UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado do Programa de Pós-graduação em Zootecnia

CINÉTICA DIGESTIVA E PARÂMETROS RUMINAIS EM NOVILHAS LEITEIRAS ALIMENTADAS COM DIFERENTES NÍVEIS DE INCLUSÃO DE GLICERINA BRUTA

STELA BARACHO MOURA

Belo Horizonte
UFMG - Escola de Veterinária
2013

Stela Baracho Moura

CINÉTICA DIGESTIVA E PARÂMETROS RUMINAIS EM NOVILHAS LEITEIRAS ALIMENTADAS COM DIFERENTES NÍVEIS DE INCLUSÃO DE GLICERINA BRUTA

Tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Nutrição Animal
Orientadora: Profa. Dra. Eloísa de Oliveira Simões Saliba

Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
2013

Agradecimentos

A minha família, pai e mãe e minhas irmãs pelo apoio e incentivo. Em especial à minha mãe, que ficou acordada até tarde comigo etiquetando potinhos, e meu pai, que foi me ajudar a alimentar os animais e transportar galões de glicerina. Ás minhas amigas, que além de me darem amor e suporte, também resolveram fórmulas matemáticas á meia noite. Ao Alex, pelo amor, paciência e companhia.

Obrigada a Profa. Eloísa Saliba, pela grande oportunidade, companheirismo e orientação. Ao Prof. Geraldo Barbosa, pela dedicação e ajuda fundamentais para a realização do experimento, e pequenos gestos, como pagar o conserto da roda do carrinho de mão, que furou durante o experimento.

À CEDAF -UFV por ter cedido os animais e o espaço. Obrigada á Cecília, Filipe e Larisse, uma equipe cuja experiência, atitude, dedicação e trabalho duro foram imprescindíveis para a elaboração do projeto e realização do experimento. Obrigada aos alunos de iniciação científica Matheus e Clóvis, pelo auxílio no laboratório, e a colega Mariana pela ajuda no esvaziamento ruminal.

Agradeço o CNPq pela bolsa concedida e á empresa Biosep por ter cedido a glicerina bruta para o experimento.

Aos alunos e funcionários da CEDAF, por seu auxílio nas várias etapas do experimento, em especial Gabriel. Obrigada ao Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, e á equipe do laboratório de nutrição da EV-UFMG, em especial Toninho, Kelly, Marcos, Margô, pela ajuda nas análises laboratoriais, e Regeane, que além da ajuda se tornou uma grande amiga durante o mestrado.

Ao Nélio, Cristóvão, Guilherme e Danilo pela ajuda na elaboração do projeto e análises estatísticas. Obrigada a Juliana, pelas dicas.

Agradeço também a todos aqueles que não mencionei, mas que também foram parte integrante deste trabalho, de maneira direta ou indireta.

Sumário

RESUMO 8
ABSTRACT 9
INTRODUÇÃO GERAL 10
1. REVISÃO DE LITERATURA 11
1.1. O biodiesel 11
1.1.1.1. Conceito de Biodiesel 11
1.1.2. A obtenção da glicerina bruta a partir do biodiesel 11
1.1.3. A importância do biodiesel no Brasil e no mundo 13
1.1.4. Legislação e comercialização do biodiesel e glicerina bruta 14
1.1.5. Perspectivas do potencial futuro do biodiesel e glicerina bruta 15
1.2. A Glicerina Bruta e o Glicerol 16
1.2.1.Composição e valor nutritivo da glicerina bruta e glicerol 16
1.2.2.Glicerina bruta e glicerol na alimentação animal 18
1.2.3.Metabolismo da glicerina gruta em ruminantes 19
1.2.4.Valor nutritivo do glicerol 20
1.3.Indicadores em nutrição animal 23
1.3.1. Conceito de indicador e tipos de indicadores 23
1.3.2.Fibra mordentada com cromo ou Cromo mordante 24
1.3.3.Co-EDTA 25
1.3.4.LIPE® LÍQUIDO 25
1.3.5.Método de referência: Esvaziamento ruminal 27
1.4. O metabolismo do animal ruminante 27
1.4.1. Ambiente Ruminal 27
1.4.2. Cinética Ruminal e Taxa de Passagem 31
1.4.3.Volume e enchimento ruminal 35
2. Experimento com níveis crescentes de inclusão de glicerina bruta na dieta de novilhas mestiças 36
2.1.Introdução 36
2.2. MATERIAL E MÉTODOS 37
2.2.1. Dietas 37
2.2.3. Local, clima e período experimental 37
2.2.4. Animais, instalações e fornecimento da dieta 38

2.2.5. Procedimentos experimentais e coleta de dados.....38
2.2.5.1.Parâmetros ruminais.....38
2.2.5.2. Cinética ruminal.....39
2.2.5.3. Preparo de Indicadores utilizados.....43
2.5. Análises Laboratoriais.....43
2.6. Análises Estatísticas.....44

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....46
3.1. Consumo das dietas.....46
3.2. Ambiente Ruminal.....48
3.2.1 pH ruminal.....48
3.2.2. Produção de Amônia ($N\text{-}NH_3$).....51
3.2.3. Concentração dos ácidos graxos voláteis no rúmen.....52
3.3. Taxa de Passagem de líquidos.....60
3.4. Taxa de passagem de sólidos.....61
3.5. LIPE® LÍQUIDO.....63
3.6 Estimativas do volume ruminal.....69
3.7 Considerações finais.....72

4. CONCLUSÕES.....73

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....74

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição da Glicerina Bruta 18

Tabela 2. Composição nutricional dos ingredientes da dieta oferecida às novilhas mestiças 37

Tabela 3. Delineamento experimental (Quadrado Latino) 44

Tabela 4. Análise de variância 45

Tabela 5. Análise de variância 45

Tabela 6: Efeito de níveis crescentes de inclusão de glicerina bruta na ingestão de matéria seca 47

Tabela 7 - Efeito das dietas contendo níveis crescentes de glicerina bruta sobre o pH ruminal em função dos horários após a alimentação 49

Tabela 8: Efeito das dietas contento níveis crescentes de glicerina bruta sobre a concentração de nitrogênio amoniacal (mg/ 100ml) em função dos horários após a alimentação 51

Tabela 9 – Efeito dos níveis crescentes de glicerina bruta em substituição ao milho sobre a quantidade total de AGVs (mol/100mL) no rúmen de novilhas mestiças em função dos horários após a alimentação 53

Tabela 10: Efeito dos níveis crescentes de glicerina bruta sobre a concentração (mMol/100 mL) de acetato no rúmen de novilhas em função dos horários após a alimentação 55

Tabela 11 – Efeito dos níveis crescentes de glicerina bruta em substituição ao milho sobre a porcentagem molar de acetato (%) no rúmen de novilhas mestiças em função dos horários após a alimentação 56

Tabela 12: Efeito dos níveis crescentes de glicerina bruta sobre a concentração (mMol/100 mL) de propionato no rúmen de novilhas mestiças em função do tempo após alimentação da manhã 57

Tabela 13 – Efeito dos níveis crescentes de glicerina bruta em substituição ao milho sobre a porcentagem molar de propionato (%) no rúmen de novilhas mestiças em função do tempo após alimentação da manhã 58

Tabela 14: Efeito dos níveis crescentes de glicerina bruta sobre a concentração (mMol/100 mL) de butirato no rúmen de novilhas mestiças em função do tempo após alimentação da manhã 59

Tabela 15: Efeito dos níveis crescentes de glicerina bruta em substituição ao milho sobre a porcentagem molar de butirato (%) no rúmen de novilhas mestiças em função do tempo após alimentação da manhã 59

Tabela 16: Parâmetros da cinética de fluxo de líquido no trato gastrointestinal de novilhas mestiças, consumindo dietas contendo níveis crescentes de glicerina bruta em substituição ao milho.....61

Tabela 17: Equações de regressão (ER) para a estimativa da concentração do indicador Co-EDTA no líquido ruminal em função dos níveis crescentes de glicerina bruta na dieta, com os respectivos coeficientes de determinação (R^2).....61

Tabela 18: Parâmetros da cinética de fluxo de partículas no trato gastrointestinal de novilhas, consumindo dietas contendo níveis crescentes de inclusão de glicerina bruta , segundo estimativas obtidas pelo modelo de Grovum e Williams (1973) com os respectivos coeficientes de variação (CV).....62

Tabela 19: Equações de regressão (ER) para a estimativa da concentração do indicador (Cr-mordente) nas fezes em função dos níveis crescentes de glicerina bruta na dieta, com os respectivos coeficientes de determinação (R^2).....63

Tabela 20: - Parâmetros da cinética do conteúdo da digesta no trato gastrointestinal de novilhas, consumindo dietas contendo níveis crescentes de inclusão de glicerina bruta , segundo estimativas fornecidas pelo indicador em fase experimental LIPE® LÍQUIDO, aplicado ao modelo de Colucci (1990).....65

Tabela 21: Equações de regressão (ER) para a estimativa da concentração do indicador (LIPE® LÍQUIDO) no líquido ruminal em função dos níveis crescentes de glicerina bruta na dieta, com os respectivos coeficientes de determinação (R^2).....65

Tabela 22: Parâmetros da cinética do conteúdo da digesta no trato gastrointestinal de novilhas, consumindo dietas contendo níveis crescentes de inclusão de glicerina bruta , segundo estimativas fornecidas pelo indicador em fase experimental Lipe, aplicado ao modelo de Faichney (1975).....66

Tabela 23: Tempo médio de retenção no tratogastrointestinal em novilhas leiteiras alimentadas com diferentes níveis de inclusão de glicerina bruta, estimadas pelos indicadores LIPE® LÍQUIDO e Co-EDTA.....66

Tabela 24: Taxas de passagem em novilhas leiteiras alimentadas com diferentes níveis de inclusão de glicerina bruta, estimadas pelos indicadores LIPE® LÍQUIDO e Co-EDTA.....67

Tabela 25: Volume ruminal da digesta total e estimativas pelos indicadores LIPE® LÍQUIDO e Co-EDTA em novilhas leiteiras recebendo dietas com diferentes níveis de inclusão de glicerina bruta.....71

Tabela 26: Volume ruminal da fração líquida e estimativas pelos indicadores LIPE® LÍQUIDO e Co-EDTA em novilhas leiteiras recebendo dietas com diferentes níveis de inclusão de glicerina bruta.....71

Tabela 27: Volume ruminal da fração sólida e estimativas pelos indicadores LIPE® LÍQUIDO e Co-EDTA em novilhas leiteiras recebendo dietas com diferentes níveis de inclusão de glicerina bruta.....72

Figura 1: Reação de transesterificação do triacilglicerídeo e metanol para obtenção do biodiesel.....12

Figura 2: Glicerol ou propano-1,2,3-triol (IUPAC, 1993) em projeção de Fischer 17

Figura 3: Gráfico de dispersão com linha de tendência e equação de regressão dos valores obtidos com o indicador LIPE® LÍQUIDO ao longo dos tempos de coleta do animal 860, durante o período 1, sob dieta controle.....67

Figura 4: Gráfico de dispersão com linha de tendência e equação de regressão dos valores obtidos com o indicador Co-EDTA ao longo dos tempos de coleta do animal 860, durante o período 1, sob dieta controle.....68

Figura 5: Visualização dos dados de concentração do indicador ao longo dos tempos de coleta dos indicadores LIPE® LÍQUIDO e Cromo mordente, no animal 860 submetido à dieta controle durante o primeiro período do experimento.....69

Figura 6: Concentração do cromo ao longo do tempo (Indicador Cromo mordente) até a última coleta (144 horas) 70

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da inclusão de glicerina bruta, subproduto do biodiesel, em substituição ao milho, no ambiente e cinética ruminais de novilhas mestiças em clima tropical. A dietas eram compostas de 74% silagem de milho, milho grão e farelo de soja, com inclusão de 0 (controle); 2,5; 5,0; 7,5 e 10% de glicerina bruta na matéria seca, fornecida em substituição ao milho. Cinco novilhas mestiças Holandês-Zebu com peso médio 602,4±70,89 kg em confinamento foram utilizadas no experimento, realizado na cidade de Florestal - MG. Tratamentos eram fornecidos *ad libitum*, duas vezes ao dia. Foram avaliadas a composição química, as concentrações de ácidos graxos, nitrogênio amoniacal e valores de pH, e a cinética ruminal nos animais submetidos às dietas. A cinética ruminal foi avaliada utilizando-se simultaneamente os indicadores Cr-mordente, Co-EDTA e o indicador em fase experimental LIPE® LÍQUIDO. O delineamento experimental utilizado foi o Quadrado Latino 5x5 com parcelas subdivididas. A inclusão de glicerina bruta até 10% da matéria seca da dieta não causou efeitos deletérios no ambiente ruminal nem alterações no consumo de matéria seca. Houve um aumento na proporção do butirato nas dietas a partir de 7,5% de inclusão de glicerina bruta. Não foi observada influência da glicerina bruta na cinética ruminal. O LIPE® LÍQUIDO demonstrou potencial como indicador da fase sólida da digesta, mas serão necessárias mais pesquisas.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effects of inclusion of crude glycerin, a byproduct of biodiesel, in substitution of corn in the ruminal kinetics and environment of crossbred heifers in a tropical climate. Five crossbred Holstein-Zebu average weight 602.4 ± 70.89 kg in confinement were used in the experiment conducted in the city of Forest - MG. The diets were composed of 74% corn silage, corn grain and soybean meal, with inclusion of 0 (control), 2.5, 5.0, 7.5 and 10% crude glycerin on dry matter, replacing dietary corn. Treatments were provided *ad libitum* twice daily.. The chemical composition, concentrations of fatty acids, ammonia nitrogen and pH values and kinetics were evaluated in the animals subjected to diets. The kinetics was evaluated using both indicators Cr-cheek, Co-EDTA and forefinger in an experimental phase Lipe ® liquid. The experimental design was a 5x5 Latin square with split plots. The inclusion of crude glycerin up to 10% of the diet dry matter caused no deleterious effects on rumen environment or changes in dry matter intake. There was an increase in the proportion of butyrate in the diet from 7.5% inclusion of crude glycerin. There was no effect of crude glycerin in kinetics. The liquid form of Lipe® showed potential as an indicator of kinetics of solid phase of digesta, but more research is needed.

Introdução Geral

A alimentação dos animais é considerada a parte mais onerosa do processo de criação de bovinos leiteiros. O meio acadêmico, em conjunto com produtores rurais, sempre procurou encontrar formas de minimizar este custo, de forma a otimizar a produção animal. Uma das formas de reduzir custos com alimentação é a utilização de subprodutos ou resíduos industriais na dieta dos animais. Esta estratégia envolve a criteriosa avaliação do subproduto em questão quanto aos seus valores nutricionais, possíveis toxinas e níveis de toxicidade, segurança e conveniência do fornecimento para o animal e para o tratador, viabilidade financeira da substituição dos alimentos pelos subprodutos e o estudo dos efeitos da utilização do subproduto no organismo dos animais.

O presente trabalho tem o objetivo de explorar o uso da glicerina bruta como alimento alternativo para bovinos, da mesma forma que este têm sido utilizado na América do Norte e na Europa, como um substituto do milho na alimentação dos animais. A glicerina bruta foi o alimento selecionado devido às políticas recentes de alteração da natureza da matriz energética no Brasil, cuja exigência de inclusão cada vez maior do biodiesel no combustível gerou um excedente da substância que a torna particularmente rentável no país.

As dietas com diferentes percentagens de inclusão de glicerina bruta, em substituição ao milho foram avaliadas através de coletas de líquido ruminal e subsequentes avaliações laboratoriais. Também foi feita uma comparação entre as estimativas de parâmetros ruminais de taxa de passagem e volume ruminal pelo método de referência esvaziamento ruminal, diferentes indicadores e modelos matemáticos com destaque para avaliação do indicador LIPE® LÍQUIDO, em fase experimental. O ambiente ruminal foi avaliado para as diferentes dietas, permitindo verificar a viabilidade da utilização da glicerina como substituto do milho para a dieta de novilhas leiteiras em clima tropical, como foi proposto na literatura.

1. Revisão de Literatura

1.1 O biodiesel

1.1.1.1. Conceito de Biodiesel

O biodiesel é definido como um mono-alquil éster de ácidos graxos, obtido através da transesterificação de óleos vegetais com alcoóis metanol ou etanol, através da catálise básica com NaOH ou KOH; ou ainda pela esterificação desses materiais na presença de catalisadores ácidos, com consequente transformação dos triglicerídeos em moléculas menores de ésteres de ácidos graxos, tendo como co-produto a glicerina bruta (Thompson & He, 2006).

O biodiesel é denominado B100 (ANP, 2011). O produto é uma fonte importante de energia no longo prazo por causa da sua versatilidade e sustentabilidade de sua manutenção como fonte energética renovável. O biodiesel pode ser usado em motores de ignição a compressão (diesel) sem necessidade de modificação, e também pode ser adicionado ao petróleo em misturas. Como se trata de uma energia limpa, não poluente, o seu uso em motor diesel convencional resulta, quando comparado com a queima do diesel mineral, em uma redução substancial de monóxido de carbono e de hidrocarbonetos não queimados. (Fávaro, 2010)

1.1.2. A obtenção da glicerina bruta a partir do biodiesel

O biodiesel é fabricado através de um processo químico onde a glicerina é separada da gordura ou do óleo vegetal. A glicerina tem origem nesse processo, em que ocorre a transesterificação de um triacilglicerídio e um álcool para formar o biodiesel, como se pode ver na Figura 1.

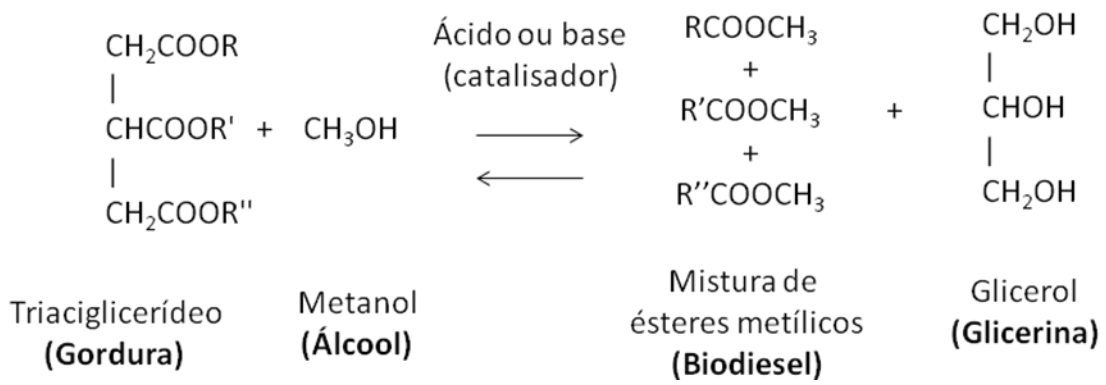

Figura 1: Reação de transesterificação do triacilglicerídeo e metanol para obtenção do biodiesel, adaptado de Volhard, 2004, p. 755

Na reação de transesterificação são usados álcoois de baixa massa molecular, como metanol, etanol, propanol, butanol e/ou álcool amílico (FERRARI, 2005, p. 19), mas metanol e etanol são os mais frequentemente empregados. Metanol é o mais utilizado devido ao seu baixo custo na maioria dos países e às suas vantagens físicas e químicas (polaridade, álcool de cadeia mais curta, reação rápida com triacilglicerídeo e dissolução fácil com o catalisador básico). Além disso, permite a separação simultânea do glicerol. A mesma reação usando etanol é mais complicada, pois requer um álcool anidro, bem como um óleo com baixo teor de água para levar a separação do glicerol (GERIS, 2007, p. 1369). Contudo, o etanol está se tornando mais popular, pois ele é renovável e muito menos tóxico que o metanol (VIEIRA, 2008, p. 14).

Como a reação de transesterificação é reversível, é necessário o uso em excesso de álcool para deslocar o equilíbrio no sentido do produto desejado. A estequiometria para a reação é de 3:1 (álcool:lipídio). Segundo Donkin, 2007, algumas empresas utilizam a estequiometria de 6:1, obtendo uma taxa de conversão de 98%. O glicerol resultante contém catalisador não utilizado e sabões, que são em seguida neutralizados com adição de ácido para obtenção da glicerina bruta. (Donkin,2007)

Com relação à quantidade de glicerina bruta produzida como produto no processo de obtenção do biodiesel, Carvalho et al. (2010) relatam que sua produção corresponde, a aproximadamente, 10% do volume total de biodiesel. Porém, Zijlstra et al. (2009) afirmaram que a cada 1L de biodiesel produzido obtêm-se 79 g de glicerina bruta.

Segundo DASARI et al. (2005) para cada 90 m^3 de biodiesel produzidos pela reação de transesterificação de óleos vegetais são gerados 10 m^3 de glicerina. É de se esperar essa variedade nas quantidades de glicerina bruta, pois são geradas em diferentes empresas, diferentes locais e com procedimentos com rendimentos diferentes. O grande volume de glicerina gerado através da reação de transesterificação prejudica o aspecto ecológico do biodiesel, sendo necessário estabelecer procedimentos para dar fim ao produto.

1.1.3. A importância do biodiesel no Brasil e no mundo

O biodiesel surgiu mundialmente como uma alternativa promissora aos combustíveis minerais. A crescente preocupação com o meio ambiente, aliada à busca por fontes alternativas de energia renováveis, têm colocado o biodiesel no centro das atenções e interesses (ABDALLA, 2008). Por ser considerado um combustível ecológico, biodegradável, atóxico, livre de enxofre e compostos aromáticos, o biodiesel pode promover substancial redução na emissão de monóxido de carbono e hidrocarbonetos para o meio ambiente (Fávaro, 2010)

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de biodiesel (13% da participação), com produção anual de 2,4 bilhões de litros (no ano de 2010) e capacidade instalada de 5,8 bilhões de litros (ANP, 2011). A União Européia e os EUA lideraram a produção mundial no ano de 2010 (FAPRI, 2010).

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

Segundo dados publicados no Boletim Mensal do Biodiesel da ANP, em maio de 2011, haviam 67 plantas produtoras de biodiesel autorizadas no Brasil , 18 solicitações de autorização de construção de novas plantas e 11 solicitações de ampliações das plantas já existentes. Os Estados do Rio Grande do Sul (25,3%), Mato Grosso (23,7%), Goiás (18,3%) e São Paulo (13,7%) lideraram, em sequência, a produção nacional no ano de 2010, respondendo por 81,1% do biodiesel produzido.

Os Estados Unidos são o maior produtor de biodiesel do mundo, com uma produção estimada de cerca de 13.600 milhões de litros em 2010 (Thurmond, 2008).

Conforme dados da *European Biobiesel Board*, a produção de biodiesel na Europa foi de 9.046 milhões de toneladas em 2009. Segundo a ANP (2010) o Brasil teve uma produção anual, em 2009, de 1,6 bilhões de litros e tem capacidade instalada, em janeiro de 2010, para produzir 4,7 bilhões de litros. Por outro lado, a Colômbia surge como a segunda potencia latino americana na produção de biodiesel, com 337.713 toneladas no ano 2010 e com a meta de chegar a 1 milhão de toneladas nos próximos 5 anos (FNBC, 2011).

Carvalho (2011) relata a contribuição do uso do Biodiesel para a conservação do meio ambiente, por diminuir o efeito estufa por meio da menor emissão de gases. Além disso, pela ausência de enxofre em sua composição, sua queima não provoca emissão de óxidos de enxofre (SO2 e SO3), considerados poluentes danosos à qualidade do ar e responsáveis pela chuva ácida.

1.1.4. Legislação e comercialização do biodiesel e glicerina bruta

O biodiesel passou a fazer parte oficialmente da matriz energética brasileira, a partir da lei de número 11.097, de 13 de janeiro de 2005, que dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira. A lei estabelece a introdução do Biodiesel com o propósito de "incrementar, nas vases econômica, social e ambiental, a participação de biocombustíveis na Matriz Energética Nacional." A adição de biodiesel ao óleo diesel aprovada para ser utilizada facultativamente até 2008 foi de 2%. A partir de janeiro de 2008 essa adição se tornou obrigatória, sendo facultativa a mistura de 5% até 2013, quando 5% de adição se tornará obrigatoriedade. O governo federal já anunciou o B10 (adição de 10%) para ser efetivada de maneira semelhante em 2014.

A especificação do biodiesel no Brasil fica a cargo da Agência Nacional do Petróleo (ANP). Até o momento foram editadas duas portarias sobre o biodiesel: a portaria nº 240, que trata do uso de combustíveis não especificados, ou seja, aqueles cujas características não estão definidas por dispositivos legais expedidos pela ANP; e a portaria nº 255, que trata da especificação técnica do biodiesel puro a ser adicionado ao óleo diesel automotivo, para testes em frotas cativas, ou para uso em processo industrial específico.

