

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**FONTE ALTERNATIVA DE INÓCULO RUMINAL PARA**  
**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE COPRODUTOS GERADOS NA**  
**CADEIA DE PRODUÇÃO DO BIODIESEL**

**HENRY DANIEL RUIZ ALBA**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**FONTE ALTERNATIVA DE INÓCULO RUMINAL PARA**  
**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE COPRODUTOS GERADOS NA**  
**CADEIA DE PRODUÇÃO DO BIODIESEL**

**HENRY DANIEL RUIZ ALBA**  
ENGENHEIRO ZOOTECNISTA

**SALVADOR - BAHIA**

**2015**

**HENRY DANIEL RUIZ ALBA**

**FONTE ALTERNATIVA DE INÓCULO RUMINAL PARA  
AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE COPRODUTOS GERADOS NA  
CADEIA DE PRODUÇÃO DO BIODIESEL**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal da Bahia, na área de Nutrição e Produção de Ruminantes, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Lopes Oliveira

Co-Orientadora: Dra. Silvana Teixeira Carvalho

**SALVADOR - BAHIA**

**2015**

Sistema de Bibliotecas da UFBA

A325 Alba, Henry Daniel Ruiz.

Fonte alternativa de inóculo ruminal para avaliação in vitro de coprodutos gerados na cadeia de produção do biodiesel / Henry Daniel Ruiz Alba. - 2015.  
63 f.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Lopes Oliveira.  
Co-orientador: Dr.<sup>a</sup> Silvana Teixeira Carvalho  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Salvador, 2015.

1. Ruminante – Alimentação e rações - Testes. 2. Biodiesel. 3. Ácidos graxos. I. Oliveira, Ronaldo Lopes. II. Carvalho, Silvana Teixeira. III. Universidade Federal da Bahia. Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia. VI. Título.

CDD – 636.085  
CDU – 591.13

**FONTE ALTERNATIVA DE INÓCULO RUMINAL PARA  
AVALIAÇÃO IN VITRO DE COPRODUTOS GERADOS NA  
CADEIA DE PRODUÇÃO DO BIODIESEL**

**Henry Daniel Ruiz Alba**

**Dissertação defendida e aprovada para obtenção do grau de  
Mestre em Zootecnia**


**Salvador, 30 de junho de 2015**

**Comissão examinadora:**



---

**Dr. Ronaldo Lopes Oliveira  
UFBA  
Orientador / Presidente**



---

**Dr. Luis Carlos Vinhas Itavo  
UFMS**



---

**Dr. Máikal Souza Borja  
UFBA**

“É melhor saber depois de ter pensado e discutido que aceitar os conhecimentos que ninguém discute para não ter que pensar”.

Fernando Savater.

Dedico, o presente trabalho,  
A meus pais Daniel Ruiz Maguiña e Raquiel Alba Ramirez,  
a meus irmãos, Roberth, Judith, Susan e Piere,  
a meus avós paternos e maternos,  
e às pessoas que se esforçaram para o meu crescimento profissional.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela força outorgada para a concretização de todos os meus sonhos e pelas bênçãos que recebo diariamente em minha vida.

A meus pais, Daniel e Raquiel, por terem me ajudado, compreendido, educado e contribuído para a minha formação profissional. Sou eternamente grato por tudo o que fizeram para que eu alcançasse os meus sonhos, em especial, a minha amada mãe, mulher corajosa que me ensinou a nunca desistir. Amo vocês.

A meus irmãos Roberth, Judith, Susan e Piere pela força, tão distantes todo esse tempo, mas unidos pelo coração.

À Organização de Estados Americanos e ao Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras pela oportunidade de estudo no Brasil, contribuindo para o meu crescimento profissional.

À Universidade Federal de Bahia e ao programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pela oportunidade de realização deste curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela conceição da bolsa de estudos.

Ao Professor Doutor Ronaldo Lopes Oliveira, pela orientação, e à Professora Doutora Silvana Teixeira Carvalho pela co-orientação; obrigado por acreditarem em mim para a execução deste trabalho. Aos pós-doutorandos que fizeram parte da equipe de pesquisa, pela ajuda outorgada.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em zootecnia, pelos conhecimentos e orientações passados e a todo o pessoal administrativo e demais funcionários da escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia.

Aos funcionários e amigos da fazenda experimental São Gonçalo dos Campos da Universidade Federal da Bahia.

A todos os meus companheiros do programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela ajuda, amizade, paciência e compreensão outorgada e aos estudantes de graduação em Zootecnia e em Medicina Veterinária que me auxiliaram nas análises de laboratório.

