

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

Níveis de glicerina semi-purificada na dieta de ovinos: comportamento ingestivo, digestibilidade *in vivo* e *in vitro* e produção cumulativa de gás

Natália da Silva Heimbach

**CAMPO GRANDE-MS
2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

Níveis de glicerina semi-purificada na dieta de ovinos: comportamento ingestivo, digestibilidade *in vivo* e *in vitro* e produção cumulativa de gás

Levels of semi-purified glycerine in the diet of sheep: feeding behavior, *in vivo* and *in vitro* digestibility and cumulative gas production

Natália da Silva Heimbach

Orientadora: Profa. Dra. Camila Celeste Brandão Ferreira Ítavo

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.
Área de concentração: Produção Animal.

CAMPO GRANDE-MS, 2015

A Deus e Nossa Senhora pelo dom da vida.

Aos meus pais Carmem e Erwin Heimbach, pela força, incentivo, motivação, conselhos,
apoio, exemplo de vida, e por não medirem esforços para me ajudar sempre.

Com amor e carinho, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora, por estarem sempre comigo, enfrentando batalhas e obstáculos, e me fazendo vencê-los.

Aos meus amados pais Carmem e Erwin Heimbach, que sempre me aconselharam, apoiaram, se esforçaram para que este sonho pudesse se realizar, e pelo amor incondicional. Eu agradeço muito!

À minha querida irmã Laura Heimbach Foscaches, cunhado Marcel Foscaches e sobrinho/afilhado Henrique Heimbach Foscaches, pelo carinho e motivação.

Ao meu padrinho, Padre Ricardo Carlos, pelo incentivo e apoio incansáveis.

À minha orientadora Camila Celeste Brandão Ferreira Ítavo, pelos ensinamentos, oportunidades, motivação, amizade, confiança e exemplo a ser seguido. Meu muitíssimo obrigado por aceitar me orientar, e me apoiar ao longo de todo este tempo.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, pela oportunidade de realização deste curso.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores que me acompanharam em mais essa jornada, em especial aos professores Gumercindo Loriani Franco e Luís Carlos Vinhas Ítavo, pelo apoio, confiança, e todo o conhecimento à mim proporcionado.

Aos membros da banca, Dr. Sérgio Raposo de Medeiros e professor Dr. Gumercindo Loriani Franco, pelo tempo e atenção disponibilizados.

Aos secretários do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Letícia Carvalho e Ricardo Oliveira pela disposição e auxílio contínuos.

Aos meus amados, que não são só colegas de trabalho, mas sim amigos, Jonilson Araújo da Silva, Eduardo Leal, Pâmila Carolini Gonçalves da Silva, Kedma Leonora Silva Monteiro, Gleice Kelly Ayardes Melo e Marlova Cristina Miotto da Costa, pela ajuda incansável, apoio, ensinamentos, conselhos, amizade, por todo o tempo que passamos juntos, eu os agradeço muito.

À querida amiga e companheira de mestrado, Letícia Costa de Rezende, pelos obstáculos e desafios dos experimentos que compartilhamos, pela força e confiança para continuar a caminhada, conhecimentos e estudos trocados, amizade e parceria de sempre. Só tenho a agradecer.

À todas as amigas e amigos de longa data que me apoiaram e motivaram por toda a minha vida.

Aos amigos e colegas de pós-graduação que de alguma forma auxiliaram na realização deste sonho.

Aos estagiários Murilo Sabino, José Carlos da Silva Florêncio Filho, Bruna Passos, Osvaldo Shiotsuki, Yasmim Ávila, Karine Nathiele, Silvia Rech, Larissa Portela, João Álvaro, Jéssica Lira, Danyelle Mattos, Caroline Canollas, Estefany Eudosciak, Ingrid Eudosciak, Priscila Bueno, Thiago Xavier Martins, Bruna Junqueira, Bianca Buldi, Fernando Cabral, Giuliano Garrus, Índira Santos, Leonardo Lara, Lucas Carvalho, Matheus Moretto e Natália Viegas, que sempre prestativos, auxiliaram em todo o processo, sem a ajuda deles nada teria sido concluído.

À todos os meus familiares e amigos que torceram e apoiaram a realização deste sonho.

Enfim, muito obrigada!

A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo”

Nelson Mandela

RESUMO

HEIMBACH, N.S. Níveis de glicerina semi-purificada na dieta de ovinos: comportamento ingestivo, digestibilidade *in vivo* e *in vitro* e produção cumulativa de gás. 2015. 42f. (Dissertação Mestrado em Ciência Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2015.

Objetivou-se avaliar o efeito de níveis crescentes de glicerina semi-purificada em substituição ao milho na alimentação de cordeiros confinados. No primeiro ensaio foram utilizados oito cordeiros machos castrados, com cânula no rúmen, divididos em quatro tratamentos: controle - sem glicerina, inclusão de 120, 240 e 360 g de glicerina semi-purificada/kg de matéria seca. O delineamento utilizado foi o quadrado latino duplo (4x4). Os animais receberam ração total misturada com relação volumoso:concentrado de 40:60; como volumoso forneceu-se feno de capim Tifton (*Cynodon spp.*), e o concentrado era a base de farelo de soja e milho. Utilizando até 360 g de glicerina/kg de matéria seca em substituição ao milho, houve efeito para o comportamento ingestivo, tempo de mastigações total e número de mastigações meréricas por dia, eficiência de ruminação da matéria seca e fibra em detergente neutro e digestibilidades da matéria seca, proteína bruta, fibra em detergente neutro e ácido. Para consumo de nutrientes não houve efeito significativo. No segundo ensaio, foram avaliados os mesmos níveis de inclusão, sob a digestibilidade *in vitro* e produção cumulativa de gás, não houve influência da inclusão de glicerina semi-purificada na digestibilidade *in vitro*. O melhor nível de inclusão de glicerina semi-purificada foi de 313g de glicerina/kg MS, proporcionando maior produção de gás, e entre 231 e 242g de glicerina/kg de MS para melhores taxas de degradação das frações de digestão lenta e rápida, respectivamente. A glicerina semi-purificada em substituição ao milho no concentrado, com base na avaliação em ovinos, pode ser utilizada até 360 g de glicerina semi-purificada/kg de matéria seca, com aumento da digestibilidade dos nutrientes, sem efeitos negativos no comportamento ingestivo e consumo dos animais.

Palavras-chave: cordeiros, energético, glicerol, ruminantes

ABSTRACT

HEIMBACH, N.S. Levels of semi-purified glycerine in the diet of sheep: feeding behavior, in vivo and in vitro digestibility and cumulative gas production. 2015. 42p. (Dissertação Mestrado em Ciência Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2015.

The objective was to evaluate the effect the increasing levels of semi-purified glycerin replacing corn in the diet of feedlot lambs. In the first experiment using eight barrows lambs with rumen cannula were divided into four treatments (control - no glycerin, inclusion of 120, 240 and 360 g of semi-purified glycerin / kg dry matter). The design was Latin square (4x4). The animals received total feed mixed with forage: concentrate ratio of 40:60; as roughage provided to Tifton hay (*Cynodon* spp.), and concentrated based on soybean meal and corn. Using up to 360 g of glycerin/kg of dry matter in replacing corn, there was effect on feeding behavior, total chewing time and ruminating chews per day, rumination efficiency of dry matter and digestibility of dry matter and neutral detergent fiber, crude protein, neutral and acid detergent fiber. For nutrient intake wasn't significantly affected. In the second trial evaluated the same levels of inclusion in the *in vitro* and cumulative gas production, there was no influence *in vitro* digestibility of semi-purified glycerin inclusion. The best inclusion level of semi-purified glycerin was 313g of glycerin/kg DM, providing greater gas production, and between 231 and 242g of glycerin/kg DM for better rates of degradation of fast and slow fractions of digestion, respectively. The semi-purified glycerin replacing corn in the concentrate, based on evaluation in sheep, can be used up to 360 g of semi-purified glycerin/kg of dry matter, with increased digestibility of nutrients, without negative effects on behavior and intake animals.

Key-words: energetic, lambs, glycerol, ruminants

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema da produção do biodiesel e da glicerina.....	10
Figura 2. Reação de transesterificação para a formação do biodiesel e glicerina.....	11
Figura 3. Tratamento de purificação do glicerol.....	12
Figura 4. Glicerina pura, semipurificada e bruta, respectivamente.....	13
Figura 5. Esquema do metabolismo hepático do glicerol em função do estado alimentar do animal.....	15
Figura 6. Via da glicólise e formação do propionato pelas bactérias rumais	15

LISTA DE TABELAS

NÍVEIS DE GLICERINA SEMI-PURIFICADA NA DIETA DE OVINOS: COMPORTAMENTO INGESTIVO, DIGESTIBILIDADE IN VIVO E IN VITRO E PRODUÇÃO CUMULATIVA DE GÁS.

Tabela 1. Proporção de ingredientes e composição química das rações.....	29
Tabela 2. Valores médios e erro padrão da média em horas/dia do tempo gasto por atividade comportamental de cordeiros canulados alimentados com glicerina, em função dos níveis de glicerina.....	32
Tabela 3. Valores médios do tempo de ruminação por bolo, em minutos (TRUMBMIN), número de mastigações por minuto (NMMIN), tempo de mastigação total (TMT), número de bolos por dia (BOLDIA), número de mastigação por bolo (NMASTBOL), número de mastigações meréricas por dia (MMNDIA), eficiência de alimentação (EAL), eficiências de ruminação da matéria seca (ERU _{MS}), da fibra em detergente neutro (ERU _{FDN}), em função dos níveis de inclusão de glicerina semi-purificada.....	32
Tabela 4. Valores de pH ruminal em função do nível de inclusão de glicerina semi-purificada e do horário do dia.....	33
Tabela 5. Consumos de matéria seca (CMS), proteína bruta (CPB), matéria mineral (CMM), matéria orgânica (CMO), fibra em detergente neutro (CFDN), fibra em detergente ácido (CFDA), extrato etéreo (CEE), carboidratos não fibrosos (CCNF), carboidratos totais (CCHOT), e energia metabolizável (CEM), em função dos níveis de glicerina semi-purificada nas rações.....	34
Tabela 6. Digestibilidade da matéria seca (DMS), matéria orgânica (DMO), proteína bruta (DPB), fibra em detergente neutro (DFDN), fibra em detergente ácido (DFDA), extrato etéreo (DEE), e energia metabolizável (DEM), em função dos níveis de inclusão de glicerina semi-purificada.....	35
Tabela 7. Digestibilidade <i>in vitro</i> em função de níveis de inclusão de glicerina semi-purificada.....	36
Tabela 8. Parâmetros estimados da produção cumulativa de gases <i>in vitro</i> em função dos níveis de inclusão de glicerina semi-purificada.....	37

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	9
1. Glicerina	9
2. Ação da glicerina no metabolismo dos ruminantes	13
3. Limitação da glicerina	16
4. Glicerina na alimentação de ruminantes	16
4.1 <i>Glicerina bruta</i>	16
4.2 <i>Glicerina pura</i>	18
4.3 <i>Glicerina com pureza não informada</i>	19
4.4 <i>Glicerina semi-purificada</i>	20
REFERÊNCIAS	22
Níveis de glicerina semi-purificada na dieta de ovinos: comportamento ingestivo, digestibilidade in vivo e in vitro e produção cumulativa de gás.	26
INTRODUÇÃO	27
MATERIAL E MÉTODOS	28
RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38

INTRODUÇÃO

A glicerina representa 10% da produção total de biodiesel (Pinto et al., 2005), e tem como característica higroscopicidade e constitui-se como fonte energética, segundo Eckl et al. (2008), a glicerina bruta possui 3,738 Mcal de energia metabolizável/kg de matéria seca para ovinos, e de acordo com Pagliaro & Rossi (2008), a glicerina pura possui 4,32 kcal/g⁻¹ de energia metabolizável.

A glicerina tem sido utilizada para produtos de uso humano, em sabonetes, umectantes, amaciantes de doces, carne e queijo, solventes para corantes e aromatizantes, adoçante, emulsificante na preservação de alimentos, e na fabricação de ésteres de poli glicerol utilizados em banhas e manteigas, entre outros produtos (Dasari et al., 2005; Peres et al., 2005). Entretanto, devido ao aumento da produção de biodiesel, ocorre a produção de glicerina excedente à sua demanda. O mercado não tem utilizado todo esse excedente de glicerina, o que tem gerado preocupações ambientais e ao mesmo tempo estimulado a realização de mais pesquisas para o aproveitamento seguro do coproduto (Silva et al., 2010).

Desta maneira, a glicerina torna-se uma alternativa promissora para a alimentação animal, podendo substituir parcialmente os ingredientes energéticos da ração, principalmente o milho (Gonçalves et al., 2006). Portanto, o estudo do potencial de uso de glicerina proveniente da indústria de biodiesel como ingrediente energético na alimentação de animais é de relevante interesse científico, econômico e ambiental (Gomes et al., 2011).

