e Neusa, pelos princípios que têm orientado minha vida e pelo incentivo constante...

À Mariane, que sempre esteve ao meu lado me apoiando, dando amor e carinho. Te Amo muito...

À minha família e meus amigos que sempre compreenderam minha ausência para me dedicar aos estudos...

A vocês dedico essa tese!!!

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelo dom da vida, e por me dar saúde e força para sempre seguir em frente;

À Universidade Federal de Santa Maria, pela minha formação;

Ao meu orientador Gilberto Kozloski, por todos seus ensinamentos;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PPGZ);

Aos meus colegas de pós-graduação, pela convivência e troca de conhecimentos nas aulas;

A um grupo muito especial e fundamental de amigos e colaboradores, que são os colegas de pós-graduação e os estagiários do Laboratório de Nutrição de Ruminantes (LabRúmen).

Aos animais que foram utilizados para que este estudo pudesse ser desenvolvido; o significado de sua importância é plenamente contemplado pelo respeito aqui declarado e a seriedade com que o trabalho foi conduzido.

A todos, meu muito obrigado!!!

“Cada sonho que você deixa para trás, é um pedaço do seu futuro que deixa de existir.”

*Steve Jobs*

"Só sei que nada sei, e o fato de saber isso, me coloca em vantagem sobre aqueles que acham que sabem alguma coisa."

*Sócrates*

## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia  
Universidade Federal de Santa Maria

### IMPACTO NUTRICIONAL DA INFUSÃO RUMINAL DE NÍVEIS DE GLICERINA BRUTA EM OVINOS ALIMENTADOS COM FORRAGEM

AUTOR: DIEGO ZENI

ORIENTADOR: GILBERTO VILMAR KOZLOSKI

Santa Maria, 05 de Agosto de 2013.

O objetivo deste trabalho consistiu em avaliar o impacto da infusão ruminal de níveis (0, 0.5, 1.5 e 3 mL/Kg de peso corporal (PC)) de glicerina bruta (GB) sobre a ingestão e digestão em ovinos alimentados com forragem temperada ou tropical. Foram realizados dois ensaios em duplo Quadrado Latino 4x4, cada um com oito ovinos da raça corriedale (26 ±3 kg de PV), implantados com cânula duodenal e sonda ruminal. Em um dos ensaios os animais foram alimentados com aveia fresca e no outro com feno de tifton. Um terceiro ensaio foi realizado para medir a taxa de desaparecimento do glicerol no rúmen. Não houve interação dieta com tratamento para a maior parte das variáveis analisadas. A infusão ruminal de GB reduziu linearmente o consumo de forragem, o pH ruminal e a concentração de N amoniacal no fluido ruminal, mas não interferiu na digestibilidade ruminal ou total da matéria orgânica, fibra em detergente neutro e dos compostos nitrogenados. Da mesma forma, reduziu linearmente a excreção fecal e urinária de N, assim como a quantidade de  $\alpha$ -amino N que fluiu para o duodeno, mas não interferiu na retenção de N. O fluxo duodenal de N microbiano foi similar em todos os tratamentos quando estimado pelos derivados de purinas na urina, mas foi afetado negativamente pela GB quando estimado pelas purinas na digesta duodenal. Independente do marcador utilizado, a eficiência de síntese microbiana não foi afetada pela GB. O fluxo duodenal de N não amoniacal e não microbiano (NNANM), assim como a proporção de proteína degradável na dieta, foram afetados pela interação tratamento com tipo de forragem. Nos animais alimentados com aveia, o fluxo duodenal de NNANM aumentou linearmente, enquanto que naqueles alimentados com tifton diminuiu linearmente com o aumento da infusão ruminal de GB. Como consequência, a proporção da proteína degradada no rúmen diminuiu linearmente quando a dieta consistiu em aveia e tendeu a aumentar quando a dieta foi tifton, principalmente na dose mais alta de GB. Menos de 1% do glicerol infundido no rúmen chegou ao intestino delgado. A conclusão é que a presença de GB no rúmen de animais alimentados com forragem, independente se for gramínea tropical ou temperada, diminuiu drasticamente a oferta de aminoácidos e de energia digestível, principalmente por reduzir o consumo de forragem.

**Palavras-chave:** *Avena strigosa*. *Cynodon spp.* Consumo. Fermentação ruminal. Digestibilidade. Ruminantes.

## ABSTRACT

Doctor's Thesis  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia  
Universidade Federal de Santa Maria

### **NUTRITIONAL IMPACT OF RUMINAL INFUSION OF GROSS GLYCERINE LEVELS IN OVINES FED WITH FORAGE**

AUTHOR: DIEGO ZENI  
ADVISOR: GILBERTO VILMAR KOZLOSKI  
Santa Maria, August 05, 2013.

The aim of this study was to evaluate the impact of rumen infusion levels (0, 0.5, 1.5 and 3 ml / kg body weight (BW)) of crude glycerin (CG) on intake and digestion by sheep fed tropical or temperate forage . Two experiments were conducted in a double 4x4 Latin square each with eight Corriedale breed sheep ( $26 \pm 3$  kg BW), cannula implanted with ruminal and duodenal probe. In one of the experiments the animals were fed oats and the other of Tifton. A third test was performed to measure the rate of disappearance of glycerol in the rumen. No significant interaction with treatment diet for most of the variables analyzed. Ruminal infusion of CG linearly reduced forage intake, ruminal pH and ammonia N concentration in ruminal fluid, but no effect on ruminal digestibility or total organic matter, neutral detergent fiber and nitrogen compounds. Similarly, linearly decreased urinary and fecal excretion of N, as well as the amount of  $\alpha$ -amino N which flowed into the duodenum, but did not affect the retention of N. The duodenal flow of microbial N was similar in all treatments when estimated by purine derivatives in the urine, but was negatively affected by the CG when estimated by purines in duodenal digesta. Regardless of the label used, the efficiency of microbial protein synthesis was not affected by CG. The duodenal flow of N and not microbial no ammonia (NNANM) as well as the proportion of degradable protein in their diet, were affected by treatment interaction with type of material. In animals fed with oats NNANM duodenal flow increased linearly, whereas those fed Tifton decreased linearly with increasing ruminal infusion of CG. As a result, the proportion of the protein degraded in the rumen linearly decreased when the diet was oats, and tended to increase when the diet was Tifton, particularly at the highest dose of CG. Less than 1% of the glycerol infused into the rumen reached the small intestine. In conclusion, the presence of CG in the rumen of animals fed forage, regardless if it is tropical or temperate grass, dramatically lowers the supply of amino acids and digestible energy, mainly by reducing forage intake.

**Keywords:** *Avena strigosa*, *Cynodon* spp, intake, ruminal fermentation, digestibility, ruminants.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxograma da Produção de Biodiesel .....	15
Figura 2 - Reação global de transesterificação dos triglicerídeos .....	16
Figura 3 - Reações consecutivas de transesterificação dos triglicerídeos ..	16
Figura 4 - Fórmula estrutural do glicerol .....	28
Figura 5 - Conversão do glicerol a intermediários da rota glicolítica .....	19
Figura 6 - Concentração de amônia (N-NH <sub>3</sub> ) em mg/dl, no fluido ruminal ao longo do tempo, após a refeição (■), em ovinos alimentados com aveia e suplementados com diferentes níveis de glicerina bruta (0, 0.5, 1.5 e 3 mL/Kg/PV). D= efeito da dieta; Tr= efeito do tratamento. Tp= efeito do tempo de coleta; D*Tr=efeito da interação entre a dieta e tratamento; onde, n= 8 por horário e tratamento .....	40
Figura 7 - Concentração de amônia (N-NH <sub>3</sub> ) em mg/dl, no fluido ruminal ao longo do tempo, após a refeição (■), em ovinos alimentados com feno de tifton e suplementados com diferentes níveis de glicerina bruta (0, 0.5, 1.5 e 3 mL/Kg/PV). D= efeito da dieta; Tr= efeito do tratamento. Tp= efeito do tempo de coleta; D*Tr=efeito da interação entre a dieta e tratamento; onde, n= 8 por horário e tratamento .....	41
Figura 8 - Variação do pH, no fluido ruminal ao longo do tempo, após a refeição (■), em em ovinos alimentados com feno de tifton e suplementados com diferentes níveis de glicerina bruta (0, 0.5, 1.5 e 3 mL/Kg/PV). D= efeito da dieta; Tr= efeito do tratamento. Tp= efeito do tempo de coleta; D*Tr=efeito da interação entre a dieta e tratamento; onde, n= 8 por horário e tratamento .....	42
Figura 9 - Concentração de glicerol no fluido ruminal após infusão de diferentes níveis de glicerina bruta no rúmen de ovinos alimentados com aveia ou feno de tifton e suplementados com diferentes níveis de glicerina bruta (0, 0.5, 1.5 e 3 mL/Kg/PV). D= efeito da dieta; Tr= efeito do tratamento. Tp= efeito do tempo de coleta; D*Tr=efeito da interação entre a dieta e tratamento; onde, n= 8 por horário e tratamento .....	43

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química dos alimentos .....	26
Tabela 2 - Composição química da glicerina bruta .....	27
Tabela 3 - Consumo diário de matéria seca, matéria orgânica e compostos não nitrogenados por ovinos alimentados com aveia ou feno de tifton e suplementados com diferentes níveis de glicerina bruta .....	35
Tabela 4 - Digestibilidade da matéria seca, matéria orgânica e da fração fibrosa da dieta de ovinos alimentados com aveia ou feno de tifton e suplementados com diferentes níveis de glicerina bruta .....	36
Tabela 5 - Consumo, digestibilidade, balanço do nitrogênio de ovinos alimentados com aveia ou feno de tifton e suplementados com diferentes níveis de glicerina bruta .....	37
Tabela 6 - Digestibilidade ruminal, fluxo duodenal, e síntese de proteína microbiana ruminal de ovinos alimentados com aveia ou feno de tifton e suplementados com diferentes níveis de glicerina bruta .....	38

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2 HIPÓTESE .....</b>	<b>13</b>
<b>3 ESTUDO BIBLIOGRÁFICO .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1 Caracterização da glicerina bruta .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2 Glicerol: características e fermentação ruminal .....</b>	<b>17</b>
<b>3.3 Efeito da glicerina bruta sobre consumo, digestão e desempenho de ruminantes .....</b>	<b>20</b>
<b>3.4 Características nutricionais das gramíneas de estação fria e de estação quente .....</b>	<b>22</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
<b>4.1 Local e época .....</b>	<b>25</b>
<b>4.2 Ensaio 1 (Aveia) e 2 (Tifton) – Avaliação do Consumo e digestibilidade .....</b>	<b>25</b>
4.2.1 Animais, dietas e delineamento experimental .....	25
4.2.2 Condução do experimento .....	27
4.2.3 Coletas de amostras .....	27
<b>4.3 Ensaio 3 – Avaliação da taxa de desaparecimento do glicerol no rúmen .....</b>	<b>29</b>
<b>4.4 Análises químicas .....</b>	<b>29</b>
<b>4.5 Cálculos.....</b>	<b>30</b>
<b>4.6 Análise estatística .....</b>	<b>32</b>
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
<b>5.1 Ensaio 1 e 2– Avaliação do Consumo e digestibilidade .....</b>	<b>34</b>
<b>5.2 Ensaio 3 – Desaparecimento do glicerol no rúmen .....</b>	<b>34</b>
<b>5.2 Fermentação ruminal .....</b>	<b>39</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>48</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A glicerina bruta (GB) é um coproduto da indústria do biodiesel (ABDALLA et al., 2008). Para cada 90 m<sup>3</sup> de biodiesel produzidos, são gerados 10 m<sup>3</sup> de GB (DASARI et al., 2005). A exigência, por parte do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel do Governo Federal, de adição do biodiesel ao óleo diesel será de 5% a partir de 2013. Desta forma, serão necessários cerca de 2,5 bilhões de litros de biodiesel para cumprir a Lei 11097/2005 (ABDALLA et al., 2008). As indústrias de tabaco, alimentos, bebidas e cosméticos (DASARI et al., 2005) possivelmente não irão aproveitar todo o excedente de GB, sendo necessário encontrar novas aplicações para este coproduto e, dentre elas podemos citar o uso na alimentação animal.

São dois os fatores que tornam relevante pesquisar o uso de GB como ingrediente para alimentação animal. O primeiro é seu potencial energético. O segundo fator está atrelado à responsabilidade ambiental, uma vez que, devido à crescente produção de biodiesel, é necessário absorver a produção deste coproduto. De acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA, 21 C.F.R. 582.1320, 2006), a GB tem seu uso seguro e reconhecido na alimentação animal. Neste contexto, o uso de GB como fonte energética para ruminantes vem despontando como uma alternativa para produtores em todo o País.

Apesar de pesquisas utilizando a GB como suplemento alimentar não serem raras, a maioria dos trabalhos foi realizada com animais confinados e/ou recebendo este suplemento em substituição a parte de algum concentrado energético. No entanto, além do efeito nutricional da GB ficar confundido com efeito do concentrado. A produção de ruminantes no Brasil é predominantemente realizada em sistemas pastoris. Estes sistemas se caracterizam por estacionalidade produtiva e por uso restrito de alimentação suplementar.

No sul do Brasil, a produção de ruminantes é baseada no uso de gramíneas de estação quente (C<sub>4</sub>) durante o verão e em gramíneas de estação fria (C<sub>3</sub>) durante o inverno. No primeiro caso, a produtividade é geralmente limitada por baixa oferta de energia e de proteína metabolizável, em função de que gramíneas C<sub>4</sub> contém altos teores de fibra. Nesta situação, a suplementação com GB poderia aumentar diretamente a oferta de energia metabolizável aos animais e, indiretamente,

potencializar o crescimento microbiano ruminal e a digestibilidade da fibra. Por outro lado, as gramíneas C<sub>3</sub> usualmente apresentam alta digestibilidade, porém contém altos teores de N solúvel, acima da disponibilidade de carboidratos fermentáveis e da capacidade de captação pelos microorganismos ruminais. A eficiência do uso do N por animais alimentados com estas gramíneas é usualmente reduzida, a qual poderia ser melhorada pela suplementação com GB.