Estima-se que com a adição de 4% de biodiesel a diesel o excedente de glicerina produzida a partir do biodiesel no mercado tenha sido de aproximadamente 264 mil toneladas/ano, e com a adição de 5%, chegará a 325 mil toneladas/ano (Mota et al.,

2009). A glicerina resultante do processo de obtenção do biodiesel não possui legislação especifica para seu descarte, sendo armazenada, e consequentemente se acumulando nas usinas de produção de biodiesel, formando grandes estoques desse subproduto.

A dificuldade de acomodação do excedente de glicerina se agrava porque a glicerina resultante da produção de biodiesel tem características diferentes da que é utilizada na indústria de higiene e cosmética. A forma bruta, obtida no processo de produção de biodiesel vem misturada a água, ácidos graxos e sabões. Só depois de purificada é que a substância pode ser utilizada na área de química fina e no setor alimentício. (Diniz, 2005).

A glicerina é uma matéria-prima de alto valor agregado que pode ser empregada em uma ampla variedade de produtos como cosméticos, químicos, produtos alimentícios e farmacêuticos. Para a purificação da glicerina bruta, são necessários processos complexos e onerosos para que essa matéria-prima alcance as exigências em grau de pureza necessária para esses fins. O descarte é difícil pois não se pode simplesmente depositar a glicerina residual em aterros, pois isso gera um problema ambiental, devido à alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO) da substância.

1.1.5. Perspectivas do potencial futuro do biodiesel e glicerina bruta

Segundo o Ministério de Minas e Energia, com o uso do biodiesel como combustível, o Brasil vai aumentar a utilização de fontes de energias renováveis na sua matriz energética em aproximadamente 43,8%. Para referência comparativa, a média atual de utilização mundial de recursos energéticos renováveis é de 13%.

Com o aumento da demanda de produção de biodiesel no Brasil, aumenta-se a oferta de subprodutos derivados da produção deste combustível. A obrigatoriedade da inclusão do biodiesel ao diesel de petróleo motivará, concomitantemente, a geração de coprodutos que necessitam de destinos ecologicamente corretos e economicamente viáveis (Lage, 2010)

Apesar de a glicerina purificada ser um composto industrial valioso, a purificação pode ser antieconômica e insuficiente para consumir o crescimento projetado na produção mundial de biodiesel. (Lage et al., 2010). Alguns estudos indicam que o mercado, a médio prazo, só conseguirá absorver 50% de toda essa matéria-prima produzida (Krause, 2004; McCoy, 2005).

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

O excesso de produção de glicerina do biodiesel extrapolará a capacidade de utilização das indústrias químicas e farmacêuticas nos próximos anos (Donkin, 2008). Além disso, a tecnologia exigida para extração das impurezas, para a utilização por estas indústrias tem custo elevado e é dominada por apenas algumas empresas brasileiras (Diniz, 2005).

A glicerina bruta no momento apresenta disponibilidade em todo o país a preços acessíveis quando comparada ao valor do milho. Quando foi realizado o experimento, o preço do milho se encontrava R$33,36 por saca de 60kg, segundo o CEPEA. A glicerina bruta utilizada no experimento foi fornecida de forma gratuita pela empresa Biosep, na cidade de Três Pontas, Minas Gerais.

1.2. A Glicerina Bruta e o Glicerol

1.2.1. Composição e valor nutritivo da glicerina bruta e glicerol

A glicerina bruta é definida como a glicerina separada do biodiesel, sem sofrer qualquer tipo de purificação, apresenta-se na forma de líquido pardo e escuro. (Rivaldi et al., 2007). É um composto orgânico, líquido à temperatura ambiente (25ºC), higroscópico, inodoro, viscoso e de sabor adocicado. Seu ponto de fusão é de 17,8°C e ebulição com decomposição em 290°C (ANP, 2010).

Deve-se esclarecer a diferença entre o glicerol e glicerina bruta. O termo glicerol aplica-se, geralmente, ao composto puro, ou seja, ao 1,2,3-propanotriol, enquanto o termo glicerina bruta aplica-se ao coproduto com impurezas e, portanto, com menos de 90% de glicerol. (Serrano, 2011) O glicerol ainda é o principal componente da glicerina bruta, e o mais significativo nutricionalmente, quando se aplica a glicerina bruta na alimentação de animais.

A glicerina pode ser vendida na sua forma bruta (glicerina natural), sem qualquer purificação, ou purificada. São comercializados dois tipos de glicerina natural. O primeiro apresenta 80% de glicerol, enquanto o segundo de 88 a 91% de glicerol. Quanto à glicerina purificada, é classificada em glicerina técnica (99.5% de glicerol) ou glicerina farmacêutica (86% ou 99.5% de glicerol). (Felizardo, 2003)

A glicerina bruta pode ser classificada em vários graus, tanto pela quantidade de glicerol como pelas impurezas presentes, como água, lipídios, cinzas e metanol. Embora o glicerol seja incolor, as formas menos puras podem ter sua cor variando do âmbar para um castanho muito escuro (Carvalho, 2011).

As características físicas, químicas e nutricionais do glicerol bruto dependem do tipo de ácido graxo (gordura animal ou óleo vegetal) e do tipo de catálise empregada na produção de biodiesel (Rivaldi et al., 2007). A composição de glicerina bruta analisada pela Universidade de Iowa pode ser encontrada na Tabela 1. Vale ressaltar, porém, que os componentes da glicerina bruta variam de acordo com a metodologia de fabricação do biodiesel, substâncias usadas na transesterificação e a fonte da glicerina bruta.

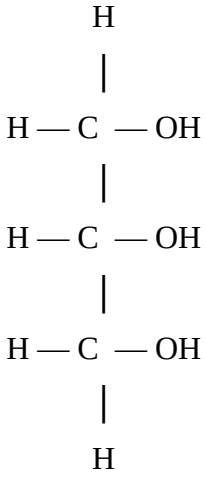

Figura 2: Glicerol ou propano-1,2,3-triol em projeção de Fischer.

Tabela 1: Composição da Glicerina Bruta

Caracteristicas da Glicerina Bruta	
Glicerol Total (%)	86,95
Metanol (%)	0,028
pH	5,33
Umidade (%)	9,22
Proteína Bruta (%)	0,41
Gordura (%)	0,12
Cinzas (%)	3,19
Sódio (%)	1,26
Cloro (%)	1,86
Potássio(%)	<0,005

Fonte: Iowa State Uni. Anim. Ind Report 2007

Thompson & He (2006), ao analisarem a glicerina bruta produzida a partir de transesterificação de sete fontes de óleos vegetais, relataram que a presença de carboidratos, gordura, proteína, cinzas e outros elementos traços é variável, e depende

do tipo de óleo usado no processo. Os mesmos autores determinaram que o teor de gordura varia de 1 a 13% e de carboidratos 75 a 83%. Porém, no mercado encontra-se glicerina bruta com percentual de glicerol variando de 35 a 90%.

A chamada glicerina loura é normalmente utilizada para designar a glicerina oriunda do processo de produção de biodiesel onde a fase glicerinosa 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 (Mota et al., 2009) e apresenta coloração mais clara que a glicerina bruta. Nas plantas de produção de biodiesel no Brasil, o álcool mais utilizado é o metanol, assim como o catalisador mais utilizado é o hidróxido de sódio.

1.2.2. Glicerina bruta e glicerol na alimentação animal

O potencial do glicerol purificado, principal componente da glicerina bruta, já vem sendo estudado na América do Norte e na Europa e muitas vezes validado como alimento para bovinos de corte e leite, devido a seu valor energético e capacidade de digestão no organismo do ruminante. O que despertou o interesse da pesquisa em nutrição animal utilizando glicerina bruta foi a possibilidade de fornecer este excedente comercial sem necessidade de purificação, viabilizando a substituição dos outros alimentos dos animais de forma econômica.

Segundo a *Food and Drug Administration* (FDA, 21 C.F.R. 582.1320, 2006) a glicerina é de uso seguro e reconhecido na alimentação animal, porém, o teor de metanol presente na glicerina não deve ultrapassar 150 mg/kg. Porém, segundo Lage et al. (2010), o risco à saúde associado ao consumo de metanol, decorrente da inclusão de glicerina bruta na dieta não é esperado em animais ruminantes, pois o metanol é naturalmente produzido no rúmen como resultado da fermentação da pectina.

Nos últimos anos, os nutricionistas de ruminantes têm demonstrado interesse em pesquisar os produtos derivados da indústria do biodiesel, especialmente da glicerina bruta. De maneira geral, pode-se dizer que os resultados tem sido positivos. Todavia, há informações pouco consistentes e contraditórias, isto em parte pode ser explicado pela falta de padronização do produto comercial. No entanto, grandes esforços vêm sendo feitos nas indústrias de biodiesel com o intuito de padronizar a produção de glicerina bruta, procurando formas mais puras e com benefícios para os produtores num futuro próximo. (Serrano, 2011)

De acordo com Donkin (2008) a glicerina vinda do biodiesel poderá ser considerada o "novo milho" na alimentação de ruminantes, e nos seus estudos com glicerol foi observado que o glicerol pode ser incluído até 15% na matéria seca da dieta, sem interferir na ingestão de alimentos nem na produção animal.

Pesquisas têm sido desenvolvidas nos últimos anos, porém as informações sobre o uso da glicerina bruta na alimentação animal ainda são controversas com relação aos aspectos fisiológicos e metabólicos. Todavia, de maneira geral, pesquisas indicam que a utilização da glicerina bruta é viável na produção de ruminantes, principalmente na substituição do milho nas rações. (Serrano, 2011)

1.2.3. Metabolismo da glicerina bruta em ruminantes

A inclusão da glicerina bruta em dietas para ruminantes, desde os primeiros estudos (Johns et al., 1953; Garton et al., 1961) até os mais recentes (Avila et al., 2011), mostra que o glicerol é quase totalmente fermentado a propionato. Isso é altamente interessante na nutrição de bovinos de corte e foi comprovado por Bergner et al. (1995) que usaram glicerol marcado com C14 e observaram que a maior parte do glicerol foi convertido em ácido propiônico. Outros estudos observaram aumento na concentração dos ácidos acético e propiônico (Wright, 1969), e dos ácidos propiônico e butírico (Czerkawski & 5 Breckenridge, 1972; Krehbiel, 2008). No entanto, como foi destacado por Rémond et al. 1993, estes experimentos foram feitos respectivamente *in vivo* e *in vitro*, com um ou dois animais de condições bem diferentes, e nos estudos *in vitro*, o líquido ruminal utilizado foi de animais que não estavam adaptados à dieta com glicerol. A aparente discordância entre algumas observações também pode ser atribuída à falta de padronização dos produtos glicerol e glicerina bruta usados na alimentação dos animais.

Estudos *in vitro* sugerem que bactérias da espécie *Selenomonas ruminantium* são as grandes responsáveis pela fermentação do glicerol no rúmen, com consequente produção de propionato, succinato, lactato e acetato (Hobson & Mann, 1961). Isto também está evidenciado de acordo com Silva & Leão (1979), que dizem que o glicerol pode ser metabolizado no rúmen por microorganismos, fornecendo como principal produto da fermentação o ácido propiônico.

Dentro do rúmen, o glicerol pode seguir duas rotas metabólicas: absorção direta pelo epitélio da parede ruminal (Rémond et al., 1993) ou transformação em ácidos

graxos voláteis (AGV) pelas bactérias ruminais (Czerkawski e Breckenridge, 1972), principalmente em ácido propiônico.

No fígado, o destino do glicerol absorvido é a oxidação pela via glicolítica, com necessidade da enzima glicerol quinase (Lin, 1977). Entretanto, quando há alta demanda de glicose, como no caso de vacas em lactação, o destino do glicerol passa a ser a gliconeogênese, juntamente com o propionato (Donkin, 2008).

O glicerol é o precursor do gliceraldeído-3-fosfato, um intermediário na lipogênese no tecido adiposo e da gliconeogênese no figado, fornecendo também energia pela via glicolítica e no ciclo do ácido cítrico (Brisson et al., 2001).

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

Segundo Trabue et al. (2007), o fornecimento de glicerina bruta também tende a reduzir a quantidade disponível de carbono e de hidrogênio ruminal para produção de gás metano, pela redução da produção de acetato, com consequente melhoria na eficiência de utilização da energia pelo animal. Outro fator interessante citado por Serrano, 2011, é que o glicerol presente na glicerina bruta pode aumentar a capacidade de retenção de água das rações em ambientes de baixa umidade e melhorar a palatabilidade do concentrado por causa de seu aroma suave e sabor adocicado (Elam et al., 2008).

Segundo Donkin (2008), o glicerol é fermentado no rúmen a ácidos graxos de cadeia curta, de modo que 50 a 70% do glicerol desaparecem do rúmen em 4 horas, levando a um aumento na produção de propionato.

As taxas máximas de desaparecimento de glicerol no rúmen, determinada utilizando fermentadoras *in vitro* é de 52-0,62 gramas por hora (Rémond et al., 1993).. Estimativas do desaparecimento de uma dose de 200g de glicerol indicam que mais de 85% de glicerol no rúmen desaparece dentro de 2 horas em bovinos aclimatados a alimentação de glicerol (Kijora et al., 1998). Outros dados, utilizando uma dose de 240g de glicerol indicam taxas de desaparecimento do rúmen variando entre 1,2 e 2,4g por hora (Rémond et al., 1993).

1.2.4. Valor nutritivo do glicerol

Um dos grandes interesses na utilização da glicerina bruta na alimentação animal é devido ao seu valor energético. Recentemente, um grupo de pesquisadores de Iowa e Mississippi, nos Estados Unidos, estudaram de forma detalhada o valor energético da glicerina bruta para aves e suínos, cujos resultados são apresentados a seguir.

Através do método de coleta total de excretas, Dozier et al. (2008) determinaram os valores de energia metabolizável aparente corrigida para o nitrogênio (EMAn) da glicerina bruta (86,95% de glicerol, 280ppm de metanol, 1,26% de sódio e energia bruta de 3.625 kcal/kg) para frangos de corte de diferentes idades. Utilizando dietas não corrigidas para o teor de sódio, em aves de 4 a 11, 17 a 25 e 37 a 45 dias de idade, foram observados, respectivamente, os valores de EMAn de 3.621, 3.331 e 3.349 kcal/kg. Os autores reportaram, pela avaliação conjunta de todas as fases de criação, o valor de EMAn de 3.434 kcal/kg, o que corresponde a 95% da energia bruta. Isto indica que a glicerina bruta é utilizada eficientemente por frangos de corte.

Pelo método do indicador indigestível (1% de celite como cinza insolúvel), Lammers et al. (2008a) determinaram os valores de energia metabolizável corrigida para o nitrogênio (EMAn) da glicerina bruta (86,95% de glicerol, 280 ppm de metanol, 1,26% de sódio) para galinhas poedeiras. Analisando os dados por regressão polinomial, foi encontrado o valor de EMAn de 3.805 kcal/kg na glicerina bruta para galinhas poedeiras, sendo este semelhante ao valor de energia bruta da glicerina utilizada no estudo (3.625 kcal/kg), novamente demonstrando o alto grau de aproveitamento energético por galinhas poedeiras. Os valores de energia metabolizável determinados para a glicerina bruta são muito próximos quando comparados aos valores de energia metabolizável aparente do milho para suínos (3.340 kcal/kg) e aves (3.381 kcal/kg) (Rostagno et al., 2005).

É importante ressaltar que ao formular dietas, o valor de energia metabolizável da glicerina bruta será proporcional ao seu nível de glicerol, ou seja, deve ser considerado o teor de glicerol e a energia bruta do glicerol como sendo de 4.320 kcal/kg, conforme sugerido por Lammers et al. (2008b).

No caso do valor energético de glicerol na alimentação de bovinos, devido ao glicerol não ter sido utilizado como um macroingrediente, as estimativas de energia líquida de lactação (NEL) ainda não estão disponíveis para os cenários de alimentação típicos.

Schröder e Südekum (1999) relataram estimativas de 0,9-1,03 Mcal/lb (energia líquida de lactação) com valores decrescentes de energia para as dietas com alta quantidade de amido, e, recentemente, DeFrain et al. (2004) em estimativas pré e pós experimentais de Energia líquida de lactação, obtiveram valores corrigidos para glicerol e amido de 1,9 e 2,13 Mcal/kg, respectivamente. Há uma incerteza no valor da energia de glicerol devido às quantidades alimentados anteriormente desconhecidos e interações com componentes da ração outros. Na maioria dos trabalhos na literatura é considerado que a glicerina bruta tem o valor energético semelhante ao do milho na dieta dos animais.

1.3. Indicadores em nutrição animal

1.3.1. Conceito de indicador e tipos de indicadores

Indicadores são substâncias indigestíveis, normalmente de fácil determinação, que podem ser administradas com o alimento ou diretamente em algum segmento do aparelho digestório, sendo posteriormente identificados e quantificados nas fezes ou ao final do segmento em estudo (Warner, 1981). Logo, indicador é o termo utilizado para denominar materiais usados na estimativa qualitativa ou quantitativa de fenômenos fisiológicos ou nutricionais relacionados à digestão. Um indicador, portanto, é um composto usado como monitor químico (hidrólise e síntese) e físico (fluxo) de aspectos de digestão e/ou metabólitos (Owens & Hanson, 1992).

Indicadores possuem grande aplicação nos estudos das taxas de passagem de líquidos e sólidos, consumo voluntário, produção fecal e digestibilidade de alimentos em animais em pastejo ou confinados (Curran et al., 1976; Olubajo & Oyunuga, 1970, Aroeira, 1997, Moore & Sollenberger, 1997; Saliba, 1998). De acordo com Grace & Body (1981); Mayes et al. (1986); Owens & Hanson (1992); Huhtanen et al. (1995) e Saliba (1998), um indicador ideal deve possuir algumas propriedades fundamentais, sendo as principais não ser tóxico, não ter função fisiológica, não ser metabolizado, ser completamente recuperável a partir do aparelho digestório e não ter influência sobre motilidade e secreções intestinais. Os indicadores podem ser classificados como internos, representados por substâncias indigestíveis presentes naturalmente em algum componente da dieta, ou externos, quando adicionados à dieta ou fornecidos via oral ou ruminal aos animais. Podem ser divididos em indicadores de fase líquida, ao se

movimentarem na mesma velocidade que a fase líquida, e indicadores de fase sólida, quando transitam com as partículas sólidas do conteúdo digestivo.

O uso de indicadores externos ou internos em avaliações de digestibilidade de nutrientes dos alimentos não é recente. Esta técnica foi inicialmente utilizada com a finalidade de facilitar a determinação da produção fecal. A forma de administração dos marcadores externos pode ser: A) contínua: quando é fornecido para o animal por um período suficiente para que garanta seu fluxo homogêneo pelo trato digestório; B) na forma de cápsulas de liberação lenta; ou C) em dose única com coletas sucessivas posteriormente à administração, normalmente aplicada nos estudos de trânsito da digesta (Berchielli et al. 2006). O uso de indicadores internos ou externos em avaliações de digestibilidade de nutrientes dos alimentos é usado a muitos anos , inicialmente com a intenção de facilitar a determinação da produção fecal, realizada anteriormente de forma manual em um procedimento bastante trabalhoso e exaustivo. Além destas desvantagens, a constante interferência no ambiente dos animais pode causar quedas significativas no consumo.

A dose única ou dose pulso consiste na aplicação de única dose e subsequente amostragem de digesta a tempos definidos, com vistas a caracterizar o pulso ou a curva de excreção do indicador, sendo largamente utilizada na estimação de parâmetros da cinética de trânsito do trato gastrointestinal de ruminantes (Pond et al., 1988; Moore et al., 1992; Susmel et al., 1996). A administração de dose única de um indicador permite estimar a produção fecal, o consumo de matéria seca, a taxa de passagem da digesta, o tempo médio de retenção e o enchimento do trato gastrintestinal (Pond et al., 1989; Quiroz et al., 1988).

Os indicadores selecionados para o experimento foram: a fibra mordantada com cromo (ou Cr-mordente) como indicador externo de fase sólida, o Co-EDTA como indicador externo de fase líquida e o LIPE® LÍQUIDO, indicador experimental externo, objetivando-se observar sua dinâmica de comportamento.

1.3.2. Fibra mordentada com cromo ou Cromo mordante

Os complexos de cromo denominados mordantes são marcadores da fase sólida, insolúveis, que se ligam covalentemente à fração fibrosa do alimento na forma iônica de dicromato ($Cr_2O_7^{-2}$). O óxido crômico (Cr_2O_3) pode ser empregado de forma ligada à parede celular, complexo denominado Cromo-mordante (Úden *et al.*, 1980). Esta

técnica de utilização, conhecida como dose pulso, é amplamente empregada em estudos de cinética de trânsito e consiste na aplicação de uma única dose e subsequente amostragem fecal em tempos definidos,.

Isso possibilita caracterizar a curva de excreção do indicador nas fezes (Burns et al., 1994) e, posteriormente, o ajuste por meio de modelos matemáticos não lineares. Ruiz et al. (2001), em estudo com avaliação do cromo mordente, relata que o indicador estimou, com 96% de confiabilidade, os resultados referentes à ingestão de matéria seca.

A técnica de Williams et al. (1962), para determinação de cromo nas fezes, envolve diversas etapas de extrações químicas, implicando gasto de tempo e reagentes e aumento no erro analítico, conforme relatado por Oliveira Jr. et al. (2004). Savastano (1993), descreve uma marcha analítica para digestão nitroperclórica de cromo, no entanto o fato de o cromo ser oriundo do óxido crômico ou do dicromato oferece certos problemas analíticos. Por colorimetria, a própria técnica admite a necessidade de manter a mesma concentração molar de ácido sulfúrico para não alterar a absorbância da amostra, aumentando o grau de dificuldade e reduzindo a repetibilidade dos resultados.

Segundo Savastano (1993), a técnica de absorção atômica, aparentemente mais confiável, pode dar resultados diferentes conforme o preparo da amostra e a chama utilizada (redutora ou oxidante).

1.3.3. Co-EDTA

Em comparação aos indicadores de fase sólida, os indicadores de fase líquida apresentam menos problemas quanto à sua determinação. Os quelatos de cromo (Cr-EDTA) e cobalto (Co-EDTA) são indicadores de fase líquida que têm sido utilizados em substituição ao Polietilenoglicol (PEG). Tanto o Cr- EDTA (Ellis *et al*., 1980) como o Co-EDTA (Udén *et al*., 1980) são totalmente solubilizados e têm sido utilizados para a estimativa de volume ruminal e a taxa de passagem. Ao contrário do PEG, as análises desses indicadores são mais simples e precisas (Merchen, 1988).

O Cobalto-EDTA é um indicador de fase líquida cuja forma de utilização, desde que foi proposta por Úden *et al.* (1980), não sofreu modificações significativas na sua aplicação pelos pesquisadores, exceto no experimento de Daniel *et al.* (2007), no qual a solução de Co-EDTA foi preparada adaptando-se a metodologia proposta por Binnerts et al. (1968) para Cr-EDTA.

1.3.4. LIPE® LÍQUIDO

Em 2002, pesquisadores da EV-UFMG começaram a trabalhar a molécula da lignina, no sentido de otimizar a sua determinação nas fezes. SALIBA et al. (2003) isolaram a lignina e a enriqueceram com grupamentos fenólicos não comumente encontrados na lignina da dieta animal, dando origem a um hidroxifenilpropano modificado e enriquecido denominado LIPE®, indicador externo de digestibilidade desenvolvido especificamente para pesquisas.

No tocante à praticidade, o LIPE® merece destaque, denominação dada ao hidroxifenilpropano modificado e desenvolvido na Universidade Federal de Minas Gerais. Trata-se de uma técnica alternativa, que exige menor tempo de adaptação dos animais, é de baixo custo e pode ser recuperado nas fezes quase que em sua totalidade. Para SILVA et al. (2006) o LIPE® mostrou ser o indicador de maior sensibilidade às mudanças no consumo e, consequentemente, na produção fecal em novilhas.

SALIBA et al. (2004) utilizando a Ressonância Nuclear Magnética e produtos de oxidação com o nitrobenzeno, demonstrou que o LIPE® apresenta propriedades físico-químicas bastante estáveis e grande consistência químico-estrutural, passando inalterado no trajeto pelo trato gastrointestinal dos animais, sendo totalmente recuperado nas fezes.

O LIPE® foi inicialmente utilizado em estudo de consumo e digestibilidade em coelhos, suínos, ovinos, e eqüinos com diferentes dietas (Saliba et al., 2003b, Saliba et al., 2003c).

As estimativas de produção fecal e digestibilidade revelaram a eficiência do LIPE® como indicador externo, não apresentando diferenças estatísticas com relação à coleta total. Além disso, apresentou as vantagens de um curto período de adaptação e ser de baixo custo.

A taxa de recuperação fecal do LIPE® foi de 97,9% e 99,23% para os coelhos, 95,9% nos ovinos, 102,6% e 94,6% nos suínos, e 96% nos eqüinos. Estes estudos mostram que o LIPE® é um indicador externo confiável para estudos de digestibilidade nestas espécies.