À Médica Veterinária Maria Ivani Borges de Santana e a todo o pessoal administrativo do centro de abate de animais “FRIFEIRA”, pela ajuda prestada no presente experimento.

Agradecimento especial a Arinalva, técnica do laboratório de nutrição animal, ao Ricardo Maia, funcionário da escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, o meu sincero muito obrigado pela atenção que sempre tiveram comigo.

A Maikal e Vinícius pelo auxílio nas análises dos dados.

A todos os meus amigos Peruanos e estrangeiros pela companhia e pelo apoio.

Agradecimento especial ao Professor Ossival Lolato Ribeiro e à Doutoranda Emellinne Ingrid de Souza Costa pela ajuda incondicional outorgada em todo este processo, sem medir esforços para me ajudar e acreditando em meus esforços.

Agradecimento especial a Felipe Neri pela companhia na realização de todo o experimento, a Felipe Mendez por ser meu maestro em muitas ocasiões; aos dois pela paciência e, mais que me ajudar, por me lembrar de que as pessoas nunca deixam de aprender.

Agradecimento especial a Rafael Magalhães pela disposição e pela ajuda na revisão do texto.

**Muito obrigado e, que Deus abençoe a todos vocês.**



## **BIOGRAFIA**

HENRY DANIEL RUIZ ALBA nasceu no município de Caraz, Ancash, Perú, no dia 22 de agosto de 1986, filho de Daniel Ruiz Maguiña, Técnico Ebanista, e Raquel Victoria Alba Ramirez. Coursou ensino médio no Colégio “2 de Mayo” – Caraz – Ancash, Perú, concluindo no ano de 2002. Em abril de 2004, iniciou o curso de graduação em Engenharia Zootecnia na Universidade Nacional de Trujillo, no município de Trujillo, Perú, concluindo no ano de 2009. Em Abril de 2013, mudou-se para Salvador - Bahia, Brasil, onde iniciou o curso de Mestrado pelo programa de Pós-Graduação em Zootecnia, na Universidade Federal de Bahia, desenvolvendo estudos na área de Nutrição e Produção de Ruminantes, submetendo à dissertação a defesa no ano de 2015.

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 01</b> - Composição percentual dos ingredientes da dieta com base na matéria seca e composição químico-bromatológica da dieta dos animais fistulados .....	15
<b>Tabela 02</b> - Composição químico-bromatológica dos ingredientes usados para a formulação das dietas .....	16
<b>Tabela 03.</b> Composição percentual dos ingredientes nas dietas e os níveis de inclusão dos coprodutos nos dietas .....	17
<b>Tabela 04</b> - Composição químico-bromatológica das dietas .....	18
<b>Tabela 05</b> - Digestibilidade da Matéria seca dos níveis de inclusão dos coprodutos gerados na cadeia de produção de biodiesel .....	24
<b>Tabela 06</b> - Digestibilidade da fibra insolúvel em detergente neutro (DIVFDN) dos níveis de inclusão dos coprodutos gerados na cadeia de produção de biodiesel .....	25
<b>Tabela 07</b> – Concentrações médias de ácido acético (média dos 5 horários de coleta) de diferentes dietas incubadas com duas fontes de inóculo ruminal .....	26
<b>Tabela 08</b> – Concentrações médias de ácido propiônico (média dos 5 horários de coleta) de diferentes dietas incubadas com duas fontes de inóculo ruminal ..	27
<b>Tabela 09</b> – Concentrações médias da relação entre Ácido Acético : Ácido Propiônico (média dos 5 horários de coleta) de diferentes dietas incubadas com duas fontes de inóculo ruminal .....	28
<b>Tabela 10</b> – Concentrações médias de ácido Butírico (média dos 5 horários de coleta) de diferentes dietas incubadas com duas fontes de inóculo ruminal .....	29
<b>Tabela 11</b> – Concentrações médias de Nitrogênio Amoniacal (média dos 5 horários de coleta) de diferentes dietas incubadas com duas fontes de inóculo ruminal .....	30
<b>Tabela 12</b> – Concentrações médias de pH (média dos 5 horários de coleta) de diferentes dietas incubadas com duas fontes de inóculo ruminal .....	31

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AOAC	Association of official analytical chemistry
CZ	Cinzas
EE	Extrato etéreo
EPM	Erro padrão da média
FDA	Fibra em detergente ácido
FDN	Fibra em detergente neutro
FFNF	Fonte de fibra não forragem
MM	Matéria mineral
MS	Matéria seca
NDT	Nutrientes digestíveis totais
NIDA	Nitrogênio insolúvel em detergente ácido
NIDN	Nitrogênio insolúvel em detergente neutro
NRC	Nutrient Research Council
PB	Proteína bruta
TNT	Tecido não tecido