O objetivo deste trabalho consistiu em avaliar o impacto da infusão ruminal de GB sobre a ingestão e digestão em ovinos alimentados exclusivamente com gramínea C<sub>3</sub> ou C<sub>4</sub>. A inovação deste trabalho consistiu em avaliar o uso suplementar de GB para animais alimentados exclusivamente com forragem. Como critério para definir a oferta de suplemento, foi utilizado o peso corporal. O peso corporal é um critério de fácil aplicação a campo e permitirá eliminar confundimento.

## **2 HIPÓTESE**

A glicerina bruta apresenta o potencial de melhorar a eficiência de utilização ruminal do nitrogênio sem afetar a digestibilidade da fibra em animais alimentados com gramíneas temperadas.

A glicerina bruta apresenta o potencial de aumentar a oferta de energia e proteína metabolizável em animais alimentados com gramíneas tropicais.

## 3 ESTUDO BIBLIOGRÁFICO

### 3.1 Caracterização da glicerina bruta

A GB é definida como a glicerina separada do biodiesel sem sofrer qualquer tipo de purificação, apresentando-se na forma de líquido viscoso pardo escuro. As características físicas, químicas e nutricionais da GB 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, quando 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 e apresenta coloração mais clara que a GB. Nas plantas de produção de biodiesel no Brasil, o álcool utilizado é o metanol, assim como o catalisador mais utilizado e 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 esteárico, oleico, palmítico e láurico, para formar moléculas de triacilglicerol. Sua temperatura de fusão é de 17,8°C, sendo decomposto aos 290°C e miscível em água e álcool (PERRY & GREEN, 1997; PACHAURI & HE, 2006).

De acordo com Berenchein (2008), são necessários processos complexos e de alto custo para que a GB alcance as exigências em grau de pureza necessária para fins alimentícios e farmacêuticos, visto que apresenta impurezas provindas de reagentes como a água, catalisadores (alcalino ou ácido), alcoóis (etanol ou metanol), ácidos graxos livres, ésteres, propanodióis, monoéteres, oligômeros de glicerina e polímeros (PINTO et al., 2008).

A reação de transesterificação consiste na substituição do glicerol da molécula por um álcool primário de cadeia curta, geralmente o metanol ou etanol, para produzir ésteres e glicerol na presença de catalisador, que tem por finalidade aumentar a velocidade da reação.

As reações com catalisadores básicos são mais rápidas, sendo comumente utilizados o hidróxido de sódio (NaOH) ou hidróxido de potássio (KOH). Porém, o

hidróxido de sódio é o mais usado, por ser facilmente encontrado no mercado e possuir menor valor comercial. Dependendo do catalisador a ser utilizado, ocorrerá a geração de uma glicerina bruta com níveis diferenciados de Na ou K, que devem ser avaliados para possível utilização da glicerina nas formulações de rações animais (PENZ JUNIOR; GIANFELICE, 2008).

Os catalisadores básicos, como os hidróxidos de sódio e potássio, têm como inconveniente a reação secundária de saponificação, quando em excesso (ARAUJO et al., 2008).

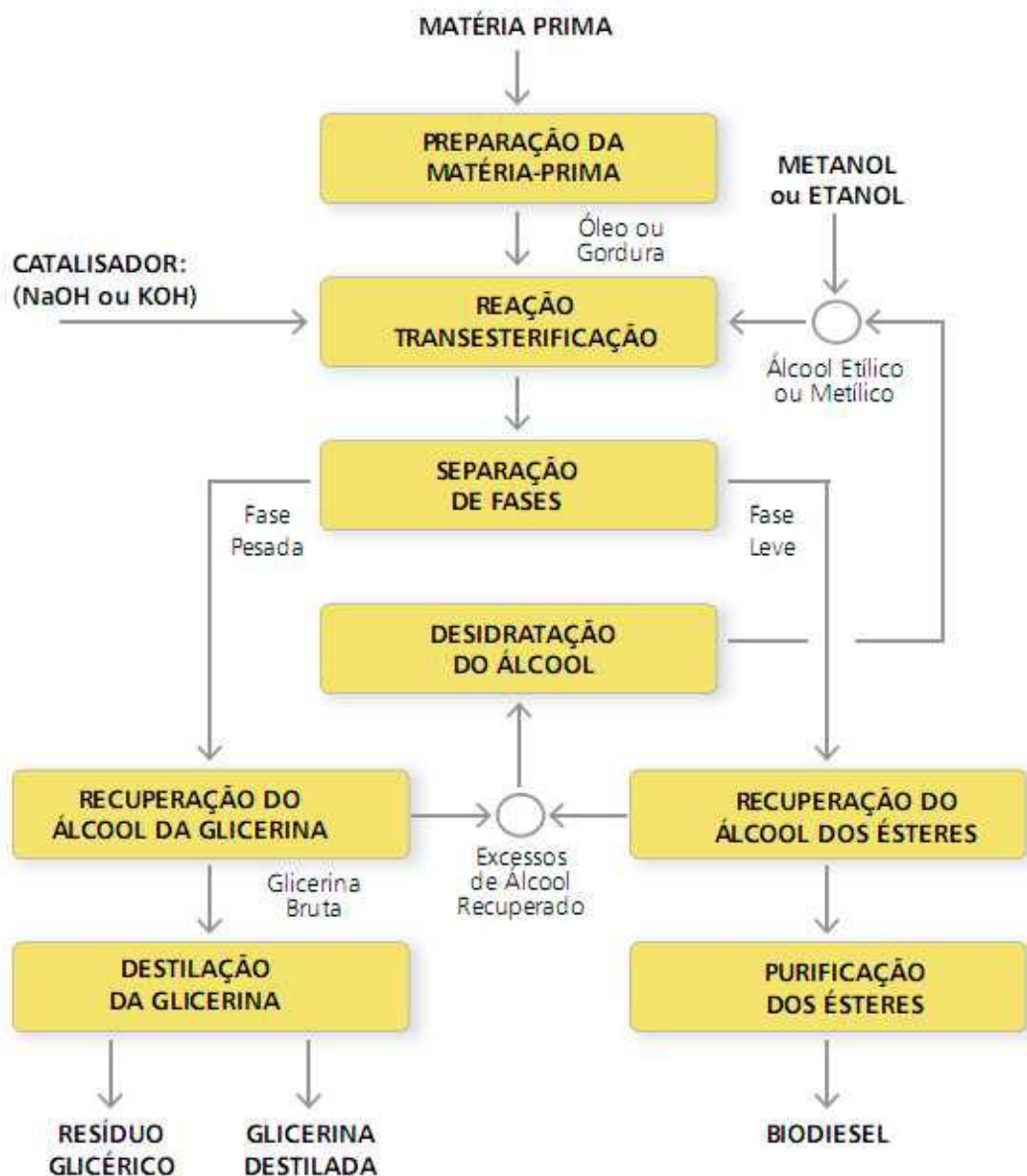


Figura 1 - Fluxograma da Produção de Biodiesel



A equação global de transesterificação é apresentada na Figura 2, na qual a reação demanda três moles de álcool por cada mol de triglicerídeo. Esta reação é consequência de um número de reações reversíveis e consecutivas mostradas na Figura 3. A primeira consiste na conversão de triglicerídeos em diglicerídeos, seguida da conversão deste diglicerídeos em monoglicerídeos e, finalmente, de monoglicerídeos a glicerol, rendendo uma molécula de éster de álcool por cada glicerídeo em cada etapa da reação. Contudo, no processamento industrial, o glicerol resultante do processo reacional não está livre de contaminantes. Por isso, a porção líquida viscosa com elevada concentração de glicerol é denominada de glicerina bruta.

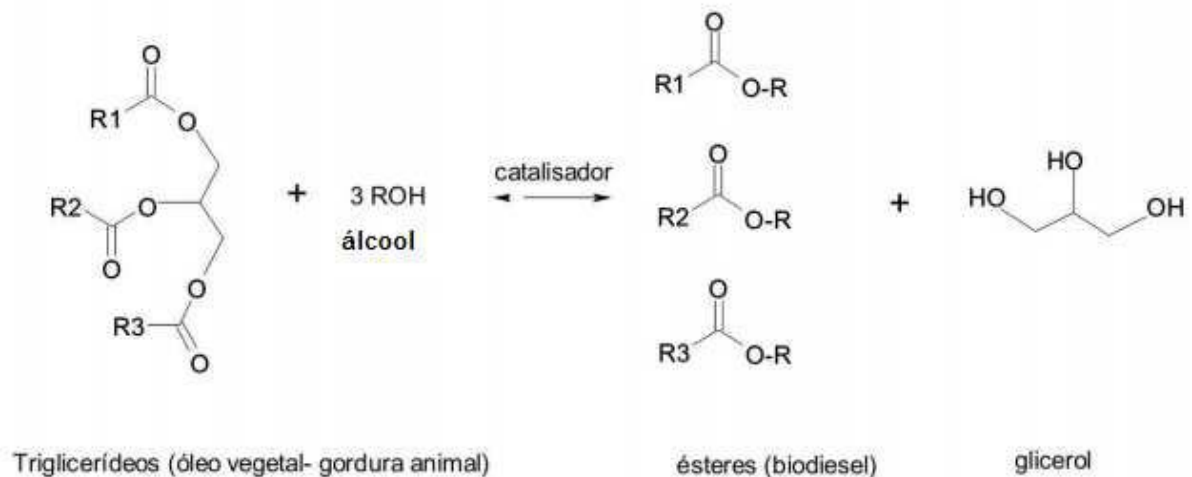


Figura 2 - Reação global de transesterificação dos triglicerídeos  
 Fonte: Rivaldi et al. (2007)

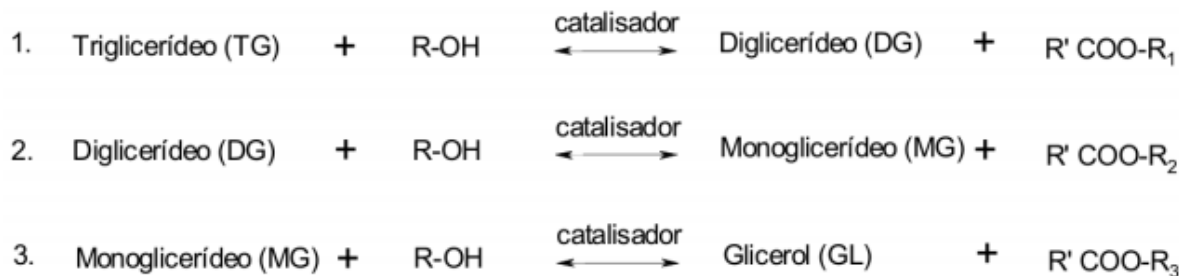


Figura 3 - Reações consecutivas de transesterificação dos triglicerídeos  
 Fonte: Rivaldi et al. (2007).

As características físicas, químicas e nutricionais da GB dependem do ácido graxo utilizado (gordura animal ou óleo vegetal) e da catálise empregada na produção de biodiesel (RIVALDI et al., 2007), bem como da eficiência dos equipamentos utilizados no processo (KERR et al., 2007). Segundo Penz Junior e Gianfelice (2008), a concentração energética da GB determina a eficiência do processo de transesterificação, em que níveis baixos de energia bruta são a resposta do melhor aproveitamento dos ácidos graxos no processamento, sem sobra de triglicerídeos intactos. Porém, níveis de energia bruta elevados podem significar a ineficiência do processo, acarretando em maior concentração dos produtos residuais.

Nos Estados Unidos, foi estabelecido que para a GB ser usada como componente de alimentos o nível máximo de metanol não pode exceder 150 ppm (*Code of Federal Regulations* §573.640). Dasari (2007) apresentou dados coletados em plantas de biodiesel nos Estados Unidos em que a GB tinha níveis de metanol variando de <100 ppm até 11.500 ppm. Todavia, como a glicerina obtida do processo de transesterificação do óleo apresenta-se na forma bruta, com impurezas – metais pesados, excesso de lipídeos e metanol, os impactos no consumo, na digestibilidade dos componentes da dieta e no desempenho animal podem ser diferentes dos obtidos com a glicerina purificada, de custo mais elevado.

A intoxicação por metanol em animais é identificada pela excreção de ácido fórmico na urina. O metanol ingerido é oxidado no fígado a formaldeído e este a ácido fórmico. O ácido fórmico é a substância tóxica. Lammers et al. (2008) indicaram que, quando em quantidades elevadas, o ácido fórmico pode causar cegueira pela destruição do nervo óptico, sendo relatadas também a ocorrência de depressão do sistema nervoso central, vômito, acidose metabólica e alteração motora. No entanto, o uso de GB com contaminantes, como, por exemplo, metanol, não apresenta toxicidade para ruminantes, pois metanol é um dos produtos do metabolismo bacteriano ruminal.

### **3.2 Glicerol: características e fermentação ruminal**

O glicerol (Figura 4) ou propano-1,2,3-triol é um composto orgânico pertencente à função álcool, líquido à temperatura ambiente (25°C), higroscópico, inodoro, viscoso e de sabor adocicado (IUPAC,1993).

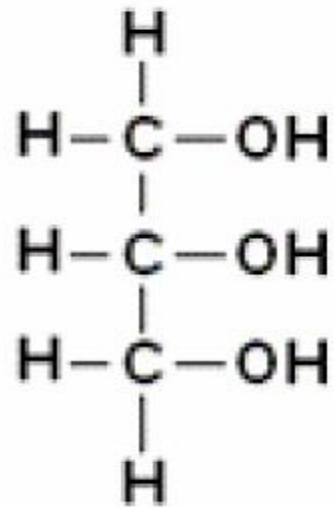


Figura 4 - Fórmula estrutural do glicerol

O glicerol é um componente normal do metabolismo celular, particularmente do metabolismo dos triglicerídios, assim como dos intermediários da rota glicolítica ou gliconeogênica (Figura 5). Quando absorvido do trato digestivo ou administrado via sanguínea pode ser oxidado, utilizado como precursor da síntese de triglicerídeos no tecido adiposo ou utilizado na rota neoglicogênia hepática. A substituição do propilenoglicol (1,2-propanodiol) por glicerina (1,2,3-propanotriol) no período de transição de vacas leiteiras aumentou a síntese de lactose e a produção de leite (DOPPENBERG ; VAN DER AAR, 2007).