Com frangos de corte (Saliba et al., 2005), o LIPE® também mostrou ser um bom indicador de digestibilidade de nutrientes e da energia de vários alimentos comparado com o método padrão de coleta total.

Assis (2005) avaliando respostas fisiológicas de vacas de leite sob pastejo suplementadas ou não com volumoso, utilizou o LIPE® como indicador externo para estimativa da produção fecal total. Os consumos de matéria seca médios obtidos para as vacas primíparas (13,9 kg/MS/dia) e multíparas (15,9 kg/MS/dia) neste experimento foram aproximados aos recomendados pelo NRC (2001). Pode-se concluir com este experimento que o LIPE® foi capaz de estimar adequadamente a excreção fecal e o consumo de bovinos criados a pasto.

Métodos diretos e indiretos têm sido desenvolvidos para quantificar o conteúdo de material do rúmen-retículo, as taxas de passagem de suas fases sólida e líquida e a taxa de degradação. As medições diretas do conteúdo ruminal e da taxa de passagem podem ser realizadas fazendo-se a evacuação ruminal e a determinação do fluxo diário de material. Com o intuito de estudarmos uma substância derivada do LIPE® que poderia ser solúvel em líquidos, foi desenvolvido o LIPE® LÍQUIDO (Saliba e Norberto, 2009)

1.3.5. Método de referência: Esvaziamento ruminal

A remoção completa e mistura do conteúdo do rúmen -reticulo aparenta ser uma técnica válida em estudos de digestão. Towne et al (1986) não encontraram diferenças na atividade microbiana do rúmen entre animais evacuados e não-evacuados.

Os pesos totais do conteúdo do rúmen podem ser estimados manualmente esvaziando o rúmen de cada animal em momentos diferentes. Deve haver um mínimo de 24 horas entre esvaziamentos consecutivos (Towne et al, 1986; Robinson et al, 1987; Tamminga et al, 1989).

<u>Processo para estimar o volume do rúmen através da evacuação:</u>

- Retirar a tampa da cânula do rúmen e esvaziar todo o conteúdo do rúmen à mão num barril (tamanho dependendo pesos totais de conteúdo de rúmen). Se possível, mantenha o barril em um recipiente com água morna.
- Pesar todo o material, misturar bem e retirar uma amostra.
- Retornar o material restante para o rúmen, logo que possível.
- Todo o processo não deve exceder 10 minutos por animal e as rúmen deve estar "vazio" por somente 2-3 minutos.

1.4. O metabolismo do animal ruminante

1.4.1. Ambiente Ruminal

O sistema de digestão dos alimentos pelos ruminantes é um complexo processo que envolve interações entre o organismo do animal, a dieta e a população microbiana. A fisiologia do rúmen exige teores de material fibroso, que regula o pH e influencia a dinâmica de crescimento da população bacteriana dentro do rúmen. Os parâmetros tidos como indicadores da qualidade do ambiente ruminal e que foram avaliados no experimento foram os valores observados de pH, Nitrogênio amoniacal Ácidos Graxos Voláteis no líquido ruminal.

O pH ruminal está diretamente relacionado com os produtos finais da fermentação (Church, 1979). A acidificação do ambiente ruminal, demonstrada pelo abaixamento do pH ocorre, principalmente, após a ingestão de alimentos e consequente rápida taxa de fermentação. A redução do pH ruminal ocorre principalmente devido às elevadas taxas de degradação, atingindo seu menor valor entre 30 minutos e 4 horas após a alimentação. O pH ruminal é um importante parâmetro a ser avaliado, pois reflete diretamente as características da dieta. Qualquer alteração reflete na taxa de crescimento das bactérias e dos protozoários, podendo ocorrer consequentes variações nos microrganismos predominantes no rúmen.

A faixa de pH para que haja atividade microbiana normal no rúmen é de 6,7 ± 0,5. A estabilidade do pH é atribuída, em parte, à saliva, que possui poder tamponante, e à capacidade da mucosa ruminal em absorver os ácidos produzidos na fermentação ruminal (Van Soest, 1994). Segundo Church, 1988 o pH deve ser mantido entre 5,5 e 7,0, de modo que as variações ocorridas são dependentes do tipo e da freqüência de alimentação.

O funcionamento do rúmen com adequada ruminação, produzindo quantidade suficiente de substâncias tamponantes por meio da salivação mantém o pH ótimo para ação dos microrganismos celulolíticos, os quais promovem aumento na relação acetato:propionato no líquido ruminal (Santini et al., 1992).

O pH ruminal recebe atenção considerável também por ser um mecanismo que pode explicar as reduções na ingestão e digestibilidade de volumosos, sendo um resultado da suplementação energética (Caton & Dhuyvetter, 1997), além de estar diretamente relacionado à taxa de crescimento dos microrganismos ruminais (Russell et al., 1979).

O segundo parâmetro avaliado, o Nitrogênio Amoniacal, recebe especial atenção por, em conjunto com outros parâmetros, fornecer informações sobre a qualidade da fermentação ruminal. A amônia é o principal componente do metabolismo dos compostos nitrogenados em ruminantes (Huntington & Archibeque, 1999). O indicador da eficiência de utilização do N pelo bovino é a concentração de amônia ruminal. Cerca de 60 a 80% do N incorporado pelos microrganismos advém dela (Satter e Roffler, 1975). A presença dos compostos nitrogenados amoniacais (N-NH3) no líquido ruminal é fator fundamental para os microrganismos do rúmen, especialmente os celulolíticos, que utilizam unicamente a amônia para efetuar a síntese de proteína microbiana (Russell et al., 1992).

Os microrganismos do rúmen degradam as fontes protéicas produzindo o N-NH_3. A amônia ruminal é proveniente do nitrogênio não-protéico da dieta, da degradação da proteína verdadeira dietética e da reciclagem via saliva ou difusão pela parede ruminal; enquanto sua remoção pode ser realizada via incorporação em proteína microbiana, pela passagem ao trato posterior ou absorção ruminal (Van Soest, 1994).

A determinação das concentrações de amônia permite o conhecimento do desbalanceamento protéico energético, pois, quando ocorrem altas concentrações de amônia, pode estar havendo excesso de proteína dietética degradada no rúmen e, ou, baixa concentração de carboidratos degradados no rúmen (Ribeiro et al., 2001). No entanto, concentrações mais altas de amônia podem ser necessárias para sustentar máximas taxas de digestão de alimentos rapidamente degradáveis.

A produção de amônia no rúmen muitas vezes excede sua utilização, ocorrendo acúmulo e posterior remoção do ambiente ruminal, principalmente por difusão pela parede ruminal (Russell et al., 1991; Nolan, 1993). A amônia é transportada para o fígado, onde é convertida em uréia. Assim, a uréia liberada no sangue é excretada na urina ou é reciclada para o rúmen, retornando via saliva ou por difusão pelo epitélio ruminal (Coelho da Silva & Leão, 1979; Huntington & Archibeque, 1999). A reciclagem de uréia é mecanismo vital que conserva compostos nitrogenados dietético e corporal, mantendo o suprimento de aminoácidos para os tecidos (Lapierre & Lobley, 2001).

A concentração ruminal de N-NH_3 (nitrogênio amoniacal) é conseqüência, portanto, do equilíbrio entre a sua produção e utilização pelos microrganismos, e esta última depende da quantidade de energia disponível (Borges, 1999). A proporção

relativa dos diferentes ácidos graxos voláteis produzidos varia amplamente, dependendo dos componentes químicos degradados e do pH ruminal.

Segundo France et al. (1991), os maiores indicadores da utilização dos alimentos pelos ruminantes são a proporção molar e a produção total de AGVs. Por esta razão, as determinações quantitativas dos processos de fermentação ruminal requerem medidas das taxas de produção de ácidos graxos voláteis. A proporção relativa dos diferentes AGVs produzidos varia amplamente, dependendo dos componentes químicos degradados e do pH ruminal (Mota, 2006).

A fermentação microbiana e a produção de ácidos graxos voláteis (AGV) no rúmen são eventos nutricionalmente importantes em ruminantes, uma vez que aproximadamente 70% da exigência energética destes animais pode ser atendida por acetato, propionato e butirato (Bergman, 1990). A avaliação de um alimento para ruminantes inclui investigações sobre o padrão de fermentação ruminal, que está associado ao potencial do alimento em promover o bom desempenho dos animais

Uma maior proporção de acetato é produzida na degradação da celulose e hemiceluloses, enquanto que com a degradação dos carboidratos solúveis da planta (amido e açúcares), o padrão de produção de AGVs é elevado tanto em propionato, quanto em acetato, e baixo em butirato. Em contrapartida, a degradação de amido de cereais produz alta concentração de propionato. A proporção molar típica dos AGVs produzidos quando o animal alimenta-se basicamente de forragens, representa relação de 73:20:7 (acetato:propionato:butirato), comparado com 60:30:10 em misturas de concentrado e forragens, e somente com concentrado a relação é de 50:40:10 (Black, 1990). Sabe-se que a proporção de AGVs varia também com o tipo de forragem oferecida e seu estádio de maturação. (Mota, 2010)

Os microorganismos do rúmen, através de suas vias metabólicas de extração de energia, produzem os AGVs. A fermentação anaeróbia que ocorre durante o metabolismo dos carboidratos no rúmen, efetuado pela população microbiana, converte os carboidratos em ácidos graxos de cadeia curta, formando principalmente os ácidos acético, propiônico e butírico. Nesse processo fermentativo são produzidos dióxido de carbono e metano, em maior ou menor quantidade, dependendo da concentração e proporções relativas dos ácidos produzidos (Mota, 2010)

Os ácidos acético e propiônico, mais abundantes, respondem coletivamente por aproximadamente 90% dos AGVs ruminais. A absorção de AGVs pelo epitélio ruminal é essencial para evitar o acúmulo desses ácidos, o que pode levar a acidose ruminal.

Dietas com mais carboidratos não estruturais irão promover maior fermentação ruminal e produção de AGVs. (Costa, 2010)

Quase que a totalidade dos AGVs produzidos pelo processo fermentativo ruminal é absorvida passivamente através do epitélio rúmen-retículo, omaso e abomaso, sendo o rúmen retículo responsável por 88% dos AGVs absorvidos. A fração que passa do rúmen aumenta com o aumento da taxa de passagem do líquido. Também se observa uma relação positiva na taxa de absorção dos AGVs do rúmen, com aumento da superfície das papilas, que por sua vez são afetadas pela dieta. A queda de pH pode alterar a produção de ácidos graxos voláteis levando à queda no consumo, causando menor síntese de leite e mudança na sua composição (Bergman, 1990).

Metade do ácido propiônico absorvido é convertido em glicose, suprindo tecidos importantes como o cérebro e servindo como fonte precursora de carboidratos como a lactose (açúcar do leite), e o ácido butírico é amplamente convertido a corpos cetônicos no epitélio ruminal (Oliveira et al., 2005).

O manejo alimentar, a freqüência diária de alimentação concentrada pode afetar a variação na concentração dos AGVs. O padrão de fermentação ruminal pode ser modificado em função da dieta fornecida aos animais, o que leva a uma variação na proporção média de AGVs (Lana, 2005).

Há também uma relação entre o pH, a absorção ruminal de ácidos graxos voláteis e o volume ruminal, Em ambientes com valor de pH alto a maioria dos AGV está na forma iônica, de acordo com a equação de Henderson-Hasselbalch. Sabe-se que a absorção por difusão ocorre na forma protonada ou não dissociada (Kramer et al., 1996); então, em pH alto ocorre menor absorção de AGV, mantendo a osmolaridade mais alta, já que os AGV são os principais determinantes da osmolaridade (Dobson et al., 1976), e por isto ocorre maior influxo de água para dentro do rúmen, aumentando o volume ruminal.

1.4.2. Cinética Ruminal e Taxa de Passagem

A cinética de trânsito ou passagem refere-se ao fluxo do alimento ao longo do trato digestório e é influenciada pelos níveis de consumo, forma física da dieta, diferenças na ruminação existente entre animais, tipo de marcador utilizado na determinação da curva de excreção fecal (Mertens e Ely, 1982), proporção volumoso: concentrado e fatores climáticos.

Os alimentos passam pelo trato digestivo de modo diferente. Componentes solúveis dissolvem e transitam com taxa semelhante ao líquido ruminal. Concentrados passam mais rapidamente do que partículas longas fibrosas. A taxa de passagem (k)através do trato gastrintestinal é o fluxo de material dentro ou através de todo o trato digestivo por unidade de tempo, ou seja, por hora (h-1). A taxa de passagem do alimento afeta de forma direta a utilização dos nutrientes pelo animal (Uden, et al., 1982). A digestão é um processo múltiplo. A divisão do trato gastrintestinal do ruminante pode ser feita em três compartimentos que possuem propriedades únicas digestivas e de passagem, que são: retículo-rúmen, intestino delgado e intestino grosso. Esses compartimentos diferem em seus mecanismos de digestão e nos processos de mistura e de passagem. O conteúdo ruminal possui ainda três diferentes fases (líquida, partículas que fluem e as que permanecem no rúmen), que possuem diferentes características de fluxo (Mertens, 1993).

A taxa de remoção da digesta ruminal afeta a extensão da degradação protéica (Orskov e Mcdonald, 1979), a digestão da parede celular e, conseqüentemente, a digestibilidade in vivo da dieta (Allen e Mertens, 1988), e a eficiência de síntese de proteína microbiana (Sniffen e Robinson, 1987), por isso, a importância de se estudar a cinética de passagem das partículas. Logo, digestão e passagem atuam de forma simultânea e competitiva para a remoção da digesta presente no rúmen, devendo-se, então, estudar os efeitos combinados de digestão e taxa de passagem para maximizar o consumo de nutrientes digestíveis.

O interesse dos pesquisadores que estudam a absorção e utilização de nutrientes no rúmen tem recaído sobre o volume ruminal. Para isso, indicadores da fase líquida são usados tanto em estudos de digestibilidade, como também, do balanço hídrico de avaliação do volume ruminal e da taxa de passagem da fase líquida. No estudo da taxa de passagem da fase sólida e líquida da dieta no trato gastrintestinal de bovinos, utilizam-se modelos que ajustam os valores observados. Tais modelos como o de Grovum e Williams (1973) e o de Dhanoa et al.,(1985), são mais usados em sistemas intensivos de criação de animais, que emprega diferente tipo de manejo alimentar quando comparado com animais em pastejo, em que devem ser avaliados neste sistema utilizando forrageiras tropicais.

Sabe-se que a taxa de passagem do alimento no rúmen é uma variável importante na regulação do consumo. O maior ou menor tempo de retenção no retículo-rúmen influencia nos processos de digestão e de assimilação dos nutrientes. Segundo

Seone (1995), as forragens que ocuparam menor volume e que retiveram menos água foram consumidas em maior quantidade, devido, possivelmente, ao aumento da taxa de passagem. Além disso, o tamanho e a forma da partícula ingerida afetaram o consumo, a taxa de degradação e o tempo de retenção da digesta no rúmen (Luginbuhl et al., 1991).

Van Soest (1994) infere que o fluxo que sai do rúmen inclui bactérias, alguns resíduos potencialmente degradáveis do alimento e material lignificado indisponível e que a taxa de passagem real é aquela relacionada à fração indigestível, onde líquidos e sólidos podem ter passagens individuais.

Portanto a cinética de trânsito ou passagem refere-se à medição do fluxo de resíduos não digeridos do alimento ao longo do trato digestório e é influenciada pelos nível de consumo, forma física da dieta, diferenças na ruminação existente entre animais, tipo de marcador utilizado na determinação da curva de excreção fecal (Mertens & Ely, 1982), proporção volumoso: concentrado e fatores climáticos (Faichney, 1993). A taxa de remoção da digesta ruminal afeta a extensão da degradação protéica (Orskov & Mcdonald, 1979), a digestão da parede celular e, consequentemente, a digestibilidade *in vivo* da dieta (Allen & Mertens, 1988; Van Soest, 1994) e a eficiência de síntese de proteína microbiana (Snniffen & Robinson, 1987), por isso, a importância de se estudar a cinética de passagem das partículas. Deste modo, digestão e passagem atuam de forma simultânea e competitiva para a remoção da digesta presente no rúmen, devendo-se, então, estudar os efeitos combinados de digestão e taxa de passagem para maximizar o consumo de nutrientes digestíveis (Aitchinson *et al.*, 1986, citado por Oliveira et al,. 1999).

Quando os animais são alimentados com forragens de baixo valor nutritivo, verifica-se uma menor taxa de passagem das partículas do rúmen o que acarreta a redução no consumo de matéria seca (Van Soest, 1994). Inversamente proporcional à taxa de passagem, o tempo médio de retenção das partículas e fluidos da digesta no trato gastrintestinal é geralmente relacionado à capacidade do trato digestório, com relação ao consumo e a digestibilidade da dieta ingerida (Lechner-Doll et al., 1991). Assim, o sistema de digestão dos alimentos pelos ruminantes é um complexo processo que envolve interações entre dieta, população microbiana e animal.

A forma mais comum de determinar a taxa de passagem ruminal é através da infusão de marcadores seguida de coletas freqüentes por um determinado número de dias, dessa forma o aparecimento do marcador ocorre até um máximo atingido e em

seguida acontece um declínio assintótico. O marcador precisa ser recuperável, caso contrário haverá super estimativa da taxa de passagem (Van Soest, 1994).

Através do método de infusão em dose pulso, os indicadores utilizados para a cinética de passagem de partículas sólidas são os indicadores mordentes, insolúveis, que se ligam covalentemente à fração fibrosa do alimento, como o cromo (Cr) na forma iônica de dicromato e os elementos químicos, como os lantanídeos ou terras raras, como o európio (Eu), cério (Ce), praseodímio (Pr) e o itérbio (Yb), também na forma iônica (Owens & Hanson, 1992). O Cromo forma ligação covalente via grupo hidroxila. Este elemento, quando ligado á parede celular, é inibitório, ou seja, reduz a digestibilidade e forma ligações resistentes à ação enzimática. As soluções de terras raras, assim como as de Cr complexado, reagem com substâncias que possuem grupos carboxílicos livres, oxalatos, fosfatos, parede celular microbiana e saliva. Portanto, não devem ser administradas diretamente no rúmen, e sim previamente complexadas às partículas do alimento (Van Soest, 1994).

Podem ocorrer variações nas estimativas dos parâmetros de cinética, como a taxa de passagem, devido à quantificação das partículas complexadas. Às diferentes propriedades físicas e interações resultantes entre as partículas e o alimento; e ao grau de complexação dos elementos complexados, que podem migrar das partículas complexadas (Beauchemin & Buchanan-Smith, 1989). Se um indicador migra de uma partícula para um nutriente solúvel no órgão que está sendo avaliado, a estimativa torna-se menos exata. Porém, se a migração ocorre após o órgão de interesse, pode não haver comprometimento.

A cinética de trânsito ou passagem pode ser estimada por métodos diretos e indiretos. O método indireto é realizado por indicadores e modelos matemáticos não lineares. Para compreender a taxa de passagem é necessário compreender o significado dos termos tempo de trânsito ou o tempo mínimo de retenção e tempo médio de retenção. Abaixo suas respectivas definições:

- Tempo de trânsito (TT) ou tempo mínimo de retenção é o tempo entre o fornecimento do marcador e o primeiro aparecimento do mesmo nas fezes.

- Tempo médio de retenção (TMR) é o tempo médio integrado entre a ingestão do marcador e a sua excreção. O TT e o TMR podem ser iguais, caso a homogeneização do marcador não ocorra.

O tempo de trânsito ocorre porque há um fluxo de sentido único no trato digestivo, e a ele pode ser atribuído o efeito de retenção do marcador no interior dos compartimentos do trato digestivo (Welyenberg et al., 2006).

1.4.3. Volume e enchimento ruminal

Segundo Mertens (1997), o enchimento ruminal é um fator limitante de consumo, pois, quanto maior for a ingestão de FDN, menor será a taxa de passagem do alimento. O consumo de alimento está correlacionado negativamente com a FDN, ou seja, quanto menos degradável, mais tempo permanecerá a forragem no rúmen, e conseqüentemente, mais o enchimento limitará a ingestão de volumosos.

As medições diretas do conteúdo ruminal e da taxa de passagem podem ser realizadas fazendo-se a evacuação/esvaziamento ruminal e a quantificação do fluxo diário de material que deixa o rúmen, utilizando-se animais fistulados no rúmen (Fontes et al., 2001)

Um pré-requisito para estimação segura dos parâmetros cinéticos de digestão e de passagem que usam esvaziamento do rúmen ou técnica de abate é que os animais estejam em equilíbrio dinâmico *(steady-state*), ou seja, que os esvaziamentos sejam realizados para permitir estimação com acurácia e precisão do tamanho médio do pool do rúmen. Outra condição prévia é que os procedimentos de esvaziamento não interfiram com as funções normais do rúmen (Huhtanen et al., 2007)

2. Estudo da cinética ruminal com níveis crescentes de inclusão de glicerina bruta na dieta de novilhas mestiças

2.1. Introdução

Neste experimento foi desenvolvida uma dieta bastante comum na pecuária brasileira, composta de silagem de milho, fubá de milho e farelo de soja, além da mistura mineral. A glicerina bruta foi adicionada em percentagens de 0 (dieta controle), 2,5, 5, 7,5 e 10% da matéria seca da , em substituição ao milho. A proporção da inclusão de glicerina bruta foi organizada de tal forma que os animais recebendo a inclusão máxima (10%) de glicerina bruta tinham todo o milho da dieta substituído pela glicerina. Os objetivos do trabalho foram determinar o consumo de matéria seca, avaliar o ambiente ruminal dos animais sob diferentes níveis de inclusão de glicerina bruta na dieta, pela análise dos parâmetros pH, nitrogênio amoniacal e ácidos graxos voláteis acético, propiônico e butírico. Foi avaliada também a cinética da fase líquida e sólida da digesta ruminal, utilizando-se os indicadores Cromo mordente para a fase solida e Co-EDTA para a a fase líquida .

O trabalho também teve o objetivo de avaliar diferentes métodos de determinação do volume ruminal e a taxa de passagem de sólidos dos animais recebendo níveis crescentes da glicerina bruta, comparando as estimativas fornecidas pelos indicadores com o método referência do esvaziamento ruminal. O experimento também utilizou o indicador em fase experimental LIPE® LÍQUIDO, que foi aplicado nos diferentes modelos matemáticos utilizados para a estimativa de parâmetros de cinética de passagem e comparado com o método referência e com as estimativas obtidas com os outros indicadores, com a intenção de explorar o potencial e possivelmente validar sua utilização.

2.2. Material e Métodos

2.4.1. Dietas

As dietas foram constituídas de uma proporção volumoso:concentrado 74:27 sendo o volumoso a silagem de milho e o concentrado composto de fubá de milho (61,1%), e farelo de soja (33,7%). Foi fornecido complexo vitamínico-mineral (1,24%), que possuía bicarbonato de sódio (1%), fosfato bicálcico (1,72%), e sal comum (1,24%) as dietas foram as mesmas para todos os animais, sendo a única diferença a inclusão de glicerina bruta.

A glicerina bruta foi adicionada na dieta substituindo o fubá de milho, sendo a dieta 1 o controle (0%), dieta 2 com 2,5%, dieta 3 com 5%, dieta 4 com 7,5% e dieta 5 com 10% de inclusão. Com esta definição de percentagens de inclusão, foi possível fornecer uma dieta controle com 100% fubá de milho, e no caso da dieta 5, 100% do milho da dieta foi substituído por glicerina bruta. Enquanto que as outras dietas apresentavam composições intermediárias.

Tabela 2 - Composição nutricional dos ingredientes da dieta oferecida às novilhas mestiças

Item	Silagem de milho	Concentrado
Matéria seca (%)	35,67	87,39
Matéria orgânica (%MS)	94,7	91,98
Proteína bruta (%MS)	7,17	24,15
Extrato etéreo (%MS)	3,03	2,43
FDN (%MS)	58,20	17,76
CNF(%MS)	26,30	47,64

FDN = Fibra em detergente neutro; CNF = carboidratos não fibrosos

2.2.3. Local, clima e período experimental

O experimento foi conduzido na fazenda experimental da Central de Ensino e Desenvolvimento Agrário de Florestal (CEDAF) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) durante o período de primavera (setembro a dezembro de 2011). O clima de Florestal é classificado como sendo o tropical de altitude. A média de temperatura anual

é 20,1ºC, sendo a média mínima anual 13,9ºC, e a máxima 28ºC. O índice médio pluviométrico anual é de 1465mm. A umidade relativa do ar é de 72%. Os dados climáticos são fornecidos pelo IBGE.