Neste sentido, objetivou-se discutir sobre a glicerina, seu funcionamento no metabolismo animal e limitações a respeito da utilização da glicerina na ração de ruminantes como alternativa de fonte energética.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Glicerina

A glicerina proveniente do biodiesel pode ser obtido de diferentes fontes oleaginosas, como soja, girassol, mamona, dendê, pinhão-mansão, nabo forrageiro, algodão, amendoim, canola, gergelim, babaçu e macaúba (Abdalla et al., 2008). É constituída de glicerol, água, lipídios, cinzas, sódio, fósforo e cálcio (Oliveira et al., 2013). Sua fórmula molecular é C₃H₈O₃, massa molecular é 92,09382 g/mol⁻¹, ponto de fusão 18,2°C, e ponto de ebulição 290°C (Pagliaro & Rossi, 2008).

Segundo a Agência Nacional de Petróleo (ANP), o Brasil produz em torno de 250 mil toneladas de glicerina semi-purificada por ano, e o excedente é de 125 mil toneladas/ano. A glicerina semi-purificada chega a custar por volta de R\$500,00/tonelada.

A Figura 1 apresenta a produção do biodiesel e da glicerina, e a Figura 2 esquematiza as reações químicas deste processo. O biodiesel é transesterificado de um lipídio de origem vegetal com um álcool, em meio ácido ou básico, o que gera 90% de biodiesel e 10% de glicerina (Pinto et al., 2005).

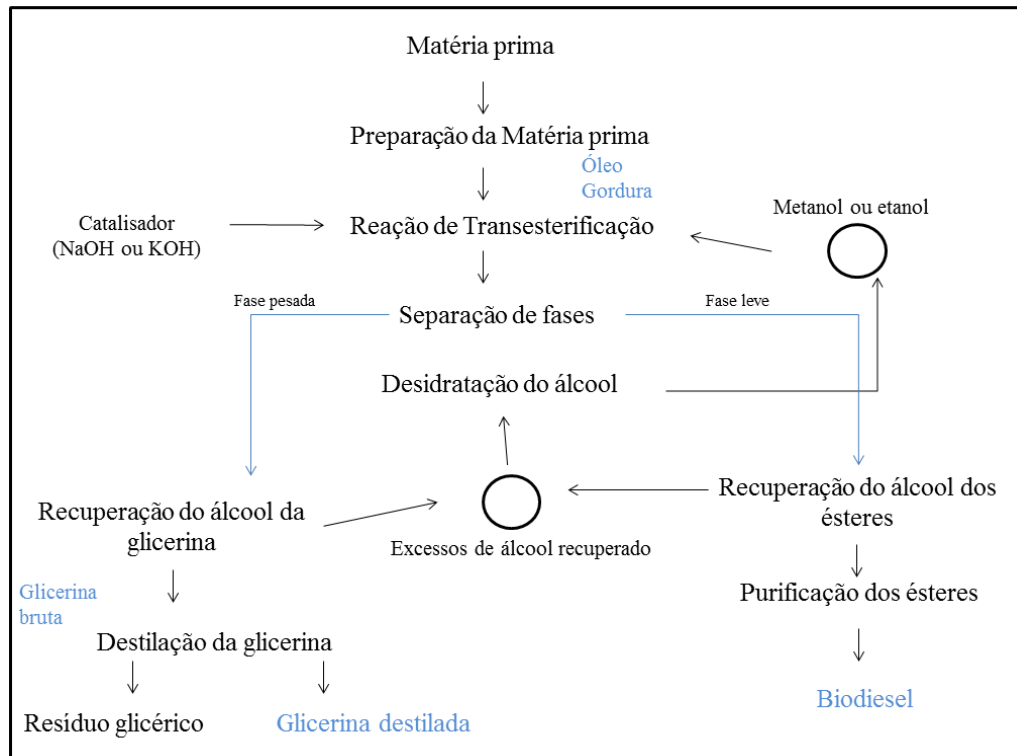


Figura 1. Esquema da produção do biodiesel e da glicerina. (Parente, 2003)

A composição da matéria prima e o processo de produção do biodiesel influenciam a qualidade da glicerina. Os componentes mais variáveis da glicerina são glicerol, água, fósforo e metanol (Rivaldi et al., 2000).

Schroder & Sudekum (1999) classificaram a glicerina de pureza baixa (ou bruta), com 500 a 700g de glicerol/kg MS, média (ou semi-purificada) com 800 a 900g de glicerol/kg MS e alta (pura) com 990g de glicerol/kg MS.

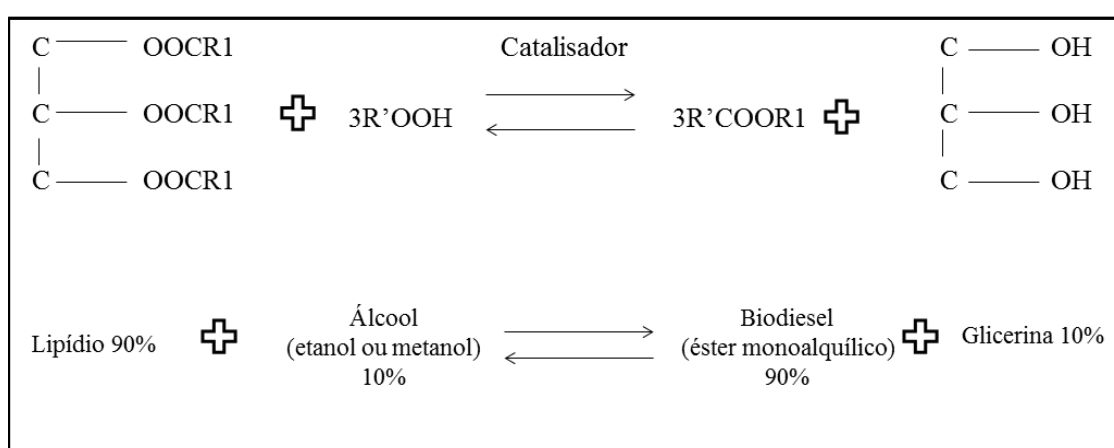


Figura 2. Reação de transesterificação para a formação do biodiesel e glicerina bruta. (Morin et al., 2007).

O glicerol é um líquido viscoso, inodoro e higroscópico. É uma fonte de energia semelhante aos carboidratos, possui em sua fórmula estrutural carbono, hidrogênio e oxigênio e está presente nos organismos vegetais e animais, associado a três ácidos graxos de cadeia longa sob a forma de triacilglicerol, sendo desta maneira armazenado nos animais (gorduras) e vegetais (sebo) (Pond et al., 2005).

A densidade da glicerina pura está entre 1,25 e 1,26 g/cm³; da glicerina semi-purificada está entre 1,20 e 1,24 g/cm³; e da glicerina bruta de 0,99 a 1,19 g/cm³ (Dow Chemical, 2011). A densidade varia de acordo com a pureza da glicerina (percentual de glicerol) e a temperatura do ambiente.

Thompson e He (2006) verificaram que, a viscosidade da glicerina depende da matéria prima da qual ela é extraída, e que na glicerina bruta há a presença de grande quantidade de ácidos graxos, sendo que cerca de 4,4 % deles reagem, produzindo assim sabões que tendem a formar emulsões, indicando que quanto mais viscosa menos pura é a glicerina.

O pH da glicerina semi-purificada varia de 6,5 a 7,5, enquanto que da glicerina bruta, está entre 4,5 e 9,0 (Pagliaro & Rossi, 2008). Portanto, como todas as outras características deste produto, o pH também é muito variável.

Para que a glicerina bruta seja purificada, a mistura deve ser submetida ao processo de acidulação com ácido concentrado (HCl , H_2SO_4 , H_3PO_4), para que o glicerol e ácidos graxos sejam separados do sabão. Durante o processo certa quantidade de sal é gerado, proveniente da reação de ácidos inorgânicos com íon do sabão. A acidulação resulta em um líquido de três fases, sendo a mais densa (do fundo) o sal, a fase intermediária composta principalmente por glicerol e álcool e a superior por ácidos graxos livres (Figura 3). Esta glicerina recuperada

possui concentrações superiores a 80% de glicerol, com variáveis quantidades de água, corantes e álcool (Rivaldi et al., 2000). Para alcançar uma glicerina pura (acima de 950g de glicerol/ kg MS), esta glicerina obtida no processo de acidulação, que contém média pureza, deve ainda ser destilada, porém este processo é de custo muito alto, sendo prioritariamente utilizada para consumo humano e produtos para humanos.

A glicerina de baixa pureza (500 a 700 g de glicerol/ kg MS) tem sido testada na alimentação animal, sendo citada como “glicerina bruta”. A glicerina de média pureza ainda é conhecida como comercial, loira e/ou semi-purificada e é mais interessante nutricionalmente por conter menos ácidos graxos livres, entre outras substâncias, que podem vir a ser prejudiciais ao metabolismo animal a longo prazo. A glicerina de alta pureza é utilizada para alimentação e produtos voltados para os humanos e, inicialmente pelo custo de produção mais oneroso atrelado a destilação, a princípio não tem sido utilizada na alimentação animal. A glicerina bruta é pastosa e apresenta coloração escurecida, a semi-purificada apresenta coloração marrom claro, e é mais líquida, enquanto a glicerina pura é incolor e líquida (Figura 4).

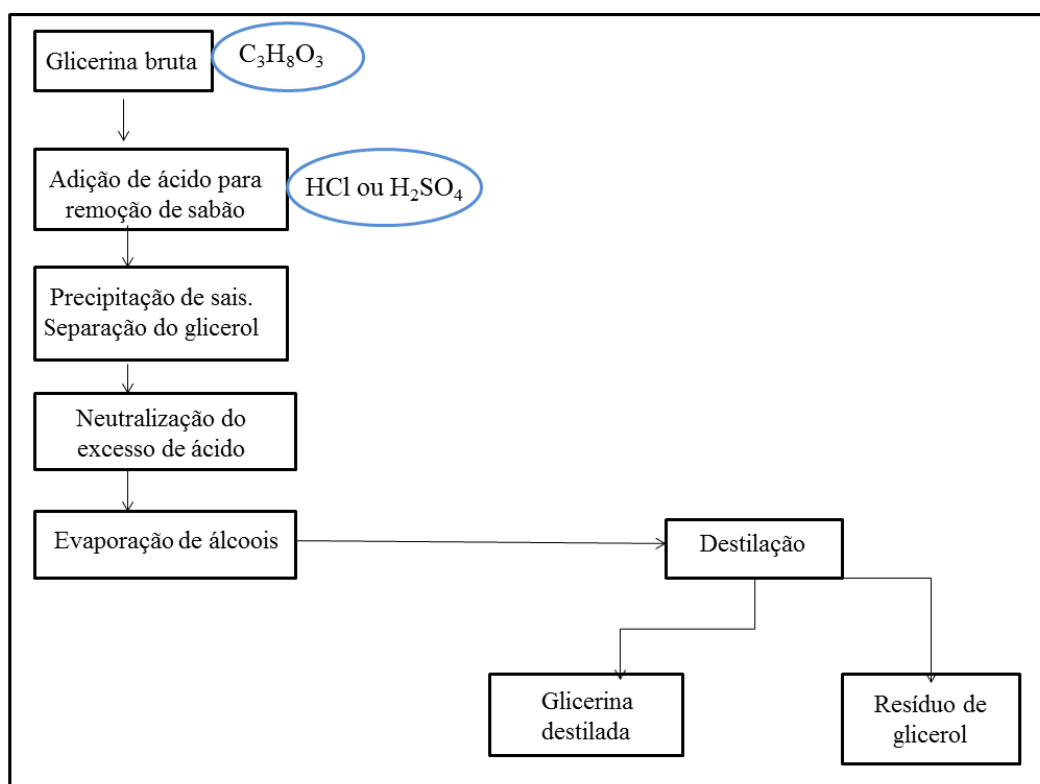


Figura 3. Tratamento de purificação do glicerol (Rivaldi et al., 2000).

Em razão do expressivo aumento da oferta de glicerina e do potencial de uso como macro ingrediente na ração de animais, o Ministério da Agricultura, Abastecimento e Pecuária

(MAPA, 2013) autorizou o uso da glicerina do biodiesel em outubro de 2010, sendo que a glicerina semi-purificada para ser utilizada na alimentação animal como ingrediente de rações, deve conter no máximo 150 mg/kg de metanol, 130 g de umidade/kg de produto e, no mínimo, 800g de glicerol/kg.



(Fonte: Ooi et al., 2004)

(Fonte: Arquivo pessoal)

(Fonte: Arquivo pessoal)

Figura 4. Glicerina pura, semi-purificada e bruta.

2. Ação da glicerina no metabolismo de ruminantes

O glicerol já está presente no metabolismo dos animais, sendo encontrado no sangue e nas células, sob a forma de triglicerídeos. Segundo Lin (1977), o glicerol é derivado da lipólise no tecido adiposo e da hidrólise dos triglicerídeos das lipoproteínas do sangue. Em tecidos adiposos, o Glicerol 3- fosfato é obtido da dihidroxiacetona fosfato por meio da ação da enzima Glicerol-3- fosfato desidrogenase (Mouro et al., 1994).

No músculo, ocorre captação do glicerol contido no sangue. Mesmo o músculo não possuindo a enzima Glicerol-quinase (que está presente na gliconeogênese), o glicerol pode ser metabolizado através da enzima Glicerol-redutase, com a participação de NADPH (Toews, 1996). O metabolismo do glicerol é dependente também do estado alimentar do animal, sendo que em condições de energia excedente, o glicerol é direcionado para a síntese de gordura; entretanto, em situações de energia deficiente é precursor da gliconeogênese (Bartelt & Schneider, 2002).