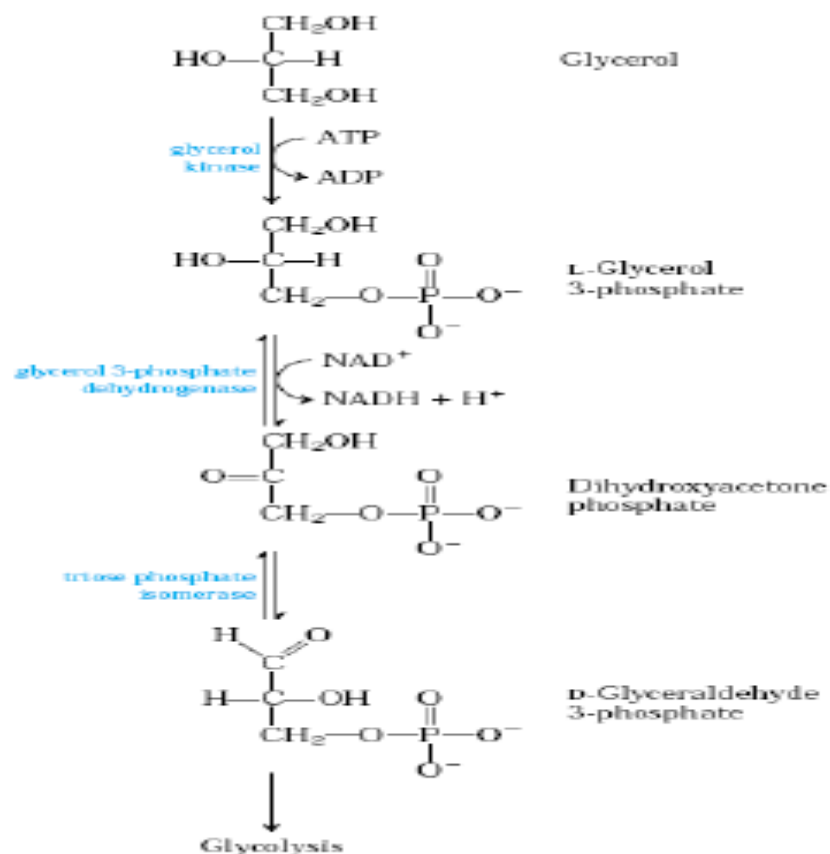


Figura 5 - Conversão do glicerol a intermediários da rota glicolítica

Três diferentes destinos tem sido reportados para o glicerol quando este entra no rúmen: 1) passagem para o intestino delgado, 2) absorção através da parede ruminal, 3) ou captação e metabolismo pelas bactérias ruminais (CHUNG et al., 2007; KREHBIEL, 2008). As bactérias oxidam o glicerol a ácidos graxos voláteis. Em torno de 50 a 70% do glicerol fornecido na dieta de bovinos desapareceu do rúmen em 4 horas (DONKIN, et al 2009). Foram reportados aumentos nas concentrações ruminais de acetato e propionato (WRIGHT, 1969) ou de propionato e butirato (CZERKAWSKI & BRECKENRIDGE, 1972) quando GB foi usada como suplemento em estudos *in vivo*. REMOND et al. (1993) também verificaram aumento nas concentrações de propionato e butirato em estudo *in vitro*.

### 3.3 Efeito da glicerina bruta sobre consumo, digestão e desempenho de ruminantes

Avaliando o efeito da substituição de milho por glicerol em níveis de 0, 5, 10 e 15% da MS de dietas de vacas em lactação, Donkin et al. (2009) não observaram aumento no consumo de MS e produção e composição do leite, assim como Gun et al., (2010) que avaliaram o efeito da inclusão de glicerina em substituição ao milho moído em níveis de 0, 5, 10, 15 e 20% da MS com dietas isoprotéicas e isoenergéticas para ovinos, não observando efeitos sobre o consumo de MS, ganho de peso e características da carcaça. No entanto, Lage et al. (2010) ao avaliarem a inclusão de 0, 3, 6, 9 e 12% de GB em substituição ao milho em dietas para cordeiros observaram um efeito linear decrescente no consumo de MS e na digestibilidade da FDN com o aumento nos níveis de GB. O mesmo detectaram Parsons et al. (2009) que, ao suplementarem 0, 2, 4, 8, 12 e 16% de GB (%MS) em substituição ao milho em dietas para novilhas, observaram redução linear no consumo de MS com o aumento nos níveis de suplementação. Avila-Stagno et al. (2013) observaram redução linear no consumo de matéria seca de ovinos confinados suplementados com dietas que continham níveis de 0, 7, 14 e 21 % da MS de glicerina bruta e Boyd et al, (2013) ao suplementarem 0, 200 ou 400 g de glicerol para vacas de leite, observaram redução da IMS com a inclusão de glicerol comparado com o controle. No entanto, outros autores não encontraram diferença na ingestão de matéria seca (IMS) ao incluir glicerol na dieta de ruminantes em substituição de parte do milho da dieta (DeFRAIN et al., 2004; LINKE et al., 2004)

Wang et al. (2009) trabalhou com 8 bovinos em um Quadrado Latino 4x4, com o objetivo de avaliar o efeito da suplementação de glicerol sobre a fermentação ruminal, excreção urinária de derivados de purina e a digestibilidade do alimento em todo o trato digestivo, na qual a dieta era igual para todos os animais, sendo que diferia nos níveis de glicerol 0ml de glicerol controle, 100ml (BG), 200ml (MG) e 300ml (AG), sendo que o aumento da suplementação de glicerol aumentou a concentração de ácidos graxos no rúmen e alterou a fermentação ruminal, com maior produção de propionato, sendo que o nível de infusão de 200 mL foi o que apresentou melhor resultado.

Pereira et al. (2007) avaliaram a influência da GB (0; 0,5; 1; 2; 3 e 5%) na cinética de fermentação *in vitro* do feno de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu et al.

observaram que o acréscimo de 2 ou 5% de GB modificou as curvas de produção de gases e que a GB teria efeito negativo nos parâmetros de cinética de produção de gases e digestibilidade. Entretanto, a fermentação do glicerol por microrganismos ruminais proporciona elevados níveis de produção de ácidos graxos voláteis no rúmen, principalmente propionato e butirato, que são utilizados como principais fontes de energia para manutenção e produção animal, além de diminuir a razão acetato:propionato (BERGMAN, 1990; TRABUE et al., 2007). Roger et al., (1992) ao avaliarem os efeitos da inclusão de 0.1, 0.5, 1, 2 ou 5% de glicerol no meio de incubação *in vitro* sobre o crescimento e atividade celulolítica ruminal, observaram redução drástica no crescimento e atividade celulolítica com 5% de inclusão de glicerol, assim como El-Nor et al. (2010), que incluíram 0, 3.6, 7.2 e 10.8% (%MS) de glicerol em substituição ao milho com fermentadores contínuos, não encontrando efeito sobre o pH, concentração de amônia e a digestibilidade da MS, porém observaram que reduziu a digestibilidade da FDN. Lee et al. (2011) avaliaram *in vitro* a fermentação do glicerol (0.5 g) e a inclusão deste no meio de incubação (0.1 g) com alfafa ou milho, resultando em aumento na produção de propionato, diminuição da taxa Acetato/propionato, reduzindo a produção de gás metano, fato este que indica que o glicerol pode aumentar a eficiência da utilização da energia da dieta pelos ruminantes. Avila et al. (2011) reportaram aumento linear na digestibilidade *in vitro* da MS quando o glicerol foi incluído na concentração de 0 a 21% da MS, em substituição de grão de cevada em dietas com 50% de cevada grão e 50% de silagem de cevada para bovinos confinados.

Ao medirem a absorção da GB e o metabolismo do glicerol no fígado de vacas que receberam, via cânulas ruminal, 925 g/dia de GB com 85% de glicerol, Kristensen e Raun (2007) recuperaram, na veia porta, 10% de glicerol administrado que foi absorvido pelo fígado e convertido em glicose e o glicerol não-recuperado na veia porta, possivelmente, foi convertido a propionato no rúmen, que poderia contribuir com a gliconeogênese. Osborne et al. (2009), estudando o efeito da suplementação de glicerol 20mL/litro de água e óleo de soja 10g/litro de água em vacas, sete dias antes e sete dias após o parto, concluíram que o glicerol não possui efeito glicogênico em vacas suplementadas na água e nem o glicerol e nem o óleo de soja foram capazes de baixar a quantidade de beta-hidroxibutirato nos animais pós-parto. No entanto, Chung et al. (2007) avaliaram os efeitos da suplementação de 250 g/d de glicerina seca para vacas do parto até 21 dias após o parto, quando

vacas recebendo glicerina seca tiveram um balanço energético positivo (maior concentração de glicose e menor de beta-hidroxibutirato no plasma e menor concentração de corpos cetônicos na urina), indicando um efeito glicogênico da suplementação. Já DeFrain et al. (2004), que suplementaram vacas 14 dias pré-parto até 21 dias de lactação com 430 ou 860 g/d de glicerol, encontraram redução de 17% no consumo de MS com a suplementação.

Ramos e Kerley (2011), ao estudarem o efeito dietético dos níveis de GB sobre a fermentação ruminal em culturas contínuas e sobre a performance de carcaça de bovinos, concluíram que os níveis de GB em substituição ao milho diminuem a relação acetato:propionato e aumentam a proporção de lactato e que a GB poder ser incluída em dietas a base de forragem até um taxa de 20% sem efeito negativo sobre a performance de carcaças.

### **3.4 Características nutricionais das gramíneas de estação fria e de estação quente**

Existem diferenças de composição bromatológica entre as gramíneas de estação fria (aveia) e estação quente (feno tifton), as quais são amplamente difundidas nos sistemas de produção de ruminantes no RS, mas que divergem, em aspectos qualitativos, para utilização na alimentação de ruminantes.

A disponibilidade e a qualidade das forrageiras são influenciadas pela espécie e pela cultivar, pelas propriedades químicas e físicas do solo, pelas condições climáticas, pela idade fisiológica e pelo manejo a que a forrageira é submetida (ALQUINI et al. 2003). Características químicas da planta forrageira, como elevadas concentrações de lignina na parede celular, comprometem a digestibilidade da matéria seca e a alta concentração de parede celular limita o consumo pelos bovinos pela limitação física (ALQUINI et al. 2003). Apesar de representar a maior parte da matéria seca das forrageiras e constituir-se na maior fonte de energia para ruminantes sob regime de pastejo, frequentemente menos de 50 % da parede é prontamente digestível e utilizada pelo animal (PACIULLO, 2000). Neste caso, a anatomia da planta, o tipo de arranjo das células nos tecidos, a proporção de tecido e espessura da parede celular desempenham importante papel sobre a digestão de gramíneas forrageiras (WILSON E MERTENS, 1995).

A digestibilidade de uma forrageira está relacionada à sua composição bromotalógica e também a sua composição histológica (BRITO et al., 1997). Assim, maiores quantidades de tecidos vasculares lignificados e esclerenquimáticos proporcionam menores taxas de digestibilidade (RODELLA, 1982). Com o envelhecimento das plantas ocorre espessamento e lignificação das paredes celulares, principalmente na região dos feixes vasculares. Este fenômeno foi relacionado com a redução das áreas de digestão dos tecidos (HANNA *et al.*, 1973). A epiderme constitui-se em uma barreira para a aderência e penetração dos microrganismos ruminais no processo de digestão dos tecidos vegetais, daí a importância da mastigação e da ruminação no processo do rompimento da epiderme. A digestibilidade apresenta acentuada redução com o aumento da idade, evidenciando que o estágio de desenvolvimento é o mais importante fator a influenciar o valor nutritivo das plantas forrageiras (PACIULLO, 2000).

As gramíneas são classificadas em duas categorias quanto a sua adaptação ambiental e eficiência fotossintética, espécies temperadas (ciclo metabólico C<sub>3</sub>) e tropicais (ciclo metabólico C<sub>4</sub>). Normalmente, as espécies forrageiras temperadas apresentam melhor qualidade, definida em termos de digestibilidade, consumo e teor de proteína (MOREIRA, 2006). A degradação ruminal de gramíneas hibernais ocorre mais rapidamente por apresentarem parede celular mais fina e com maior degradabilidade ruminal, como o teor de lignina, quando comparado com as espécies estivais. Por outro lado, as gramíneas tropicais apresentam maior eficiência fotossintética, sendo, portanto, mais produtivas em termos de matéria seca (VALLE, 2001).

Em geral, altos valores de digestibilidade são observados nas espécies forrageiras de estação fria quando comparados com as de estação quente (MACADAM et al., 1996). Minson & Mcleod (1970), em trabalho avaliando mais de 1000 espécies de gramíneas tropicais e temperadas, mostraram uma diferença média de 13% a menos na digestibilidade da matéria seca nas forrageiras de clima tropical.

Conforme Pereira (2007), as pastagens de clima temperado bem manejadas apresentam valores de proteína bruta próximos a 20% e fibra detergente neutro (FDN) entre 40 e 50%, indicativos de uma forragem de excelente qualidade. Ao se utilizar dietas baseadas em gramíneas de estação fria (C<sub>3</sub>), aparecem muitos benefícios, mas existem aspectos negativos como, por exemplo, o excesso de



nitrogênio solúvel no rúmen, o qual acaba não sendo incorporado pelas bactérias ruminais, sendo absorvido na forma de amônia e excretado como ureia, fato este que tem um custo energético para o animal e um efeito contaminante para o meio ambiente. Sabe-se que isto acontece principalmente pela falta de energia (carboidratos fermentáveis) para as bactérias ruminais aproveitar o nitrogênio solúvel. O uso de GB em animais que se alimentam exclusivamente com gramíneas C<sub>3</sub> poderia ser a alternativa para suprir a deficiência de energia para as bactérias ruminais.