2.2.4. Animais, instalações e fornecimento da dieta

Foram utilizadas cinco novilhas mestiças holandês-zebu com 37±5 meses de idade e 602,4 ± 70,89 kg de peso vivo. Os animais foram mantidos em regime de confinamento, alojados em baia coletiva coberta, com piso de concreto, contendo comedouros de alvenaria e bebedouros automáticos, ambos individuais. O piso era de concreto com vala para escoamento de urina. Os animais eram alimentados *ad libitum* duas vezes ao dia, com previsão de 10% de sobras. A mistura do volumoso e concentrado era feita manualmente no momento do fornecimento, e a glicerina bruta era colocada sobre o alimento da maneira mais homogênea possível. O período de adaptação às dietas antes do início das coletas de amostras e dados foi de 10 dias.

2.2.5. Procedimentos experimentais e coleta de dados

2.4.4.1.Parâmetros ruminais

Foram realizadas amostragens individuais do líquido ruminal dos animais em todos os períodos de coletas nos tempos zero (imediatamente antes da alimentação matutina), 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16 e 24 horas após o fornecimento dos alimentos. O líquido ruminal foi coletado de quatro pontos diferentes do rúmen via fístula. Após filtração em tecido de algodão e homogeneização, foi feita a leitura do valor de pH, com auxílio de pHmetro Analion® modelo PM 608, calibrado com soluções padrão de pH 4,0 e 7,0 da marca Cinética®. A calibração com os padrões era repetida a cada duas aferições de pH.

Amostras de líquido ruminal para análise de ácidos graxos voláteis (AGV) e nitrogênio amoniacal ($N\text{-}NH_3$) foram coletadas. O líquido ruminal foi filtrado em tecido de algodão homogeinizado, e, após aferição do pH, alíquotas de 5mL do líquido coletado foram adicionadas de 1mL de Ácido metafosfórico 25%, com o auxílio de seringas descartáveis. As amostras foram acondicionadas em frascos plásticos com tampa de rosca. Para determinação da concentração de $N\text{-}NH_3$, alíquotas de 50 mL de conteúdo ruminal também foram coletadas e adicionadas de 1 mL de solução de ácido

sulfúrico 1:1 (6N). Estas amostras foram acondicionadas em frascos plásticos com tampas herméticas com lacre. Todas as amostras foram imediatamente congeladas a -10ºC até as análises laboratoriais.

2.2.5.2. Cinética ruminal

A cinética digestiva das cinco dietas experimentais, a base de silagem de milho e níveis de inclusão de glicerina bruta distintos, foi estimada mediante o uso de Co-EDTA e LIPE® LÍQUIDO como marcadores das fases líquida e fibra mordentada com cromo como marcador de fase sólida.

A taxa de passagem de fluídos pelo rúmen retículo foi determinada utilizando-se Co-EDTA, conforme preconizado por Udén et al. (1980). O complexo Co-EDTA (17,24% de Co na MS) foi fornecido, via fístula ruminal, em dose única, 20 g por animal no 17° dia de cada período experimental. O LIPE® LÍQUIDO foi administrado na concentração de 20g do indicador/100 mL de água destilada, simultaneamente com o Co-EDTA. Foram coletadas amostras de 120 mL de líquido ruminal nos tempos 0 (pré-dosagem) e 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 24 horas pós-dosagem. As amostras foram coletadas, filtradas em tecido de algodão e acondicionadas em potes plásticos com tampa hermética com lacre, e amazenadas a -5°C para análises posteriores. Para ajuste aos dados das concentrações de cobalto nas amostras de líquido ruminal foi utilizado o modelo exponencial unicompartimental descrito por Colucci (1984):

$$YCo = A \cdot e^{(-kl.t)}$$

Em que:
YCo = concentração do indicador (ppm), no tempo t;
A = concentração de equilíbrio do Co (ppm);
k1 = taxa de passagem ou de diluição do Co (/h);
t = tempo de amostragem.

Para se calcular as taxas de passagem de partículas e de líquido ruminal, utilizou-se regressão linear entre os tempos de coleta das amostras e o logaritmo natural das concentrações dos indicadores, em que as taxas de passagens foram consideradas como os coeficientes de inclinação (b) das equações de regressão, pois a diluição do

cromo e do cobalto no rúmen tem comportamento que pode ser representado por uma função logarítmica, conforme descrito por Gomes (1991).

Os parâmetros da dinâmica da fase líquida foram calculados conforme Colucci et al. (1990):

$$TR = 1/ klCo$$

$$VR = Co/A$$

$$TF = k1\ Co * VR$$

Em que:
TR = tempo de reciclagem no rúmen (h);
k1Co(%/h) = taxa de passagem de fluidos;
VR = volume ruminal (L);
Co = quantidade de cobalto fornecido (mg);
A = concentração de equilíbrio de cobalto (mg/L);
TF = fluxo de líquido ruminal (L/h).

A taxa de reciclagem (TRec) da fase líquida ruminal foi calculada conforme Maeng e Baldwin (1976):

$$TRec = 24\ h/TR.$$

Em que:
Tx R = taxa de reciclagem (n° de vezes/dia);
TR = tempo de retenção no rúmen (h).

Para avaliar a taxa de passagem de sólidos utilizando o indicador fibra mordentada com cromo, em cada fase experimental, no 11º dia de cada período, foram administrados no rúmen das vacas, 100g de FDN de silagem de milho mordentada com cromo, acondicionadas em saquinhos de papel. Foram realizadas coletas de fezes diretamente na ampola retal, nos intervalos de tempo 0 (pré-infusão) e 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 144 pós infusão, as amostras de fezes foram acondicionadas em bandejas de alumínio tampadas, identificadas e imediatamente congeladas a -5ºC.

Para o ajuste das curvas de excreção fecal do cromo utilizou-se o modelo exponencial bicompartimental, proposto por Grovum e Williams (1973) de expressão geral:

$$Y = A \cdot e^{[-K1(t-TT)]} - A \cdot e^{[-K2(t-TT)]} \quad \text{para } t \geq TT$$

$$Y = 0 \text{ para } t < TT$$

Em que:
Y= concentração do cromo nas fezes (%);
A = parâmetro de escala, indefinido do ponto de vista biológico;
K1= taxa de passagem no rúmen (%/h);
t = tempo de amostragem,
TT = tempo de trânsito ou estimativa do tempo em que o indicador apareceu pela primeira vez nas fezes (h);
K2 = taxa de passagem de partículas no ceco-cólon proximal.

Os cálculos dos parâmetros da dinâmica fase sólida foram realizados de acordo com Colucci et al. (1990):

$$TRR = 1/K1$$

$$TRCC = 1/K2$$

$$TMR = TRR+TRCC$$

$$TRT = TMR+TT$$

Em que: TRR = tempo de retenção no rúmen (h); TRCC = tempo de retenção do ceco e cólon proximal (h); K1= taxa de passagem de partículas no rúmen (%/h); K2= taxa de passagem de partículas no ceco-cólon proximal (%/h); TMR = tempo médio de retenção nos dois compartimentos (h); TRT = tempo de retenção total (h); e TT = tempo de trânsito (h)

O tempo médio de retenção da digesta em todo o trato digestivo também foi calculado pela equação proposta por Faichney (1975):

$$TMR(\text{horas}) = \frac{\sum mi*ti}{\sum mi}$$

Em que mi é a quantidade de indicador excretado no i intervalo de tempo e ti, o intervalo de tempo entre o fornecimento do indicador e i tempo de coleta fecal. A taxa de passagem da digesta em todo o tubo digestivo foi estimada como o inverso da TMR:

$$TxPassagem(\%h^{-1}) = 1/TMR$$

O tempo de trânsito da digesta foi considerado como o intervalo de tempo entre o fornecimento do indicador aos animais e o aparecimento inicial nas fezes.

O método de referência para avaliar a cinética ruminal que foi utilizado foi o esvaziamento ruminal, como descrito por Osuji et al., 1993. No 19º dia de cada período foi realizado o esvaziamento ruminal dos animais. O esvaziamento se iniciou sempre quatro horas após a alimentação do animal. Foi feita a rápida remoção manual do conteúdo do rúmen pela fístula ruminal, pesagem da digesta total, seguida por separação de fases líquida e sólida, com o auxílio de peneiras e sacos de algodão, para determinação do peso e volume de ambas fases. Amostras de 300g da fase sólida e de 2 litros do líquido ruminal foram coletados de cada animal. As amostras sólidas foram acondicionadas em bandejas de alumínio com tampa, e o líquido foi armazenado em garrafas plásticas. Subamostras foram posteriormente compostas, contendo a fase sólida e líquida em igual proporção à encontrada pelas pesagens do conteúdo ruminal, denominadas amostras de digesta total. Estas amostras receberam o mesmo acondicionamento das amostras sólidas.

O indicador LIPE® foi utilizado neste estudo pela primeira vez na sua forma líquida, no qual a lignina purificada e enriquecida é preparada de forma a se tornar solúvel em água. A LIPE® líquida resultante foi fornecida aos animais da mesma maneira que o Co-EDTA, e as amostras que foram analisadas para Cobalto também passarem pela análise similar à realizada no LIPE®, feita no aparelho FTIV com transformada de Fourier. Os resultados obtidos foram aplicados aos modelos matemáticos de Colluci e de Faichney, e comparados com os valores referência obtidos no esvaziamento ruminal, de maneira a explorar as possibilidades deste novo indicado,

sua afinidade para com as porções do conteúdo da digesta ruminal e sua utilidade na estimativa de parâmetros ruminais.

2.2.5.3. Preparo de Indicadores utilizados:

O preparo da fibra mordentada com cromo e do Co-EDTA foram feitos segundo Úden et al., 1980. A quantidade de cromo e cobalto presentes nos indicadores foi aferida juntamente com a análise das amostras, utilizando as mesmas técnicas descritas nas análises laboratoriais.

2.5. Análises Laboratoriais

Todas as amostras resultantes do experimento foram transportadas congeladas para o laboratório de Nutrição da Escola de Veterinária da UFMG, onde foram armazenadas em câmara fria a -6ºC até a realização de cada análise.

As amostras de fezes foram descongeladas, pesadas e secas em estufa ventilada a 55ºC durante 72 horas. Após remoção da estufa e estabilização da temperatura, foram pesadas novamente. Em seguida foram moídas em moinho de facas modelo Wiley e dotado de peneira de com perfurações de 1 mm de diâmetro. As amostras de fezes moídas e secas foram acondicionadas em saquinhos plásticos com fechamento do tipo *zip-lock.*

A determinação da concentração de cromo nas amostras de fezes foi feita após digestão nitro-perclórica, conforme procedimentos relatados por Kimura e Miller (1957), por espectrofotometria de absorção atômica, utilizando equipamento Espectrômetro de Absorção Atômica Perkin Elmer 3110.

Para a leitura do Cobalto, as amostras de líquido ruminal foram centrifugadas em ultracentrífuga Sorvall® modelo RC-5B a 5000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante analisado no Espectrofotômetro de Absorção Atômica Perkin Elmer 3110. de acordo com UDÉN et al. (1980). A leitura do LIPE® LÍQUIDO foi feita através de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier em aparelho modelo VARIAN 800 - FTIV.

As amostras coletadas para análise de ácidos graxos voláteis foram descongeladas e centrifugadas a 5000 rpm em centrifuga Sorvall® modelo RC-5B e filtradas utilizando filtro Milipore Millex® PVDF 0,45. Em seguida foram analisadas para concentração de AGV por cromatografia gasosa, segundo método preconizado por Erwin et. al. (1961). Foi utilizado cromatógrafo gasoso Shimadzu modelo GC -17A.

O método utilizado para a análise da concentração do N-NH_3 no líquido ruminal foi baseada no método Micro-Kjeldahl, realizado por meio de destilação com cloreto de cálcio e óxido de magnésio, utilizando-se o ácido bórico como indicador misto de cor como solução receptora (vermelho de metila+ verde de bromocresol) e o ácido clorídrico HCl 0,01N para a titulação.

As amostras de fase sólida e digesta total foram descongeladas, pesadas e pré-secas em estufa ventilada a 55ºC por 72h. Após remoção da estufa e estabilização da temperatura, foram pesadas novamente. Em seguida foram moídas em moinho de facas modelo Wiley e dotado de peneira de com perfurações de 1 mm de diâmetro. As amostras foram analisadas quanto ao teor de MS, MM, FDN, PB, EE, e CFN, segundo metodologia descrita pela AOAC, 1999 e INCT et al., 2012.

2.6. Análises Estatísticas

O delineamento experimental adotado foi o quadrado latino 5 X 5 com arranjo em parcelas subdivididas. Os animais e os períodos constituíram os blocos, as parcelas foram os indicadores e as subparcelas constituídas pelos diferentes tempos de coleta do líquido ruminal. Na tabela 3 podemos verificar o delineamento experimental, enquanto que a tabela 4 apresenta a análise de variância.

Tabela 3. Delineamento experimental (Quadrado Latino)

Período	860	870	874	815	858
1	A	B	C	D	E
2	C	A	B	E	D
3	D	E	A	C	B
4	E	C	D	B	A
5	B	D	E	A	C

A = 0% (dieta controle); B = 2,5% glicerina bruta; C = 5% glicerina bruta; D = 7,5% glicerina bruta; E = 10% glicerina bruta.

As variáveis de fermentação ruminal (pH, concentração de N-NH_3 e AGVs) foram analisadas pelo procedimento MIXED do SAS (SAS Institute Inc., 2001), segundo o delineamento QL 5x5 em esquema de parcela subdividida, com as dietas alocadas nas parcelas e os tempos de amostragem nas subparcelas. O modelo para análise de variancia incluiu como fontes de variação: novilhas, período, dietas, além de residuos. Os animais e os períodos constituiram os blocos, e as dietas (controle e 2,5%, 5%, 7,5% e 10% de inclusão de Glicerina bruta na matéria seca) foram os tratamentos (tabela 3). Os testes adotados para a comparação da médias foram selecionados conforme o coeficiente de variação (CV) com nível de significancia ($P<0.05$).

Tabela 4. Análise de variância.

FONTES DE VARIAÇÃO	GL
Total	24
Dietas	4
Novilhas (blocos)	4
Períodos	4
Erro (A)	12

Para comparação de médias entre dietas foi utilizado o teste SNK a 5 % de probabilidade do erro através da utilização do software SISVAR® segundo Ferreira 2007.

Para as variáveis referentes à cinética ruminal o delineamento experimental adotado foi o quadrado latino 5 $_X$ 5 com arranjo em parcelas subdivididas. Os animais e os períodos constituíram os blocos, as parcelas foram as dietas, com subparcelas constituídas pelos diferentes tempos de coleta do líquido ruminal (tabela 5).

Tabela 5. Análise de variância.

FONTES DE VARIAÇÃO	GL
Total de parcelas	24
Indicadores (parcelas)	4
Novilhas (blocos)	4
Períodos	4
Erro (A)	12
Total de sub-parcelas	249
Parcelas	24
Períodos de coleta (sub-parcelas)	9
Indicadores x períodos de coleta	36
Erro (B)	180

Para comparação de médias entre dietas foi utilizado o teste SNK a 5 % de probabilidade do erro através da utilização do software SISVAR® segundo Ferreira 2007. E para os períodos de coleta foi realizada estimativa de equação de regressão em mesmo software segundo o mesmo autor.

Os dados referentes às taxas de passagem das fases sólida e líquida foram analisadas pelo procedimento GLM do SAS (SAS Institute Inc., 2001), tendo como fontes de variação: QL, animal dentro do QL, período e tratamento (níveis de glicerina bruta). A comparação de médias foi feita utilizando-se o LSMEANS do SAS(2001), por meio do teste de Tukey ($P<0.05$). Foi adotado o seguinte modelo para análise da cinética animal:

$$Y_{ijk} = \mu + d_i + a_j + p_k + e_{ijk} + t_l + dt_{il} + \alpha_{ijkl}$$

Em que: Y_{ijk} = valor observado relativo ao nível de inclusão da glicerina bruta **i**, ao animal **j**, ao período **k** e ao tempo **l**; μ = média geral; d_i = efeito da dieta **i**, sendo **i** = 1, 2, 3, 4, 5; a_j = efeito do animal **j**, sendo **j** = 1, 2, 3, 4, 5; p_k = efeito do periodo **k**, sendo **k** = 1, 2, 3, 4, 5; e_{ijk} = erro atribuído às parcelas; t_l = efeito do tempo **l**; dt_{il} = efeito da interação do **i**-ésimo nível da dieta **i**, com o **l**-ésimo nível do tempo **l**; α_{ijkl} = erro aleatório atribuído às sub-parcelas.

O efeito da suplementação da silagem de milho com os níveis de inclusão de glicerol sobre taxas de passagem das fases líquida e sólida foram também estudados por meio de regressões lineares e quadráticas, utilizando-se procedimento PROC REG do SAS(2001)

3. Resultados e Discussão

3.1. Consumo das dietas

Não foi observado efeito dos diferentes níveis de glicerina ($P>0,05$) sobre o consumo de matéria seca em nenhuma das dietas, como pode ser observado na tabela 6. A ausência de decréscimo no consumo também foi observada por Lage et al. (2010), trabalhando com cordeiros em terminação com níveis de 0, 3, 6, 9 e 12% de glicerina bruta na dieta.

Tabela 6: Efeito de níveis crescentes de inclusão de glicerina bruta na ingestão de matéria seca

	Tratamentos					
	0%	2,5%	5%	7,5%	10%	CV
Consumo (kg MS)	13,66	13,90	14,11	14,41	14,68	7,86

0%, 2,5%, 5%, 7,5% e 10% = Níveis de inclusão da glicerina bruta na MS da dieta.
Medias iguais pelo teste Tukey (p>0,05).

Schröder e Südekum (1999) utilizaram dietas contendo 10% de glicerol e não verificaram diferença no consumo de MS. Donkin et al. (2009), trabalhando com diferentes níveis de glicerina com alto grau de pureza (99,5% de glicerol), 0, 5, 10 e 15% da dieta de vacas leiteiras, também não encontraram diferença no consumo de MS.

Ao substituírem 10% do milho por glicerina na dieta de terminação de novilhos cruzados, Pyatt et al. (2007), observaram redução no consumo de matéria seca de 10,1% para os animais alimentados com glicerina, entretanto verificaram maiores ganhos de peso e melhor conversão alimentar para os animais que receberam esse ingrediente.

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

Mach et al. (2009) avaliaram os efeitos da glicerina nas concentrações 0, 4, 8 ou 12% em substituição aos grãos de cereais utilizados na dieta (milho e cevada), sobre a fermentação ruminal, desempenho e qualidade de carne de novilhos leiteiros confinados recebendo dietas com alta proporção de concentrado. O consumo de matéria seca não foi alterado com a inclusão de glicerina apresentando valor médio de 8,27 kg/dia.

No experimento conduzido por Serrano, 2011 em novilhos Nelore alimentados com 0, 3, 6, 9 e 12% de glicerina bruta na MS, A ingestão de MS (IMS); os coeficientes de digestibilidade aparente ruminal (CDR); de digestibilidade aparente intestinal (CDI)

e de digestibilidade aparente total (CDT) da matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, fibra em detergente neutro e carboidratos não-fibrosos não foram influenciados (P>0,05) pelos tratamentos. Os resultados de Serrano foram semelhantes aos observados por Mach et al. (2009).

Fávaro, 2010, em um experimento com bovinos mestiços submetidos a dietas com inclusão de 0, 5, 10, 15 e 20 % de glicerina na MS, verificou que os consumos de MS, MO, PB, FDNcp e FDAcp (kg/dia, %PV/dia e g/kg PV 0,75), não foram influenciados pelo o aumento no porcentual de glicerina da dieta. Também foi observado no mesmo experimento que as diferenças encontradas em relação aos resultados de consumo de matéria seca na literatura podem ser causadas tanto pela composição da glicerina que varia de acordo com o método de obtenção, quanto por seus efeitos intrínsecos ao glicerol no metabolismo ruminal e do animal. Substâncias como sais e metanol, que são utilizados no processo de transesterificação, podem influenciar a palatabilidade da glicerina obtida (Chung et al., 2007). Além disso, a pureza da glicerina utilizada também pode influenciar a aceitabilidade pelos animais

3.2. Ambiente Ruminal

3.2.1. pH ruminal

A Tabela 7 apresenta o efeito da adição dos níveis crescentes de glicerina bruta sobre o pH no rúmen de vacas mestiças Holandês x Zebu.

Não houve interação entre dieta e tempo de coleta (P<0,05) para os valores de pH ruminal. Ou seja, tanto no tratamento controle como nos tratamentos com percentagem de inclusão de glicerina bruta de até 10% da matéria seca total da dieta, o pH ruminal apresentou comportamento semelhante, variando de 6,20 a 6,92.

Conforme Hoover e Stockes (1991) reduções moderadas no pH ruminal para valores até 6,2 causam pouco efeito sobre a digestão de carboidratos fibrosos, sendo no entanto, reduções mais severas (<6,0) passíveis de inibirem a população de microrganismos celulolíticos. De forma geral. os valores mantiveram-se dentro do recomendado por Hobson e Stewart (1997), entre 6 e 7, e por Church (1988), entre 5,5 e 7.

Tabela 7 - Efeito das dietas contendo níveis crescentes de glicerina bruta sobre o pH ruminal em função dos horários após a alimentação

	pH ruminal										
Dietas	0h	2h	4h	6h	8h	10h	12h	16h	20h	24h	Médias
0%	6,82	6,71	6,49	6,54	6,42	6,37	6,29	6,48	6,55	6,87	6,55
2,5%	6,83	6,57	6,34	6,41	6,47	6,33	6,25	6,44	6,65	6,92	6,52
5%	6,93	6,62	6,42	6,36	6,54	6,35	6,20	6,37	6,53	6,81	6,51
7,5%	6,78	6,56	6,46	6,48	6,49	6,45	6,23	6,38	6,59	6,75	6,52
10%	6,79	6,60	6,42	6,28	6,45	6,41	6,24	6,42	6,64	6,81	6,51
Médias	6,83	6,61	6,43	6,41	6,47	6,38	6,24	6,42	6,59	6,83	

0%, 2,5%, 5%, 7,5% e 10% = Níveis de inclusão da glicerina bruta na MS da dieta.
Medias seguidas de letras distintas na coluna representam diferença pelo teste SNK (P<0,05).
CV (%)= 2,89.

O pH ruminal permaneceu a valores constantes ao longo do tempo na dieta controle e em todos os outros tratamentos, com até 10% de inclusão de glicerina bruta. Não houve diferença (P>0,05) no pH entre os diferentes tratamentos.

Um dos fatores essenciais para o funcionamento ruminal como câmara de fermentação é o pH, e as variações ocorridas são dependentes do tipo e da freqüência de alimentação (Church, 1988). Pode-se observar que até os 10% de glicerina bruta inclusos na dieta dos animais, o pH em diferentes tempos pós alimentação se manteve dentro da faixa aceitável para a boa fermentação ruminal.

O pH ruminal recebe atenção considerável como um mecanismo que explica as reduções na ingestão e digestibilidade de volumosos como resultado da suplementação energética (Caton & Dhuyvetter, 1997), além de estar diretamente relacionado à taxa de crescimento dos microrganismos ruminais (Russell et al., 1979).

Hungate (1966) e Church (1979) admitem que as flutuações no pH do rúmen refletem as variações nas quantidades dos ácidos orgânicos que acumulam no conteúdo ruminal e da quantidade de saliva que é produzida. Dessa maneira, o pH ruminal geralmente atingirá o nível mais baixo de duas a seis horas após a alimentação, dependendo da natureza da dieta, e da rapidez com que é ingerida.

Valadares Filho & Pina (2006), descrevem que o pH ruminal pode variar de 5,5 a 7,2, com valores baixos detectados em intervalos de tempos curtos após alimentação dos animais com dietas ricas em concentrado, sendo que valores de pH abaixo de 6,0 podem inibir as bactérias fermentadoras de celulose. Segundo Van Soest (1994), a faixa de pH para que haja atividade microbiana normal no rúmen é de 6,7 + 0,5.

Os resultados encontrados foram mais favoráveis para a estabilidade do ambiente ruminal do que os observados por Mach et al. (2009) , que avaliaram os efeitos da glicerina nas concentrações 0, 4, 8 ou 12% em substituição aos grãos de cereais utilizados na dieta (milho e cevada), sobre a fermentação ruminal de novilhos leiteiros confinados recebendo dietas com alto concentrado. Os autores encontraram valor de pH de 5,68 em bovinos alimentados com 8% de glicerina, valor esse menor que os encontrados nos animais que não receberam glicerina ou alimentados com 4 ou 12% de glicerina (6,07; 6,06; 6,08; respectivamente). Segundo os autores esse resultado pode estar relacionado ao maior consumo de concentrado pelos animais na dieta com 8% de glicerina quando comparado aos demais tratamentos.