O rim é o órgão responsável por metabolizar cerca de 10% do glicerol total do organismo, portanto desempenham um papel menor, exceto durante um jejum prolongado, quando se tornam importantes órgãos produtores de glicose (Champe & Harvey, 1996). O rim

produz glicose principalmente a partir de aminoácidos, no entanto, somente parte dela é liberada para o sangue, pois é utilizada para executar suas funções. Quando é excedida a capacidade dos rins de reabsorver a glicose, haverá excreção desta na urina. Quando o corpo utiliza as reservas de gordura corporal como fonte de energia, o glicerol e ácidos graxos são liberados na corrente sanguínea. O metabolismo renal de glicerol ocorre nos túbulos proximais, local onde a Glicerol quinase está localizada, e os produtos do seu metabolismo são glicose e lactato (Koolman & Röhm, 2005).

De acordo com 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 e butirato, além de diminuir a razão acetato:propionato, e que estes são utilizados como principais fontes de energia para manutenção e produção animal.

Hobson & Mann (1961) afirmaram que as bactérias da espécie *Selenomonas ruminantium* são as grandes responsáveis pela fermentação do glicerol no rúmen, com conseqüente produção de propionato, succinato, lactato e acetato.

O glicerol é convertido a propionato no rúmen e é um precursor da síntese de glicose hepática. O fornecimento de glicerina tende a diminuir a quantidade disponível de carbono e hidrogênio para a produção de gás metano, devido ao aumento da produção de propionato (Mourot et al., 1994).

De acordo com Lage et al. (2010), o glicerol é metabolizado no fígado, lá é convertido em glicose para gerar energia para o metabolismo celular. O glicerol liberado no catabolismo do triacilglicerol é transformado em glicose por meio da fosforilação em Glicerol-3-fosfato catalisado pela enzima glicerol-quinase, iniciando assim a gliconeogênese. A Glicerol-quinase é controlada principalmente, pela insulina, a oxidoredutase citosólica pelos corticosteróides e a desidrogenase mitocondrial pelos hormônios da tireóide. O aumento de Glicerol-quinase hepática é reflexo do aumento dos níveis séricos da insulina em condições de gliconeogênese (Mourot et al., 1994).

A gordura sintetizada pelo fígado é incorporada a VLDL e liberada para a circulação ou armazenada na forma de triacilgliceróis ou ainda oxidada (Palmquist & Mattos, 2006).

O metabolismo do glicerol é dependente também do estado alimentar do animal (Figura 5).

Na Figura 6 está apresentada a via da glicólise e formação do propionato pelas bactérias ruminais.

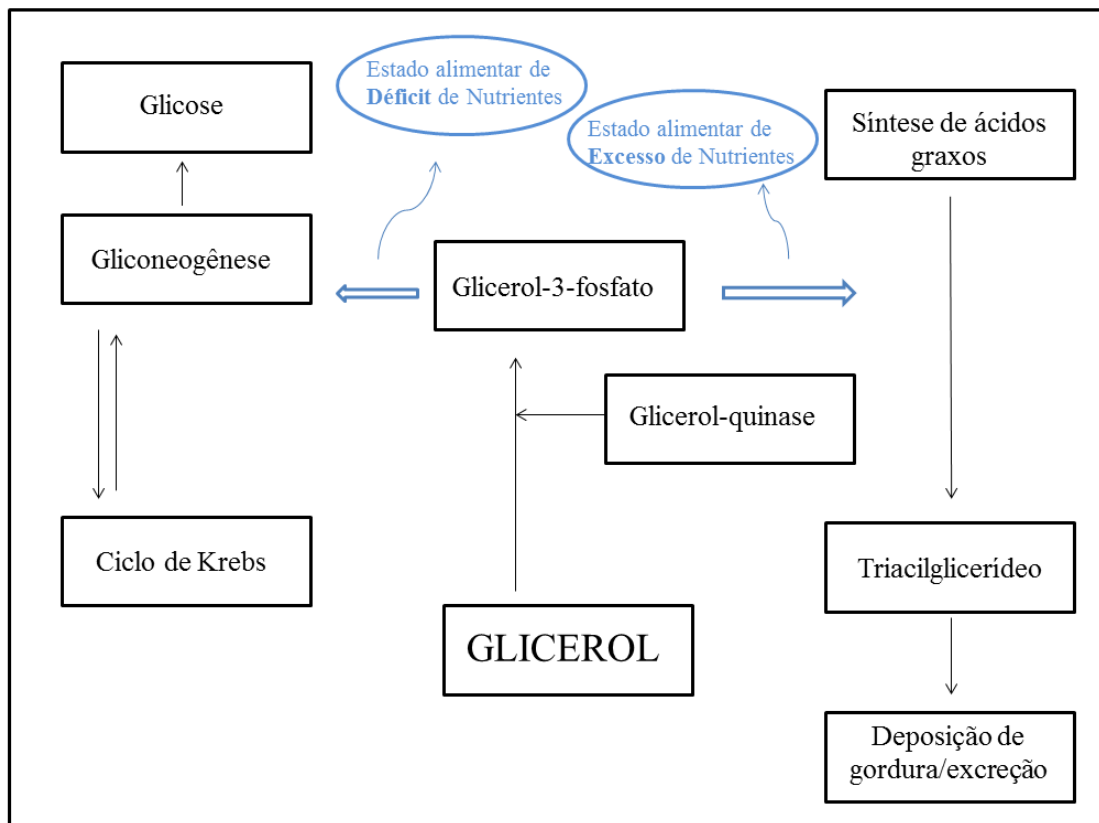


Figura 5. Esquema do metabolismo hepático do glicerol em função do estado alimentar do animal (Best, 2006).

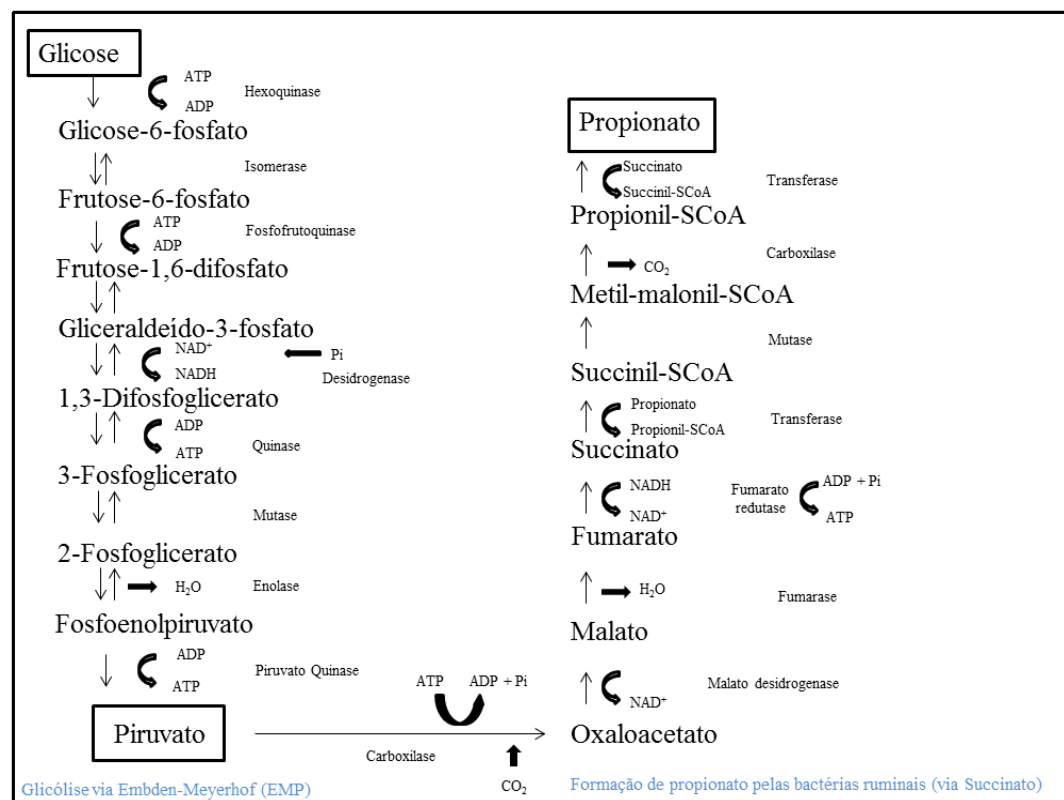


Figura 6. Via da glicólise e formação do propionato pelas bactérias ruminais (Kozloski, 2009).

3. Limitações do uso da glicerina na alimentação animal

O uso de glicerina também é limitado pela quantidade de metanol (no máximo 150 mg/kg de metanol). Altas concentrações de metanol pode causar toxicidade em animais, notadamente pelo acúmulo de ácido fórmico no sangue, produzido no fígado a partir de reações de desidrogenação do metanol. O ácido fórmico é excretado na urina, mas o seu excesso no sangue pode causar depressão do sistema nervoso central, acidose metabólica e lesão ocular (Oliveira et al., 2011). No entanto, ruminantes provavelmente são mais tolerantes à ingestão de metanol, pois o mesmo pode ser convertido em metano no rúmen. Pol & Demeyer (1988) verificaram que a infusão ruminal de metanol não afetou a produção e composição de ácidos graxos voláteis, e que 770 g/kg do metanol foi convertidos a metano (*in vitro*) no meio de cultivo com inóculo de ovinos adaptados.

Segundo Tyson et al. (2004) as impurezas nos óleos reciclados e os reagentes usados na transesterificação são os principais problemas da glicerina de biodiesel, pois podem limitar o consumo. Doppenberg & Van der Aar (2007) observaram que o hidróxido de sódio utilizado como catalisador na hidrólise, pode se combinar com ácido clorídrico, aumentando o conteúdo de cloreto de sódio na glicerina e, assim, restringir a quantia de glicerina que poderia ser incluída na ração (Ooi et al., 2004).

Da mesma maneira a presença de metais pesados, tais como: chumbo, níquel, e cádmio, também pode representar um risco da ingestão de glicerina. Porém, Lage et al. (2014) ao avaliar níveis crescentes de glicerina bruta (contendo 362 g/kg de glicerol, 464,8 g/kg de ácidos graxos totais, 86,6 g/kg de metanol e 62 g/kg de água) na ração (0, 30, 60, 90 e 120 g de glicerina/kg de MS na ração) de ovinos em confinamento da raça Santa Inês, observaram que não houve diferença significativa dos níveis de glicerina bruta na ração sobre o teor de zinco no fígado e de cobre na carne, entretanto, o teor de cobre aumentou linearmente no fígado, houve um decréscimo linear na deposição de zinco na carne e diferença quanto ao teor de cobre na carne, concluindo que não houve comprometimento da qualidade e segurança alimentar da carne no tocante aos níveis de metais pesados no músculo e fígado.

4. Glicerina na alimentação de ruminantes

Pesquisas já foram realizadas utilizando glicerina na alimentação de ruminantes, porém há algumas divergências entre os resultados. Nesse sentido, abaixo são apresentados resultados, de acordo com o grau de pureza da glicerina.

4.1 Glicerina Bruta

Parsons et al. (2008) analisaram o desempenho de novilhas em terminação, confinadas, alimentadas com glicerina bruta, com níveis 20, 40, 80, 120, 160g de glicerina bruta/kg de matéria seca, e concluíram que a glicerina bruta traz efeitos positivos na eficiência alimentar e peso final, quando adicionados em quantidade inferior a 80g do produto/kg MS, adicionando de 120 a 160g de glicerina bruta/kg de matéria seca, há redução no desempenho e características de carcaça.

Pereira et al. (2008) avaliando a influência da glicerina bruta resultante do óleo de mamona na cinética de fermentação ruminal *in vitro*, utilizando a técnica de produção de gases, com inclusão de 5; 10; 20; 30 e 50g de glicerina/kg MS do concentrado, encontraram que a inclusão de glicerina bruta no concentrado associado ao feno de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu diminuiu linearmente a taxa de produção de gases, prejudicou a digestibilidade *in vitro* e aumentou o tempo de colonização das bactérias, o que pode ter sido consequência da qualidade da glicerina utilizada uma vez que altas concentrações de impurezas podem prejudicar o desempenho dos animais.

Lage et al. (2010) e Lage et al. (2014), analisando a inclusão de 30, 60, 90 e 120g de glicerina bruta/kg MS (362g de glicerol/kg MS), concluíram que a inclusão de glicerina bruta em até 30g não causa danos à cordeiros confinados em terminação, por outro lado, incluindo 60g de glicerina bruta/kg MS, apesar de não apresentar efeitos negativos na segurança da carne para consumo humano e na força de cisalhamento, influenciou o desempenho e características de carcaça e até 120 g/kg MS da ração, não causa alterações nos rendimentos dos cortes comerciais da carcaça.

Resultados contraditórios, foram encontrados por D'Aurea (2010) ao avaliar níveis diferentes (0, 100 e 200 g de glicerina bruta/kg de MS da ração) de glicerina em novilhas da raça Nelore a pasto de *Brachiaria brizantha*, sobre o desempenho e as características de carcaça, digestibilidade aparente das rações e características da carne, concluíram que a inclusão de glicerina bruta não prejudicou nenhuma das variáveis analisadas, sendo o consumo médio dos animais em porcentagem do peso vivo de 2,61.