Por outro lado, a utilização de GB na dieta de animais alimentados exclusivamente com gramíneas (C<sub>4</sub>), além de aumentar diretamente a oferta de energia digestível, poderia indiretamente aumentar o crescimento bacteriano e potencializar o uso da forragem.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local e época

Foram conduzidos dois ensaios de digestibilidade *in vivo* com ovinos nas instalações do Laboratório de Bromatologia e Nutrição de Ruminantes pertencente ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria, RS. O estudo foi conduzido no ano de 2012.

### 4.2 Ensaios 1 (Aveia preta) e 2 (Feno de tifton) – Avaliação do Consumo e digestibilidade

#### 4.2.1 Animais, dietas e delineamento experimental

O protocolo de pesquisa seguiu as diretrizes recomendadas pela Comissão de Ética e bem estar no uso de animais para pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria, sob o número 23081.000480/2012-01.

Foram utilizados oito ovinos, machos castrados da raça Corriedale ( $26 \pm 3$  kg de peso corporal (PC)), implantados cirurgicamente com uma cânula em forma de “T” no duodeno proximal e uma sonda no rúmen em um delineamento experimental duplo Quadrado Latino 4x4 para avaliar o efeito de quatro níveis de inclusão de Glicerina Bruta (GB), 0,(controle) 0.5, 1.5 e 3mL/Kg/PC.

A utilização de uma quantidade fixa de GB por kg de peso corporal deve-se a inexistência na literatura de níveis e efeitos nutricionais desse ingrediente em animais alimentados exclusivamente com forragem, em situações nas quais o produto é ofertado com base no peso corporal de animais mantidos em pastagens. Inicialmente, as doses pretendidas eram de 0, 1.5, 3.0 e 4.5 mL/Kg/PC. Contudo, o uso da dose 4.5mL/Kg/PC levou ao aparecimento de acidose ruminal aguda nos animais e, inclusive, levando um dos animais veio a óbito. Após isso, foi substituído o tratamento 4.5 pelo tratamento 0.5 mL/Kg/PC.

As dietas experimentais foram constituídas de aveia preta (*Avena strigosa* Schreb, Ensaio 1) fresca em estágio vegetativo ou feno de tifton (*Cynodon spp*, Ensaio 2). A pastagem de aveia foi implantada e cortada no ano de 2012, logo após

ser cortada a uma altura de 5 cm acima do nível do solo quando atingiu uma altura média de 30 cm e armazenada em uma câmara de congelamento a -20°C durante todo o período experimental. O Feno de tifton foi adquirido de uma propriedade, o qual foi cortado e enfenado no ano de 2011.

O volumoso foi ofertado duas vezes ao dia, às 08h e às 17h de forma *ad libitum*, com ajuste de sobra de 10% do ofertado. A GB foi infundida diretamente no rúmen via sonda ruminal, em torno de 15 minutos após o fornecimento do alimento. O alimento ofertado e as sobras foram pesados diariamente para determinação do consumo. O feno de tifton foi triturado em partículas de  $\pm 3$  cm antes de ser fornecido e a aveia era retirada da câmara fria  $\pm 1$  hora antes de ser fornecida para os animais. Água e sal mineral contendo (g/kg): Ca: 165 g, P: 73 g, Na: 117 g, Mg: 15 g, Mn: 1,5 g, Zn: 3,0 g, Fe: 2,0 g, Cu: 0,2 g, Co: 0,025 g, I: 0,04 g, Se: 0,01 g, F: 0,74 g, foram ofertados em cochos separados à vontade.

A composição química dos alimentos é apresentada na tabela 1 e a composição da Glicerina Bruta (GB) na tabela 2.

Tabela 1 – Composição química<sup>1</sup> dos alimentos

Item <sup>1</sup>	Aveia Preta	Feno de Tifton
MS (%)	18.2	92
Composição (% da MS)		
MO	82.6	89.9
N total	3.31	1.82
FDN	56.1	74.8
FDA	32.4	37.5
MM	17.1	10.1
NIDN (%MS)	0.83	0.82
NIDA (%MS)	0.11	0.11
LDA (%MS)	6.4	4.2

<sup>1</sup>MS= matéria seca; MO= matéria orgânica; N total= nitrogênio total; FDN= fibra em detergente neutro; FDA= fibra em detergente ácido; MM= matéria mineral; NIDN= nitrogênio insolúvel em detergente neutro; NIDA= nitrogênio insolúvel em detergente ácido; LDA= lignina.

Tabela 2 - Composição química<sup>1</sup> da glicerina bruta.

Item <sup>1</sup>	Glicerina Bruta (%)	
Composição (% da MS)		
MO		92
PB		0.29
EE		0.6
MM		8
Glicerol		84
Ca		3.8
K		0.004
Na		3.8
P		0
Contaminantes		
As	< 50ppb	
Cd	< 25 ppb	
Pb	<100 ppb	

<sup>1</sup>MS= matéria seca; MO= matéria orgânica; PB= Proteína bruta; EE= Extrato etéreo; MM= matéria mineral; Glicerol= % na glicerina bruta; Ca= Cálcio; K= potássio; Na= Sódio, P= fósforo; As= Arsênio; Cd= Cádmio; Pb=Chumbo.

#### 4.2.2 Condução do experimento

Após a cirurgia de implantação da cânula no duodeno e recuperação do procedimento cirúrgico, os animais foram alojados em gaiolas de metabolismo providas de cochos para volumoso, sal mineral e bebedouro com água permanentemente disponível, onde permaneceram durante todo o período experimental. Antes da fase experimental, os animais passaram por um período pré-experimental de uma semana para adaptação às instalações, sistema de alimentação e manejo, quando receberam também tratamento antiparasitário.

O experimento foi conduzido em duplo Quadrado Latino 4x4, para cada uma das forragens, com períodos de 15 dias, sendo 10 dias de adaptação às dietas e cinco dias de coleta de amostras.

#### 4.2.3 Coletas de amostras

Os alimentos ofertados foram pesados e amostrados diariamente do 10º ao 15º dia de cada período experimental. O total de fezes foi coletado diariamente ao longo do período de coletas e armazenados a -20°C. Ao final de cada período experimental, as fezes foram descongeladas, pesadas, homogeneizadas e uma amostra de cada animal foi coletada. As amostras dos alimentos e das fezes foram

secas em estufa com circulação forçada de ar a 55°C durante pelo menos 72 horas, moídas através de peneira de 1mm (moinho Willey, Arthur H. Thomas, Filadélfia, PA, EUA) e armazenadas para posterior análise.

A urina foi coletada através de um colete de borracha e lona, fixado no animal com o auxílio de duas tiras no dorso com uma mangueira de látex presa a um galão de 5 litros, contendo 100 mL de uma solução de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) a 20% (v/v) suficiente para reduzir o pH a valores abaixo de 2. Num primeiro momento, da excreção total, a qual foi medida diariamente, para amostragem, foi coletada uma alíquota de 1% do volume total, diluída com água destilada até completar 50 ml e congelada fazendo uma composta para posterior análise. No segundo momento, coletou-se a urina total, e desta tirou-se uma amostra diária de 10 mL em balão volumétrico de 50 mL, cujo volume foi completado com água destilada e armazenado em congelador (-20°C) para posterior análise. As amostras foram compostas por animal por período.

Entre os dias 11° ao 14° dia de cada período, foram coletadas amostras do conteúdo duodenal (aproximadamente 100 ml) a intervalos de 12 horas, acrescentando 3 horas a cada coleta para o dia seguinte. Estas amostras foram compostas por animal e por período e congeladas para posterior análise.

Para análise da concentração do glicerol na digesta duodenal, foi coletada uma amostra do líquido sobrenadante da amostra composta duodenal, o qual foi filtrado com o auxílio de papel filtro e congelado para posterior análise.

Amostras de líquido ruminal (100 mL) foram coletadas no 15° dia de cada período. As amostragens eram realizadas antes da alimentação da manhã (tempo zero) e 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 24 horas. Imediatamente após a coleta, as amostras eram filtradas com tecido de nylon de 50  $\mu$ . Logo após, era feita a leitura do pH (peagâmetro digital MB 10 Master) e, a seguir, duas alíquotas eram coletadas.

Do líquido coletado em cada tempo foi guardada uma alíquota de 18mL que foi tratada com  $H_2SO_4$  (2ml) e mantidas congeladas a -20°C, em recipientes plásticos identificados e com tampa, para posteriores análises de nitrogênio amoniacal.

A síntese de proteína microbiana ruminal foi estimada com base na excreção urinária das purinas e dos derivados de purinas.

### **4.3 Ensaio 3 – Avaliação da taxa de desaparecimento do glicerol no rúmen**

Foram utilizados oito ovinos, machos castrados da raça Corriedale ( $26 \pm 3$  kg de peso corporal (PC)), implantados cirurgicamente com uma sonda no rúmen. O manejo e as dietas experimentais foram os mesmos descritos anteriormente.

Este ensaio adicional, para avaliar a taxa de desaparecimento do glicerol infundido no rúmen, foi conduzido em função de que o tratamento com solução ácida das amostras de líquido ruminal, coletadas no ensaio de digestibilidade, inviabilizou a determinação do glicerol nas amostras.

Após a cirurgia de implantação da sonda no rúmen, os animais foram alojados em gaiolas de metabolismo providas de cochos para volumoso, sal mineral e bebedouro com água permanentemente disponível, onde permaneceram durante todo o período experimental.

O experimento foi conduzido em duplo Quadrado Latino 4x4, para cada tipo de Volumoso. Os períodos experimentais foram de 4 dias, sendo 3 dias de adaptação às dietas e um dia de coleta de amostra de líquido ruminal.

Amostras de líquido ruminal (50 mL) foram coletadas no 4º dia de cada período, antes da alimentação da (tempo zero) e 2, 4, 6 e 8 horas após a infusão ruminal da glicerina bruta. Imediatamente após a coleta, as amostras eram filtradas com tecido de nylon de 50  $\mu$  de porosidade, e uma alíquota era coletada e congelada para posterior análise do glicerol.

### **4.4 Análises químicas**

O teor de matéria seca (MS) das amostras de alimento, eventuais sobras, fezes e digesta duodenal foram determinadas por secagem em estufa a 105°C por pelo menos 12 horas. A matéria mineral (MM) foi determinada pela queima em mufla a 600°C durante 4 horas.

O nitrogênio total (N) foi determinado por método Kjeldahl (Método 984.13, AOAC, 1997). O nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN) e insolúvel em detergente ácido (NIDA), nitrogênio não proteico (NNP) e nitrogênio solúvel e insolúvel em tampão borato-fosfato foram determinados de acordo com Licitra et al. (1996).

A análise dos teores de fibra em detergente neutro (FDN) foi baseada em Mertens (2002), e de fibra em detergente ácido (FDA) e lignina em detergente ácido (LDA) baseada no método 973.18 do AOAC (1997). Contudo, as amostras foram pesadas em saquinhos de poliéster (porosidade de 16  $\mu$ ) e tratadas com solução detergente neutro (FDN) ou ácido (FDA) em autoclave a 110°C, durante 40 minutos (SENGER et. al., 2008). Para análise de LDA, os saquinhos contendo o resíduo detergente ácido foram tratados em ácido sulfúrico 12 M durante 3 horas.

O teor de purinas foi quantificado nas amostras de digesta duodenal segundo a técnica proposta por Makkar e Becker (1999). A análise de N  $\alpha$ -amino na digesta duodenal foi realizada de acordo com método adaptado de Palmer e Peters (1969), descrito previamente por Hentz et al., (2012).

A concentração de N amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) no fluido duodenal foi analisada colorimetricamente conforme Weatherburn (1967).

Nas amostras de fluido ruminal acidificadas com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20%) determinou-se a concentração de N-NH<sub>3</sub> conforme Weatherburn (1967).

A análise de glicerol no líquido ruminal e duodenal foi realizada com um *kit* enzimático comercial, fornecido pela Bioclin (Quibasa), para determinação de triglicerídeos, usando como padrão glicerina (glicerol P.A. Vetec).

Em um amostra de GB bruta, foram determinadas as quantidades de glicerol através de Kit colorimétrico Bioclin, A concentração de extrato etéreo na GB foi realizada conforme Bligh e Dyer (1959). A concentração de minerais e contaminantes foi realizada por espectrofotometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado conforme Korn et al., (2008).

#### 4.5 Cálculos

A digestibilidade aparente da matéria seca (DMS), assim como das demais frações, foi calculada como:

$$\text{DMS (\%)} = (\text{MS consumida (g/dia)} - \text{MS fecal (g/dia)}) / \text{MS consumida (g/dia)} \times 100$$

A digestibilidade verdadeira da matéria orgânica (DVMO) foi calculada considerando que somente a FDN excretada nas fezes era originada do alimento (Mulligan et al., 2001), onde:

$$\text{DVMO (\%)} = \frac{\text{Consumo de MO (g/dia)} - \text{FDN fecal (g/dia)}}{\text{Consumo de MO (g/dia)}} \times 100$$

O fluxo duodenal de MS e das demais frações no duodeno foi calculado com base na excreção fecal e na concentração duodenal de FDA da seguinte forma:

$$\text{MS duodenal (g/dia)} = \frac{[(\text{MS fecal (g/dia)} \times \text{FDA fecal (g/kg MS)}) / \text{FDA duodenal (g/kg MS)}]$$

O fluxo de N de origem microbiana no intestino delgado foi estimado com base no fluxo de purinas no duodeno, considerando um conteúdo de N nas purinas de 49% e uma proporção de N purina: N microbiano de 0,116 (CHEN & GOMES, 1992).