## SUMÁRIO

### FONTE ALTERNATIVA DE INÓCULO RUMINAL PARA AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE COPRODUTOS GERADOS NA CADEIA DE PRODUÇÃO DO BIODIESEL

	Página
RESUMO .....	xi
ABSTRACT .....	xii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
2.1 Digestibilidade <i>IN VITRO</i> .....	4
2.2 Parâmetros da fermentação ruminal .....	5
2.2.1 Ácidos graxos voláteis .....	5
2.2.2 Potencial de hidrogênios (pH) .....	6
2.2.3 Nitrogênio amoniacal .....	7
2.3 Inoculo Ruminal .....	8
2.4 Coprodutos derivados da produção de Biodiesel .....	9
2.4.1 Dendê .....	9
2.4.2 Glicerina .....	11
2.4.3 Licurí .....	12
2.4.4 Mamona .....	13
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>14</b>
3.1 Local de realização dos experimentos .....	14
3.2 Animais e instalações .....	14
3.3 Tratamentos e delineamento experimental .....	16
3.4 Manejo experimental .....	19
3.5 Variáveis a serem estudadas .....	20
3.5.1 Composição nutricional dos alimentos .....	20
3.5.2 Determinação da digestibilidade <i>In vitro</i> da matéria seca (DIVMS) e da Fibra insolúvel em Detergente Neutro .....	21
3.5.3 Determinação <i>In vitro</i> do N-amoniaco e pH .....	22

3.5.4	Determinação dos Ácidos Graxos Voláteis (AGV) .....	23
3.6	Análises estatísticas .....	23
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>24</b>
4.1	Digestibilidade <i>in vitro</i> da Matéria Seca .....	24
4.2	Digestibilidade <i>In vitro</i> da Fibra Insolúvel em detergente neutro (DIVFDN) .....	25
4.3	Produção de ácidos graxos voláteis (AGV) .....	26
4.3.1	Ácido Acético .....	26
4.3.2	Ácido Propiônico .....	26
4.3.3	Relação Ácido Acético : Ácido Propiônico .....	27
4.3.4	Ácido Butírico .....	28
4.4	Nitrogênio Amoniacal – N-NH <sub>3</sub> (mg N-NH <sub>3</sub> /L) .....	29
4.5	Potencial de Hidrogênios (pH) .....	30
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>31</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>36</b>
	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	37
	REFERÊNCIAS .....	38

**FONTE ALTERNATIVA DE INÓCULO RUMINAL PARA  
AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE COPRODUTOS GERADOS NA  
CADEIA DE PRODUÇÃO DO BIODIESEL**

## **FONTE ALTERNATIVA DE INÓCULO RUMINAL PARA AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE COPRODUTOS GERADOS NA CADEIA DE PRODUÇÃO DO BIODIESEL**

**Autor:** Henry Daniel Ruiz Alba.

**Orientador:** Ronaldo Lopes Oliveira

### **RESUMO:**

Duas fontes de inóculo ruminal, inóculo ruminal de animais abatidos em frigorífico e inóculo ruminal de animais fistulados, foram comparadas através da metodologia *in vitro*. Para essa comparação foram utilizadas dezesseis dietas que compreendiam quatro coprodutos gerados na cadeia de produção de biodiesel com quatro níveis de inclusão de cada coproduto. Foram avaliadas a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da fibra insolúvel em detergente neutro (DIVFDN) em incubações de 72 horas, a concentração dos ácidos graxos voláteis (ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico), a relação ácido acético : ácido propiônico, o nitrogênio amoniacal, e o pH em até 8 horas após o início da incubação. Foi observado o efeito da fonte de inóculo ruminal ( $p < 0,001$ ) sobre a DIVMS e DIVFDN quando usada a torta de dendê em níveis de inclusão de 7%, 14% e 21%. Não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) nas concentrações de ácido acético nem na proporção de ácido acético : ácido propiônico das dietas. Observaram-se diferenças significativas na concentração de ácido propiônico no nível de inclusão de 0% de glicerina bruta ( $p = 0,0114$ ) e na concentração de ácido butírico nos níveis de inclusão de 7% de torta de dendê ( $p = 0,0446$ ), de 21% de torta de licurí ( $p = 0,0032$ ) e de 10% de farelo de mamona ( $p = 0,0045$ ) sendo maiores as concentrações quando usado o inóculo ruminal de animais fistulados. A maior concentração do pH foi observada ( $p < 0,05$ ) na maioria das dietas quando incubadas com inóculo ruminal de animais abatidos em frigorífico.