Serrano (2011) avaliou os efeitos da inclusão de glicerina bruta (0, 30, 60, 90 e 120 g de glicerina bruta/kg de MS da ração), na ração de bovinos de corte confinados, utilizando cinco novinhos da raça Nelore (522 kg $\pm$ 43 kg) e verificou que a ingestão de matéria seca, e os coeficientes de digestibilidade aparente ruminal (CDR); intestinal (CDI) e total (CDT) da matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, fibra em detergente neutro e carboidratos não-fibrosos, não foram influenciados pelos tratamentos. Por outro lado, os coeficientes de digestibilidade aparente intestinal e total do extrato etéreo, aumentaram linearmente à medida

que se aumentou o nível de glicerina bruta na ração, sem influência na síntese de proteína microbiana e a cinética ruminal.

Kass et al. (2012), avaliaram o efeito da glicerina bruta nos níveis de 52, 104 e 156 g de glicerina bruta/kg MS substituindo a farinha de cevada, para vacas leiteiras confinadas, e constataram que até 156 g de glicerina bruta/kg MS na ração basal não influenciou a composição do leite, entretanto houve aumento do consumo de matéria seca, o que pode ser explicado pela rápida degradação do glicerol no rúmen, maior produção de propionato, em relação ao milho que produz mais acetato, o que pode acidificar o ambiente ruminal. De forma contrária, Barros (2012), utilizando glicerina bruta (439 g/kg MS da ração) na alimentação de cordeiros mestiços Santa Inês x Dorper, castrados, com níveis de 0; 26,5; 53,3; 80,6 e 108,4 g de glicerina/kg de MS da ração, encontraram diminuição linear do consumo de matéria seca, matéria orgânica e proteína bruta, conforme aumentou-se os níveis de inclusão, fato que pode estar relacionado a qualidade da glicerina utilizada, com baixa quantidade de glicerol e níveis elevados de metanol, metais pesados, água, ácidos graxos e sabões.

Santana Júnior et al. (2013), suplementando vacas em lactação, mantidas em pastagem de *Brachiaria brizantha* MG-5 com 94, 191, 289 e 389g de glicerina bruta/kg MS do concentrado (teor de glicerol não identificado), com um consumo total médio diário de matéria seca de 31,82g/kg PV, concluíram que até 389 g de glicerina/kg em base da matéria seca pode ser adicionado sem interferir nas variáveis nutricionais e produtivas dos animais.

4.2 Glicerina Pura

Wang et al. (2009), alimentando vacas leiteiras com 100, 200 e 300 g de glicerina pura/kg MS (998g de glicerol) diariamente, concluíram que a adição de até 300g de glicerina/kg MS na ração, não afetou o consumo de matéria seca (média de 16,43 kg/d) e a produção de leite.

Em estudo *in vitro* de Ferraro et al. (2009), utilizando a técnica de produção de gás, com inclusão de glicerina pura (900g de glicerol) em dois níveis (0,36 e 0,72 g de glicerina/kg MS da ração total), propilenoglicol e melaço, encontraram que o glicerol é lentamente fermentado à propionato pelos microrganismos ruminais, diferindo do propilenoglicol, que é rapidamente convertido a propionato, e do melaço que é degradado no rúmen para acetato e butirato. Essa conversão lenta do glicerol para propionato pode ser devido à falta de adaptação da microbiota ruminal ao glicerol, tendo em vista a necessidade dessa adaptação para garantir bons parâmetros de desempenho aos animais. Se-Young Lee et al. (2011) em estudo *in vitro*, utilizando a técnica de Goering e Van Soest (1970), verificaram que com a inclusão de 0,1 g

glicerina pura/kg MS da ração total (990g de glicerol) houve fermentação lenta, com potencial para diminuir a produção de metano e aumento da eficiência do uso da energia da ração por ruminantes.

AbuGhazaleh et al. (2010), avaliando *in vitro* níveis de substituição do milho por glicerina pura (0; 150; 300 e 450 g de glicerina/kg MS da ração), com 995 g de glicerol/kg, observaram que a inclusão de até 150 g de glicerina/kg de MS da ração não afetou a população e a fermentação ruminal. Entretanto, níveis maiores de glicerina (300 e 450 g de glicerina/kg de MS da ração) diminuíram as populações de bactérias responsáveis pela fermentação de fibra (*Ruminococcus albus* e *Succinivibrio dextrinosolvens*).

Em ensaio *in vitro*, pelo método de produção de gás *in vitro*, avaliando a substituição de grãos de cevada por níveis de glicerina pura (995g de glicerol), para os níveis de 70, 140 e 210 g de glicerol/kg da matéria seca da ração, encontraram aumento da concentração de propionato no líquido ruminal, sem efeito na produção de gás metano. A avaliação dos dados também revelou que o glicerol tem potencial para melhorar a digestibilidade (Avila-Stagno et al., 2011).

Em estudo com cordeiros confinados, Avila-Stagno et al. (2012) utilizaram 70, 140 e 210g de glicerina/kg MS (995g de glicerol) no concentrado de cordeiros confinados, e encontraram que a digestibilidade da proteína bruta, fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido não foram afetadas pela inclusão da glicerina, assim como a emissão de CH₄ também não foi afetada. Portanto, pode ser utilizado até 210g de glicerina/kg MS para cordeiros.

4.3 Glicerina com pureza não informada

Parte dos resultados de pesquisas não apresentam caracterização da glicerina utilizada. Em ensaio *in vitro* e *in vivo* com bovinos canulados com a finalidade de avaliar a fermentação do glicerol na microbiota ruminal, Rémond et al. (1993) encontraram que em baixas doses (até 1200 g de glicerina) diárias de glicerol adicionadas ao rúmen, uma parte do glicerol produz glicose, enquanto que outra parte, que é fermentada no rúmen, produz alta proporção de butirato.

Paggi et al. (2004), com base em estudos de digestibilidade *in vitro*, relataram que a atividade celulolítica diminuiu em função do aumento de concentrações de glicerol. Também Roger et al. (1992), em ensaios *in vitro*, observaram que 5 e 50 g de glicerol/kg MS da ração inibiram a degradação da celulose.

Em pesquisa sobre os efeitos de 36, 72 e 108 g de glicerina (concentração de glicerol não informada)/kg da matéria seca na fermentação e microbiota ruminal, Abo El-Nor et al. (2010) não encontraram mudanças em experimento *in vitro*, no pH e concentração de N-NH₃ ruminal, proporção de propionato e digestibilidade da matéria seca, entretanto a proporção molar de acetato diminuiu linearmente e a de butirato aumentou, com a inclusão de glicerol, o que está relacionado ao fato de que os primeiros ácidos graxos gerados pela fermentação do glicerol são propionato e butirato, diminuindo assim a taxa de acetato.

Também Terré et al. (2011) avaliando a inclusão de glicerina (teor de glicerol não informado) em 50g/kg e 100g/kg na ração, encontraram que a glicerina pode ser incluída até de 100g/kg na alimentação de cordeiros leves, pois não prejudicou o consumo de concentrado e feno, metabólitos do sangue, desempenho e a composição da gordura na carne.

A glicerina (teor de glicerol não informado) adicionada em substituição ao milho diminuiu a relação acetato-propionato, sem produção de lactato, sendo que o desempenho de bovinos de corte alimentados com glicerina neste estudo foi igual ou superior à ração com milho quando utilizou-se a glicerina até 200g/kg na ração como fonte energética (Ramos et al., 2011).

4.4. Glicerina Semi-purificada

Segundo Pyatt et al. (2007) com a inclusão de 100 g/kg de glicerina (800 g de glicerol/kg) na ração de bovinos, observou-se uma melhoria de 11% na eficiência alimentar, como consequência do aumento na produção de propionato, que se traduz em melhor eficiência energética durante a fermentação ruminal (NRC, 2001).

Os efeitos da substituição do milho pela glicerina (860g de glicerol) no concentrado para touros foram avaliados por Mach et al. (2008), que verificaram que a adição de até 120g de glicerina/kg de matéria seca (3,47 Mcal de Energia metabolizável/kg MS) não influenciou a fermentação ruminal, metabolismo, saúde animal, desempenho e variáveis de carne e carcaça.

De acordo com Gunn et al. (2010), a inclusão de até 200g de glicerina/kg (875g de glicerol) em substituição ao milho, em base da matéria seca, para cordeiros castrados em terminação durante os primeiros 14 dias do período de transição, pode ter um impacto positivo no desempenho dos animais, sem afetar as características de carcaça.

Da mesma maneira, Gomes et al. (2011) suplementaram cordeiros em terminação com 150 e 300g de glicerina/kg (832g de glicerol) em substituição ao milho, verificaram que a glicerina pode ser utilizada em até 300g/kg sem causar efeito negativo no consumo,

desempenho e características de carcaça. Confirmando a potencialidade da glicerina semi-purificada, Pellegrin et al. (2012) avaliaram a substituição do milho por glicerina (848g de glicerol) em comedouros privativos de 100, 200 e 300g de glicerina/kg MS, e concluíram que a inclusão de até 300g de glicerina na ração não alterou as concentrações de colesterol no sangue e na carne de cordeiros lactentes mantidos em pastagens.

Entretanto, Farias et al. (2012) testaram 280; 610 e 900g de glicerina/kg MS (812g de glicerol) em concentrado para novilhas mestiças a pasto de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, e encontraram influência negativa no desempenho animal, conforme aumentou-se a inclusão da glicerina na dieta. Possivelmente esse desempenho negativo pode ser explicado pela presença de sais, impurezas e reagentes usados no processo de transesterificação, acarretando à glicerina um aspecto oleoso, adstringente ao paladar e cor escura.

Leão et al. (2012) testaram a inclusão de 60, 120 e 240g de glicerina/kg MS (proveniente do óleo de soja, com 804g de glicerol/kg) em base da matéria seca da ração e encontraram que a inclusão de até 240g de glicerina na ração de bovinos castrados de aptidão leiteira confinados, não prejudicou o consumo e o desempenho, sendo similares aos de animais alimentados com milho como fonte energética da ração.

Corroborando com os resultados positivos de Leão et al. (2012), Rezende (2014) avaliaram glicerina semi-purificada (900g de glicerol/kg MS) no concentrado de borregos confinados em terminação, em substituição milho, concluíram que pode-se incluir até 360 g de glicerina/ kg MS, pois não causa alteração no comportamento ingestivo, digestibilidade de nutrientes, desempenho reprodutivo, biometria, características de carcaça e qualidade da carne dos animais.

A partir dos resultados apresentados, pode-se perceber a potencialidade do uso da glicerina na alimentação de ruminantes, a partir da maioria de resultados positivos da glicerina semi-purificada e pura, principalmente.

Nesse contexto, realizou-se o presente projeto de pesquisa com o objetivo de avaliar o efeito de níveis de glicerina semi-purificada superiores aos recentemente testados em pesquisas, em substituição ao milho na ração total, sobre o comportamento ingestivo, consumo e digestibilidade de nutrientes em ovinos, digestibilidade e produção de gases *in vitro*. Os resultados estão apresentados na forma do artigo [“Níveis de glicerina semi-purificada na dieta de ovinos: comportamento ingestivo, digestibilidade *in vivo* e *in vitro* e produção cumulativa de gás”], redigido de acordo com as normas do periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, A.L.; SILVA FILHO, J.C.; GODOI, A.R.; CARMO, C.A.; EDUCARDO, J.L.P. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, suplemento especial, p. 260-258, 2008.
- ABO EL-NOR, S.; ABUGHAZALEH, A.A.; POTU, R.B.; HASTINGS, D.; KHATTAB, M.S.A. Effects of differing levels of glycerol on rumen fermentation and bacteria. **Animal Feed Science and Technology**, 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, 2010.
- ANP – AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Biodiesel – Introdução**, 2012 Disponível em: <www.anp.gov.br> Acesso em 14 fev. 2014.>.
- AVILA-STAGNO, J.; CHAVES, A.V.; HERNANDEZ-CALVA, M.; BEAUCHEMIN, K.A.; MCGINN, S.M.; WANG, Y.; HARSTAD, O.M.; McALLISTER, T.A. Effects of replacing barley grain in feedlot diets with increasing levels of glycerol on *in vitro* fermentation and methane production. **Animal Feed Science and Technology**, 166-167, p.265-268, 2011.
- AVILA-STAGNO, J.; CHAVES, A.V.; HE, M.L.; HARSTAD, O.M.; BEAUCHEMIN, K.A.; MCGINN, S.M.; 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. **Journal of Animal Science**, 91:829-837, 2012.
- BARROS, M.C.C. **Glicerina bruta na dieta de ovinos confinados**. 2012. 81f. Tese (Doutor em Zootecnia) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga.
- BARTELT, J.; SCHNEIDER, H. D. **Glycerine in der Tierernährung**. UFOP Schriften, Bonn, Bermany, p.1 -36, 2002.
- BEST, P. Increased biofuel production will grow supplies of by-products: Glycerin gives an energy option. **Feed International**, v.27, n.10, p.20-21, 2006.
- CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. **Bioquímica Ilustrada**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed 1996. 357p.
- D'AUREA, A.P. **Glicerina, resíduo da produção de biodiesel, na terminação de novilhas da raça nelore**, 2010. 470f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal.
- DASARI, M.A.; KIATSIMKUK, P.; SUTTERLIN, W.R. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. **Applied Catalysis A: General**, v.281, p.225-231, 2005.
- DONKIN, S.S. Glycerol from Biodiesel Production: The New Corn for Dairy Cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.280-286, 2008.
- DOPPENBERG, J.; VAN DER AAR, P. The nutritional value of biodiesel by-products. **Feed Business Asia**, v.12, p.42-43, 2007.
- DOW CHEMICAL. **Density of Glycerine-Water solutions**. Disponível em: <[http://www.dow.com/webapps/lit/litorder.asp?filepath=glycerine/pdfs/noreg/115-0656.pdf&pdf=true%](http://www.dow.com/webapps/lit/litorder.asp?filepath=glycerine/pdfs/noreg/115-0656.pdf&pdf=true%>)>. Acesso em: 12 jan. 2015.
- ECKL, E.; STEINGAB, H.; DROCHNER, W. Enegetic evaluation of glycerol in ruminants. **Society of Nutrition Physiology**, v.17, p.126, 2008.
- FARIAS, M.S.; PRADO, I.N.; VALERO, M.V.; ZAWADZKI, F.; SILVA, R.R.; EIRAS, C.E.; RIVAROLI, D.C.; LIMA, B.S. Níveis de glicerina para novilhas suplementadas em pastagens: desempenho, ingestão, eficiência alimentar e digestibilidade. **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, n.3, p.1177-1188, 2012.