A digestibilidade ruminal verdadeira da matéria orgânica (DRVMO) foi calculada considerando que o nitrogênio representa 99,6 g/kg da MO microbiana (CLARK et al., 1992).

$$\text{DRVMO} = \frac{[1 - (\text{MO duodenal (g/dia)} - \text{MO microbiana (g/dia)}) / \text{Consumo de MO (g/dia)}]} \times 100$$

A digestibilidade verdadeira do nitrogênio (DVN) foi calculada como:

$$\text{DVN} = \frac{\text{Consumo de N (g/dia)} - \text{NIDN fecal (g/dia)}}{\text{Consumo de N (g/dia)}}$$

O nitrogênio presente em compostos degradáveis no rúmen foi calculado pela diferença entre o consumo total de nitrogênio e o fluxo duodenal de nitrogênio não amoniacal e não microbiano (NANMN).

A retenção de nitrogênio foi calculada descontando do consumo de nitrogênio menos a soma da excreção fecal e urinária de nitrogênio.



O fluxo de glicerol no duodeno foi estimado com base na estimativa de passagem de líquido duodenal da seguinte forma:

**Fluxo líquido duodeno (ml/dia) = (100 - % MS no duodeno x Fluxo de MS (g/dia))**

**Fluxo de glicerol mg/dia = Fluxo líquido duodeno (ml/dia) x Concentração de glicerol mg/ml**

A digestibilidade ruminal do glicerol (DRGlic) foi calculada com base na glicerina bruta administrada no rúmen e a chegada de glicerol no intestino delgado.

**DRGlic = Glicerina infundida (mg) x 0.84 (Concentração de glicerol) - glicerol duodenal (mg/dia) / Glicerina infundida (mg) x 0.84 (Concentração de glicerol)**

#### 4.6 Análise estatística

Os dados de digestibilidade total, digestibilidade ruminal, fluxo duodenal, excreção fecal, excreção urinária e retenção de nitrogênio foram submetidos à análise de regressão e as médias comparadas pelo teste t de Student ( $P < 0,05$ ) utilizando o procedimento Mixed do SAS (2009) de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + P_j + D_k + Tr_l + (D \times Tr)_{kl} + e_{ijkl}$$

Onde:

$Y_{ijkl}$  = variável dependente

$\mu$  = média das observações

$A_i$  = efeito aleatório dos animais

$P_j$  = efeito aleatório dos períodos

$D_k$  = efeito fixo da dieta

$Tr_l$  = efeito fixo da inclusão de glicerina bruta

$(D \times Tr)_{kl}$  = efeito da interação dieta x inclusão de glicerina bruta na dieta

$e_{ijk}$  = erro residual

Os dados de parâmetros ruminais foram analisados por meio do procedimento Mixed do SAS (2009) satisfazendo o seguinte modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + P_j + D_k + Tr_l + A(P \times D \times Tr) + Tp_m + (D \times Tr)_{kl} + (Tr \times Tp)_{km} + (Tr \times Tp)_{lm} + (D \times Tr \times Tp)_{klm} + e_{ijklm}$$

Onde:

$Y_{ijkl}$  = variável dependente

$\mu$  = média das observações

$A_i$  = efeito aleatório dos animais

$P_j$  = efeito aleatório dos períodos

$D_k$  = efeito fixo da fonte proteica

$Tr_l$  = efeito fixo da inclusão de glicerina bruta

$A(P \times D \times Tr)$  = efeito aleatório dos animais em cada período, dieta e inclusão de glicerina bruta (erro tipo a)

$Tp_m$  = efeito fixo do tempo de coleta

$(D \times Tr)_{kl}$  = efeito da interação entre a dieta e inclusão de glicerina bruta

$(D \times Tr)_{km}$  = efeito da interação entre dieta e do tempo de coleta

$(Tr \times Tp)_{lm}$  = efeito da interação entre inclusão de glicerina bruta e tempo de coleta

$(D \times Tr \times Tp)_{klm}$  = efeito da interação entre dieta, inclusão de glicerina bruta e tempo de coleta

$e_{ijklm}$  = erro residual

Após submeter os dados à análise de regressão, as médias foram comparadas pelo teste t de Student a 5% de probabilidade.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Ensaios 1 e 2– Avaliação do Consumo e digestibilidade

Não houve interação dieta versus tratamento para maior parte das variáveis analisadas, com exceção do consumo de FDN ( $P<0,05$ ), e FDA ( $P<0,05$ ), (Tabela 3).

A infusão ruminal de glicerina bruta reduziu linearmente o consumo de forragem, MS, ( $P<0,05$ ), MO ( $P<0,05$ ), FDN ( $P<0,05$ ), e FDA ( $P<0,05$ ), e MOD ( $P<0,05$ ), (Tabela 3), bem como o pH ruminal ( $P<0,05$ ), e a concentração de nitrogênio amoniacal no fluido ruminal ( $P<0,05$ ), mas não interferiu na digestibilidade ruminal ou total da matéria orgânica, fibra em detergente neutro e dos compostos nitrogenados. Da mesma forma, reduziu linearmente a excreção fecal e urinária de N ( $P<0,05$ ), assim como a quantidade de  $\alpha$ -amino N que fluiu para o duodeno ( $P<0,05$ ), mas não interferiu na retenção de N.

O fluxo duodenal de N microbiano foi similar em todos os tratamentos quando estimado pelos derivados de purinas na urina, mas foi afetado negativamente pela GB quando estimado pelas purinas na digesta duodenal ( $P<0,05$ ). Independente do marcador utilizado, a eficiência de síntese microbiana não foi afetada pela GB.

O fluxo duodenal de N não amoniacal e não microbiano (NNANM), assim como a proporção de proteína degradável na dieta, foram afetados pela interação tratamento com tipo de forragem ( $P<0,05$ ).

Nos animais alimentados com aveia o fluxo duodenal de NNANM aumentou linearmente ( $P<0,05$ ), enquanto que naqueles alimentados com tifton diminuiu linearmente com o aumento da infusão ruminal de GB ( $P<0,05$ ). Como consequência, a proporção da proteína degradada no rúmen diminuiu linearmente quando a dieta foi aveia ( $P<0,05$ ) e tendeu a aumentar quando a dieta foi tifton, principalmente na dose mais alta de GB. Menos de 1% do glicerol infundido no rúmen chegou ao intestino delgado.

### 5.2 Ensaio 3 – Desaparecimento do glicerol no rúmen

Os dados de desaparecimento do glicerol no rúmen são apresentados na Figura 10.

Tabela 3 - Consumo diário de matéria seca, matéria orgânica e compostos não nitrogenados por ovinos alimentados com aveia ou feno de tifton e suplementados com diferentes níveis de glicerina bruta.

Item1	Aveia				Feno de tifton				EPM 2	P <sup>3</sup>		
	0	0.5	1.5	3	0	0.5	1.5	3		D	Tr	Tr*D
<b>Consumo (g/dia)</b>												
<b>MS</b>	477	454	450	384	516	524	384	268	61.7	0.338	0.001	0.094
<b>MS (%PC)</b>	1.96	1.87	1.85	1.59	1.94	1.98	1.44	0.97	0.222	0.789	<0.001	0.079
<b>MO</b>	395	375	378	331	465	469	348	239	52.7	0.095	0.002	0.050
<b>FDN</b>	258	247	246	209	383	394	288	208	36.7	<0.001	0.0004	0.024
<b>FDA</b>	144	129	147	118	185	193	142	98	19.2	0.009	0.001	0.020
<b>GlicD</b>	0	3	11	21	0	3	11	36	2.8	0.347	<0.001	0.007
<b>MOD</b>	294	297	297	263	287	275	212	148	46.3	0.834	0.032	0.169

<sup>1</sup>MS= matéria seca; MS (%PC)= matéria seca em porcentagem do peso corporal; MO= matéria orgânica; FDN= fibra em detergente neutro; FDA= fibra em detergente ácido; GlicD= % de glicerol na dieta; MOD= matéria orgânica digestível <sup>2</sup>EPM= Erro padrão das médias onde n=8 por tratamento <sup>3</sup>Probabilidade do erro tipo I da análise de variância onde: D = dieta; Tr =tratamento; Tr\*D = interação entre tratamento e a dieta

Tabela 4 - Digestibilidade da matéria seca, matéria orgânica e da fração fibrosa da dieta de ovinos alimentados com aveia ou feno de tifton e suplementados com diferentes níveis de glicerina bruta.

Item <sup>1</sup>	Aveia				Feno de tifton				EPM <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>		
	0	0.5	1.5	3	0	0.5	1.5	3		D	Tr	Tr*D
MS	0.67	0.73	0.71	0.73	0.60	0.58	0.59	0.63	0.03	0.005	0.134	0.950
MO	0.71	0.77	0.76	0.78	0.62	0.59	0.61	0.64	0.03	<0.001	0.064	0.678
FDN	0.71	0.77	0.74	0.73	0.67	0.64	0.65	0.73	0.03	0.004	0.285	0.355
DVMO	0.80	0.84	0.83	0.83	0.73	0.70	0.71	0.76	0.02	<0.001	0.167	0.730

<sup>1</sup>MS= matéria seca; MO= matéria orgânica; FDN= fibra em detergente neutro; FDA= fibra em detergente ácido; DVMO= digestibilidade verdadeira da matéria orgânica; <sup>2</sup>EPM= Erro padrão das médias onde n=8 por tratamento

<sup>3</sup>Probabilidade do erro tipo I da análise de variância onde: D= dieta; Tr = tratamento; D\*Tr = interação entre dieta e tratamento.

Tabela 5 - Consumo, digestibilidade, balanço do nitrogênio de ovinos alimentados com aveia ou feno de tifton e suplementados com diferentes níveis de glicerina bruta.

Item <sup>1</sup>	Aveia				Feno de tifton				EPM <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>		
	0	0.5	1.5	3	0	0.5	1.5	3		D	Tr	Tr*D
Consumo de N (g/dia)	16.75	16.64	15.44	13.39	10.62	9.29	6.75	5.40	2.32	0.001	0.015	0.612
Excreção (g/dia):												
Fecal	3.70	2.75	3.14	2.39	3.20	3.65	2.52	1.57	0.38	0.791	<0.001	0.165
Urinário	11.59	11.83	10.65	8.45	4.76	4.43	3.81	3.38	0.97	<0.001	0.004	0.230
Retenção (g/dia)	1.45	2.07	1.43	1.96	2.84	1.61	1.67	0.07	2.40	0.523	0.4557	0.339
Digestibilidade:												
Aparente	0.75	0.82	0.75	0.75	0.69	0.58	0.63	0.66	0.05	0.001	0.723	0.654

<sup>1</sup>CN=consumo de nitrogênio; Nf=nitrogênio fecal; NU=nitrogênio urinário; RN=retenção de nitrogênio; DN= digestibilidade aparente do nitrogênio; <sup>2</sup>EPM= Erro padrão das médias onde n=8 por tratamento. <sup>3</sup>Probabilidade do erro tipo I da análise de variância onde: : D= dieta; Tr = tratamento; D\*Tr = interação entre dieta e tratamento.

Tabela 6 - Digestibilidade ruminal, fluxo duodenal, e síntese de proteína microbiana ruminal de ovinos alimentados com aveia ou feno de tifton e suplementados com diferentes níveis de glicerina bruta.

Item <sup>1</sup>	Aveia				Feno de tifton				EPM <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>		
	0	0.5	1.5	3	0	0.5	1.5	3		D	Tr	Tr*D
DRMO	0.65	0.67	0.67	0.69	0.61	0.54	0.51	0.54	0.53	0.032	0.729	0.463
MODR	308	282	293	259	278	272	183	116	51	0.001	<0.001	0.105
PDR	0.96	0.91	0.92	0.79	0.63	0.55	0.58	0.78	0.09	<0.001	0.879	0.054
PNDR	0.03	0.08	0.08	0.21	0.36	0.45	0.41	0.22	0.09	<0.001	0.879	0.054
Fluxo Duodenal (g/dia)												
MO	150	119	113	109	186	226	171	111	18.95	0.007	0.004	0.036
N	7.82	7.81	7.22	7.06	7.85	8.85	6.30	4.16	1.07	0.488	0.009	0.072
N-NH <sub>3</sub>	0.70	0.57	0.48	0.52	0.31	0.25	0.20	0.13	0.09	<0.001	0.023	0.989
N α-amino	5.98	5.30	4.65	5.12	5.10	5.76	4.49	3.36	0.72	0.951	0.027	0.326
Nmp	6.01	5.83	5.55	4.20	4.91	4.40	3.70	2.83	0.94	0.166	0.034	0.875
Nmd	4.72	4.18	3.76	3.71	3.14	3.97	2.43	2.92	0.61	0.068	0.122	0.818
NANMN	0.73	1.47	1.19	2.32	3.21	4.19	2.57	1.30	0.84	0.001	0.438	0.022
ESPMp	22.4	24.3	24.7	20.0	19.1	16.8	22.8	24.6	4.55	0.190	0.604	0.257
ESPMd	17.7	18.5	14.9	12.9	11.3	14.9	12.9	18.8	3.05	0.001	0.723	0.654

<sup>1</sup>DRMO= digestibilidade ruminal da matéria orgânica; MODR= matéria orgânica degradável no rúmen; PDR= proteína degradável no rúmen; PNDR= proteína não degradável no rúmen; GlicD= glicerol na dieta; MO= matéria orgânica; N=nitrogênio; N-NH<sub>3</sub>=nitrogênio amoniacal; N α – amino=nitrogênio alfa amino; Nmp=nitrogênio microbiano estimado por purinas; Nmd=nitrogênio microbiano estimado por derivados de purinas; NANMN=nitrogênio não amoniacal e não microbiano; ESPM= eficiência de síntese de proteína microbiana (g/Kg de MO degradada no rúmen); (P<0,05)

<sup>2</sup>EPM= Erro padrão das médias onde n=8 por tratamento <sup>3</sup>Probabilidade do erro tipo I da análise de variância onde D= dieta; Tr = tratamento; D\*Tr = interação entre dieta e tratamento.