No presente experimento, com a substituição do milho pela glicerina bruta, os animais recebendo dietas com 2,5, 5, 7,5 e 10% de inclusão de glicerina gradualmente receberam níveis menores de concentrado, à medida que a inclusão de glicerina aumentava, o que pode explicar o equilíbrio dos tratamentos.

Estes resultados também estão de acordo com o trabalho conduzido por Abo El-Nor et.al., em 2010, utilizado fermentadoras contínuas para avaliar dietas com 0, 36, 72 e 108g glicerol/kg MS (equivalente a 0; 3,6; 7,2; e 10,8 % glicerol na MS) substituindo o milho no concentrado de dietas baseadas em feno de alfafa e concentrado, foi observado que não houve efeito no pH e N-NH_3 do líquido ruminal com a inclusão de glicerol.

AbuGhazaleh et al. (2010), trabalhando com níveis de substituição do milho pelo glicerol,(0; 15; 30 e 45%) em experimento *in vitro*, também não observaram diferenças para o pH. No entanto Silva, et al.(2012) fornecendo dietas com inclusão de 0; 7,5; 15; 22,5 e 30% de glicerina na alimentação de bovinos Nelore, observaram redução linear do pH do líquido ruminal coletado dos animais, que estavam submetidos a uma dieta com proporção volumoso:concentrado de 30:70. Estes resultados provavelmente estão associados, além de uma utilização de maiores percentagens de inclusão de glicerina bruta do que a utilizada no presente experimento, à influência da alta quantidade de concentrado da dieta dos animais.

Wang et al. (2009) relataram queda linear do pH do líquido ruminal em novilhos alimentados com 0, 100, 200 e 300 g/dia de glicerina bruta, observando valores de pH no líquido ruminal de 6,58; 6,56; 6,32 e 6,23 respectivamente. Da mesma forma, DeFrain et al. (2004) reportaram queda de pH à medida que inclusão de glicerina bruta (80,2% de glicerol) na dieta aumentou, em vacas leiteiras no pós-parto.

3.2.2. Produção de Amônia ($N\text{-}NH_3$)

A quantidade de amônia medida no líquido ruminal, (em mg/100mL) está disposta na tabela a seguir. Não houve interação significativa entre dieta e tempo nas médias marginais.

Tabela 8: Efeito das dietas contendo níveis crescentes de glicerina bruta sobre a concentração de nitrogênio amoniacal (mg/ 100ml) em função dos horários após a alimentação

Hora (h)	$N\text{-}NH_3$ (mg/100mL) no líquido ruminal					
	0%	2,5%	5%	7,5%	10%	**Médias**
0[1]	13,21	15,23	13,52	12,49	13,68	13,63a
2	14,04	16,42	15,94	15,71	15,94	15,61a
4	14,51	18,09	12,97	14,4	14,51	14,90a
6	12,96	13,21	10,11	11,18	8,56	11,20b
8	12,49	12,25	10,23	11,18	9,4	11,11b
10	13,92	13,8	15,35	14,4	12,97	14,09a
12	16,06	15,35	16,54	14,87	14,63	15,49a
16	13,09	15,35	13,44	14,52	15,82	14,44a
20	14,75	13,56	13,21	14,63	19,36	15,10a
24	12,61	14,27	12,49	12,37	12,97	12,94ab
Médias	13,76	14,75	13,38	13,58	13,78	

0%, 2,5%, 5%, 7,5% e 10% = Níveis de inclusão da glicerina bruta na MS da dieta. Medias seguidas de letras distintas na coluna representam diferença pelo teste SNK ($P<0,05$).
CV (%) = 22,37.
[1] Coleta imediatamente anterior ao fornecimento da alimentação.

A taxa de produção de $N\text{-}NH_3$ no rúmen reflete a solubilidade e a fermentabilidade da dieta, bem como a produção endógena de compostos nitrogenados (Huntington & Archibeque, 1999). A ausência da influência da inclusão de glicerina bruta em substituição ao milho da dieta é, juntamente com outros fatores, um indicativo da estabilidade do ambiente ruminal dos animais alimentados com até 10% de glicerina bruta na matéria seca da dieta.

A produção de amônia no rúmen muitas vezes excede sua utilização, ocorrendo acúmulo e posterior remoção do ambiente ruminal, principalmente por difusão pela parede ruminal (Russell et al., 1991; Nolan, 1993). A amônia é transportada para o fígado, onde é convertida em uréia. Assim, a uréia liberada no sangue é excretada na urina ou é reciclada para o rúmen, retornando via saliva ou por difusão pelo epitélio

ruminal (Coelho da Silva & Leão, 1979; Huntington & Archibeque, 1999). A reciclagem de uréia é mecanismo vital que conserva compostos nitrogenados dietético e corporal, mantendo o suprimento de aminoácidos para os tecidos (Lapierre & Lobley, 2001).

Não foi observada diferença significativa entre dietas para a concentração de N-NH_3 no líquido ruminal. Esses resultados coincidem com os de Abo El-Nor et.al., em 2010, que também não observaram variação no N-NH_3 no seu experimento com inclusão de 0; 3,6; 7,2; e 10,8 % de glicerol na MS.

No experimento de Serrano (2011) também não foi observada influência da inclusão de glicerina bruta na dieta para a concentração mínima de N-NH_3. No seu estudo, assim como neste, verificou-se que, para todos os tratamentos, os valores mantiveram-se acima de 5mg/100mL ; considerados por Satter & Slyter (1974) como os valores mínimos de nitrogênio amoniacal para uma adequada fermentação ruminal da parede celular. Serrano (2011) no entanto observou um decréscimo do valor de N-NH_3 (nas concentrações máxima e média) com o aumento da inclusão de Glicerina Bruta, o que não foi observado no presente experimento.

Chizzotti et al. (2007) trabalhando com vacas de alta produção obteve 13,34 mg/100 ml, Magalhães et al. (2006) e Soares et al. (2005) avaliando vacas de média produção verificaram um valor médio de 13,95 e 13,64 mg/100 mL, respectivamente. Van Soest (1994) citou como nível ótimo 10 mg/100 mL de líquido ruminal, valor que não deve ser considerado fixo, pois varia conforme a capacidade de síntese de proteína microbiana, a disponibilidade de substrato e a taxa de fermentação dos carboidratos

A menor concentração de N-NH_3 pode indicar uma fermentação ruminal mais ativa, pois a a maioria das bactérias celulolíticas exigem amônia para o seu crescimento e, possivelmente, mais energia sendo absorvida na forma de AGVs, estando, assim, disponível para fins produtivos. (Costa, 2010). As variações ($p<0,05$) entre os horários de coleta do N-NH_3 mostram uma redução dos valores do nitrogênio no período de 6 a 8 horas após a alimentação da manhã. Deve-se atentar que a baixa quantidade de N-NH_3 no líquido ruminal pode ser associada ou à uma baixa disponibilidade do nutriente ou a um alto consumo do nutriente, portanto a interpretação deste fator sozinho pode levar à ambiguidade, que deve ser sanada pela avaliação de outros fatores que indiquem a qualidade do ambiente ruminal. Baixas concentrações de NH_3 podem limitar a atividade microbiana e diminuir a taxa e a extensão da digestão da parede celular.

Existe grande controvérsia em relação à concentração de nitrogênio amoniacal ruminal exigida para o máximo crescimento microbiano. Mehrez et al. (1977), afirmaram que o máximo de atividade fermentativa ruminal foi obtido quando o N amoniacal alcançou valores entre 19 e 23 mg/100 mL de líquido ruminal. Porém, estes valores estão acima dos valores citados por Satter e Slyter (1974) - 5mg/100mL. Mas faz-se a ressalva de que, segundo Preston et al, 1986, 5 mg de N-NH_3 /100mL seria o mínimo para manter a síntese microbiana, enquanto que para otimizar efetivamente a fermentação, principalmente da fibra, seriam necessários de 15 a 29 mg de N-NH_3/100mL

3.2.3. Concentração dos ácidos graxos voláteis no rúmen

As concentrações em (mMol/100 ml) de Ácidos graxos voláteis totais, acetato, propionato e butirato encontram-se nas Tabela 9, 10, 12 e 14, respectivamente. As proporções molares (%) do acetato, propionato e butirato encontram-se na Tabelas 11, 13 e 15, respectivamente.

Tabela 9 – Efeito dos níveis crescentes de glicerina bruta em substituição ao milho sobre a quantidade total de AGVs (mMol/100mL) no rúmen de novilhas mestiças em função dos horários após a alimentação

	Ácidos graxos voláteis totais					
Hora (h)	0%	2,5%	5%	7,5%	10%	**Médias**
0[1]	54,79	47,05	52,59	45,99	52,33	50,55b
2	52,49	56,07	55,71	54,13	62,94	56,27ab
4	51,59	61,83	55,71	53,36	62,82	57,06ab
6	57,00	51,75	62,17	52,17	62,34	57,09ab
8	51,48	54,14	57,99	60,63	53,42	55,53ab
10	58,07	62,63	59,97	57,07	56,96	58,94a
12	55,58	64,04	64,50	63,18	60,49	61,56a
16	59,92	54,12	55,98	57,72	60,30	57,61ab
20	57,00	52,74	62,52	52,63	54,28	55,83ab
24	47,37	41,89	46,51	42,85	42,96	44,32c
Médias	54,53	54,63	57,37	53,97	56,88	

0%, 2,5%, 5%, 7,5% e 10% = Níveis de inclusão da glicerina bruta na MS da dieta. Medias seguidas de letras distintas minúscula na linha e maiúscula na coluna representam diferença pelo teste SNK (P<0,05). CV (%)= 13,79.

[1] Coleta imediatamente anterior ao fornecimento da alimentação.

As dietas não diferiram entre si em relação ao tempo (P>0,05) e também não houve diferenças estatísticas (P>0,05) na quantidade total de ácidos graxos voláteis entre a dieta controle e as com 2,5, 5, 7,5 e 10% de inclusão de glicerina bruta em substituição ao milho. As variações que ocorreram em função do tempo foram semelhantes em todas as dietas, sendo os dois pontos mais baixos os tempo 0h, antes da alimentação da manhã, e 24h, antes da alimentação da manhã seguinte, e um pico no tempo 10h, que sucedeu a segunda alimentação diária dos animais.

Os ácidos graxos voláteis (AGV) produzidos no trato gastrointestinal como produtos do metabolismo microbiano de nutrientes podem prover até 80% da exigência diária de energia dos ruminantes. As concentrações de ácidos graxos voláteis (AGV) total ou individual no rúmen são altamente variáveis e dependem da frequência de alimentação, tempo após a alimentação e composição da dieta (Bergman, 1990). As concentrações totais de AGV no rúmen estão normalmente entre 60 e 150 mM/mL. Além disso, o pH do fluido ruminal pode influenciar bactérias produtoras de AGV específicos. A proporção molar dos AGV individuais no rúmen é de interesse considerável, pois o padrão de fermentação e a concentração total de AGV são os principais determinantes da utilização dos alimentos pelos ruminantes (France e Siddons, 1993).

Os coeficientes de variação das respostas observadas nas tabelas que apresentam a concentração molar de acetato, propionato e butirato, apesar de elevados (CV acetato (%) = 16,32, CV propionato (%) = 16,43 e CV butirato (%)= 24,22, estão dentro do considerado aceitável para respostas agrícolas e zootécnicas (CV entre 5 a 35%), logo a percepção de instabilidade da variável deve ser relevada, levando-se em conta a natureza da resposta sendo observada.

Tabela 10: Efeito dos níveis crescentes de glicerina bruta sobre a concentração (mMol/100 mL) de acetato no rúmen de novilhas mestiças em função dos horários após a alimentação

	Concentração Ruminal de Acetato					
Hora (h)	0%	2,5%	5%	7,5%	10%	**Médias**
0[1]	29,00	24,17	26,37	23,45	25,94	25,79a
2	27,47	28,15	27,55	25,86	29,10	27,63a
4	26,29	30,82	26,04	25,08	28,43	27,33a
6	28,50	25,48	28,48	24,28	26,91	26,73a
8	26,82	27,88	29,57	28,27	23,69	27,25a
10	29,09	31,86	27,81	26,08	25,81	28,13a
12	28,21	31,58	30,63	29,06	26,70	29,24a
16	30,99	27,27	27,63	27,48	28,20	28,31a
20	28,85	27,25	30,66	25,66	26,04	27,69a
24	25,02	22,47	23,42	21,70	21,06	22,73b
Médias	28,02	27,69	27,82	25,69	26,19	

0%, 2,5%, 5%, 7,5% e 10% = Níveis de inclusão da glicerina bruta na MS da dieta. Médias seguidas de letras distintas na coluna representam diferença pelo teste SNK (P<0,05).
CV acetato (%)= 16,32.
[1] Coleta imediatamente anterior ao fornecimento da alimentação.

As interações entre tempo e coleta de líquido ruminal só foram significativas (P<0,05) no horário de coleta 24 horas após a primeira alimentação (após o período noturno em que o animal não recebeu alimento durante 13 horas). Não houve diferença significativa (P>0,05) entre dietas na interação entre dieta e tempo para a concentração de acetato no líquido ruminal.

As médias encontradas dos valores de acetato, em mMol/100mL foram de 28,02, 27,69, 27,82, 25,69 e 26,19mMol/100mL para as dietas com 0%, 2,5%, 5%, 7,5% e 10% de inclusão de glicerina bruta, respectivamente. Os valores foram inferiores aos encontrados por Donkin, 2008, que nas dietas de 0, 5 e 10% de inclusão de glicerol obtiveram valores de 37,1, 37,6 e 37,7mMol de acetato, respectivamente.

Tabela 11 – Efeito dos níveis crescentes de glicerina bruta em substituição ao milho sobre a proporção molar de acetato (%) no rúmen de novilhas mestiças em função dos horários após a alimentação

Hora (h)	% molar de acetato no rúmen					
	0%	2,5%	5%	7,5%	10%	**Médias**
0[1]	52,61	51,92	50,53	51,81	49,46	51,27ab
2	52,09	50,39	49,48	47,69	46,24	49,18bc
4	51,05	49,64	47,11	47,39	45,21	48,08c
6	50,6	49,53	46,05	46,84	43,75	47,35c
8	52,21	51,53	50,49	46,69	44,57	49,10b
10	50,65	51,07	46,62	45,8	45,68	47,96c
12	50,53	49,35	47,55	46,07	44,63	47,63c
16	51,71	50,37	49,5	47,85	47,2	49,33bc
20	51,19	51,68	49,45	49,51	48,56	50,08abc
24	52,71	53,56	50,58	52,25	50,89	52,00a
Médias	51,54a	50,90a	48,74b	48,19bc	46,62c	

0%, 2,5%, 5%, 7,5% e 10% = Níveis de inclusão da glicerina bruta na MS da dieta. Médias seguidas de letras distintas minúscula na linha e maiúscula na coluna representam diferença pelo teste SNK (P<0,05). CV acetato (%) = 6,84.
[1] Coleta imediatamente anterior ao fornecimento da alimentação.

Embora não tenha sido demonstrada diferença significativa entre os valores de concentração do acetato no rúmen, houve uma diferença quando se considerou a proporção molar do acetato. O efeito significativo demonstrou um declínio linear na proporção molar de acetato, com o aumento da inclusão de glicerina bruta na dieta.

Segundo Ítavo et al. (2000), as concentrações de AGVs total ou individual no rúmen são altamente variáveis e dependem da freqüência de alimentação, tempo após a alimentação e composição da dieta. Além disso, o pH do fluído ruminal pode influenciar bactérias produtoras de AGVs específicos.

Segundo Silva e Leão (1979) as faixas de normalidade para as proporções molares do acetato em ruminantes seriam de 54 a 74%. Os valores de proporção molar encontrados para o Acetato no experimento se encontram abaixo desta faixa para todas as dietas. Houve diferença significativa (P<0,05) entre as dietas, sendo que a inclusão de 2,5% de glicerina bruta deu resultados semelhantes aos da dieta controle, e uma queda na proporção molar de acetato ocorreu nas dietas com 5%, 7,5% e 10% de inclusão de glicerina bruta, sendo que a de 10% e inclusão apresentou a menor

proporção molar de acetato em relação ao propionato e butirato. As médias de acetato variaram ao longo do tempo de forma semelhante em todas as dietas.

Segundo Trabue et al. (2007), o fornecimento de glicerina bruta reduz a produção de acetato, o que tende a reduzir a quantidade disponível de carbono e de hidrogênio ruminal para produção de gás metano, com consequente melhoria na eficiência de utilização da energia pelo animal. Mas diferentes estudos apresentaram resultados diferentes quanto á proporção de acetato no rúmen de animais recebendo glicerina bruta na dieta, o que pode ser atribuído à falta de padronização da glicerina bruta usada. No entanto, a proporção molar do acetato deve ser avaliada em conjunto com a variação dos outros ácidos graxos voláteis. As diferenças observadas no propionato e principalmente no butirato podem tem ocorrido em detrimento da proporção do acetato. Vale também ressaltar que ocorrem interconversões naturais entre acetato e butirato dentro do rúmen.

Tabela 12: Efeito dos níveis crescentes de glicerina bruta sobre a concentração (mMol/100 mL) de propionato no rúmen de novilhas mestiças em função do tempo após alimentação da manhã.

	Concentração Ruminal de Propionato					
Hora (h)	0%	2,5%	5%	7,5%	10%	**Médias**
0[1]	14,55	12,77	14,4	12,94	14,62	13,86b
2	15,02	16,59	16,32	15,76	18,54	16,45a
4	15,31	18,06	16,25	15,63	19,02	16,85a
6	16,55	14,82	17,29	14,84	18,27	16,35a
8	15,03	15,24	16,18	16,98	16,28	15,94a
10	16,69	17,41	16,85	16,09	16,97	16,80a
12	15,96	17,79	18,21	17,79	17,78	17,51a
16	16,53	15,06	15,33	15,85	17,72	16,10a
20	15,85	14,09	16,35	14,57	15,73	15,32a
24	12,88	11,15	12,34	11,55	11,94	11,97c
Médias	15,44ab	15,30ab	15,95ab	15,20b	16,69a	

0%, 2,5%, 5%, 7,5% e 10% = Níveis de inclusão da glicerina bruta na MS da dieta. Medias seguidas de letras distintas minúscula na linha e maiúscula na coluna representam diferença pelo teste SNK (P<0,05). CV propionato (%)= 16,43.
[1] Coleta imediatamente anterior ao fornecimento da alimentação.

As médias encontradas dos valores de propionato, em mMol/100mL foram inferiores aos encontrados por Donkin, 2008, que nas dietas de 0, 5 e 10% de inclusão de glicerol obtiveram valores de 18,1, 10,2 e 20,1 mMol de propionato, respectivamente. No entanto no experimento de Donkin, que utiizou glicerol purificado e avaliou os AGVs obtidos da fermentação in vitro, não foi observada diferença entre

estas três percentagens de inclusão. No presente experimento foi observado um aumento na produção do propionato na dieta com 10% de inclusão de glicerina bruta, no entanto este aumento não foi linear, dada a observação dos resultados da dieta com 7,5% de inclusão, o que leva a resultados inconclusivos em relação à produção de propionato no rúmen dos animais, o que também pode ser observado na tabela x a seguir.

Tabela 13 – Efeito dos níveis crescentes de glicerina bruta em substituição ao milho sobre a proporção molar de propionato (%) no rúmen de novilhas mestiças em função do tempo após alimentação da manhã.

	% molar de propionato no rúmen					
Hora (h)	0%	2,5%	5%	7,5%	10%	**Médias**
0[1]	26,92	26,83	27,35	27,51	28,02	27,33c
2	28,7	29,59	29,31	29,16	29,76	29,30a
4	29,43	29,4	29,07	29,04	30,34	29,46a
6	29,1	28,7	27,94	28,42	29,12	28,66ab
8	28,86	28,25	27,96	28,06	30,37	28,70ab
10	28,76	27,54	27,99	28,33	29,51	28,43ab
12	28,78	27,82	28,29	28,26	29,26	28,48ab
16	27,68	27,68	27,24	27,17	28,94	27,74bc
20	27,49	26,75	26,04	27,3	28,5	27,22c
24	27,31	26,83	26,49	26,14	27,1	26,77c
Médias	28,30ab	27,94b	27,77b	27,94b	29,09a	

0%, 2,5%, 5%, 7,5% e 10% = Níveis de inclusão da glicerina bruta na MS da dieta. Medias seguidas de letras distintas minúscula na linha e maiúscula na coluna representam diferença pelo teste SNK ($P<0,05$). CV (%) = 5,19.

[1] Coleta imediatamente anterior ao fornecimento da alimentação.

Os valores de propionato ficaram dentro do esperado de acordo com Silva e Leão (1979) segundo os quais as faixas de normalidade para as proporções molares do propionato de variam de 16 a 27 %. Houve um pico na proporção de propionato no período de 2 a 4 horas após a alimentação matinal, Segundo Donkin (2008), o glicerol é fermentado no rúmen a ácidos graxos de cadeia curta, de modo que 50 a 70% do glicerol desaparecem do rúmen em 4 horas, levando a um aumento na produção de propionato.

Tabela 14: Efeito dos níveis crescentes de glicerina bruta sobre a concentração (mMol/100 mL) de butirato no rúmen de novilhas mestiças em função do tempo após alimentação da manhã.

	Concentração Ruminal de Butirato					
Hora (h)	0%	2,5%	5%	7,5%	10%	**Médias**
0[1]	11,24	10,11	11,82	9,6	11,76	10,91bc
2	9,99	11,31	11,84	12,5	15,31	12,19ab
4	9,98	12,94	13,4	12,64	15,36	12,86ab
6	11,94	11,45	16,4	13,04	17,16	14,00a
8	9,63	11	12,25	15,37	13,44	12,34ab
10	12,28	13,37	15,31	14,89	14,18	14,01a
12	11,41	14,68	15,66	16,01	16,33	14,82a
16	12,39	11,78	13,01	14,38	14,36	13,18ab
20	12,3	11,39	15,49	12,39	12,51	12,82ab
24	9,47	8,28	10,74	9,6	9,95	9,61c
Médias	11,06c	11,63bc	13,59a	13,04ab	14,04a	

0%, 2,5%, 5%, 7,5% e 10% = Níveis de inclusão da glicerina bruta na MS da dieta. Medias seguidas de letras distintas minúscula na linha e maiúscula na coluna representam diferença pelo teste SNK (P<0,05). CV butirato (%)= 24,22.

[1] Coleta imediatamente anterior ao fornecimento da alimentação.

Tabela 15: Efeito dos níveis crescentes de glicerina bruta em substituição ao milho sobre a proporção molar de butirato (%) no rúmen de novilhas mestiças em função do tempo após alimentação da manhã.

	% molar de butirato no rúmen					
Hora (h)	0%	2,5%	5%	7,5%	10%	**Médias**
0[1]	20,46	21,24	22,11	20,68	22,52	21,40ab
2	19,2	20,01	21,21	23,15	23,99	21,51ab
4	19,51	20,94	23,82	23,57	24,45	22,46ab
6	20,73	21,77	26,02	24,75	27,13	24,08a
8	18,93	20,22	21,55	25,24	25,06	22,20ab
10	20,59	21,4	25,38	25,87	24,81	23,61ab
12	20,69	22,84	24,15	25,67	26,11	23,89ab
16	20,61	21,96	23,25	24,98	23,86	22,93ab
20	21,31	21,58	24,51	23,19	22,94	22,71ab
24	19,98	19,61	22,92	21,6	22,6	21,34b
Médias	20,20b	21,16b	23,49a	23,87a	24,35a	

0%, 2,5%, 5%, 7,5% e 10% = Níveis de inclusão da glicerina bruta na MS da dieta. Medias seguidas de letras distintas minúscula na linha e maiúscula na coluna representam diferença pelo teste SNK (P<0,05). CV (%)= 13,79.

[1] Coleta imediatamente anterior ao fornecimento da alimentação.

Percebe-se na tabela 15 que a proporção molar do butirato no rúmen foi alterada quando se variou a percentagem de inclusão de glicerina bruta na dieta, sendo a diferença significativa (P<0,05) a partir da inclusão de 5% de glicerina bruta na matéria seca da dieta. A partir desta percentagem de inclusão, houve uma maior proporção de butirato

Vários estudos têm demonstrado que a fermentação ruminal de glicerol resulta na produção de ácidos graxos voláteis, com produção mais proeminente de propionato e butirato (Hess et al., 2008).

Wang et al. (2009), em estudo realizado com gado Simental alimentados com 60% de palha de milho e 40% de concentrado, observaram que a suplementação com 100, 200 e 300 g/dia de glicerol melhorou o padrão de fermentação ruminal, diminuindo a proporção acetato:propionato, de maneira semelhante com o que ocorreu neste estudo, em que houve uma redução na proporção de acetato e um aumento no propionato quando comparando as dietas com até 10% de inclusão de glicerina bruta com as dietas controle.