- FERRARO, S.M.; MENDOZA, G.D.; MIRANDA, L.A.; GUTIÉRREZ, C.G. *In vitro* gas production and ruminal fermentation of glycerol, polyethylene glycol and molasses. **Animal Feed Science and Technology**, v. 154, p.112-118, 2009.
- GOMES, M.A.B.; MORAES, G.V.; MATAVELI, M.; MACEDO, F.A.F.; CARNEIRO, T.C.; ROSSI, R.M. Performance and carcass characteristics of lambs fed on diets supplemented with glycerol from biodiesel production. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p.2211-2219, 2011.
- GONÇALVES, V.L.C.; PINTO, B.P.; MUSGUEIRA, L.C.; SILVA, J.C.; MOTA, C.J.A. Biogásolina: produção de ésteres da glicerina. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, Brasília. **Anais...** Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia: Associação Brasileira das Instituições de Pesquisa Tecnológica, p.14-19, 2006.
- GUNN, P.J.; NEARY, M.K.; LEMENAGER, R.P.; LAKE, S.L. Effects of crude glycerol on performance and carcass characteristics of finishing wether lambs. **Journal of Animal Science**, 88:1771-1776, 2010.
- HOBSON, P.N.; MANN, O.S. The isolation of glycerol-fermenting and lipolytic bacteria from the rumen of the sheep. **Journal of General Microbiology**, v.25, 227-240, 1961.
- KASS, M.; ARIKO, T.; KAART, T.; RIHMA, E.; OTS, M.; ARNEY, D.; KART, O. Effect of replacement of barley meal with crude glycerol on lactation performance of primiparous dairy cows fed a grass silage-based diet. **Livestock Science**, 150:240-247, 2012.
- KOOLMAN, J.; RÖHM, K.H. **Color Atlas of Biochemistry**. 2.ed. New York: Thieme Stuttgart, 2005. 467p.
- KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica dos ruminantes**. 2 ed. Santa Maria: Ed. Da UFSM, 2009. 214p.
- LAGE, J.F.; PAULINO, P.V.R.; PEREIRA, L.G.R.; DUARTE, M.S.; VALADARES FILHO, S.C.; OLIVEIRA, A.S.; SOUZA, N.K.P.; LIMA, J.C.M. Carcass characteristics of feedlot lambs fed crude glycerol contaminated with high concentrations of crude fat. **Meat Science**, v.96, p.108-113, 2014.
- LAGE, J.F.; PAULINO, P.V.R.; PEREIRA, L.G.R.; VALADARES FILHO, S.C.; OLIVEIRA, A.S.; DETMANN, E.; SOUZA, N.K.P.; LIMA, J.C.M. Glicerina bruta na dieta de cordeiros terminados em confinamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, n.9, p.1012-1020, 2010.
- LEÃO, J.P.; NEIVA, J.N.M.; RESTLE, J.; PAULINO, P.V.R.; SANTANA, A.E.M.; MIOTTO, F.R.C.; MÍSSIO, R.L. Consumo e desempenho de bovinos de aptidão leiteira em confinamento alimentados com glicerol. **Ciência Animal Brasileira**, v.13, n.4, p. 421-428, 2012.
- LIN, E.C.C. Glycerol utilization and its regulation in mammals. **Annual Review Biochemistry**, v.46, p.765-795, 1977.
- MACH, N.; BACH, A.; DEVANT, M. Effects of crude glycerol supplementation on performance and meat quality of Holstein bulls fed high-concentrate diets. **Journal of Animal Science**, 87:632-638, 2008.
- MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO 470 **Ministério da agricultura autoriza novo uso da glicerina**. Disponível em: 471 <http://www.sindicatos.org.br/index.php?option=com_content&task=view&id=974722&Itemid=1> Acesso em: 01 out. 2013.
- MORIN, P.; HAMAD, B.; SAPALY, G. et al. Transesterification of rapeseed oil with ethanol. **Applied Catalysis. A: General**, v.330, p.69-76, 2007.

- MOUROT, J.; AUMAITRE, A.; MOUNIER, A. Nutritional and physiological effects of dietary glycerol in the growing pig. Consequences on fatty tissues and post mortem muscular parameters. **Livestock Production Science**, v.38, p.237-244, 1994.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL, NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7.ed. Washington: Nacional Academy, 2001. 381p.
- OLIVEIRA, A.S.; OLIVEIRA, M.R.C.; SOUZA, J.G.; GABRIEL, J.A.; ALESSI, K.C.; SOUZA, M.C.; SCHWAMBACH, T.C. Perspectiva da Utilização dos Co-produtos do Biodiesel na Produção de Bovinos de Corte. In: Joanis T. Zervoudakis; José Antônio Neto; Renata Pereira da Silva; Lilian Chambó Rondena P. Silva; Rafael G. F. da Silva; Jefferson F. W. Koscheck. (Org.). **Anais... I SIMBOV-MT Simpósio Matogrossense de Bovinos de Corte**. Cuiabá: Juscemil Serafim, v. 1, p. 131-150, 2011.
- OLIVEIRA, J.S.; ANTONIASSI, R.; FREITAS, S.C.; MULLER, M.D. Composição química da glicerina produzida por usinas de biodiesel no Brasil e potencial de uso na alimentação animal. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.43, n.3, p.509-512, mar, 2013.
- OOI, T.L.; YONG, K.C.; HAZIMAH, A.H.; DZULKEFLY, K.; WAN-YUNUS, WMZ. Glycerol residue – a rich source of glycerol and medium chain fatty acids. **Journal of Oleo Science**, v.53, n.1, p.29-33, 2004.
- PAGGI, R.A.; FAY, J.P.; FAVERIN, C. In vitro ruminal digestibility of oat hay and cellulolytic activity in the presence of increasing concentrations of short-chain acids and glycerol. **Journal of Agricultural Science**, v.142, p.89-96, 2004.
- PAGLIARO, Mario; ROSSI, Michele. The future of glycerol: New uses of a versatile raw material. **RSC Publishing (Green Chemistry Book Series)**, Cambridge, 2008.
- PALMQUIST, D. L.; MATTOS, W. R. S. Metabolismo de lipídeos. In: **Nutrição de Ruminantes**. 2.ed. Jaboticabal: Funep, 2006, p.583.
- PARENTE E.J. de S. **Biodiesel – Uma Aventura tecnológica num país engraçado**. Editora Unigráfica: Fortaleza-CE, 2003.
- PARSONS, G.L.; SHELOR, M.K.; DROUILLARD, J.S. Performance and carcass traits of finishing heifers fed crude glycerin. **Journal of Animal Science**, 87:653-657, 2008.
- PELLEGRIN, A.C.R.S.; PIRES, C.C.; CARVALHO, S.; PACHECO, P.S.; PELEGRIINI, L.F.V.; GRIEBLER, L.; VENTURINI, R.S. Glicerina bruta no suplemento para cordeiros lactentes em pastejo de azevém. **Ciência Rural**, Santa Maria, Online, 2012.
- PEREIRA, L.G.R.; MAURÍCIO, R.M.; MENEZES, D.R.; ARAÚJO, G.G.L.A.; SOUSA, L.F.; CARVALHO, W.T.V.; GUIMARÃES JUNIOR, R. Influência da glicerina bruta na cinética de fermentação ruminal in vitro. **Anais... 45ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Lavras, MG, 2008.
- PERES, J.R.R.; FREITAS JUNIOR, E.; GAZZONI, D.L. Biocombustíveis: Uma oportunidade para o agronegócio brasileiro. **Revista de Política Agrícola**, Brasília, v.1, p. 31-41, 2005.
- PINTO, A.C.; GUARIEIRO, L.L.N.; REZENDE, M.J.C. Biodiesel: An overview. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.16, p.1313-1330, 2005.
- POL, A.; DEMEYER, D.I. Fermentation of methanol in the sheep rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.832-834, 1988.
- POND, W.G.; CHURCH, D.C.; POND, K.R. **Basic animal nutrition and feeding**. 5.ed. Hoboken: John Wiley & Sons Inc., 2005. p.580.
- PYATT, N.A.; DOANE, P.H.; CECAVA, M.J. Effect of crude glycerin in finishing cattle diets. **Journal of Animal Science**, v.85, p. 407- 412, 2007
- RAMOS, M.H.; KERLEY, M.S. Effect of dietary crude glycerol level on ruminal fermentation in continuous culture and growth performance of beef calves. **Journal of Animal Science**, 90:892-899, 2011.

- RÉMOND, B.; SOUDAY, E.; JOUANY, J.P. *In vitro* and *in vivo* fermentation of glycerol by rumen microbes. **Animal Feed Science and Technology**, v.41, p. 121-132, 1993.
- REZENDE, L.C. **Glicerina semi-purificada na dieta de borregos confinados**. 2014. 67f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UFMS, Campo Grande.
- RIVALDI, J.D.; SARROUB, B.F.; FIORILO, R.; SILVA, S.S. Glicerol de Biodiesel. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.37, 2000.
- ROGER, V.; FONTY, G.; ANDRE, C.; GOUET, P. Effects of glycerol on the growth, adhesion and cellulolytic activity of rumen cellulolytic bacteria and anaerobic fungi. **Current Microbiology**, v.25, p.197-201, 1992.
- SANTANA JÚNIOR, H.A.; FIGUEIREDO, M.P.; CARDOSO, E.O.; MENDES, F.B.L.; ABREU FILHO, G.; PINHEIRO, A.A.; VIANA, P.T.; ROSEIRA, J.P.S. Crude glycerin in supplement to primiparous lactating cows grazing on tropical pasture: nutritional and productive characteristics. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.42, n.2, p. 117-124, 2013.
- SCHRODER, A.; SUDEKUM, K-H. Glycerol as a by-product of biodiesel production in Diets for ruminants. **Paper presented at the 10th International Rapeseed Conference, Canberra Australia**, 1999.
- SERRANO, R.D.C. **Glicerina bruta e uréia de liberação lenta na alimentação de bovinos de corte**. 2011. 49 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- SE-YOUNG LEE; SANG-MOON LEE; YOUNG-BAE CHO; DONG-KEUN KAM; SANG-CHEOL LEE; CHANG-HYUN KIM; SEONGWON SEO. Glycerol as a feed supplement for ruminants: *In vitro* fermentation characteristics and methane production. **Animal Feed Science and Technology**, 166-167, p.269-274, 2011.
- SILVA, R.R.; PRADO, I.N; CARVALHO, G.G.P.; SILVA, F.F.; ALMEIDA, V.V.S.; SANTANA JUNIOR, H.A.; PAIXÃO, M.L.; ABREU FILHO, G. Níveis de suplementação na terminação de novilhos nelore em pastagens: aspectos econômicos. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.39, p.2091-2097, 2010.
- TERRÉ, M.; NUDDA, A.; CASADO, P.; BACH, A. The use of glycerin in rations for light lamb during the fattening period. **Animal Feed Science and Technology**, 164:262-267, 2011.
- TOEWS, C.J. Evidence for metabolism of glicerol by skeletal muscle and teh presence of a muscle nicotinamide-adenide dinucleotide phosphatedependent glycerol deshydrogenase. **Journal of Biochemistry**, Oxford, v.98, 1996.
- THOMPSON, J.C.; H.E, B.B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Applied Engineering in Agriculture**, v.22, p. 261- 265, 2006.
- TYSON, K.S.; BOZELL, J.; WALLACE, R. **Biomass Oil Analysis: Research Needs and Recommendations**. Technical Report National Renewable Energy Laboratory Golden. Disponível em:<<http://www.nrel.gov/docs/fy04osti/34796.pdf>>. Acesso em: 20 set. 2013.
- WANG, C.; LIU, Q.; YANG, W.Z.; HUO, W.J.; DONG, K.H.; HUANG, Y.X.; YANG, X.M.; HE, D.C. Effects of glycerol on lactation performance, energy balance and metabolites in early lactation Holstein dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v.151, p.12-20, 2009.