## 5.2 Fermentação ruminal

O teor de amônia foi afetado de forma diferente nos animais que recebiam aveia (Figura 6), quando comparado aos animais que recebiam feno de tifton (Figura 7). A amônia diminuiu linearmente com o aumento dos níveis de glicerina bruta ( $P < 0,05$ ). Contudo, na dieta à base de aveia, esse efeito foi mais pronunciado somente no nível de inclusão de 3 ml/Kg de PC. Em ambas as dietas, o teor de amônia foi afetado pelo tempo após a refeição ( $P < 0,05$ ). Em geral, o teor de amônia aumenta nas primeiras duas horas após a refeição e depois cai a níveis basais novamente. Além disso, é possível observar, nos gráficos, que existe um efeito residual da alimentação da manhã sobre as variáveis ruminais no período da noite.

O pH ruminal foi influenciado negativamente pela inclusão de níveis de glicerina bruta ( $P < 0,05$ ). O tempo após a infusão da glicerina bruta e alimentação dos animais também influenciaram o pH do rúmen ( $P < 0,05$ ), com quedas mais acentuadas nas primeiras 4 horas após a alimentação dos animais (Figura 9).

O desaparecimento do glicerol no rúmen foi influenciado pelo tempo e pelo tratamento ( $P < 0,05$ ), pois quase que 100% deste desapareceu nas primeiras 8 horas pós-infusão, existindo interação positiva tempo e tratamento, quando este diminui linearmente do menor para o maior nível de inclusão ( $P < 0,05$ ) (Figura 10).



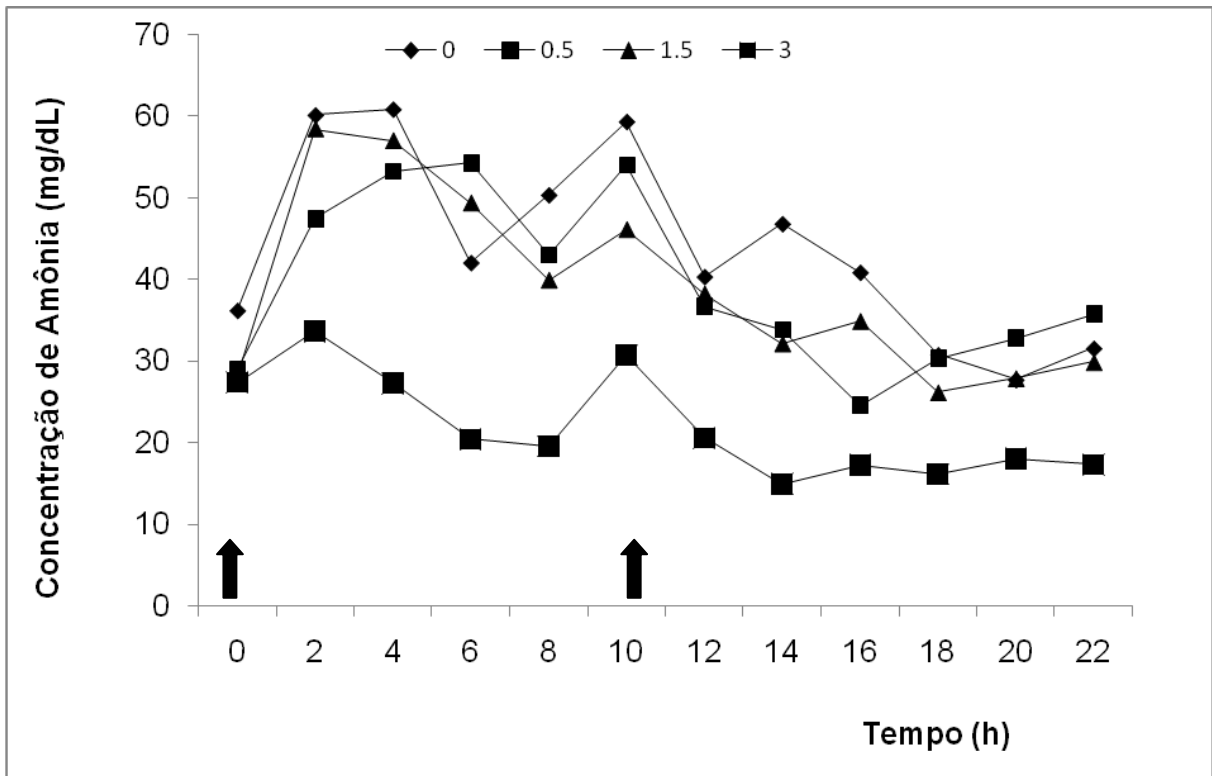


Figura 6 - Concentração de amônia (N-NH<sub>3</sub>) em mg/dl, no fluido ruminal ao longo do tempo, após a refeição (↑), em ovinos alimentados com aveia e suplementados com diferentes níveis de glicerina bruta (0, 0.5, 1.5 e 3 mL/Kg/PV). D= efeito da dieta; Tr= efeito do tratamento. Tp= efeito do tempo de coleta; D\*Tr=efeito da interação entre a dieta e tratamento; onde, n= 8 por horário e tratamento.

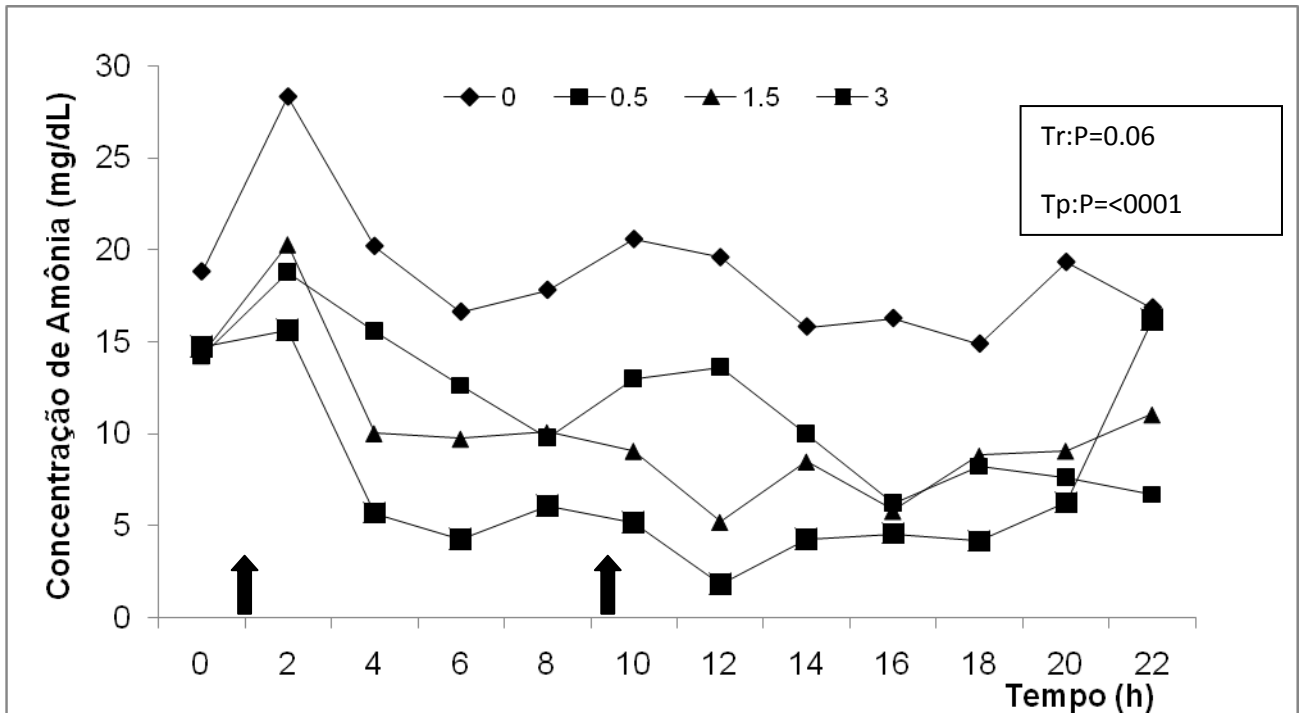


Figura 7 - Concentração de amônia (N-NH<sub>3</sub>) em mg/dl, no fluido ruminal ao longo do tempo, após a refeição (↑), em ovinos alimentados com feno de tifton e suplementados com diferentes níveis de glicerina bruta (0, 0.5, 1.5 e 3 mL/Kg/PV). D= efeito da dieta; Tr= efeito do tratamento. Tp= efeito do tempo de coleta; D\*Tr=efeito da interação entre a dieta e tratamento; onde, n= 8 por horário e tratamento.

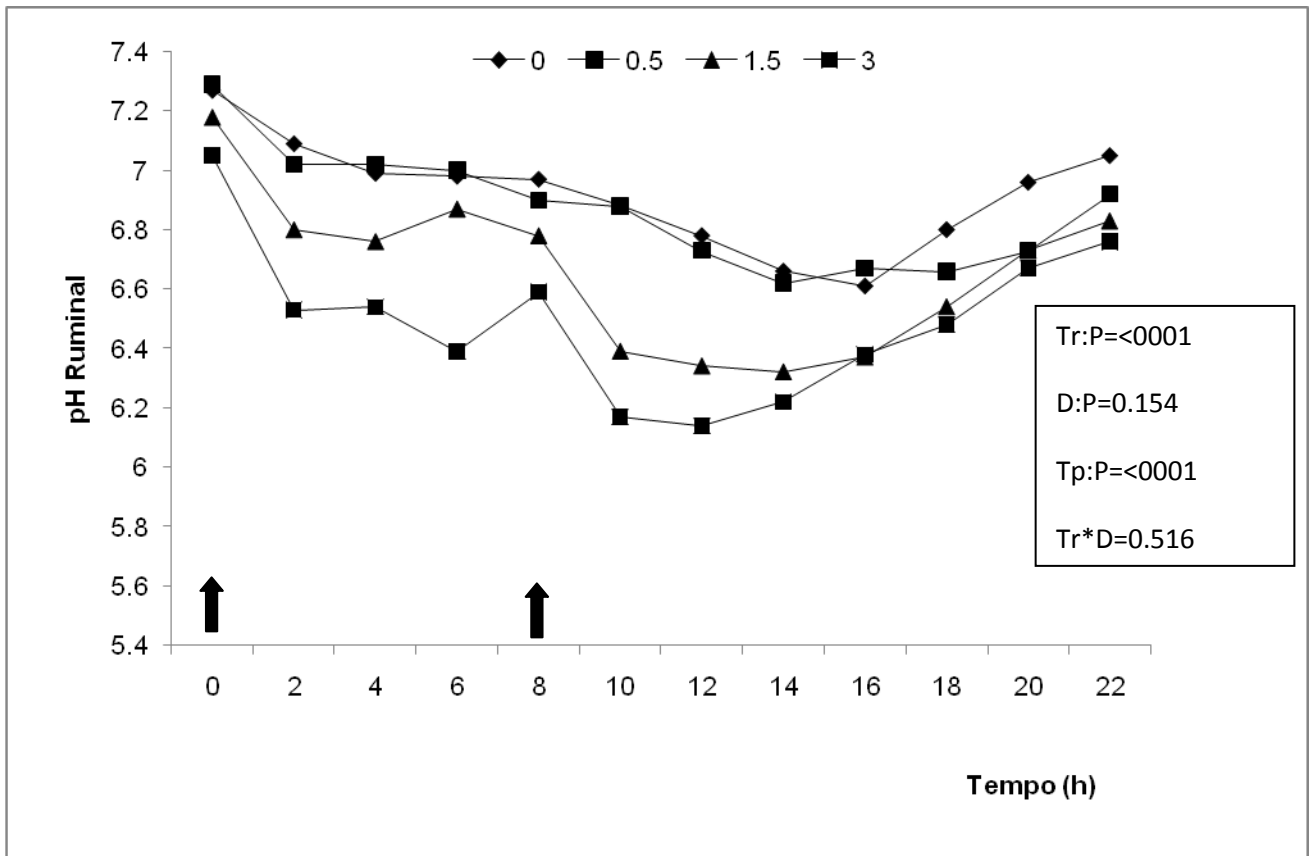


Figura 8 - Variação do pH, no fluido ruminal ao longo do tempo, após a refeição (↑), em em ovinos alimentados com feno de tifton e suplementados com diferentes níveis de glicerina bruta (0, 0.5, 1.5 e 3 mL/Kg/PV). D= efeito da dieta; Tr= efeito do tratamento. Tp= efeito do tempo de coleta; D\*Tr=efeito da interação entre a dieta e tratamento; onde, n= 8 por horário e tratamento.