Avila et.al., 2006 realizaram um estudo utilizando quantidades crescentes de glicerol submetidas à fermentação *in vitro*, em substituição a grãos de cevada (as quantidades de glicerol utilizadas foram 0, 70, 140 e 210g/kg da matéria seca da dieta). No estudo, como foi observado no presente experimento, a produção total de Ácidos Graxos Voláteis (AGV) não foi alterada pela inclusão de glicerol na dieta. Efeitos do glicerol no perfil de fermentação parecem diferir de acordo com a degradabilidade da dieta. Por exemplo, o glicerol aumentou a produção de AGV quando misturado com celulose, mas não com amido (Remónd et. al., 1993). Wang et. al. (2009) aumentou a concentração de AGV em novilhos adicionando pequenas quantidades de glicerol (1,1; 2,2 e 3,3g/kg MS) a dietas com grande quantidade de volumoso, o que foi principalmente atribuído às concentrações aumentadas de propionato e butirato no AGV total. A substituição da cevada por glicerol aumentou a produção *in vitro* de propionato no estudo, mas não afetou a concentração *in vitro* de metano (CH_4).

No trabalho conduzido por Abo El-Nor et.al., em 2010 utilizado fermentadoras contínuas para avaliar dietas com 0, 36, 72 e 108g gicerol/kg MS (equivalente a 0; 3,6; 7,2; e 10,8 % glicerol na MS) substituindo o milho no concentrado de dietas baseadas em feno de alfafa e concentrado, foi observado que além de não ter havido efeito no pH e N-NH_3 com a inclusão de glicerol, a proporção molar de acetato diminuiu, enquanto que a proporção de butirato aumentou nas dietas com glicerol, assim como foi

observado no presente estudo. O aumento da proporção molar de butirato ao se utilizar glicerol foi também encontrado nos estudos de outros pesquisadores (Czerkawski e Breckenridge, 1972; Rémond et al., 1993; Wang et al., 2009), que mostraram que o propionato e butirato foram os ácidos graxos de cadeia curta principais da fermentação de glicerol.

3.3. Taxa de Passagem de líquidos

Os parâmetros encontrados com a utilização do indicador Co-EDTA aplicado ao modelo matemático de Colucci, 1990 para a cinética ruminal da fase líquida estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16: Parâmetros da cinética de fluxo de líquido no trato gastrointestinal de novilhas mestiças consumindo dietas contendo níveis crescentes de glicerina bruta em substituição ao milho estimados pelo indicador Co-EDTA.

	Tratamentos					
Parâmetros	0%	2,5%	5%	7,5%	10%	CV
VR	81,66	92,94	90,51	93,91	98,75	3,03
TMR	9,01	9,41	8,79	9,05	9,81	6,61
TxR	2,69	2,57	2,76	2,66	2,49	6,9
Tx Fluxo	9,14	9,94	10,44	10,41	10,18	11,41
Tx Passagem	11,23	10,71	11,51	11,10	10,39	6,92

0%, 2,5%, 5%, 7,5% e 10% = Níveis de inclusão da glicerina bruta na MS da dieta. VR - Volume ruminal (L); TMR - Tempo médio de retenção; TR – Tempo de reciclagem (horas); TxR – Taxa de reciclagem (vezes/dia); Tx Fluxo – Taxa de Fluxo (L/hora); Tx Passagem – Taxa de passagem da fase líquida (%/hora). As médias analisadas não foram significativas para o teste de Tukey (P>0,05).

Tabela 17: Equações de regressão (ER) para a estimativa da concentração do indicador Co-EDTA no líquido ruminal em função dos níveis crescentes de glicerina bruta na dieta, com os respectivos coeficientes de determinação (R^2)

	Indicador	
Tratamentos	ER*	R^2
0%	$Y_{Co} = 33,77 \cdot e^{(-0,115.t)}$	0,97
2,5%	$Y_{Co} = 27,71 \cdot e^{(-0,108.t)}$	0,96
5%	$Y_{Co} = 26,61 \cdot e^{(-0,103.t)}$	0,95
7,5%	$Y_{Co} = 28,33 \cdot e^{(-0,109.t)}$	0,96
10%	$Y_{Co} = 27,41 \cdot e^{(-0,103.t)}$	0,95

*Equações derivada do modelo de Colucci (1984) onde t representa o tempo em horas

Grãos de cereais são protegidos por uma matriz proteica com função estrutural, que está densamente concentrada no endosperma vítreo, especialmente no grão de milho (Van Soest, 1994). Essa estrutura no milho dificulta a degradação e diminui a digestibilidade do amido no rúmen quando comparado com outros cereais (McAllister et al., 1990).

Krehbiel (2008) sugere que a velocidade de desaparecimento de glicerol no rúmen aumenta em animais previamente adaptados, como foi o caso este experimento. Seria provável que a inclusão de glicerina bruta em substituição do milho na dieta afetasse a cinética ruminal do animal, aumentando a taxa de passagem e reduzindo o volume ruminal e a taxa e reciclagem, devido a sua fórmula física e química distinta do grão de milho, no entanto isso não aconteceu. Este resultado foi semelhante ao que foi observado no experimento de Serrano, 2011, onde a taxa de passagem de líquidos, o volume ruminal , o tempo de retenção e a taxa de reciclagem não foram influenciados pelos níveis de glicerina bruta na dieta. Seus valores médios foram de 10,8%/h, 78,8L, 9,6h e 2,6 vezes/dia, respectivamente.

3.4. Taxa de passagem de sólidos

Os parâmetros encontrados para a cinética ruminal da fase sólida utilizando-se o indicador Cromo mordente estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18: Parâmetros da cinética de fluxo de partículas no trato gastrointestinal de novilhas, consumindo dietas contendo níveis crescentes de inclusão de glicerina bruta , segundo estimativas obtidas pelo modelo de Grovum e Williams (1973) com os respectivos coeficientes de variação (CV).

	Tratamentos					
Parâmetros	**0%**	**2,5%**	**5%**	**7,5%**	**10%**	**CV%**
k_1	2,7	3,5	3,0	3,1	2,5	0,27
k_2	7,3	6	5,4	4,9	7,9	0,33
TT	8,4	10,7	7,8	7,8	10,5	33,6
TRR	37,2	28,8	32,5	34,4	57,3	56,9
TRPOS	$15,8^{ab}$	$16,3^{ab}$	$18,8^{ab}$	$20,1^{a}$	$12,5^{b}$	31,03
TMR	61,5	55,8	59,0	62,3	80,8	33,0

0%, 2,5%, 5%, 7,5% e 10% = Níveis de inclusão da glicerina bruta na MS da dieta

[1]k_1- Taxa de passagem no rúmen (%/h); k_2- Taxa de passagem no ceco e cólon (%/h); TT – Tempo de trânsito (h); TRR - Tempo médio de retenção no rúmen (h); TRPOS - Tempo médio de retenção no pós-rúmen (h); TMR - Tempo médio de retenção no trato gastrointestinal (h). Médias seguidas de letras distintas na linha representam diferença pelo teste t ($p<0,05$).

A substituição do milho da dieta por glicerina bruta, até o valor de 10% de inclusão na matéria seca, não foi acompanhada de mudanças significativas na taxa de passagem de sólidos. Foi observada uma redução no tempo médio de retenção no pós rúmen quando se forneceu a dieta com 10% de inclusão de glicerina bruta na matéria seca, em relação à dieta de 7,5%.

Os parâmetros biológicos da cinética de fluxo de partículas das dietas, estimados em função dos níveis de glicerina bruta, a partir dos modelos de Grovum e Williams (1973) apresentaram-se dentro da faixa de valores relatados por Lopes et al. que foram dados retirados de um experimento de vacas mestiças so regime de pastagem de capim elefante (2003), a saber, de 2,1 a 4,1%/h para k_1, e de 3,9 a 11,3%/h para k_2.

Tabela 19: Equações de regressão (ER) para a estimativa da concentração do indicador (Cr-mordente) nas fezes em função dos níveis crescentes de glicerina bruta na dieta, com os respectivos coeficientes de determinação (R^2)

	Indicador Cr mordente	
Tratamentos	ER*	R^2
0%	$Y_{Cr} = 708,4 \cdot e^{[-0,0269(t-8,5916)]} - 708,4 \cdot e^{[-0,073(t-8,5916)]}$	0,96
2,5%	$Y_{Cr} = 527,3 \cdot e^{[-0,0354(t-8,7437)]} - 527,3 \cdot e^{[-0,06(t-8,7437)]}$	0,94
5%	$Y_{Cr} = 729,6 \cdot e^{[-0,0306(t-7,8892)]} - 729,6 \cdot e^{[-0,0536(t-7,8892)]}$	0,96
7,5%	$Y_{Cr} = 3040,5 \cdot e^{[-0,0306(t-7,9375)]} - 3040,5 \cdot e^{[-0,0493(t-7,9375)]}$	0,95
10%	$Y_{Cr} = 490,5 \cdot e^{[-0,0251(t-9,4749)]} - 490,5 \cdot e^{[-0,0788(t-9,4749)]}$	0,95

*Equações derivada do modelo de Grovum e Wiliams(1973), onde t representa o tempo em horas.

O ajuste do modelo de Grovum e Williams (1973) apresentados na (Tabela 18) demonstram que os dados geraram valores de R2 bastante consistentes, todos acima de 94%. De acordo com Owens e Hanson (1992), a não-adequação do ajuste dos parâmetros matemáticos aos componentes fisiológicos pode prejudicar o conhecimento da fisiologia de passagem da dieta pelo trato gastrintestinal, a segregação de subcomponentes da digesta e o comportamento do marcador.

A taxa de passagem do alimento no rúmen é uma variável de grande importância, pois determina o fluxo da digesta pelo trato digestivo. A taxa de passagem do alimento no rúmen é importante também na regulação do consumo, pois, afeta a utilização de nutrientes, por estar diretamente relacionada ao efeito de enchimento físico do rúmen, influencia o consumo voluntário de alimentos e, por conseguinte, a produtividade animal (Van Soest, 1994).

Ao trabalharem com vacas leiteiras que receberam dieta baseada em silagens de milho e de alfafa (83% da MS) e suplemento concentrado composto basicamente por milho laminado e farelo de soja, Colucci et al. (1982) relataram taxas de passagem ruminal k_1e k_2 ruminal, respectivamente, de 6,83 e 15,44 %/h. O valor médio observado neste experimento para k1 foi de 3,0 e k2 6,0, inferiores aos valores observados por Colucci e colaboradores. No entanto, a ausência de diferença significativa entre os parâmetros ruminais de taxa de passagem de sólidos entre a dieta controle e as dietas com inclusão crescente de glicerina bruta demonstram que a baixa taxa de passagem observada não foi efeito da utilização da glicerina bruta.

Segundo Mertens e Ely (1982), as cinéticas de trânsito estariam relacionadas, principalmente, ao nível de consumo, à forma física da dieta, às diferenças na ruminação entre animais, ao tipo de marcador utilizado na determinação da curva de excreção fecal, à relação volumoso:concentrado e aos fatores climáticos. Shingfield et al., (2008), verificaram que à medida que aumentava o teor de óleo vegetal, reduzia ($P<0,05$) o k1.

3.5. LIPE® LÍQUIDO

O indicador LIPE® LÍQUIDO é derivado do indicador de fase sólida LIPE®, e foi fornecido aos animais da mesma maneira que o Co-EDTA. Os resultados das leituras deste indicador foram aplicados , como foi feito com o Co-EDTA, ao modelo de Faichney (1975) e ao modelo de Colluci (1990) e estão dispostos nas tabelas 20 e 21:

Quando se utilizou o modelo de Collucci para o LIPE® LÍQUIDO, foi percebido que os parâmetros indicavam um longo tempo de retenção da digesta no rúmen, taxas de passagem baixas, baixa taxa de fluxo e de reciclagem, além de um baixo valor de R^2 das equações. O único parâmetro que teve um Coeficiente de Variação baixo, e mostrou valores mais próximos do esperado foi o Volume Ruminal, como demonstrado nas tabelas:

Tabela 20: Parâmetros da cinética do conteúdo da digesta no trato gastrointestinal de novilhas, consumindo dietas contendo níveis crescentes de inclusão de glicerina bruta , segundo estimativas fornecidas pelo indicador em fase experimental LIPE® LÍQUIDO, aplicado ao modelo de Collucci (1990).

	Tratamentos					
Parâmetros	**0%**	**2,5%**	**5%**	**7,5%**	**10%**	**CV**
VR	57,50	57,28	57,78	56,48	56,55	2,4
TMR	296,36	315,57	296,14	253,65	221,92	35,28
TxR	0,092	0,084	0,090	0,102	0,120	44,28
Tx Fluxo	0,212	0,200	0,216	0,248	0,282	41,92
Tx Passagem	0,372	0,348	0,380	0,440	0,498	43,53

0%, 2,5%, 5%, 7,5% e 10% = Níveis de inclusão da glicerina bruta na MS da dieta. VR - Volume ruminal (L); TR – Tempo de reciclagem (horas); TxR – Taxa de reciclagem (vezes/dia); Tx Fluxo – Taxa de Fluxo (L/hora); Tx Passagem – Taxa de passagem da fase líquida (%/hora). Médias iguais pelo teste F ($p>0,05$)

Tabela 21: Equações de regressão (ER) para a estimativa da concentração do indicador (LIPE® LÍQUIDO) no líquido ruminal em função dos níveis crescentes de glicerina bruta na dieta, com os respectivos coeficientes de determinação (R^2)

	Indicador	
Tratamentos	ER*	R^2
0%	$Y_{Co} = 35,15 \cdot e^{(-0,0036.t)}$	0,14
2,5%	$Y_{Co} = 35,38 \cdot e^{(-0,0027.t)}$	0,51
5%	$Y_{Co} = 35,02 \cdot e^{(-0,0031.t)}$	0,29
7,5%	$Y_{Co} = 35,52 \cdot e^{(-0,0042.t)}$	0,38
10%	$Y_{Co} = 35,28 \cdot e^{(-0,0045.t)}$	0,27

*Equações derivada do modelo de Colucci (1984) onde t representa o tempo em horas

Os resultados obtidos com o indicador LIPE® LÍQUIDO foram portanto aplicados ao modelo matemático de Faichney, onde mostraram valores mais próximos da normalidade, como pode ser observado na tabela 22:

Tabela 22: - Parâmetros da cinética do conteúdo da digesta no trato gastrointestinal de novilhas, consumindo dietas contendo níveis crescentes de inclusão de glicerina bruta , segundo estimativas fornecidas pelo indicador em fase experimental Lipe, aplicado ao modelo de Faichney (1975)

	Tratamentos					
Parâmetros	**0%**	**2,5%**	**5%**	**7,5%**	**10%**	**CV**
TT	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5	-
Tx Pass Lipe	10,65	10,65	10,65	10,65	10,65	4,0
TMR Lipe	9,41	9,41	9,41	9,41	9,41	4,5

0%, 2,5%, 5%, 7,5% e 10% = Níveis de inclusão da glicerina bruta na MS da dieta
TMR - Tempo médio de retenção no trato gastrointestinal (h).); Tx Pass – Taxa de passagem da fase líquida (%/hora). , TT - Tempo de trânsito. Médias iguais pelo teste F (p>0,05)

Dado o aparente insucesso da aplicação do LIPE® LÍQUIDO ao modelo de Colucci (1990) o indicador foi aplicado a outro modelo matemático utilizado para estimar a cinética ruminal. Para efeitos de comparação, o Co-EDTA também foi submetido ao mesmo modelo. As médias obtidas com o indicador LIPE® LÍQUIDO e Co-EDTA aplicados ao modelo de Faichney (1975) podem ser visualizadas nas tabela 23 e 24, que mostram os resultados obtidos dos parâmetros Tempo médio de retenção e Taxa de passagem, respectivamente:

Tabela 23: Tempo médio de retenção no tratogastrointestinal em novilhas leiteiras alimentadas com diferentes níveis de inclusão de glicerina bruta, estimadas pelos indicadores (modelo de Faichney, 1975) e Co-EDTA (modelo de Colucci, 1990)

	Tratamentos					
TMR	**0%**	**2,5%**	**5%**	**7,5%**	**10%**	**Média**
LIPE® LÍQUIDO	10,65	10,42	10,67	10,42	10,19	10,47A
Co-EDTA	9,02	9,41	8,76	9,05	9,81	9,21B
Média	9,84	9,92	9,72	9,74	10,00	

0%, 2,5%, 5%, 7,5% e 10% = Níveis de inclusão da glicerina bruta na MS da dieta
TMR - Tempo médio de retenção no trato gastrointestinal (h).). Medias seguidas de letras distintas na coluna representam diferença pelo teste de Fisher (P<0,05). CV (%)= 7,42.

Tabela 24: Taxas de passagem em novilhas leiteiras alimentadas com diferentes níveis de inclusão de glicerina bruta, estimadas pelos indicadores LIPE® LÍQUIDO (modelo de Faichney, 1975) e Co-EDTA (modelo de Colucci, 1990)

	Tratamentos					
Tx Passagem	**0%**	**2,5%**	**5%**	**7,5%**	**10%**	**Média**
LIPE® LÍQUIDO	9,41	9,61	9,43	9,62	9,81	9,58 B
Co-EDTA	11,23	10,71	11,51	11,1	10,39	10,99 A
Média	10,32	10,16	10,47	10,36	10,10	

0%, 2,5%, 5%, 7,5% e 10% = Níveis de inclusão da glicerina bruta na MS da dieta; Tx Pass – Taxa de passagem (%/hora). Medias seguidas de letras distintas na coluna representam diferença pelo teste de Fisher (P<0,05). CV (%)= 7,42.

Ao comparar os resultados do tempo médio de retenção e taxa de passagem obtidos pelo Co-EDTA e LIPE® LÍQUIDO, observa-se que os valores foram próximos, mas que houve diferença significativa(P<0,05) nos parâmetros estimados. Isso poderia ser indicativo de duas circunstâncias: ou os dois indicadores têm dinâmicas diferentes, ou o Lipe Líquido não se aplica ao modelo de Faichney.

Com intuito de verificar esta dinâmica, uma das observações mais pertinentes quanto ao comportamento do LIPE® LÍQUIDO foi observada durante o processamento dos dados para aplicação no modelo matemático de Colucci (1990) Amostras desta observação podem ser observadas nas figuras 3 e 4:

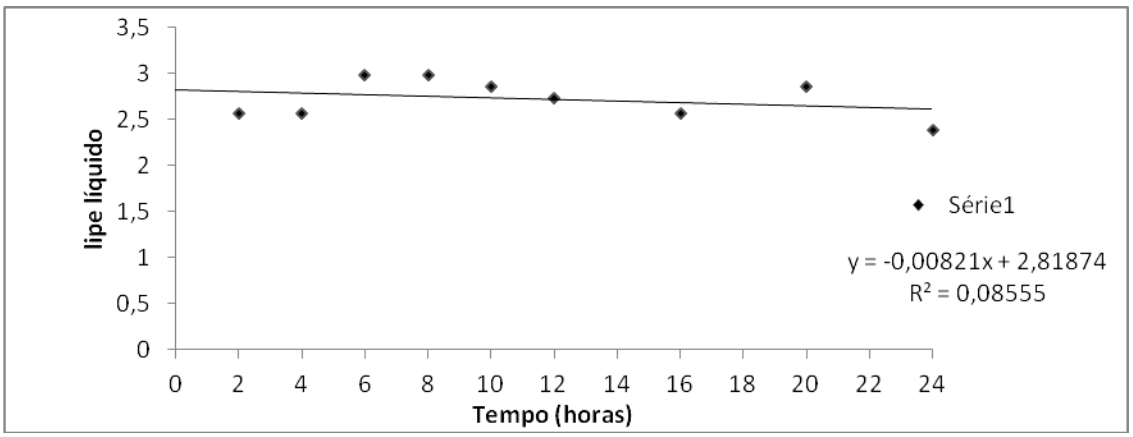

Figura 3: Gráfico de dispersão com linha de tendência e equação de regressão dos valores obtidos com o indicador LIPE® LÍQUIDO ao longo dos tempos de coleta do animal 860, durante o período 1, sob dieta controle.

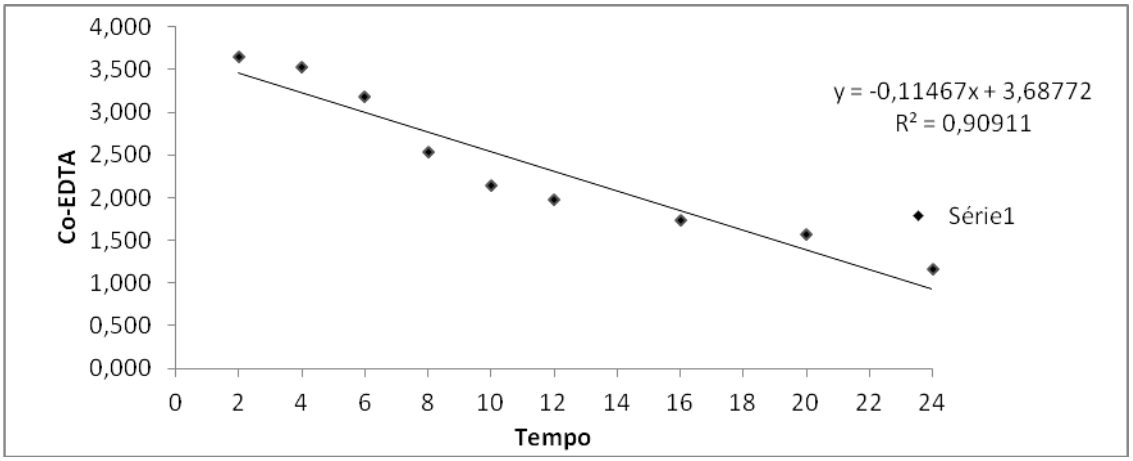

Figura 4: Gráfico de dispersão com linha de tendência e equação de regressão dos valores obtidos com o indicador Co-EDTA ao longo dos tempos de coleta do animal 860, durante o período 1, sob dieta controle

Nos dois gráficos de dispersão é mostrada a quantidade do indicador no liquido ruminal ao longo dos tempos de coleta, e estas medidas se referem ao mesmo animal, no mesmo período, submetido à dieta controle. Enquanto o indicador Co-EDTA seguiu a tendência habitualmente observada quando se utiliza indicadores em dose pulso, o LIPE® LÍQUIDO teve uma tendência de permanecer constante no líquido ruminal. Uma hipótese mais clara foi levantada em relação ao comportamento do indicador LIPE® LÍQUIDO:

É possível que o indicador tenha mantido sua qualidade original de ter a afinidade pela porção sólida da digesta, particularmente a fração fibrosa do alimento, o que explicaria os valores obtidos pelo modelo de Faichney (1975); Os valores obtidos no modelo de Colucci (1990) dos tempo de retenção foram extremamente altos, mas ao observar o comportamento do indicador ao longo do tempo. Verificou-se que este realmente permaneceu constante na digesta ruminal (*steady state*), portanto o resultado obtido pelo modelo de Colucci, apesar de incomum, não estava incorreto.

O aparecimento do marcador quando fornecido em dose pulso segue o padrão de estabilidade, seguida de aumento até um máximo atingido e em seguida um declínio assintótico. O LIPE® LÍQUIDO permaneceu na fase de estabilidade. Isso pode indicar que o intervalo de tempo de coletas não foi suficientemente grande para que se fosse percebido o seu declínio na digesta ruminal. Quando se utiliza um indicador de fase sólida, há um longo período de coleta devido à dinâmica da fase sólida. Para o Cr-mordente, neste experimento, foram 144 tempos de coleta ao longo de 5 dias, enquanto que no LIPE® LÍQUIDO foram somente 10 tempos de coleta ao longo de 24 horas.

Para visualização dos dados desta hipótese, compara-se a curva do indicador LIPE® LÍQUIDO ao longo dos tempos de coleta com a curva do Cromo mordente ao longo das primeiras 24 horas de coleta.