Níveis de glicerina semi-purificada na dieta de ovinos: comportamento ingestivo, digestibilidade in vivo e in vitro e produção cumulativa de gás

RESUMO: Objetivou-se avaliar o efeito de níveis crescentes de glicerina semi-purificada em substituição ao milho na alimentação de cordeiros confinados. No primeiro ensaio foram utilizados oito cordeiros machos castrados, com cânula no rúmen, divididos em quatro tratamentos: controle - sem glicerina, inclusão de 120, 240 e 360 g de glicerina semi-purificada/kg de matéria seca. O delineamento utilizado foi o quadrado latino duplo (4x4). Os animais receberam ração total misturada com relação volumoso:concentrado de 40:60; como volumoso forneceu-se feno de capim Tifton (*Cynodon spp.*), e o concentrado era a base de farelo de soja e milho. Utilizando até 360 g de glicerina/kg de matéria seca em substituição ao milho, houve efeito para o comportamento ingestivo, tempo de mastigações total e número de mastigações meréricas por dia, eficiência de ruminação da matéria seca e fibra em detergente neutro e digestibilidades da matéria seca, proteína bruta, fibra em detergente neutro e ácido. Para consumo de nutrientes não houve efeito significativo. No segundo ensaio, foram avaliados os mesmos níveis de inclusão, sob a digestibilidade *in vitro* e produção cumulativa de gás, não houve influência da inclusão de glicerina semi-purificada na digestibilidade *in vitro*. O melhor nível de inclusão de glicerina semi-purificada foi de 313g de glicerina/kg MS, proporcionando maior produção de gás, e entre 231 e 242g de glicerina/kg de MS para melhores taxas de degradação das frações de digestão lenta e rápida, respectivamente. A glicerina semi-purificada em substituição ao milho no concentrado, com base na avaliação em ovinos, pode ser utilizada até 360 g de glicerina semi-purificada/kg de matéria seca, com aumento da digestibilidade dos nutrientes, sem efeitos negativos no comportamento ingestivo e consumo dos animais.

Palavras-chave: cordeiros, energético, glicerol, ruminantes

Levels of semi-purified glycerine in the diet of sheep: feeding behavior, in vivo and in vitro digestibility and cumulative gas production

ABSTRACT: The objective was to evaluate the effect the increasing levels of semi-purified glycerin replacing corn in the diet of feedlot lambs. In the first experiment using eight barrows lambs with rumen cannula were divided into four treatments (control - no glycerin, inclusion of 120, 240 and 360 g of semi-purified glycerin / kg dry matter). The design was Latin square (4x4). The animals received total feed mixed with forage: concentrate ratio of

40:60; as roughage provided to Tifton hay (*Cynodon* spp.), and concentrated based on soybean meal and corn. Using up to 360 g of glycerin/kg of dry matter in replacing corn, there was effect on feeding behavior, total chewing time and ruminating chews per day, rumination efficiency of dry matter and digestibility of dry matter and neutral detergent fiber, crude protein, neutral and acid detergent fiber. For nutrient intake wasn't significantly affected. In the second trial evaluated the same levels of inclusion in the *in vitro* and cumulative gas production, there was no influence *in vitro* digestibility of semi-purified glycerin inclusion. The best inclusion level of semi-purified glycerin was 313g of glycerin/kg DM, providing greater gas production, and between 231 and 242g of glycerin/kg DM for better rates of degradation of fast and slow fractions of digestion, respectively. The semi-purified glycerin replacing corn in the concentrate, based on evaluation in sheep, can be used up to 360 g of semi-purified glycerin/kg of dry matter, with increased digestibility of nutrients, without negative effects on behavior and intake animals

Key-words: energetic, lambs, glycerol, ruminants

INTRODUÇÃO

A glicerina é um composto orgânico, pertencente à função álcool, e pode possuir cerca de 3,738 Mcal de energia metabolizável/kg de matéria seca (Eckl et al., 2008). Torna-se uma alternativa promissora para a alimentação animal, podendo substituir parcialmente os ingredientes energéticos da ração, principalmente o milho (Gonçalves et al., 2006). Portanto o estudo do potencial de uso da glicerina proveniente da indústria de biodiesel na alimentação de animais é de relevante interesse científico, econômico e ambiental.

A composição da matéria prima e o processo de produção do biodiesel influenciam a qualidade da glicerina. No processo de extração, 90% é obtido como biodiesel e 10% como glicerina. Os componentes mais variáveis da glicerina são glicerol, água, fósforo e metanol, e a fórmula química do glicerol é $C_3H_8O_3$.

Schroder e Sudekum (1999) classificaram a glicerina considerada de pureza baixa (ou bruta), com 500 a 799 g de glicerol/kg MS, média (ou semi-purificada) com 800 a 989 g de glicerol/kg MS e alta (pura) com 990 g de glicerol/kg MS.

A glicerina de média pureza ainda é pouco avaliada sendo conhecida como comercial, loira e/ou semi-purificada. Em razão do expressivo aumento da oferta de glicerina e do potencial de uso como macroingrediente na ração de animais, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2013) autorizou o uso da glicerina do biodiesel em outubro de 2010, sendo que a glicerina semi-purificada para ser utilizada na alimentação

animal como ingrediente de rações, deve conter no máximo 150 g/kg de metanol, 130 g de umidade/kg e, no mínimo, 800g de glicerol/kg.

Neste sentido, objetivou-se avaliar o efeito de diferentes níveis de glicerina semipurificada em substituição ao milho na ração sobre o comportamento ingestivo, consumo e digestibilidade aparente em ovinos, e digestibilidade e produção de gases *in vitro*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Metabolismo Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul e no Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Nutrição Animal da Universidade Católica Dom Bosco, em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso dos Animais da UFMS, protocolo nº 576/2013.

No primeiro ensaio foram utilizados oito borregos castrados, cruzados Dorper x Texel x Suffolk, contemporâneos, oito meses de idade, com peso corporal médio inicial de $27,29 \pm 2,31$ kg, portadores de cânula ruminal. Os animais foram alocados em baias individuais de 3 m², com piso ripado, contendo comedouro, bebedouro e cocho para suplemento mineral.

As rações foram isonitrogenadas e isoenergéticas, com feno de capim Tifton (*Cynodon spp.*) moído e concentrado a base de farelo de soja e milho, formuladas segundo o NRC (2007) para ganho médio de 200 g por dia. Os tratamentos foram: controle (sem inclusão de glicerina), inclusão de glicerina semipurificada de 120, 240 e 360 g/kg (em base da matéria seca), em substituição ao milho (Tab. 1). A ração foi fornecida duas vezes ao dia, às 8 horas e 17 horas, sendo 60% do total de ração, fornecidas no período da manhã, e 40% no período da tarde. A água e o suplemento mineral foram fornecidos à vontade.

O delineamento experimental utilizado foi o quadrado latino duplo. Cada período teve a duração de 21 dias, sendo 10 dias de adaptação e 11 de coleta, totalizando 84 dias de ensaio.

O consumo era ajustado diariamente de acordo com as sobras do dia anterior, visando 10% de sobras.

Durante o período de coleta, em torno de 10% de sobras foram amostradas, para realização de amostras compostas por animal/período, as quais foram pré-secas em estufa de ventilação forçada de ar, a 55°C por 96 horas, e trituradas em moinho de facas dotado de peneira com crivos de 1 mm. A determinação dos teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB) e extrato etéreo (EE), foram realizados de acordo com AOAC (2000), pelos métodos 930.15, 932.05, 976.05 e 920.39, respectivamente. Os teores de

fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram determinados segundo Goering e Van Soest (1970) sem o uso de sulfito e amilase termoestável. E os teores de carboidratos não fibrosos (CNF) foram determinados de acordo com Sniffen et al. (1992).

Tabela 1. Proporção de ingredientes e composição química das rações.

Ingredientes	Glicerina semi-purificada na ração total (g/kg MS)			
	0	120	240	360
Milho Moído (g/kg)	435,00	293,40	150,00	5,00
Farelo de Soja (g/kg)	138,00	161,10	185,00	210,30
Glicerina Semi-purificada (g/kg)	0,00	120,00	240,00	360,00
Fosfato Bicálcico (g/kg)	16,50	15,60	15,00	14,70
Ureia (g/kg)	10,00	10,00	10,00	10,00
Feno de Tifton 85 (g/kg)	400,00	400,00	400,00	400,00
Composição bromatológica (g/kg MS)				
Matéria seca	915,29	915,31	911,30	913,55
Matéria orgânica	921,20	943,65	934,67	935,65
Proteína bruta	180,54	181,17	179,14	177,20
Extrato etéreo	27,78	27,11	28,64	27,88
Fibra em detergente neutro	429,99	427,73	425,65	424,16
Fibra em detergente ácido	202,27	202,12	200,89	202,19
Carboidratos não fibrosos	283,0	307,8	301,3	306,4
Energia metabolizável (Mcal/kg MS)	2,49	2,55	2,51	2,63
Composição da Glicerina Semi-purificada: Glicerol - 900g de glicerol/kg (Cromatografia Gasosa); MS - 995,20 g/kg (AOAC, 2000); Energia Bruta - 3500 Kcal/kg/MS (Calorímetro adiabático de Parr) e Proteína Bruta - 1,1 g/kg (KJELDAHL); Metanol: 103 mg/kg; Estimativa de Energia Metabolizável: ED x 0,82; CNF:100-(PB+EE+FDN+MM).				

A cada 14 dias, nos quatro períodos experimentais, foram realizadas colheitas de líquido ruminal dos animais, visando a determinação do pH. Sendo realizadas uma hora antes do fornecimento da dieta, uma hora depois, e após 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas. Foi utilizado um recipiente plástico com capacidade de 250 mL, onde o conteúdo ruminal era coletado, por intermédio da fístula ruminal. O material coletado foi filtrado em camadas de gaze a fim de se obter 100 mL de líquido ruminal e proceder a imediata determinação do pH em pHmetro digital.

As coletas total de fezes foram realizadas durante 48 horas em cada período, por meio de bolsas coletoras. As fezes foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas a - 20°C. Ao término do período de coleta as amostras de fezes foram descongeladas, secas em estufa de ventilação forçada de ar a 55°C durante 96 h e, posteriormente, moídas em moinho com peneira dotada de crivos de 1 mm e realizou-se as análises químicas (MS, PB, FDN, FDA, EE).

As avaliações de comportamento ingestivo foram realizadas a cada 14 dias, nos quatro períodos. A coleta de dados foi realizada em sessões de 24 horas com início às oito horas da manhã, com a primeira alimentação dos animais, até oito horas do dia seguinte, com o novo fornecimento, totalizando 96 horas de observação por animal. A coleta de dados de comportamento ingestivo dos ovinos foi baseada em amostragens de varredura instantânea, a cada 10 minutos, segundo Altmann (1974) e Martin e Bateson (1993), por meio de etograma, caracterizado por quatro categorias básicas de comportamento (alimentação, ruminação, deslocamento e ócio).

A média do número e do tempo de mastigações merícicas por bolo ruminal foram obtidas registrando-se três valores de mastigações e número de bolos em cada horário de avaliação em cada período, das 10 às 12 h, 14 às 16 h e 19 às 21 h, utilizando-se cronômetro digital (Burger *et al.*, 2000). Os resultados referentes aos fatores do comportamento ingestivo foram obtidos pelas relações: $EAL = CMS/TAL$, $ERU = CMS/TRU$, $ERU = CFDN/TRU$, $TMT = TAL + TRU$, $BOL = TRU/MM_{tb}$, $MM_{nd} = BOLMM_{nb}$ em que EAL (g MS/h) é eficiência de alimentação; CMS (g MS/dia), consumo de MS; TAL (h/dia), tempo de alimentação; ERU (g MS/h; g FDN/h), eficiência de ruminação; TRU (h/dia), tempo de ruminação; TMT (h/dia), tempo de mastigação total; BOL (n°/dia), número de bolos ruminais; TRU (s/dia), tempo de ruminação; MM_{tb} (s/bolo), tempo de mastigações merícicas por bolo ruminal; MM_{nd} (n°/dia), número de mastigações merícicas; e MM_{nb} ($n^{\circ}/bolo$), número de mastigações merícicas por bolo.

Para digestibilidade *in vitro* e produção de gás, foram utilizadas como doadoras de líquido ruminal, duas vacas com cânula implantada no rúmen, mantidas em pastagens recebendo suplementação mineral.

Na digestibilidade foram realizadas pesagens em saquinhos de TNT de 4x5 cm em triplicata, selados, previamente lavados em acetona, secos e pesados. Pesou-se 0,5 g de amostra de cada ração em cada saquinho, proporção de volumoso:concentrado de 40:60, 0,3 g de feno, 0,2 g de concentrado (controle), 0,176, 0,152 e 0,128 g de concentrado, e quantidade de glicerina de 0,024 μ L, 0,048 μ L e 0,072 μ L, respectivamente. Depois da pesagem das amostras e selagem dos saquinhos, os mesmos foram colocados nos frascos da incubadora *in vitro* para teste de degradabilidade, modelo MA 443 (Marconi®), com simulação do ambiente ruminal. A saliva artificial é feita segundo a solução tampão de McDougall (1948), que sugere como composição 9,80 g/L de $NaHCO_3$; 9,30 g/L de $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$; 0,47 g/L $NaCl$; 0,57 g/L de KCl ; 0,04 g/L de $CaCl_2$ e 0,06 g/L de $MgCl_2$.