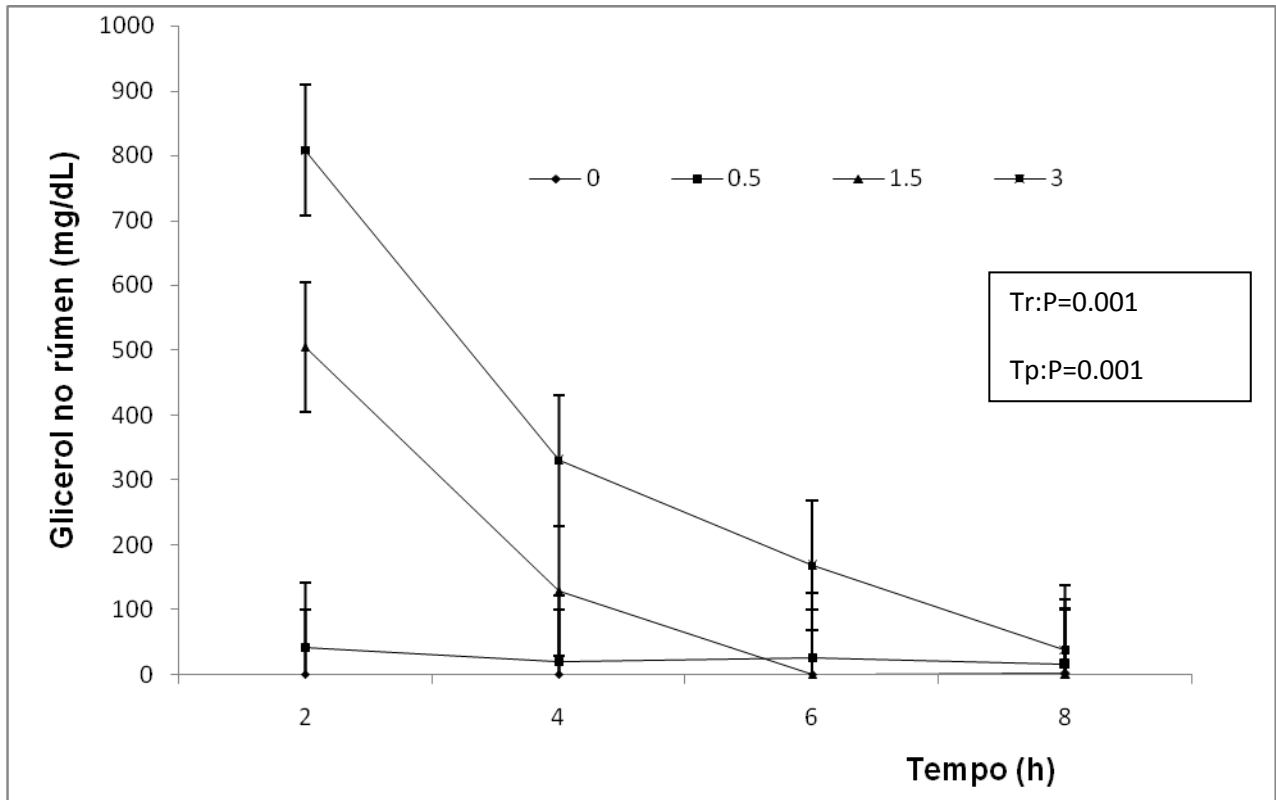


Figura 9 - Concentração de glicerol no fluido ruminal após infusão de diferentes níveis de glicerina bruta no rúmen de ovinos alimentados com aveia ou feno de tifton e suplementados com diferentes níveis de glicerina bruta (0, 0.5, 1.5 e 3 mL/Kg/PV). D= efeito da dieta; Tr= efeito do tratamento. Tp= efeito do tempo de coleta; D\*Tr=efeito da interação entre a dieta e tratamento; onde, n= 8 por horário e tratamento.

## 6 DISCUSSÃO

Uma das hipóteses do trabalho era que a GB teria o potencial de aumentar a oferta de energia e proteína metabolizável em animais alimentados com gramíneas de estação quente (C<sub>4</sub>). A GB serviria de substrato energético (fonte de carbono) para bactérias ruminais, com potencial de aumentar o seu crescimento (i.e. a síntese de proteína microbiana ruminal) e, conseqüentemente, a digestibilidade da fibra e o consumo de forragem. Adicionalmente, nos animais alimentados com a gramínea de estação fria, era esperado que a GB aumentasse a captação de amônia, a síntese de proteína microbiana ruminal e o fluxo de aminoácidos para o intestino delgado. De fato, tanto nos animais alimentados com aveia quanto nos alimentados com feno de tifton, a infusão ruminal de GB reduziu a concentração ruminal de amônia. Shin et al., (2012) reportaram menor quantidade de amônia no rúmen de vacas suplementadas com 10% de inclusão de GB na MS. Outros reportaram diminuição da concentração do nitrogênio ureico no sangue de vacas alimentadas com dietas contendo GB (DeFRAIN et al., 2004; DONKIN et al., 2009; SHIN et al., 2012). Contudo, em ambas as situações impactaram negativamente o fluxo duodenal de N microbiano e o consumo de MO, sem afetar a digestibilidade da MO ou da FDN e, nem tampouco, a eficiência da síntese microbiana. Este efeito negativo da GB sobre o consumo de alimento também foi reportado por Avila-Stagno et al. (2013) em ovinos e por Boyd et al. (2013) em vacas de leite.

A explicação para os resultados obtidos não é aparente. Contudo, em ambas as gramíneas a GB reduziu o pH ruminal a valores que podem ter inibido a aderência bacteriana e a taxa de degradação da forragem. Kozloski et al. (2008) relataram que as diferenças de degradabilidade *in vitro* entre as amostras de gramíneas de clima temperado e tropical estão diretamente relacionadas às diferenças da adesão microbiana sobre aquelas forragens e, além disso, observaram um efeito linear negativo da redução do pH sobre a degradabilidade *in vitro* das gramíneas. Além disso, em um estudo *in vitro*, foi observado que o crescimento de bactérias celulolíticas, como o *Ruminococcus flavefaciens* e *Fibrobacter succinogenes*, foi inibido quando 2 a 5% de glicerol foram adicionados no meio de incubação (ROGER et al., 1992), indicando a existência de um efeito negativo pH-independente do glicerol sobre as bactérias ruminais. Da mesma forma, Paggi et al. (2004) reportaram que a atividade celulolítica ruminal reduziu quando a concentração de glicerol no meio de cultura aumentou de 50 para 300 mM. O impacto

negativo da GB sobre o crescimento e atividade microbiana ficou evidenciado no presente estudo também pela redução do fluxo duodenal de proteína microbiana. Considerando que a digestibilidade da MO e da FDN não foram afetadas, é provável que a redução da atividade fibrolítica pela GB tenha resultado em aumento do tempo de retenção da digesta no rúmen, reduzindo, então, o consumo de forragem.

É possível, de outra forma, que o aumento dos níveis de infusão de GB tenha influenciado negativamente o consumo de forragem por mecanismos metabólicos, como consequência de absorção direta de glicerol através do epitélio ruminal, ou por um aumento da absorção de propionato. A infusão de propionato na veia mesentérica de novilhos reduziu a ingestão de alimento, mas o acetato infundido a taxas semelhantes não provocou o mesmo resultado (ALLEN, 2000). Receptores de propionato no epitélio ruminal de ovinos e cabras podem estar envolvidos no controle da ingestão de alimento (FURLAN et al., 2006).

Foi observada uma interação entre o tipo de forragem e o tratamento sobre a degradabilidade ruminal da proteína. A PDR nos animais alimentados com aveia diminuiu linearmente pela infusão de GB, enquanto que naqueles alimentados com tifton, doses intermediárias de GB diminuíram a degradabilidade, mas a dose mais alta impactou positivamente a PDR. Os valores de PDR nos tratamentos com aveia foram relativamente mais altos do que a média dos valores encontrados na literatura, como aqueles reportados por Pires et al. (2006) (i.e., em torno de 90% vs 80%). Embora as estimativas de fluxo duodenal de digesta usualmente estejam sujeitas a erro inerente à metodologia, é possível que o processo de congelamento e descongelamento da forragem poderia facilitar o rompimento das células vegetais e da exposição do conteúdo celular à fermentação, levando a um aumento da PDR. Durante o processo de congelamento e descongelamento, ocorre o rompimento do citoplasma e extravasamento do conteúdo celular (XIMENES et al., 2004). A explicação para o aumento da proporção de PDR no tratamento que incluiu a dose mais alta de GB nos animais alimentados com tifton é menos aparente. A excreção de N endógeno é assumida ser diretamente proporcional ao consumo de alimento (HUTCHINSON, 1958; LUKAS et al., 2005). Desse modo, é possível que a drástica redução do consumo nesse tratamento reduziu a participação da fração endógena do NNANM de forma mais intensa neste tratamento.

Outro aspecto relevante observado no presente estudo foi que a concentração de glicerol no rúmen diminuiu com o tempo após a infusão ruminal, mas a taxas diferentes em função da dose infundida. Remond et al. (1993) e Bergner et al. (2007) reportaram

que o glicerol é rapidamente fermentado no rúmen, desaparecendo nas primeiras duas horas de incubação. Em estudo *in vivo*, foram reportados 100% de desaparecimento após 4 horas da ingestão de alimento contendo GB (REMOND et al., 1993). Contudo, no presente estudo, nas doses mais altas, observou-se que a concentração de glicerol atingiu valores basais somente 6 a 8 horas após a infusão ruminal. Garton et al. (1961) incubaram glicerol *in vitro* com glicerol e observaram que somente 25% deste desapareceu antes das primeiras 2 horas e quase 90% do glicerol não foi mais detectável após 8 horas de incubação. Trabue et al. (2007) observaram que somente 80% do glicerol incubado *in vitro* desapareceu após 24 horas de fermentação. No presente estudo, somente 1% do glicerol infundido chegou ao duodeno, indicando que o desaparecimento foi em nível ruminal. Contudo, não foi avaliado se o glicerol foi totalmente metabolizado pelas bactérias ou absorvido pelo epitélio ruminal. Kristensen e Raun (2007) infundiram 925 g/dia de GB no rúmen de vacas em lactação e observaram que 10% do glicerol administrado foi absorvido e recuperado na veia porta.

Foi observado, também, no presente estudo, um efeito residual da dieta fornecida na refeição da manhã sobre os parâmetros ruminiais após a ingestão da refeição da tarde. Está claramente evidenciado que os valores de pH e de concentração de amônia ruminal são menores no período após a refeição da tarde (i.e., durante a noite) se comparado com o intervalo entre as duas refeições durante o dia. Estes resultados indicam que o período de 8 horas é insuficiente para o ambiente ruminal recuperar sua condição basal observada antes da refeição da manhã.

## **7 CONCLUSÃO**

A inclusão de glicerina bruta na dieta de ovinos alimentados com gramínea de estação fria ou de estação quente aveia ou feno de tifton, em níveis acima de 0.5 mL/Kg PC, diminuiu a oferta de aminoácidos e de energia digestível, principalmente por reduzir o consumo de forragem.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, A. L. et al . Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **R. Bras. Zootec.**, Viçosa, v. 37, n. spe, jul. 2008.
- ALLEN, M. S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **J. Dairy Sci.** n. 83, p. 83, 2000.
- ALQUINI, Y., BONA, C., BOEGER, M.R.T.; COSTA, C.G.; BARROS, C.F. Epiderme. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. Viçosa: eds. UFV, 2003, p.87-107.
- AKAIKE, H. A new look at the statistical model identification. **IEEE Transactions on Automatic Control.**, Boston, v. 19, n. 6, p. 716-723, dec. 1974.
- ANUALPEC. **Anuário da pecuária brasileira**. São Paulo: OESP Gráfica, 2011.365p.
- ARAUJO, L. R. R.; ZOTIN, F. M. Z.; SCOFIELD, C. F. et al. Transesterificação etílica de óleo de soja via catálises básica e ácida. **48º Congresso brasileiro de Química**. 2008
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**, 16<sup>th</sup>, 3. ed. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD. 1997.
- AVILA, J. S.; CHAVES, A. V.; HERNANDEZ-CALVA, L. M.; BEAUCHEMIN, K. A.; MCGINN, S. M.; WANG, Y.; HARSTAD, O. M.; McALLISTER, T. A. Effects of replacing barley grain in feedlot diets with increasing levels of glycerol on in vitro fermentation and methane production. **Anim. Feed Sci. Technol**, p. 166–167:265–268, 2011.
- AVILA-STAGNO, A. V. et al. Effects of increasing concentrations of glycerol in concentrate diets on nutrient digestibility, methane emissions, growth, fatty acid profiles, and carcass traits of lambs. **Journal of Animal Science**, v. 91, p. 829-837. 2013. doi: 10.2527/jas.2012-5215 originally published online November 12, 2013
- BERGMAN, E.N. Energy contributions of volatile fatty acids from gastrointestinal tract in various species. **Physiology Review**, v. 70, n. 2. p. 567-590, 1990.
- BERGNER, H.; KIJORA, C.; CERESNAKOVA, Z.; SZAKACS, J. In vitro studies on glycerol transformation by rumen microorganisms. *Arch. Tierernahr.* 48:245–256. **Biotecnologia Ciência de Desenvolvimento**. n.37, p.45-51, 2007.
- BLIGH, E. G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemistry Physiological**, v. 27, p. 911-917, 1959.
- BOYD, J.; BERNARD, J.K.; WEST, J.W. Effects of feeding different amounts of supplemental glycerol on ruminal environment and digestibility of lactating dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 96, p. 470-476, 2013.
- BRISSON, D., M.-C. VOHL, J. ST-PIERRE, T. J. HUDSON, AND D. GAUDET. Glycerol: a neglected variable in metabolic processes? *Bioessays*, n. 23, p. 534–542, 2001.

BRITO, C.J.F.A.; ALQUINI, Y.; RODELLA, R.A.; DESCHAMPS, C. 1997. Alterações histológicas de três ecótipos de capim-elefante (*Penisetum purpureum*) após digestão *in vitro* In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 34. Juiz de Fora, MG. **Anais...** p.12-14.

BRITO, C.J.F.A.; RODELLA, R.A.; DESCHAMPS; ALQUINI, Y. 1999. Anatomia quantitativa e degradação *in vitro* de tecidos em cultivares de capim-elefante. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 28, n. 2, p. 223-229.

CHEN, X. B.; GOMES, M. J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: an overview of the technical details. **International Feed Resources Unit Rowett Research Institute**, Bucksburn: Rowett Research Institute, Aberdeen. p.1-22. 1992.

CHESSON, A. Effect of sodium hydroxide on cereal straw in relation to the enhanced degradation of structural polysaccharides by rumen microorganisms. **Journal Science Food Agriculture**. n. 32, p. 745-748, 1981.

CHUNG, Y. H. et al. Effects of feeding dry glycerin to early postpartum Holstein dairy cows on lactational performance and metabolic profiles. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 5682-5691, 2007.

CLARK, J. K.; KLUSMEYER, T. H.; CAMERON, M. R. Symposium: nitrogen metabolism and amino acid nutrition in dairy cattle. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to duodenum of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 8, p. 2304-2323. 1992.