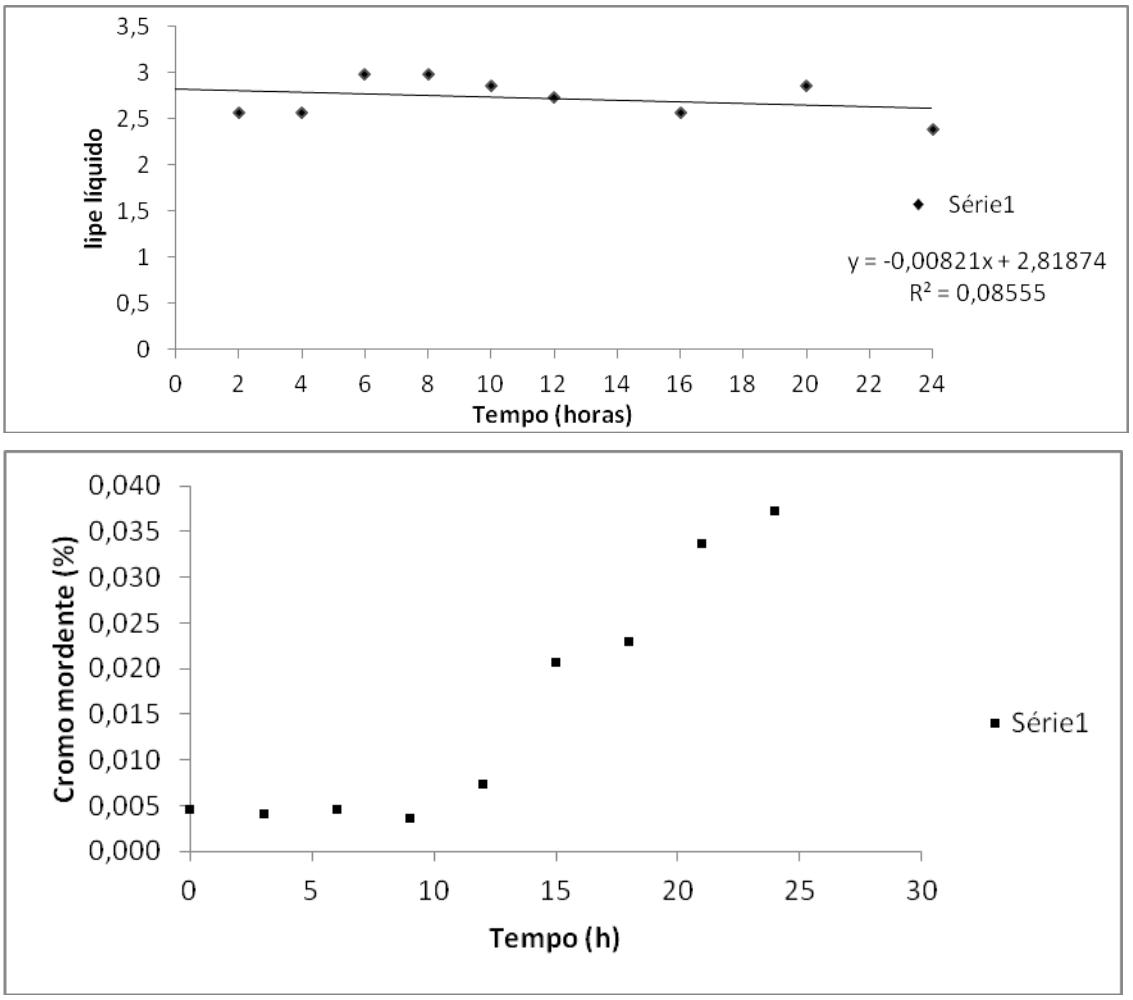

Figura 5: Visualização dos dados de concentração do indicador ao longo dos tempos de coleta dos indicadores LIPE® LÍQUIDO e Cromo mordente, no animal 860 submetido à dieta controle durante o primeiro período do experimento.

A curva completa do indicador Cromo mordente é visualizada na figura 6:

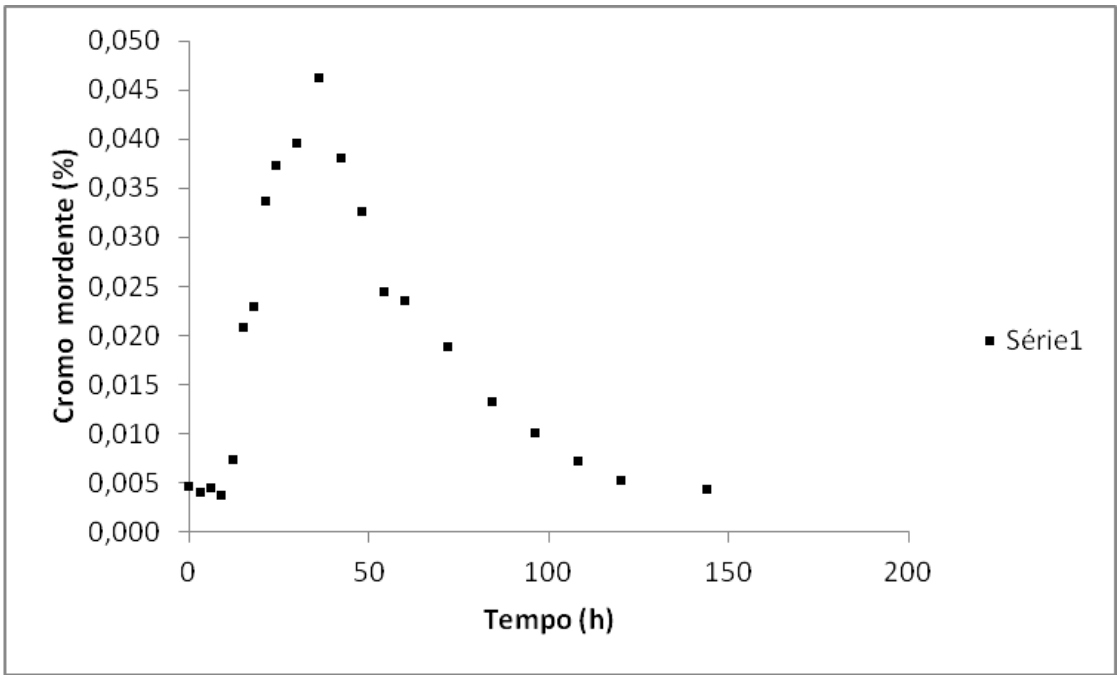

Figura 6: Concentração do cromo ao longo do tempo (Indicador Cromo mordente) até a última coleta (144 horas)

Com base nas figuras pode-se visualizar que ao observar somente as primeiras 24 horas de coleta utilizando-se o indicador cromo mordente, na primeira metade dos tempos o indicador permaneceu constante na sua excreção, aproximando-se do observado com as 24 horas de coleta utilizando-se o LIPE® LÍQUIDO.

O declínio assintótico só é observado na curva do cromo a partir de 36 horas de coleta. Portanto é possível inferir que a estabilidade observada do indicador LIPE® LÍQUIDO pode ser devida a um longo período do steady-state antes do indicador começar a ser excretado.

3.6 Estimativas do volume ruminal

No experimento, foi feito o esvaziamento ruminal dos animais, que serviu como referência para as estimativas do volume ruminal fornecida pelos indicadores LIPE® LÍQUIDO e Co-EDTA. Apesar do Co-EDTA ser um indicador bastante difundido nas pesquisas com animais, poucos estudos foram realizados com intuito de validar o indicador comparando suas estimativas com o volume ruminal real. Os dados referência do volume ruminal, obtidos pelo esvaziamento ruminal, foram comparados com as

estimativas dadas pelos indicadores utilizados no experimento, como pode ser visualizado nas tabelas 25, 26 e 27:

Tabela 25: Volume ruminal da digesta total e estimativas pelos indicadores LIPE® LÍQUIDO e Co-EDTA em novilhas leiteiras recebendo dietas com diferentes níveis de inclusão de glicerina bruta.

	Tratamentos					
VR	**0%**	**2,5%**	**5%**	**7,5%**	**10%**	**Média**
Referência	77,4	80,46	75,4	80,2	81,42	78,98 B
LIPE® LÍQUIDO	59,17	59,66	58,84	58,35	58,9	58,98 C
Co-EDTA	81,66	92,94	90,51	93,91	98,75	91,55 A
Média	72,74	77,69	74,92	77,49	79,69	

0%, 2,5%, 5%, 7,5% e 10% = Níveis de inclusão da glicerina bruta na MS da dieta; VR (volume ruminal em litros obtido pelos diferentes métodos. Medias seguidas de letras distintas na coluna representam diferença pelo teste SNK (P<0,05). CV (%)= 10,25.

Tabela 26: Volume ruminal da fração líquida e estimativas pelos indicadores LIPE® LÍQUIDO e Co-EDTA em novilhas leiteiras recebendo dietas com diferentes níveis de inclusão de glicerina bruta.

	Tratamentos					
VR líquido	**0%**	**2,5%**	**5%**	**7,5%**	**10%**	**Média**
Esvaziamento	24,6	25,8	24,7	20,2	22,4	23,54 C
LIPE® LÍQUIDO	59,17	59,66	58,84	58,35	58,9	58,98 B
Co-EDTA	81,66	92,94	90,51	93,91	98,75	91,55 A
Média	55,14	59,47	58,02	57,49	60,02	

0%, 2,5%, 5%, 7,5% e 10% = Níveis de inclusão da glicerina bruta na MS da dieta; VR (volume ruminal em litros obtido pelos diferentes métodos. Medias seguidas de letras distintas na coluna representam diferença pelo teste SNK (P<0,05). CV (%)= 12,40.

Tabela 27: Volume ruminal da fração sólida e estimativas pelos indicadores LIPE® LÍQUIDO e Co-EDTA em novilhas leiteiras recebendo dietas com diferentes níveis de inclusão de glicerina bruta.

	Tratamentos					
VR sólido	**0%**	**2,5%**	**5%**	**7,5%**	**10%**	**Média**
Esvaziamento	54,8	54,7	63,9	56,56	49,76	55,94 B
LIPE® LÍQUIDO	59,17	59,66	58,84	58,35	58,9	58,98 B
Co-EDTA	81,66	92,94	90,51	93,91	98,75	91,55 A
Média	65,21	69,10	71,08	69,61	69,14	

0%, 2,5%, 5%, 7,5% e 10% = Níveis de inclusão da glicerina bruta na MS da dieta; VR (volume ruminal em litros obtido pelos diferentes métodos. Medias seguidas de letras distintas na coluna representam diferença pelo teste SNK ($P<0,05$). CV (%)= 11,89.

Nas tabelas 26 e 27, pode-se observar os valores de VR líquido e sólido obtidos com o método de referência e com os indicadores Co-EDTA e LIPE® LÍQUIDO .

O que se observou foi a similaridade entre os valores obtidos com o método de esvaziamento ruminal e com o LIPE® LÍQUIDO, e o indicador Co-EDTA superestimando o volume ruminal da fração sólida da digesta. Estes resultados reforçam a hipótese sugerida para o comportamento do indicador experimental LIPE® LÍQUIDO como indicador de fase sólida, e encorajam futuros testes mais minuciosos para sua validação.

No presente experimento, a utilização do Co-EDTA em conjunto com o indicador experimental LIPE® LÍQUIDO foi essencial principalmente para se ter um método referencial que permitisse a certeza de fornecimento e coletas bem sucedidas, estabelecendo uma curva de recuperação do indicador ao longo do tempo que fosse condizente com a literatura, portanto descartando a possibilidade de erros em várias partes dos procedimentos.

A utilização de indicadores para estimar parâmetros ruminais sempre foi feita relevando-se a alta variação das respostas zootécnicas, as possibilidades de falhas como a não-homogeinização do indicador na digesta ruminal, e também a sua afinidade por frações específicas da digesta. O Co-EDTA vem sido utilizado quase sem questionamento quanto à sua real afinidade pelas frações da digesta, com poucos estudos dedicados à sua validação. Há alguns relatos na literatura sobre o Co-EDTA superestimar o volume ruminal (Burger et al., 2000; Daniel et al., 2007). No entanto, a inexatidão a níveis estatísticos não invalida a utilização do Co-EDTA em experimentos com animais. A literatura fornece uma grande quantidade de estudos utilizando o Co-

EDTA, o que permite a eficiente comparação dos resultados obtidos em vários diferentes experimentos, que não seriam prejudicados com um maior aprofundamento na natureza da interação dos indicadores com a digesta.

A observação do sucesso do LIPE® LÍQUIDO em estimar o volume ruminal sólido também foi uma resolução para o aparente paradoxo que ocorreu quando o indicador foi aplicado ao modelo matemático de Colucci. Enquanto todos os outros parâmetros apresentaram valores aparentemente anormais, fenômeno posteriormente explicado pelo tempo limitado de coletas do indicador, que permitiu a observação somente da sua fase de estabilidade, o parâmetro Volume Ruminal permaneceu bastante normalizado, com Coeficiente de Variação baixo. Isso ocorreu pois este é o único valor no modelo matemático que não é calculado de maneira tempo-dependente. Portanto pode-se dizer que modelo e indicador não são incompatíveis, e em pesquisas futuras o LIPE® LÍQUIDO ainda pode ser aplicado às fórmulas de Colucci(1990)

3.7 Considerações finais:

Na literatura ainda há uma carência de estudos que fizeram a análise da cinética digestiva em animais alimentados com glicerina bruta e glicerol, de forma que são recomendados mais experimentos com estas substâncias, e também com percentagens de inclusão mais extremas, para que se tirem mais conclusões sobre o efeito da glicerina bruta nestes parâmetros ruminais.

Embora o experimento tenha utilizado novilhas leiteiras mestiças, que não estavam, portanto, com uma produção viável de ser medida como ocorre com a mensuração de produção de leite ou de carne, é importante avaliar a viabilidade financeira da substituição do milho pela glicerina bruta em bovinos. Recomenda-se que mais estudos sejam feitos com animais em plena produção para que se possa avaliar o impacto econômico da substituição do milho por glicerina bruta.

4. Conclusões

A glicerina bruta em percentagens de inclusão de até 10% da matéria seca da dieta de novilhas leiteiras submetidas a dieta baseada em silagem de milho, não causou alterações na ingestão de matéria seca dos animais. Não foram observados efeitos deletérios no ambiente ruminal dos animais. Alterações no perfil de ácidos graxos voláteis observadas foram um aumento na proporção de butirato, acompanhado de um declínio na proporção de acetato. O pH e o Nitrogênio amoniacal permaneceram estabilizados e dentro de parâmetros normais para bovinos sob todos os tratamentos.

A cinética tanto de líquidos como de sólidos não demonstrou alteração entre a dieta controle e as dietas com até 10% de glicerina bruta, demonstrando que não houve alteração na cinética digestiva dos animais induzida pela inclusão do alimento.

Resultados observados com o indicador experimental LIPE® LÍQUIDO apontam para uma provável utilização como indicador da cinética da fase sólida da digesta, mas serão necessários mais experimentos.

5. Referências Bibliográficas

ABDALLA, Adibe Luiz et al. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. *R. Bras. Zootec.* [online]. 2008, vol.37, n.spe, pp. 260-268. ISSN 1806-9290.

ABO EL-NOR, S.; ABUGHAZALEH, A.A.; POTU, R.B. et al. *Effects of differing levels of glycerol on rumen fermentation and bacteria.* Animal Feeds Science and Technology, v.162, p.99-105, 2010.

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

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS E BIOCOMBÚSTÍVEIS - ANP. Disponível em: http://www.anp.gov.br. Acesso em 21 de outubro de 2012

AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL. *Energy and protein requeriments of ruminants.* Wallingford: CAB International, 1993. 159p.

AITCHISON, E., GILL, M., FRANCE, J. et al. 1986. *Comparison of methods to describe the kinetics of digestion and passage of fibre in sheep*. J. Sci. Food Agric., 37:1065-1072.

ALLEN, M.S.; MERTENS, D.R. *Evaluating constraints on fiber digestion by rumen microbes*. Journal of Nutrition, Bethesda, v .1 18, p.261-270, 1988.

AOAC (1999). *Method of analysis. Association of Analytical Chemists* 16th Edition pp. 440-446.

AROEIRA, L. J. M. Estimativas de consumo de gramíneas tropicais. In: Simpósio internacional de digestibilidade em ruminantes, 1997, Lavras Anais...Lavras: UFLA-FAEPE, 1997. p. 127-163.

ASSIS, F. A. Respostas fisiológicas e produtivas de vacas de leite sob pastejo suplementadas ou não com volumoso em cochos sombreados no período mais quente do dia durante o verão. 2005. 31p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG

AVILA, J.S.; CHAVES, A.V.; HERNANDEZ-CALVAB, M.; BEAUCHEMIN, K.A.; MCGINN, S.M.; WANG, Y.; HARSTADD, 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.* Animal Feed Science and Technology 166– 167 (2011) 265– 268. Sydney, NSW, 2006, Australia

AVILA-STAGNO, J.; CHAVES, A. V.; HE, M. L.; HARSTAD, O. M.; BEAUCHEMIN, K. A.;. MCGINN, S. M.; e MCALLISTER, T. A. *Effects of*

increasing concentrations of glycerol in concentrate diets on nutrient digestibility, methane emissions, growth, fatty acid profiles and carcass traits of lambs. J ANIM SCI jas.2012-5215; publicado antes da impressão November 12, 2012

BEAUCHEMIN, K.A.; BUCHANAN-SMITH, J.G. *Evaluation of markers, sampling sites and models for estimating rates of passage of silage or hay in dairy cows*. Anim. Feed Sci. Technol., *v*.27, p.59-75, 1989.

BERCHIELLI, T. T.; RODRIGUEZ, N. M.; GONÇALVES, L.C. Polietileno glicol e Cobalto-EDTA como marcadores da fase líquida ruminal. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 48, n. 4, p. 463-471, 1996.

BERCHIELLI, T.T.; GARCIA, A.V.; OLIVEIRA, S.G. Principais técnicas de avaliação aplicadas em estudos de nutrição. In: BERCHIELLI, T.T.; PIREZ, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Eds.) Nutrição de ruminantes. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 583p.

BERCHIELLI, T.T.; OLIVEIRA, S.G.; GARCIA, A.V. Considerações sobre os principais indicadores utilizados em estudos de nutrição com ruminantes. Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR, 8(2): p. 205-211, 2005.

BERGMAN, E.N. *Energy contribution of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species.* Physiol. Rev., v.70, p.567-590, 1990.

BERGNER, H., C. KIJORA , Z. CERESNAKOVA, and J. SZAKACS. 1995 *In vitro studies on glycerol transformation by rumen microorganisms.* Arch Tierernahr. 48:245-256.

Binnerts, W. T., A. T. van't Klooster and A. M. Frens.1968. *Soluble chromium indicator measured by atomic absorption in digestion experiments.* Vet. Rec. 82:470.
biodiesel/pnpb.html> Acesso em 21 de outubro 2012.

BLACK, J.L. 1990. *Nutrition of the grazing ruminant.* Proc. New Zel. Soc. Prod.,50: 07-27.

BORGES, A.L.C.C. 1999. Controle da ingestão de alimentos. *Cad. Técn. Esc. Vet. UFMG*, 21: 67-69.

BRISSON, D., M.-C. VOHL, J. ST-PIERRE, T. J. HUDSON, AND D. GAUDET. *2001. Glycerol: A neglected variable in metabolic processes?* Bioessays 23:534–542.

BÜRGER, P.J., PEREIRA, J.C., DA SILVA, J.F.C., FILHO, S.C.V., CECON, P.R., JORDÃO, C.P., BRAZ, S.P. Taxas de Passagem e Cinética da Degradação Ruminal em Bezerros Holandeses Alimentados com Dietas Contendo Diferentes Níveis de Concentrado. Rev. bras. zootec., 29(1):225-235, 2000

BURNS, J.C., POND, K.R., FISHER, D.S. 1994. *Measurement of forage intake*. In: FAHEY JR., G.C. (Ed.) *Forage quality, evaluation, and utilization*. Winsconsin: American Society of Agronomy. p.494-532.

CARVALHO, E.R.; SCHMELZ-ROBERTS, N.S.; WHITE, H.M.; DOANE, P.H.; DONKIN, S.S. *Replacing corn with glycerol in diets for transition dairy cows*. Journal of Dairy Science 2011;94(2):908e16

CARVALHO, P.L.O. Glicerina bruta na alimentação de suínos. Maringá. 2011. 92p.
CATON, J.S.; DHUYVETTER,D.V. *Influence of energy supplementation on grazing ruminants: Requirements and responses*. Journal of Animal Science, Savoy, v.75, p.533, 1997.
CHIZZOTTI, M.L., et al. Consumo, digestibilidade e excreção de uréia e derivados de purinas em vacas de diferentes níveis de produção de leite. Revista Brasileira de Zootecnia,v.36, n.1, p.138-146. 2007.

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

CHURCH, D. C. *Digestive Physiology and Nutrition of Ruminants*. Vol. 1 - Digestive Physiology. 3. ed. Oxford Press Inc., 1979. p.350

CHURCH, D.C. *The ruminant animal: digestive physiology and nutrition.* Englewood Cliffs: O & Books Inc., 1988. 564p.

CHURCH. The ruminant animal digestive physiology and nutrition.Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, 1988. p. 172-201.

COELHO DA SILVA, J.F.; LEÃO, M.l. Fundamentos de nutrição de ruminantes. Piracicaba: Livroceres, 1979. 380p.

COLUCCI, P. E. *Comparative digestion and digesta kinetics in sheep and cattle*. 1984. 221 f. Thesis (Thesis Animal Science) - University of Guelph.

COLUCCI, P. E.; MACLEOD, G. K.; GROVUM, W. L. et al. Digesta kinetics in sheep and cattle fed diets with different forage to concentrate ratios at high and low intakes. *Journal of Dairy Science*, v.73, p.2143-2156, 1990.

Comunicado do Ipea nº 137 – Biodiesel no Brasil: desafios das políticas públicas para a dinamização da produção. Disponível em: < http://wwwipea.gov .br/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=13354> Acesso em 10 outubro 2012.

COSTA, D. A. Degradabilidade ruminal e parâmetros da fermentação em dietas contendo Silagem de cana-de-açucar e caroço de algodão. 2010. 53 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

COSTA, R.S.; DOS SANTOS, C.A.; DULLIUS, J.E.L. Produção de Biodiesel em Usina Piloto a partir de Óleo de Fritura Usado. V Mostra de Pesquisa da Pós-Graduação. PUCRS, 2010b

CURRAN, M. K.; LEADER, J. D.; WESTON, E. W. *A note on the use of chromic oxide incorporated in a feed to estimate faecal output in ruminants*. Anim. Prod.v. 9, p. 561-564, 1976.

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

D. A. V. SILVA, J. M. B. EZEQUIEL, E. H. C. B. VAN CLEEF. Efeito da glicerina sobre parâmetros físicos e químicos do líquido ruminal e da urina de bovinos de corte. ARS VETERINARIA, Jaboticabal, SP, v.28, n.2, 128-133, 2012.

DANIEL, J. L. P. Funcionalidade do sulco do retículo em bovinos adultos e avaliação de técnicas alternativas para preparação, infusão e coleta de marcadores da fase fluida ruminal. Ciênc. agrotec. [online]. 2007, vol.31, n.6, pp. 1850-1856. ISSN 1413-7054.

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

DETMANN, E. Métodos para análise de alimentos. INCT - Ciência Animal. 214p., 2012

DHANOA, M.S., SIDDONS,R.C., FRANCE, J. et al. 1985. *A multicompartimental model to describe marker excretion patterns in ruminant feaces*. Brit. J. Nut., 53:663-671.

DINIZ, G. De coadjuvante a protagonista: Glicerina bruta obtida na produção de biodiesel pode ter muitas aplicações. *Instituto Ciência Hoje.* 2005.

DOBSON, A.; SELLERS, A. F.; GATEWOOD, V. H. *Absorption and exchange of water across rumen epithelium.* American Journal of Physiology, v. 231, n. 5, p. 1588-1594, Nov. 1976.

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

DONKIN, S.S.; 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 2009;92(10):5111e9.

DOZIER, W.A.; KERR, B.J.; CORZO, A; KIDD, M.T.; WEBER, T.E.; BREGENDAHL, K. *Apparent metabolizable energy of glycerin for broiler chickens*. Poultry Science, Champaign, v. 87, p. 317-322, 2008.

ELAM, N. A., J. T. VASCONCELO, G. HILTON, D. L.VANOVERBEKE, T. E. LAWRENCE, T. H. MONTGOMERY, W. T. NICHOLS, M. N. STREETER, J. P. HUTCHESON, D. A. YATES, AND M. L. GALYEAN. 2009. *Effect of zilpaterol*

hydrochloride duration of feeding on performance and carcass characteristics of feedlot cattle. J. Anim. Sci. 87:2133-2141.

ELLIS, W. C.; LASCANO, C.; TEETER, C. et al. *Solute and particulate flow markers.* In: OWENS, F. N. (Ed.) *Protein requeriments of cattle: Symposium*. Oklahoma: Press, 1980. p. 37-56.

ELLIS, W. C.; WYLIE, M. J.; MATIS J. H. *Validity of specifically applied rare earth elements and compartmental models for estimating flux of undigested plant tissue residues through the gastrointestinal tract of ruminants.* J. Anim. Sci. v. 80, n. 8, p. 2753–2758, 2002.

ERWIN, E.S.; MARCO, G.J.; EMERY, E.M. *Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography*. Journal of Dairy Science, v.44, n.9, p.1768-1771, 1961.

Esplanada dos Ministérios. Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel. Brasília, DF. Disponível em: < http://www.mme.gov.br/programas/biodiesel/menu/ Acesso em: 21 de outubro de 2012.