Colocou-se também saliva artificial (1600 mL) e líquido ruminal (400 mL) e depois de fechado o frasco, injetou-se CO₂, para melhor simulação do ambiente ruminal. O período de incubação foi de 72 horas, para simular a digestão total, após 48 horas de incubação, foi adicionada a enzima pepsina (8 g de pepsina e 40 mL de HCl em cada frasco), permanecendo sob a incubação por mais 24 horas (Tilley e Terry, 1963).

Na análise de produção de gás, pesou-se 0,5 g da ração em béqueres especiais, com tampas hermeticamente fechadas contendo um módulo que passa informações da quantidade de gás produzida, em duplicata, incubados com saliva artificial (100 mL em cada frasco) e líquido ruminal (25 mL em cada frasco). Antes do fechamento dos béquers, injetou-se CO₂, para melhor simulação do ambiente ruminal. A cinética da digestão foi avaliada por 48 horas de incubação, por intermédio da produção cumulativa de gás no processo fermentativo de cada alimento por meio do sistema computadorizado sem fio, dotado de transdutor de pressão, com comunicação feita por rádio frequência (ANKOM®RF – *Gas production system*). Os dados de pressão, em psi, foram coletados a cada 1 minuto, e foram transformados para mL de gás/100 mg de matéria seca. Os valores de degradabilidade, correspondentes às diferentes frações analisadas, foram obtidos segundo modelo logístico bicompartimental proposto por Pell e Schofield (1994): $y = A / \{1 + \text{EXP}[2 + 4 * B * (C - T)]\} + D / \{1 + \text{EXP}[2 + 4 * E * (C - T)]\}$, em que: y = Volume total de gás no tempo T (extensão da degradação); A e D = volume de gás (mL) das frações de degradação rápida (açúcares solúveis e amido) e lenta (celulose e hemicelulose), respectivamente; B e E = taxas de degradação das frações de digestão rápida e lenta (%/h), respectivamente; e C = tempo de colonização das bactérias (horas).

Os dados *in vivo* foram analisados por meio de análise de variância e regressão, com nível de significância de 5%.

Na digestibilidade *in vitro* os tratamentos foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram avaliados por meio de análises de variância e as médias foram comparadas pelo teste Tukey, com 5% de significância.

Os parâmetros da cinética da digestão dos alimentos, em função do nível da glicerina, foram analisados sob a forma de coeficiente não linear Gauss Newton, procedimento não linear para a estimativa de parâmetros. O delineamento experimental utilizado para comparar os parâmetros da cinética da digestão foi o inteiramente casualizado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se efeito do nível de inclusão de glicerina sobre a atividade comportamental dos borregos canulados (Tab. 2). O aumento do nível de inclusão da glicerina acarretou o aumento linear do tempo gasto com ruminação e diminuição linear do ócio.

O mesmo efeito de inclusão ocorreu com o tempo de mastigação total (TMT) e número de mastigações meréricas por dia (MMNDIA), que aumentaram linearmente conforme maior o nível de inclusão de glicerina (Tab. 3).

O tempo gasto com ruminação, tempo de mastigação total, e número de mastigações meréricas podem ter aumentado, porque a glicerina possui rápida degradação, dessa maneira, o pH tende a diminuir, e a ruminação aumenta a salivação que possui como uma das funções, o tamponamento do pH ruminal. Portanto não afetará o consumo e desempenho destes animais, fato que pode ser observado na Tab. 5.

O tempo de ócio diminui a cada aumento do tempo dispensado com outras atividades.

Tabela 2. Valores médios e erro padrão da média em horas/dia do tempo gasto por atividade comportamental de cordeiros canulados alimentados com glicerina, em função dos níveis de inclusão de glicerina.

Variáveis comportamentais	Glicerina semi-purificada na ração total (g/kg MS)				EPM	P-value
	0	120	240	360		
Ócio ¹ (h/dia)	10,77	10,38	8,52	9,33	0,672	0,0420
Outras atividades (h/dia)	4,50	4,70	5,46	4,27	0,496	0,3764
Ruminação ² (h/dia)	5,77	6,44	6,79	7,42	0,468	0,0166
Ingestão de água (h/dia)	0,08	0,13	0,13	0,15	0,053	0,8627
Alimentação (h/dia)	2,96	2,65	3,19	2,94	0,425	0,8441

$$^1 Y = 10,67 - 0,051x \text{ (R}^2=0,13\text{); } ^2 Y = 5,81 + 0,044x \text{ (R}^2=0,18\text{)}$$

Tabela 3. Valores médios do tempo de ruminação por bolo, em minutos (TRUMBMIN), número de mastigações por minuto (NMMIN), tempo de mastigação total (TMT), número de bolos por dia (BOLDIA), número de mastigação por bolo (NMASTBOL), número de mastigações meréricas por dia (MMNDIA), eficiência de alimentação (EAL), eficiências de ruminação da matéria seca (ERU_{MS}), da fibra em detergente neutro (ERU_{FDN}), em função dos níveis de inclusão de glicerina semi-purificada.

Variável	Glicerina semi-purificada na ração total (g/kg MS)				EPM	P
	0	120	240	360		
TRUMBMIN	0,6831	0,6569	0,6632	0,7054	0,0378	0,6722
NMMIN (mast/min)	98	95	95	95	2,9355	0,4925
TMT ¹ (h/dia)	8,7292	9,0833	9,9792	10,3542	0,5729	0,0293
BOLDIA (nºbolo/dia)	517	622	627	639	42,5136	0,0969
NMASTBOL (nºmast/bolo)	66	61	63	67	4,3197	0,7905
MMNDIA ² (mast/dia)	34105	36433	38576	42318	2690,18	0,0337
EAL (g MS/h)	9,92	10,62	7,57	8,60	1,357	0,4086
ERU _{MS} ³ (g MS/h)	4,30	3,60	3,30	3,07	0,3224	0,0214
ERU _{FDN} ⁴ (g FDN/h)	1,89	1,57	1,48	1,35	0,1506	0,0377

$$^1 Y = 8,67083 + 0,04809x \text{ (R}^2=0,15\text{); } ^2 Y = 33841 + 223,19063x \text{ (R}^2=0,14\text{); } ^3 Y = 4,28499 - 0,06286x + 0,00081917x^2 \text{ (R}^2 = 0,23\text{); } ^4 Y = 1,87304 - 0,02625x + 0,00033837x^2 \text{ (R}^2 = 0,20\text{)}$$

A eficiência de ruminação da matéria seca (ERU_{MS}) e a eficiência de ruminação da fibra em detergente neutro (ERU_{FDN}) apresentaram efeito quadrático, tendo seus pontos de mínimo com o nível de inclusão de 39 g de glicerina/kg de MS da ração.

O tempo de ruminação por bolo (TRUMBMIN), número de mastigações por minuto (NMMIN), número de bolos por dia (BOLDIA), número de mastigações por bolo (NMATBOL) e eficiência alimentar (EAL) não diferiram entre os tratamentos. Também Menezes (2003) avaliando vacas mestiças Holandês x Zebu recebendo diferentes níveis de glicerina bruta (518 g/kg de glicerol): 0, 50, 100, 150, 200 g de glicerina/kg de MS da ração, não observaram efeito da inclusão de glicerina sobre o número de bolos ruminados por dia, mastigações meréricas por bolo e tempo de mastigações meréricas por bolo.

Não houve interação significativa entre nível e tempo ($P>0,05$), e também não houve efeito de nível ($P>0,05$) sobre o pH ruminal. Houve efeito quadrático para horário de alimentação ($P<0,05$) sobre o pH ruminal (Tab. 4).

Tabela 4. Valores de pH ruminal em função do nível de inclusão de glicerina semi-purificada e do horário do dia.

Horário	Glicerina semi-purificada na ração total (g/kg MS)				EPM	P
	¹ 0	² 120	³ 240	⁴ 360		
7h00	6,68	6,75	6,61	6,80	0,017	0,3482
Fornecimento do alimento						
9h00	6,47	6,46	6,52	6,32	0,024	0,5142
10h00	6,32	6,32	6,46	6,25	0,020	0,4309
12h00	6,00	6,08	5,91	6,07	0,025	0,5940
14h00	5,91	5,89	5,94	5,78	0,013	0,3418
16h00	5,92	5,96	5,98	5,78	0,017	0,3585
Fornecimento do alimento						
18h00	5,98	5,80	5,99	5,99	0,028	0,5864
20h00	5,76	5,66	5,89	5,71	0,022	0,4406
EPM	0,039	0,030	0,047	0,053		
P	0,0087	0,0159	0,0278	0,0072		

¹Y₀ = 8,04406 – 0,239257.t + 0,00648281.t² (R² = 0,93); ²Y₁₂ = 8,00188 – 0,219254.t + 0,00526469.t² (R² = 0,97); ³Y₂₄ = 8,02848 – 0,239747.t + 0,0067783.t² (R² = 0,85); ⁴Y₃₆ = 8,46089 – 0,308815.t + 0,00887585.t² (R² = 0,91)

O pH normal do rúmen é em torno de 6,8. Um pH menor do que 6,0 já causa alterações na digestibilidade e morte de algumas bactérias. Acidose é alcançada com pH menor que 4,8, onde só permanecem em funcionamento bactérias produtoras de ácido lático, e tendem a agravar cada vez mais este problema.

A diferença no pH, de acordo com o horário do dia, pode ser devido à degradação do glicerol no rúmen, que diminui o pH. Porém neste experimento, não houve queda acentuada,

devido ao aumento da ruminação que faz o tamponamento do ambiente ruminal. Houve grande diminuição do pH após 12 horas da primeira alimentação, indicando que o glicerol permanece por várias horas no rúmen, apesar de possuir carboidratos prontamente disponíveis.

Os consumos de nutrientes não diferiram significativamente em função dos níveis de inclusão de glicerina (Tab. 5). A glicerina semi-purificada utilizada no presente estudo foi bem aceita pelos animais, promovendo CMS semelhante entre as rações, suprimindo as exigências dos animais.

Tabela 5. Consumos de matéria seca (CMS), proteína bruta (CPB), matéria mineral (CMM), matéria orgânica (CMO), fibra em detergente neutro (CFDN), fibra em detergente ácido (CFDA), extrato etéreo (CEE), carboidratos não fibrosos (CCNF), carboidratos totais (CCHOT), e energia metabolizável, em função dos níveis de inclusão de glicerina semi-purificada.

Item	Glicerina semi-purificada na ração total (g/kg MS)				EPM	P
	0	120	240	360		
CMS (g/kg PC)	43,57	46,79	40,61	41,11	2,241	0,2164
CPB (g/kg PC)	8,35	8,71	7,51	7,54	0,394	0,1029
CMM (g/kg PC)	2,95	3,16	2,74	2,80	0,151	0,2275
CMO (g/kg PC)	40,62	43,64	37,87	38,31	2,091	0,2158
CFDN (g/kg PC)	19,16	20,76	18,20	18,16	1,147	0,3570
CFDA (g/kg PC)	8,94	9,82	8,58	8,68	0,564	0,4067
CEE (g/kg PC)	1,41	1,47	1,26	1,29	0,069	0,1351
CCNF (g/kg PC)	12,28	12,98	10,92	11,67	1,284	0,7078
CCHOT (g/kg PC)	32,41	33,71	29,08	30,37	3,391	0,7754
CEM (Mcal/dia)	3,67	3,78	3,47	3,70	0,274	0,8704

Da mesma forma, Gomes *et al.* (2011), utilizando glicerina semi-purificada (831 g/kg de glicerol) na ração de cordeiros confinados, com níveis de 100, 250 e 300 g/kg (base da matéria seca), não encontraram diferença significativa no consumo de matéria seca.

Já Lage *et al.* (2010), testando glicerina bruta (362 g/kg de glicerol) em cordeiros, com níveis de 0, 30, 60, 90 e 120 g/kg de glicerina (em base da matéria seca), verificaram que os consumos de matéria seca, matéria orgânica e proteína bruta decresceram linearmente conforme aumentou-se os níveis de inclusão, o que pode estar relacionado à baixa qualidade da glicerina bruta, atrelado à altos teores de minerais e lipídios.

Houve efeito linear crescente para digestibilidade da matéria seca (DMS), matéria orgânica (DMO), proteína bruta (DPB), fibra em detergente neutro (DFDN), fibra em detergente ácido (DFDA), e extrato etéreo (DEE), com o aumento da inclusão de glicerina na ração (Tab. 6).

Tabela 6. Digestibilidade da matéria seca (DMS), matéria orgânica (DMO), proteína bruta (DPB), fibra em detergente neutro (DFDN), fibra em detergente ácido (DFDA), extrato etéreo (DEE), e energia metabolizável, em função dos níveis de inclusão de glicerina semi-purificada.