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

DASARI, M. Crude glycerol potencial described. **Feedstuffs**. 15 de Out., p.16-19, 2007.

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

DeFRAIN, J. M. et al. Feeding glycerol to transition dairy cows: effect on blood metabolites and lactation performance. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p.4 195-4206, 2004.

DONKIN, S. S et al. Feeding value of glycerol as a replacement for corn grain in rations fed to lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, n; 92, p. 5111-5119, 2009.

DOPPENBERG, J.; VAN DER AAR, P. The nutritional value of biodiesel by - products. (Part 2: Glycerine). **Feed Business Asia**, p. 42-43, 2007.

ELAM, N.A.; ENG., K.S.; BECHTEL, B. et al. Glycerol from Biodiesel Production: Considerations for feedlot diets. **Proceedings of the Southwest Nutrition Conference. Tempe AZ**. n.21, 2008.

- EL-NOR, S. Abo; ABUGHAZALEH, A. A.; HASTINGS, D.; et al. Effects of differing levels of glycerol on rumen fermentation and bacteria. **Animal Feed Science and Technology**, v.162, p.99-105, 2010
- FURLAN, R. L.; MACARI, M.; FILHO, D. E. F. 2006. Anatomia e fisiologia do trato gastrintestinal. In: *Nutrição de Ruminantes*. Editora: ABDR. p. 1-23.
- GARTON, G. A.; LOUGH, A. K.; VIOQUE, E. Glyceride hydrolysis and glycerol fermentation by sheep rumen contents. **J. Gen. Microbiol.** 25:215–225, 1961.
- GUNN, P. J. et al. Effects of crude glycerin on performance and carcass characteristics of finishing wether lambs. **Journal of Animal Science**, n. 88, p. 1771-1776, 2010.
- GUNN, P. J.; et al. Effects of Elevated Crude Glycerin Concentrations on Feedlot Performance, Carcass Characteristics, and Serum Metabolite and Hormone Concentrations in Finishing Ewe and Wether Lambs. **The Professional Animal Scientist**, n. 26, p. 298–306, 2010.
- HANNA, W.W.; MONSON, W.G.; BURTON, G.W. Histological examination of freshleaves after in vitro digestion. **Crop Science**, n.13:, p. 98-102, 1973.
- HENTZ, F. et al. Intake and digestion by wethers fed a tropical grass-based diet supplemented with increasing levels of canola meal. **Livestock Science**, v. 147, p. 89–95. 2012.
- HIPPEN, A.R.; DEFRAIN, J.M.; LINKE, P.L. Glycerol and other energy sources for metabolism and production of transition dairy cows. In: **Florida Ruminant Nutrition Symposium**, Gainesville, 2008.
- HUTCHINSON, B.J. Factors governing faecal nitrogen wastage in sheep. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 9, p. 508-520, 1958.
- INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. 1993. Disponível em: <<http://www.iupac.org>>. Acesso em: 07 jul. 2007.
- KARTHA, K.K. Meristem culture and germplasm preservation. In: \_\_\_\_\_. (Ed.). **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton: CRC Press, 1985. p. 115-134.
- KERR, B. J.; HONEYMAN, M.; LAMMERS, P. **Feeding bioenergy coproducts to swine: crude glycerol**. Ames: Iowa State University, 2007.
- KORN, M.G.A, et al. Sample preparation for the determination of metals in food samples using spectroanalytical methods: a review, **Applied Spectroscopy Reviews**, n. 43, p. 67–92, 2008.
- KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica dos ruminantes**, 2. ed. Santa Maria: Editora da Universidade Federal de Santa Maria, 2009. 214 p.
- KOZLOSKI, G.V.; LIMA, L.D.; CADORIN JUNIOR, R.L.; BONNECARRÈRE SANCHEZ, L.M.; SENGER, C.C.D.; FIORENTINI, G.; HÄRTER, C.J. Microbial colonization and

degradation of forage samples incubated in vitro at different initial pH. **Animal Feed Science and Technology**, n. 141, p. 356-367, 2008.

KREHBIEL, C. R. Ruminal and physiological metabolism of glycerin. **J. Anim. Sci.** v. 86 suppl. 2, p. 392, 2008.

KRISTENSEN, N.B.; RAUN, B.M.L. Ruminal fermentation, portal absorption, and hepatic metabolism of glycerol infused into the rumen of lactating dairy cows. In: ENERGY AND PROTEIN METABOLISM AND NUTRITION – International Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition, 2. Ortigues – Marty, **Proceedings...** Marty: EAAP Publication. Wageningen Academic Publishers. p.355-356, 2007.

KRUEGER, N. A.; ANDERSON, R. C.; TEDESCHI, L. O.; CALLAWAY, T. R.; EDRINGTON, T. S.; NISBERT, D. J. Evaluation of feeding glycerol on free-fatty acid production and fermentation kinetics of mixed ruminal microbes in vitro. **Bioresour. Technol.** n. 101, p. 8469–8472, 2010.

LAGE, J. F. et al. Glicerina bruta na dieta de cordeiros terminados em confinamento. **Revista Agropecuária Brasileira**, n. 45, p. 1012-1020, 2010.

LAMMERS, P. et al. Growth performance, carcass characteristics, meat quality, and tissue histology of growing pigs fed crude glycerin –supplemented diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 88, 26 p., 2008.

LEE, S. Y.; LEE, S. M.; CHO, Y. B.; KAM, D. K.; LEE, S. C.; KIM, C. H. SEO, S. Glycerol as a feed supplement for ruminants: in vitro fermentation characteristics and methane production. **Anim. Feed Sci. Technol.**, p. 166–167; 269–274, 2011.

LEMPP, B. Avaliações qualitativas, químicas, biológicas e anatômicas de lâminas de *Panicum maximum* Jacq. cv Aruana e Vencedor. Tese (Doutorado). UNESP, Jaboticabal, 1997. 148p.

LICITRA, G.; HERNANDEZ, T. M.; VAN SOEST, P. J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science Technology**, v. 57, p. 347-358, 1996.

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

LINKE, P. L.; DeFRAIN, J. M.; HIPPEN, A. R.; JARDON, P. W. 2004. Ruminal and plasma responses in dairy cows to drenching or feeding glycerol. **J. Dairy Sci.**, n. 87, suppl. 1, p. 343.

LUKAS, M.; SÜDEKUM, K.H.; RAVE, G.; FRIEDEL, K.; SUSENBETH, A. Relationship between faecal crude protein concentration and diet organic matter digestibility in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 1332-1344, 2005.

MAcADAM, J.W.; MAYLAND, H.F. The relationship of leaf strength to cattle preference in tall fescue cultivars. **Agronomy of Journal**, v. 95, p.414-419, 2003.

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

MACKINNON, B.W.; EASTON, T.N.; BARRY, T.N.; SEDCOLE, J.R. The effect of reduced leaf shear strength on the nutritive value of perennial ryegrass. **Journal of Agricultural Science**, v.111, p.469-474, 1988. 001. 458 p.

MAKKAR, H. P. S. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. **Small Ruminant Research**, v. 49, p. 241–256. 2003.

MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: a collaborative study. **J. AOAC**, v. 85, p. 1217-1240. 2002.

MINSON, D.J. **Forage in ruminant nutrition**. New York. Academic Press. 1990. 483p.

MOREIRA, A. L. 2006. **Melhoramento de pastagens através da técnica da sobressemeadura de forrageiras de inverno**. Disponível em: <<http://www.aptaregional.sp.gov.br>>. Acesso em 15 mai.2013.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 4<sup>th</sup> ed., New York, NY: Worth Publishers, 2005.

OSBORNE, V.R. et al. Effects of supplementing glycerol and soybean oil in drinking water on feed and water intake, energy balance, and production performance of periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 92, p.698–707, 2009. doi:10.3168/jds.2008-1554.

OWENS, F.N.; GOETSCH, A. L. **Ruminal fermentation**. In: CHURCH, D. C. (Ed.). The ruminant animal digestive physiology and nutrition. 1993. p. 145-171.

PACIULLO, D.S.C. **Características anatômicas e nutricionais de lâminas foliares e colmos de gramíneas forrageiras, em função do nível de inserção no perfilho, da idade e da estação de crescimento**. 2000. 104f. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2000.

PAGGI, R.A.; FAY, J.P.; FAVERIN, C. In vitro ruminal digestibility of oat hay and cellulolytic activity in the presence of increasing concentrations of short-chain acids and glycerol. **J. Agric. Sci.**, n. 142, 89–96, 2004

PALMER, D. W.; PETERS, Jr. Automated determination of free amino groups in serum and plasma using 2,4,6-trinitrobenzene sulfonate. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v.15, n.9, p. 896, Sep., 1969.

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.

PENZ JUNIOR, A. M.; GIANFELICE, M. O que fazer para substituir os insumos que podem migrar para produção de bio-combustível. **Acta Scientiae Veterinariae**, n. 36, supl 1, p. s107-s117, 2008.

PEREIRA, J. C.; CUNHA, D. N. F. V.; CECON, P. R. et al. Comportamento ingestivo e taxa de passagem de partículas em novilhas leiteiras de diferentes grupos genéticos submetidas a dietas com diferentes níveis de fibra. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.6, p.2134-2142, 2007.

PINTO, A.C.; GUARIEIRO, L.L.N.; REZENDE, M.J.C. et al. Produção brasileira de biodiesel. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 16, p. 1313, 2008.

PIRES, A. J. V. et al. Degradabilidade ruminal da matéria seca, da fração fibrosa e da proteína bruta de forrageiras. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 41, n.4, p.643-648, abr. 2006.

POPPI, D.P.; HUGHES, T.P.; l'HUILLIER, P.J. Intake of pasture by grazing ruminants. In: NICOL, A.M. (Ed.). **Livestock feeding on pasture**. Hamilton: New Zealand Society of Animal Production, 1987. p.55-64. (Occasional publication, no 10)

RAMOS, M. H. E KERLEY, M. S. Effect of dietary crude glycerol level on ruminal fermentation in continuous culture and growth performance of beef calves. **Journal of Animal Science**, v.90, p. 892-899.2012.

RAVEN P. H.; EVERT R. F.; EICHHORN S. E. **Biologia vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 2007.

REMOND, B.; SOUDAY, E.; JOUANY, J. P. 1993. In vitro and in vivo fermentation of glycerol by rumen microbes. **Anim. Feed Sci. Technol.**, n. 41, p. 121–132

RICO, D. E. et al. Effects of partially replacing dietary starch with dry glycerol in a lactating cow diet on ruminal fermentation during continuous culture. **Journal of Dairy Science**, n. 95, p. 3310–3317, 2012.

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

ROGER, V. G. et al. Effects of glycerol on the growth, adhesion, and cellulolytic activity of rumen cellulolytic bacteria and anaerobic fungi. **Current Microbiol.**, n. 25, p. 197-201. 1992.

PERRY, R. H. e GREEN, D.W. *Perry's Chemical Engineers' Handbook* McGraw-Hill: New York. p. 2-39, 1997.

RODELLA, R. A.; ISHIY, C. M.; MAIMONI, R.C.S. Estudo quantitativo de características anatômicas de folhas de duas espécies de *Brachiaria*. **Revista Agraciência**, v. 2, n. 2, p. 21-30, 1982.

SAS. Institute Inc. **SAS language reference**. Version 9.2. Cary, NC: SAS institute. 2009.

SCHRÖDER, A., AND K.H. SÜDEKUM. 1999. Glycerol as a by-product of biodiesel production in diets for ruminants. In *New Horizons for an Old Crop. Proc. 10th Int. Rapeseed Congr.*, Canberra, Australia, September 26–29, Paper No. 241. N. Wratten and P.A. Salisbury, ed.

SCHWARZ, G. Estimating the dimensional of a model. **Annals of Statistics**, Hayward, v. 6, n. 2, p. 461-464, mar. 1978.

SENGER, C. C. D. et al. Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 146, p. 169-174. 2008.

SHIN, J. H. et al.; Effects of feeding crude glycerin on performance and ruminal kinetics of lactating holstein cows fed corn silage-or cottonseed hull-based, low-fiber diets. **Journal of Dairy Science**, n. 95, p. 4006–4016, 2012.

SILVA, J.F.C. Mecanismos reguladores de consumo In: BERCHIELLI, T.T. et al. (Ed.). **Nutrição de ruminantes**. 2006. p. 57-77.

SOUSA, G.S.; PIRES, M.M.; ALVES, J.M. Análise da potencialidade da produção de biodiesel a partir de óleos vegetais e gorduras residuais. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UESC, 11., 2006, Santa Cruz. **Anais...** Santa Cruz: UESC, 2006. p. 477-478.

STORCK BIODIESEL. **O que é o biodiesel?** Curitiba. Disponível em: <<http://www.storckbiodiesel.com.br>>. Acesso em: 05 mai.2008.

TRABUE, S.; SCOGGIN, K.; TJANDRAKUSUMA, S. et al. Ruminal fermentation of propylene glycol and glycerol. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.7043-7051, 2007.

VALLE, C.B.; EUCLIDES, V.P.B.; MACEDO, M.C.M. 2001. Características das plantas forrageiras do gênero *Brachiaria*. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEM, 17., 2001. **Anais...** FEALQ. Piracicaba. 2

VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Ithaca: Cornell University Press, 1982. 373p.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3583-3597, 1991.

WANG, C. et al. Effects of glycerol on rumen fermentation, urinary excretion of purine derivatives and feed digestibility in steers. **Livestock Science**, v.121, p. 15–20, 2009.

WEATHERBURN, M.W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 39. n.38, p. 971-974, Jul., 1967.

WILSON, J.R., MERTENS,D.R. Cell wall accessibility and cell structure limitations tomicrobiol digestion of forage. **Crop Science**, n. 35, p. 251-259, 1995.

XIMENES, A.C.A.; SOUZA, L.C.F.; ROBAINA, A.D. et al. Avaliação da incidência de geadas em componentes de produtividade do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.3, n.2, p.214-227, 2004.