FAICHNEY G.(1993). *Digesta Flow*. In: *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*. pp 53-85. Cambridge: University Press

FAICHNEY, G. J. (1975). *The use of markers to partition digestion within the gastro-intestinal tract of ruminants*. In *Digestion and Metabolism in the Ruminant,* pp. 277-291 [A. C. I. Warner and I. W. McDonald, editors]. Armidale, NSW: University of New England Publishing Unit

FAICHNEY, G. J. The kinetics of particulates matter in the rúmen. In: MILLIGAN, L. P.; GROVUM, W. L.; DOBSON, A. (Ed.) *Control of digestion and metabolism in ruminants*. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1986. p. 173-195.

FAPRI - *Food and agricultural policy research institute. U.S. and world agricultural Outlook* 2010. Iowa State University and the University of Missouri Columbia.FAPRI Staff Report 10-FSR 1, 418p. 2010p. Iowa State University and the University of Missouri-Columbia.

FÁVARO, V.R. Utilização da glicerina, subproduto do biodiesel, na alimentação de bovinos. Dissertação (Mestrado em Zootecnia).Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal – SP, 2010. 48p

FELIZARDO, P.M.G. Produção de biodiesel a partir de óleos usados de fritura. Relatório de estágio submetido ao Departamento de Engenharia Química para obtenção do grau de Licenciatura em Engenharia Química do Instituto Superior Técnico. Outubro de 2003.

FNBC. Federación nacional de biocombustibles de Colombia 2011. Estadísticas. Disponível em: <http://www.fedebiocombustibles.com/v2/> Acesso em: 20 out. 2012

FONTES, C.A.A.; ALVES, G.R.; PAULINO, M.F. et al. Influência do nível de consumo sobre degradabilidade das partículas e características ligadas à cinética ruminal, em novilhos pastejando capim-elefante. Revista Brasileira de Zootecnia, v.30, n.6s, p.2134-2144,2001

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

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

FRANCE J.; SIDDONS, R.C.; DHAONA, M.S. et al. *Adaptation of compartimental schemes of interpreting isotope dilution data on volatile fatty acids metabolism in the rumen to the non steady state and for single dose injection*. Journal of Theoretical Biology,v.153, n.2, p.247- 254. 1991.

FRANCE, J., SIDDONS, R.C. 1993. *Volatile fatty acids productions* In: FORBES, J.M., FRANCE, J. (Eds.) *Quantitative aspects of ruminal digestion and metabolism*. Cambridge, UK: University Press. p.107-121.

GARTON, G.A., A.K. LOUGH AND E. VIOQUE. 1961. *Glyceride hydrolysis and glycerol fermentation by sheep rumen contents*. J. Gen. Microbiol. 25:215-225.

GOMES, B.V. Influência das características químicas e físicas das forragens sobre o consumo, degradação e cinética da digestão ruminal. Viçosa, MG: UFV, 1991. 106p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1991.

GRACE, N. D.; BODY, D. R. *Short note: the possible use of long chain (C19-C32) fatty acids in herbage as an indigestible faecal marker*. J.Agric.Sci. v. 97, n. 3, p. 743-745, 1981.

GROVUM, W.L., WILLIAMS, V.J. 1973. *Rate of passage of digesta in sheep. 4. Passage of marker through the alimentary tract and the biological relevance of rate-constants derived from the changes in concentrationof marker in faeces*. *Br. J. Nutr.*, 30(1):313-329.

HESS, B. W., S. L. LAKE, AND S. A. GUNTER. 2008. *Using glycerin as a supplement for forage-fed ruminants*. J. Anim. Sci. 86(E-Suppl. 2):392. (Abstr.)

HOBSON, P.N., STEWART, C.S. *The rumen microbial ecosystem*.1ed. London: Blackie Academic and Professional. 1997. 340p.

HOBSONP, N. & MA, S. 0. (1961**).** *The isolation of glycerol-fermenting and lipolytic bacteria from the rumen of the sheep*. J. *gen.* Microbiol. *25, 227.*

HOOVER, W.H.; STOKES, S.R. *Balancing carbohydrates and proteinsfor optimum rumen microbial yield.* Journal of Dairy Science,v.74, p.3630-3644, 1991.

HUHTANEN, P.; ASIKAINEN, U.; ARKKILA, M. et al. *Cell wall digestion and passage kinetics estimated by marker and in situ methods or by rumen evacuations in cattle fed hay 2 or 18 times daily.* Animal Feed Science and Technology, v. 133, p. 206-227, 2007.

HUHTANEN, P.; JAAKKOLA, S.; KUKKINEN, U. *Ruminal plant cell wall digestibility estimated from digestion and passage kinetics utilizing mathematical models.* Anim. Feed Sci. Technol. v. 49, n. 1/2, p. 159-173, 1995.

HUNGATE, R.E. The rumen and its microbes.London, Academic Press, 1966, 533p.

HUNTINGTON, G.B.; ARCHIBEQUE, S.L. *Pratical aspects of urea and ammonia metabolism in ruminants.* Raleigh: American Society Animal Science, 1999. p.1-11.

ITAVO, Luís Carlos Vinhas et al. Avaliação da silagem de bagaço de laranja com diferentes aditivos por intermédio dos parâmetros de fermentação ruminal de ovinos e contribuição energética dos ácidos graxos voláteis**.** Rev. Bras. Zootec.[online]. 2000, vol.29, n.5, pp. 1491-1497. ISSN 1806-9290.

JOHNS, A. T. 1953. *Fermentation of glycerol in the rumen of sheep*. New Zealand J. Sci. Technol. 35:262-269.

KIMURA, F. T.; MILLER, V. L. *Improved determination of chromic oxid in calf feed and feces.* Journal Agriculture Food Chemistry,London, v. 5, n. 2, p. 216, 1957.

KRAMER, T.; MICHELBERGER, T.; GÜRTLER, H.; GÄBEL, G. *Absorption of short-chain fatty acids across ruminal epithelium of sheep.* Journal of Comparative Physiology B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology, Berlin, v. 166, n. 4, p. 262-269, Aug. 1996.

KRAUSE, R. Comunicação pessoal. [s.d, s.l.]. 2004 a Lofrano, R.C.Z. em Uma revisão sobre biodiesel. Pensamento Plural: Revista Científica do Unifae , São João da Boa Vista, v.2, n.2, 2008

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

LAGE, J. F.; PAULINO, P. V. R.; PEREIRA, L. G. R. et al. Glicerina bruta na alimentação de cordeiros em confinamento e seus efeitos sobre o peso e rendimento de cortes comerciais da carcaça. ZOOTEC, 2009.

LAGE, J.F.; PAULINO, P.V.; PEREIRA, L.G.R. et al. Glicerina bruta na dieta de cordeiros terminados em confinamento. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.45, n.9, p.1012-1020, 2010.

LAMMERS, P.; HONEYMAN, M.; KERR, B.J. et al. *Growth and performance of nursery pigs fed crude glycerol*. Ames: Iowa State University Animal Industry Report, 2007a. 3p.

LAMMERS, P.; KERR, B.J.; HONEYMAN, M.; STALDER, K.; DOZIER, W.A.; WEBER, T.E.; KIDD, M.T.; BREGENDAHL, K. *Nitrogen-corrected apparent metabolizable energy value of crude glycerol for laying hens*. Journal of Animal Science, Champaign, v. 87, n. 1, p. 104-107, 2008b.

LAMMERS, P.; KERR, B.J.; WEBER, T.E.; BREGENDAHL, K.; LONERGAN, S.M.; PRUSA, D.U.; AHN, W.C.; STOFFREGEN, W.A.; DOZIER, W.A.; HONEYMAN, M. *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., 2008c.

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

LAMMERS, P.J; HONEYMAN, M.S; BREGENDAHL, K. Iowa State University Animal Industry Report 2007. *Energy Value of Crude Glycerol Fed to Pigs.* A.S. Leaflet R2225

LANA, R.P. Nutrição e alimentação animal (mitos e realidades).Viçosa: UFV, 2005. 344p.

LAPIERRE, H.; LOBLEY, G.E. *Nitrogen recycling in the ruminant*: *a review.* Journal of Dairy Science, v.84(Supl. E), E223- 236, 2001.

LECHNER-DOLL, M., KASKE, M., ENGELHARDT, W. v. (1991a). *Factors affecting the mean retention timeo f paiticles in the forestomachof ruminants and camelids*. In: *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants*T. Tsuda, Y. Saski, R. Kawashima, eds. Academic Press, San Diego, California.

Lei n° 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Disponível em:< http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/Lei/L11097.htm > Acesso em: 21 de outubro de 2012

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

LUGINBUHL, J.M., POND, K.L., BURNS, J.C. et al. *Computer interface system to monitor the ingestive and ruminanting behavior of grazing ruminants*. In: *Grazing livestock nutrition conference,* 2, 1991, Steamboat Springs. *Anais...* Steamboat Springs, Colorado, 1991. p.177.

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

MACHADO, A.S. et al. Utilização de óxido crómico e LIPE® como indicadores externos na estimativa de digestibilidade em ruminantes. PUBVET, Londrina, V. 5, N. 20, Ed. 167, Art. 1124, 2011.

MAENG, W. J.; BALDWIN, R. L. *Dynamics of fermentation of purified diet and microbial growth in the rumen*. Journal of Dairy Science, v. 54, p. 636-642, 1976.

MAYES, R. W; LAMB, C. S.; COLGROVE, P. M. *The use of dosed and herbage n-alcanes as markers for the determination of herbage intake*. J.Agric.Sci. v. 107, n. 1, p. 161-170, 1986.

McAllister, T. A., Gibb, D. J., Beauchemin, K. A. and Wang, Y.2006. *Starch type, structure and ruminal digestion.* In Cattle Grain Processing Symposium. Nov. 15_17, Oklahoma State University, Tulsa, OK.

McCOY, M. Glycerin Surplus - *Plants are closing, and new uses for the chemical are being found.* Chemical & En-gineering News. v. 84, n.6, p.7, fev, 2006,. Disponível em <http://pubs.acs.org/cen/news/84/i06/8406notw3.html?print> .Acesso em 22 de outubro de 2012.

MEHREZ, A.Z., ÆRSKOV, E.R., McDONALD, I. 1977. *Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration.* Br. J. Nutr. 38(3):437-443.

MERCHEN, N. R. *Digestion, absorption and excretion in ruminants*. In: D. C.

MERTENS, D.R. 1993. *Rate and extent of digestion*. In: FORBES, J.M., FRANCE, J. (Eds.) *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism*. Cambridge: Cambridge University Press. p.13-51.

MERTENS, D.R. *Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows.* Journal of Dairy Science, v.80, p.1463-1481, 1997.

MERTENS, D.R.; ELY, L.O. *Relationship of rate and extent of digestionto forage utilization: a dynamic model evaluation.* Journal of Animal Science, v.54, n.4, p.895-905, 1982.

Ministério de Relação Exteriores. Palácio do Itamaraty. *Recursos Renováveis*. Disponível em: <http://www.itamaraty.gov.br/temas/temas-multilaterais/energia-e-biocombustiveis/recursos-renovaveis> Acesso em 21 de outubro 2012.

MOORE, J. E.; SOLLENBERGER, L. E. *Techniques to predict pasture intake*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO ANIMAL EM PASTEJO, 1997, Viçosa, Anais...Viçosa: UFV, 1997, p. 81-96.

MOORE, J.A.; POND, K.R.; POORE, M.H. et al. *Influence of model and marker on digesta kinetic estimates for sheep.* Journal of Animal Science, v.70, p.3526-3540, 1992.

MOTA, C.J.A.; DA SILVA, C.X.A.; GONÇALVES, V.L.C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel.Química Nova, v.32, n.3, p.639-648, 2009.

MOTA, M. F. Desempenho, parâmetros ruminais e taxa de passagem em vacas da raça holandesa em pastagem de *coastcross.* 2006. 148p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá. 2006.

MOTA, M.F. et al. Parâmetros ruminais de vacas leiteiras mantidas em pastagem tropical. Arch. zootec. [online]. 2010, vol.59, n.226, pp. 217-224. ISSN 0004-0592.

NOLAN, J.V. Nitrogen kinetics. In: FORBES, J.M.; FRANCE, J.(Eds.) *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism*. Wallingford: CAB International, 1993. p.123-143.

OLIVEIRA JUNIOR, R. C. et al. Avaliação de indicadores para estimar a digestilidade dos nutrientes em novilhos nelore alimentados com dietas contendo alto teor de concentrado e fontes nitrogenadas. R.Bras.Zootec. v. 33, n. 3, p. 749-758, 2004.

OLIVEIRA, M.V.M., et al. Parâmetros ruminal, sangüíneo e urinário e digestibilidade de nutrientes em novilhas leiteiras recebendo diferentes níveis de monensina. Revista Brasileira de Zootecnia, v.34, n.6, p.2143-2154. 2005.

OLIVEIRA, R. L.; PEREIRA, J. C.; SILVA, P. R. C.; VIEIRA, R. A. M. Degradabilidade ruminal da cama de frango e do feno de capim *coast-cross* e avaliação de modelos matemáticos para estimativa da taxa de passagem de partículas. *R. Bras. Zootec.* [online]. 1999, vol.28, n.4, pp. 839-849. ISSN 1806-9290.

OLUBAJO, F. O.; OYENUGA, V. A. Digestibility of tropical pasture using the indicator technique. J.Agric.Sci. v. 75, n.1, p. 175-181, 1970.

ORSKOV, E. R.; MCDONALD, I. *The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage*. Journal Agricultural Science, Cambridge, v. 92, n. 1, p. 499-508, 1979.

OSUJI, P.P.; NSAHLAI, I.V. KHALILI, H. *Feed evaluation.* International Livestock Centre for Africa. Addis Ababa, Ethipia. November 1993.

OWENS, F. N.; HANSON, C. F. *External and internal markers for appraising site and extent of digestion in ruminants*. J.Dairy Sci. v. 75, n. 9, p. 2605-2617, 1992.

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

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

POND, K.R., ELLIS, W.C., MATIS, J.H., DESWYSEN, A. G. 1989. *Passage of chromium-mordanted and rare earth-labeled fiber: time dosing kinetics*. J. Anim.Sci., 67:1020-1028.

POND, K.R.; ELLIS, W.C.; MATIS, J.H. et al. *Compartment models for estimating attributes of digesta flow in cattle.* British Journal of Nutrition, v.60, n.3, p.571-595, 1988.

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

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

QUIROZ, R.A., POND, K.R., TOLLEY, E. A. et al. 1988. *Selection among nonlinear models for rate of passage studies in ruminants.* J. Anim. Sci., 66:2977-2986.

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

RIBEIRO, K.G.; GARCIA, R.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Eficiência microbiana, fluxo de compostos nitrogenados no abomaso, amônia e pH ruminais, em bovinos recebendo dietas contendo feno de capim-tifton 85 de diferentes idades de rebrota. Revista Brasileira de Zootecnia, v.30, n.2, p.581-588, 2001.

RIVALDI, J. D.; SARROUH, B. F.; FIORILLO, R.; SILVA, S. S. Glicerol de Biodiesel. Biotec. Ciên. e Desenvolvimento, v. 37, p.44-51, 2007.

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

ROBINSON, **P. H.,** S. TAMMINGA, AND **A.** M. VAN VUUREN. 1987. *Influence of declining level of feed intake and varying the proportion of starch in the concentrate on milk production and whole tract digestibility in dairy cows.* Livest. Prod. Sci. 17:19.

ROBRA, S.; Santos, J. V. da S.; Oliveira, A. M. de; da Cruz, R. S.; Anais do I Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia do Biodiesel, Brasília, Brasil, 2006.

ROSTAGNO, H.S. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. 2. ed. Viçosa: UFV, Depto. de Zootecnia, 2005. 186 p.

RUIZ, R. et al. *Use of chromium mordanted neutral detergent residue as a predictor of fecal output to estimate intake in grazing high producing Holstein cows*. Anim.Feed Sci.Technol. v. 89, n. 3/4, p. 155-164, 2001.

RUSSELL, J.B.; O'CONNOR, J.D.; FOX, D.J. et al**.** *A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation*. Journal of Animal Science, v.70, p.3551-3561, 1992.

RUSSELL, J.B.; ONODERA, R.; HINO, T. *Ruminal protein fermentation: new perspectives and previous contradictions.* In: TSUDA, T.; SASAKI, Y.; KAWASHIMA, R. (Eds.). *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants.* New York: Academic Press, 1991. p.681-697

RUSSELL, J.B.; SHARP, W.M.; BALDWIN, R.L. *The effect of pH on maximum bacterial growth rate and its possible role as a determinant of bacterial competition in the rumen.* Journal of Animal Science, v.48, p.251-258,1979

S. ABO EL-NOR, A.A. ABUGHAZALEH, R.B. POTU, D. HASTINGS, M.S.A. KHATTAB . *Effects of differing levels of glycerol on rumen fermentation and bacteria.* Animal Feed Science and Technology - 22 December 2010 (Vol. 162, Issue 3, Pages 99-105, DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2010.09.012)

SALIBA, E. O. S. Caracterização química e microscópica das ligninas dos resíduos agrícolas de milho e de soja expostos à degradação ruminal e seu efeito sobre a digestibilidade dos carboidratos estruturais. 1998. 236 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal)- Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, 1998.

SALIBA, E. O. S.; RODRIGUEZ, N. M et al. *Structural characterization of lignin from Eucalipitus Grandis beforeand after exposure to the gastrointestinal tract of ruminants.* In: 8º SIMPÓSIO MUNDIAL DE LIGNINAS, 2004. São Carlos: Anais…São Carlos, 2004.

SALIBA, E. O. S.; RODRIGUEZ, N. M. Uso de indicadores na avaliação da digestibilidade em ruminantes - LIPE® Lignina Purificada e enriquecida. In: SILVA, L. F. P.; RENNÓ, F. P (Ed.) *II Simpósio Internacional: Avanços em Técnicas de Pesquisa em Nutrição de Ruminantes*. Pirassununga: USP, 2009. p.50-67.

SALIBA, E. O. S.; RODRIGUEZ, N. M.; PILÓ-VELOSO, D. *Utilization of purified lignin extracted from Eucalyptus grandis (PELI), used as an external marker in digestibilitytrials in various animal species*. In: WORLD CONFERENCE ON ANIMAL PRODUCTION, 9. 2003, Porto Alegre. Proceedings… Porto Alegre, 2003.

SALIBA, E.O.S. Uso de Indicadores: Passado, presente e futuro. In: I TELECONFERÊNCIA SOBRE INDICADORES EM NUTRIÇÃO ANIMAL, 2005, Belo Horizonte: Anais... Belo Horizonte – MG: Escola de Veterinária da UFMG, 2005. p. 04-22.

SALIBA, E.O.S.; RODIRGUEZ, N.M.; PILÓ-VELOSO, D. et al. *Utilization of purified lignin extracted from Eucalyptus grandis (PELI), used as an external marker in digestibility trials in various animal species.* In: world conference on animal production, 9, Porto Alegre: Proceedings… Porto Alegre-RS, 2003c.

SALIBA, E.O.S.; PEREIRA, R.A.N.; FERREIRA, W.M. et al. *Lignin from Eucaliptus Grandis as indicator for rabbits in digestibility trials.* Tropical and Subtropical Agroecosystems, v.3, n.1-3, 2003a (Special Volume)

SALIBA, E.O.S.; RODRIGUEZ, N.M.; PILÓ-VELOSO, D. et al. Estudo comparativo da digestibilidade pela técnica da coleta total com lignina purificada como indicador de digestibilidade para ovinos em experimento com feno de Tifton 85. In*: Reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia,* 40, 2003, Santa Catarina. Anais... Santa Catarina – RS:SBZ, 2003b (CD-ROM)

SANTINI, F.J.; LU, C.D.; POTCHOIBA, M.J. et al. *Dietary fiber and milk yield, mastication, digestion, and rate of passage in goats fed alfafa hay*. Journal of Dairy Science, v.75, p.209-219, 1992.

SATTER, L.D., ROFFLER, R. E. 1975. *Relationship between ruminal ammonia and nonprotein nitrogen utilization by ruminants*. I. Development of a model for predicting nonprotein nitrogen utilization by cattle. *J. Dairy Sci*., 58(12):1880-1888.

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

SAVASTANO, S. Efeito do nível do concentrado sobre parâmetros digestivos do feno de capim-gordura (Melinis minutifl ora Pal de Blauv), em bovinos. 1993. 142 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.

SCHRÖDER, A., SÜDEKUM, K.-H., 1999. *Glycerol as a by-product of biodiesel production in diets for ruminants.* In: Wratten, N., Salisbury, P.A. (Eds.), New Horizons or an Old Crop. Proceedings of the 10th International Rapeseed Congress, Canberra, Australia, Paper No. 241.

SEONE, J.R. *Selected topics on intake and utilization of forages by cattle* In: *Animal science research and development-moving toward a new century*, Ottawa, Ontario, Canada, 1995. p.243-261.

SERRANO, R.D.C. Glicerina bruta e uréia de liberação lenta na alimentação de bovinos de corte. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Estadual de Maringá. Paraná. 2011

SHINGFIELD, K.J.; AHVENJA¨RVI, S.; TOIVONEN, V.; VANHATALO, A.; HUHTANEN, P.; GRIINARI, J.M .*Effect of incremental levels of sunflowerseed oil in the diet on ruminal lipid metabolism in lactating cows*. British Journal of Nutrition,v.99, p.971-983, 2008.

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

SILVA, L. D. F.; EZEQUIEL, J. M. B.; AZEVEDO, P. S.CATTELAN, J. W.; RIBEIRO, E. L. A.; ROCHA, M. A.; CASTRO, V. S.; MENDES, A. R. Uso da cutina na estimativa das digestões total e parcial de alguns componentes de rações contendo diferentes fontes de nitrogênio, em bovinos. Revista Brasileira de Zootecnia.v. 35, n 2, p.600-606, 2006.

SNIFFEN, C.J., ROBINSON, P.H. 1987. *Microbial growth and flow as influenced by dietary manipulations.* J. Dairy Sci., 70:425-441.

SOARES C.A., et al. Produção de Proteína Microbianae Parâmetros Ruminais em Vacas Leiteiras Alimentadas com Farelo de Trigo. Revista Brasileira de Zootecnia, v.34, n.1, p.345-350. 2005.

SUSMEL, P., STEFANON, B., SPANGHERO, M. et al. 1996. *Ability of mathematical models to predict faecal output with a pulse dose of indigestible marker*. *Brit. J. Nut.*, 75(4):521-532.

TAMMINGA, S., P.H. ROBINSON,M. VOGT & BOER (1989). *Rumen ingesta kinetics of cell wall components in dairy cows.* Animal Feed Science and Technology 21, 141-159.

THOMPSON, J.C.; HE, B.B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. Applied Engineering in Agriculture, v.2, p.261–265, 2006.

THURMOND, W. Biodiesel 2020: A global market survey. Emerging markets. Disponível em: <http://w.emerging-markets.com/biodiesel/> Acesso em: 20 out. 2012.

TOWNE, G.T.G. NAGARAJA,C. OWENSBY, e HARMON,D.L. 1986. *Ruminal evacuation's effect on microbial activity and ruminal function.* J. Anim. Sci. 62:783

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

UDÉN, P., COLUCCI, P.E, VAN SOEST, P.J. 1980. *Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies*. J. Sci. Food Agr., 31(7):625-632.

UDEN, P.; ROUNSAVILLE, T.R.; WIGGANS, G.R. et al. *The measurement of liquid and solid digesta retention in ruminants, equines and rabbits given Timothy hay*. British Journal Nutrition, v.48, p.329-339, 1982.

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

VAN SOEST, P. J. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2. ed. Ithaca: Cornell University, 1994. 476p.

VOLHARD, K. P. C. e SCHORE, N. E. Química Orgânica: Estrutura e Função. 4ª Ed. Porto Alegre: Bookman, 2004, p. 755 e 757

WANG, C., LUI, Q., HUO, W.J., YANG, W.Z., DONG, K.H., HUANG, X.Y., GUO, G., 2009. *Effects of feeding glycerol on rumen fermentation, urinary*

excretion of purine derivatives and feed digestibility in steers. Livestock Sci. 121, 15–20.

WANG, C.; LIU, Q.; YANG, W.Z. et al. *Effects of glycerol on lactation performance, energy balance and metabolites in early lactation Holstein dairy cows*. Animal Feed Science and Technology, v.151, p.12-20, 2009.

WARNER, A. C. I. *Rate of passage of digesta through the gut of mammals and birds.* Nutr. Abstr.Rev. v. 51, p. 789-820, 1981.

WELYENBERG,S.V.; SALES, J., JANSSENS, G. P. J. *Passage rate of digesta through the equine gastrointestinal tract: A review.* Livestock Science, n.1, v. 99, p. 3-12, 2006

WILLIAMS, C. H.; DAVID, D. J.; ILSMAA, O. *The determination of chromic oxide in faeces samples by atomic absorption spectrophotometry*. J. Agric.Sci. v. 59, n. 1, p. 381-385, 1962.

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