Variáveis	Glicerina semi-purificada na ração total (g/kg MS)				EPM	P
	0	120	240	360		
DMS ¹ (0-1)	0,6765	0,6788	0,7192	0,7498	0,024	0,0393
DMO ² (g/kg)	704,0	705,3	757,9	779,6	0,024	0,0275
DPB ³ (g/kg)	782,7	788,4	830,5	837,2	0,018	0,0163
DFDN ⁴ (g/kg)	507,3	526,9	610,5	546,8	0,046	0,0224
DFDA ⁵ (g/kg)	456,3	480,7	579,8	617,4	0,050	0,0160
DEE ⁶ (g/kg)	843,0	850,8	866,4	875,4	0,015	0,0209
DEM (Mcal/kg MS)	2,49	2,55	2,51	2,63	0,101	0,7911

Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente (P<0,05)

¹ Y= 66,70 + 0,217x (R²=0,13); ² Y= 69,48 + 0,233x (R²=0,15); ³ Y= 77,89 + 0,171x (R²=0,18); ⁴ Y= 49,76 + 0,418x (R²=0,16); ⁵ Y= 44,65 + 0,484x (R²=0,18); ⁶ Y= 83,40 + 0,111x (R²=0,19).

Segundo Berchielli (2011), o processamento dos alimentos é fundamental para melhorias na digestibilidade. Visto que a glicerina é líquida, solúvel, e possui carboidratos prontamente disponíveis, o presente estudo confirma que aumentando a inclusão de glicerina semi-purificada em rações de tamanho de partículas reduzido, facilita a colonização das bactérias, utilização dos substratos, e há maior digestibilidade do alimento. Sendo propionato o principal produto da degradação do glicerol, há um grande fornecimento de energia ao animal, pois propionato gera glicose, fato que tende a melhorar a resposta nos produtos dos animais.

Lage *et al.* (2010), não encontraram efeito da glicerina bruta na ração de ovinos para digestibilidade da matéria seca, matéria orgânica e proteína bruta com médias 73,92; 76,12 e 77,26%MS respectivamente, valores próximos aos encontrados neste estudo, que foram 70,61; 73,67; 80,97%MS, respectivamente. A diferença entre os estudos pode ter ocorrido devido à pureza das glicerinas utilizadas. O presente ensaio utilizou glicerina semi-purificada, que devido a maior solubilidade quando comparada a glicerina bruta, apresenta maior taxa de degradação no rúmen, sendo comprovado o aumento linear da digestibilidade juntamente com o nível de glicerina semi-purificada.

Os valores de digestibilidade *in vitro* não diferiram significativamente com o aumento dos níveis de inclusão da glicerina semi-purificada (Tab. 7). Ao contrário do presente estudo, Abo El-Nor *et al.* (2010) utilizando feno de alfafa e concentrado a base de milho e farelo de soja, com proporção volumoso:concentrado de 60:40, e adicionando níveis de 0; 30, 60; 72; e 108 g de glicerol/kg de MS, em experimento *in vitro*, observaram que a digestibilidade da fibra em detergente neutro diminuiu linearmente com o aumento do glicerol das rações nos níveis 0 e 108 g de glicerol/kg de MS da ração, respectivamente. Também Pereira *et al.*

(2008) em ensaio *in vitro* com inclusão de 5, 10, 20, 30 e 50 g de glicerina/kg MS, encontraram redução da digestibilidade conforme aumentou-se o nível de inclusão de glicerina bruta.

Tabela 7. Digestibilidade *in vitro*, em função de níveis de inclusão de glicerina semi-purificada.

Variáveis	Níveis de glicerina semi-purificada (g/kg MS)				EPM	P
	0	120	240	360		
DIVMS (g/kg)	686,6	647,3	689,7	682,6	0,0296	0,1802
DIVPB (g/kg)	553,8	474,7	486,9	493,0	0,0951	0,6084
DIVFDN (g/kg)	595,4	590,9	612,3	615,8	0,0204	0,24214
DIVFDA (g/kg)	563,2	563,5	587,6	588,5	0,0280	0,36588

DIVMS: digestibilidade da matéria seca; DIVPB: digestibilidade da proteína bruta; DIVFDN: digestibilidade da fibra em detergente neutro; DIVFDA: digestibilidade da fibra em detergente ácido.

O aumento da digestibilidade *in vivo* e a semelhança nos valores de digestibilidade *in vitro*, podem ser explicados pela taxa de passagem, absorção, a presença de diversidade de microrganismos que degradam a ração. No animal vivo há maiores chances de proliferação de diferentes bactérias, enquanto *in vitro* isso não ocorre, entre outros fatores que podem afetar apenas a digestibilidade *in vivo* (Berchielli, 2011).

Os parâmetros A, B, C, E da cinética de degradação foram influenciados pelos níveis de glicerina semi-purificada adicionados à ração (Tab. 8). O volume de gás das frações de degradação rápida apresentou efeito quadrático, sendo seu ponto de máximo, no nível de 313 g de glicerina semi-purificada/kg MS. Da mesma maneira, a taxa de degradação das frações de digestão rápida teve efeito quadrático, sendo o melhor nível de inclusão de 242 g de glicerina/kg MS. Esse fato é devido à rápida degradação do glicerol no ambiente ruminal.

O volume de gás das frações de degradação lenta não apresentou diferença significativa. A taxa de degradação das frações de digestão lenta mostrou efeito quadrático, sendo seu ponto de mínimo de 231 g de glicerina semi-purificada/kg MS. Essa queda na taxa de degradação pode ser devido à alta degradação do glicerol, que diminui o pH e mata bactérias celulolíticas, que digerem celulose e hemicelulose (frações de degradação lenta).

O tempo de colonização das bactérias diminuiu, conforme aumentou-se a quantidade de glicerina semi-purificada. A alta solubilidade da glicerina, facilita colonização e utilização dos substratos.

Conforme aumenta a glicerina na ração, que é líquida e solúvel, aumenta a velocidade de degradação, e como há maior produção de propionato, há diminuição de carbono no meio ruminal, isto faz com que diminua a produção do metano que sairá do animal via eructação.

Por ser um gás muito prejudicial à camada de ozônio, a diminuição de sua produção e liberação é essencial para o meio ambiente.

Tabela 8. Parâmetros estimados da produção cumulativa de gases *in vitro* em função dos níveis de inclusão de glicerina semi-purificada na ração.

Parâmetros	Glicerina semi-purificada (g/kg MS)				EPM	P-value	
	0	120	240	360		linear	quadrático
A ¹ (ml)	2,82	3,85	4,50	4,51	0,0142	0,00001	0,02765
B ² (%/h)	0,74	0,90	0,82	0,87	0,0012	0,00001	0,00828
C ³ (h)	5,57	3,67	4,04	3,07	0,0182	0,00001	0,14037
D ⁴ (ml)	8,27	7,92	7,80	8,01	0,0268	0,87799	0,73641
E ⁵ (%/h)	0,06	0,04	0,04	0,04	0,0002	0,00001	0,00004
Total ⁶	11,09	11,14	11,68	11,17	0,0235	0,62304	0,62175
R ²	0,99	0,93	0,99	0,94			

A= volume de gás das frações de degradação rápida (açúcares solúveis e amido); B= taxa de degradação das frações de digestão rápida; C= tempo de colonização das bactérias; D= volume de gás das frações de degradação lenta (celulose e hemicelulose); E= taxa de degradação das frações de digestão lenta.

n= nível de glicerina semi-purificada (g/kg); ¹ $Y_A = 2,8096 + 0,011874.n - 0,0000178779.n^2$ ($R^2 = 0,99$); ² $Y_B = 0,764378 + 0,000896692.n - 0,00000185408.n^2$ ($R^2 = 0,99$); ³ $Y_C = 5,14398 - 0,005840.n$ ($R^2 = 0,72$); ⁴ $Y_D = 7,9861$; ⁵ $Y_E = 0,0607015 - 0,000202052.n + 0,0000004365.n^2$ ($R^2 = 0,99$); ⁶ $Y_{TOTAL} = 11,29558$

De acordo com Schofield *et al.* (1994), a digestão anaeróbica da celulose e de outros tipos de fibra pelos microrganismos ruminais (*Ruminococcus albus*, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*), produz AGV, CO₂, CH₄, e traços de H₂. *In vitro* e *in vivo*, os AGVs reagem com tampão de bicarbonato para liberar CO₂, então ocorre produção de gás simultaneamente à digestão de fibra, ou seja, maior degradação ocasiona maior produção de gás.

Belato *et al.* (2013), estudando a cinética de degradação ruminal em rações para ovinos, com diferentes níveis de glicerina bruta (0, 70, 140 e 210 g de glicerina/kg MS), encontraram que o tempo de colonização pelas bactérias foi superior em rações contendo maiores níveis de glicerina bruta, o que difere do presente estudo, que houve diminuição do tempo com o aumento dos níveis. Esta ocorrência pode ser explicada pela maior pureza da glicerina no presente estudo, por sua alta solubilidade, e por apresentar mais carboidratos prontamente disponíveis.

CONCLUSÃO

A glicerina semi-purificada em substituição ao milho no concentrado, com base na avaliação em ovinos, pode ser utilizada até 360 g de glicerina semi-purificada/kg de matéria seca, com aumento da digestibilidade dos nutrientes, sem efeitos negativos no comportamento ingestivo e consumo dos animais.

REFERÊNCIAS

- ABO EL-NOR, S.; ABUGHAZALEH, A.A.; POTU, R.B.; HASTINGS, D.; KHATTAB, M.S.A. Effects of differing levels of glycerol on rumen fermentation and bacteria. **Animal Feed Science and Technology**, v.162, p.99-105, 2010.
- ALTMANN, J. Observational study of behavior sampling methods. **Behaviour**, v. 49, p. 227-267, 1974.
- ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 17th., Gaithersburg, MD, USA, 2000.
- BELATO, A.M. ; REGO, F.C.A. ; SANCHEZ, A.F. ; GASPARINE, M.J. ; ZUNDT, M. Cinética de degradação ruminal e composição química em dietas para ovinos, com diferentes níveis de glicerina bruta. **Anais... Synergismus scyentifica**, UTFPN, Pato Branco, 08(2), 2013.
- BERCHIELLI, T.T. ; PIRES, A.V. ; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de Ruminantes**. 2 ed. Jaboticabal : Funep, 2011. 616 p.
- BURGER, P. J.; PEREIRA, J.C; QUEIROZ, A. C.; VALADARES FILHO, S.; C.; CECON, P. R.; CASALI, A. D. P. Comportamento ingestivo em bezerros holandeses alimentados com dietas contendo diferentes níveis de concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 1, p. 236-242, 2000.
- ECKL, E.; STEINGAB, H.; DROCHNER, W. Enegetic evaluation of glycerol in ruminants. **Society of Nutrition Physiology**, v.17, p.126, 2008.
- GOERING, H.K.; VAN SOEST, .P.J. *Forage Fiber Analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications)*, **USDA Agricultural Handbook**, n. 379, p.20, 1970.
- GOMES, M.A.B; MORAES, G.V.; MATAVELI, M. Performance and carcass characteristics of lambs fed on diets supplemented with glycerin from biodiesel production. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.10, p.2211-2219, 2011.
- GONÇALVES, V.L.C.; PINTO, B.P.; MUSGUEIRA, L.C. Biogasolina: produção de ésteres da glicerina. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 1., 2006, Brasília. **Anais...** Brasília: Associação Brasileira das Instituições de Pesquisa Tecnológica, 2006. p.14-19.
- LAGE, J.F.; PAULINO, P.V.R.; PEREIRA, L.G.R.; VALADARES FILHO, S.C.; OLIVEIRA, A.S.; DETMANN, E.; SOUZA, N.K.P.; LIMA, J.C.M. Glicerina bruta na dieta de cordeiros terminados em confinamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, p.1012-1020, 2010.
- MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO 470 **Ministério da agricultura autoriza novo uso da glicerina**. Disponível em: 471 <http://www.sindiracoes.org.br/index.php?option=com_content&task=view&id=97472 2 Itemid=1> Acesso em: 01 out. 2013.
- MARTIN, P.; BATESON, R. Measuring Behaviour. **Cambridge University Press**. 84-100, 1993.
- McDOUGALL, E.I. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. **Biochemistry Journal**, Nashville, v. 43, n. 1, p.99-109, 1948.
- MENEZES, M. A. **Glicerina bruta em dietas de vacas leiteiras confinadas**. 2003. 92f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids and New World Camelids, Washington, D.C.: **National Academy Press**, 362p, 2007.
- PELL, A.N.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. **Journal Dairy Science**, 76, 4, 1063-1073, 1994.

- PEREIRA, L.G.R.; MAURÍCIO, R.M.; MENEZES, D.R.; ARAÚJO, G.G.L.A.; SOUSA, L.F.; CARVALHO, W.T.V.; GUIMARÃES JUNIOR, R. Influência da glicerina bruta na cinética de fermentação ruminal *in vitro*. **Anais...** 45ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Lavras, MG, CD-ROM, 2008.
- SCHOFIELD, P.; PITT, R.E.; PELL, A.N. Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. **Journal of Animal Science**, 72: 2980-2991, 1994.
- SCHRODER, A.; SUDEKUM, K-H. Glycerol as a by-product of biodiesel production in diets for ruminants. **Paper presented at the 10th International Rapeseed Conference, Canberra Australia**, 1999.
- SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, J.D.; VAN SOEST, P.J.; FOX, D.G.; RUSSELL, J.B. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3562-3577, 1992.
- TILLEY, J.M.A., TERRY, R.A. A two stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. **Journal British Grassland Society**, 18, 2, 104-111, 1963.