Os dados encontrados apresentam ao inóculo ruminal de animais abatidos em frigorífico como uma potencial fonte de inóculo ruminal para análises na metodologia *in vitro*, porém, mas estudos são necessários para poder usar com precisão esta fonte de inóculo ruminal e evitar diferenças significativas como quando incubadas amostras com conteúdo de torta de dendê.

**Palavras-chave:** Digestibilidade, Fermentação Ruminal, Ácidos graxos voláteis, Nitrogênio Amoniacal, pH, Nutrição de ruminantes.

**ALTERNATIVE SOURCE OF INOCULUM FOR RUMINAL *IN VITRO*  
EVALUATION OF BYPRODUCTS GENERATED IN THE CHAIN OF  
PRODUCTION OF BIODIESEL**

**Author:** Henry Daniel Ruiz Alba.

**Adviser:** Ronaldo Lopes Oliveira

**ABSTRACT:**

Two sources of ruminal inoculum, ruminal inoculum of animals slaughtered in a industrial slaughtered house and inoculum of rumen fistulated animals, were compared using the methodology *in vitro*. For this comparison were used sixteen diets that comprised four co-products generated in the production chain of biodiesel with four levels of inclusion of each byproduct. Were evaluated the *in vitro* dry matter digestibility (IVDMD) and insoluble fiber in neutral detergent (IVFND) in incubations of 76 hours, the concentration of volatile fatty acids (acetic acid, propionic acid and butyric acid), acetic acid : propionic acid proportion, the ammoniacal nitrogen and pH up to 8 hours after the start of incubation. It was observed the effect of source of ruminal inoculum ( $p < 0.001$ ) on the IVDMD and IVFND when used the palm kernel cake at inclusion levels of 7 %, 14% and 21 %. No significant differences were observed ( $p > 0.05$ ) in concentrations of acetic acid or the proportion of acetic acid : propionic acid of diets. We observed significant differences in the concentration of propionic acid in the level of inclusion of 0% of crude glycerin ( $p = 0.0114$ ) and in the concentration of butyric acid in the levels of inclusion of 7% palm kernel cake ( $p = 0.044$ ), 21% of licurí cake ( $p = 0.0032$ ) and 10% of castor bean meal ( $p = 0.0045$ ) and higher concentrations when used the inoculum of rumen fistulated animals. The largest concentration of pH was observed ( $p < 0.05$ ) in most diets when incubated with rumen inoculum of animals slaughtered. The data found feature to ruminal inoculum of animals slaughtered as a potential source of ruminal inoculum for analyzes in methodology *in vitro*, however, studies are needed in order to be able to use with precision this source of ruminal inoculum and avoid significant differences as when incubated samples with content of palm kernel cake.

**Keywords:** Ammoniacal nitrogen, Digestibility, fatty acids volatile, Nutrition of ruminants, pH, Ruminal Fermentation



## 1 INTRODUÇÃO

O Estado da Bahia está integrado no crescimento constante das indústrias brasileiras, trazendo benefícios socioeconômicos para a população como geração de empregos e fluxo econômico.

A indústria de biodiesel tem apresentado um crescimento constante nos últimos anos, as principais motivações para a produção de biodiesel são os benefícios socioeconômicos e ambientais que podem ser gerados. O grande mercado energético brasileiro dá sustentação a um imenso programa de geração de emprego e renda a partir da produção do biodiesel.

Segundo a pesquisa feita por Lucena (2008), a cada 1% de substituição de óleo diesel por biodiesel produzido com a participação da agricultura familiar podem ser gerados cerca de 45 mil empregos no campo, com uma renda média anual de aproximadamente R\$4.900,00 por emprego.

Além disso, a partir de 2008, a mistura de biodiesel puro (B100) a óleo diesel passou a ser obrigatória. Entre janeiro e junho de 2008, a mistura de biodiesel puro ao óleo diesel foi de 2%, entre julho de 2008 e junho de 2009 foi de 3% e entre julho e dezembro de 2009 foi de 4%. A partir de primeiro de janeiro de 2010, o biodiesel passou a ser adicionado ao óleo diesel na proporção de 5% em volume, conforme a Resolução do Conselho Nacional de Política Energética Nº 6 de 16 de setembro de 2009 (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, 2013).

O biodiesel é produzido a partir de plantas oleaginosas e gordura animal, matérias primas que podem ser produzidas por famílias rurais, melhorando a situação econômica das mesmas, que podem participar individualmente ou em associações contribuindo assim para o desenvolvimento econômico e social.

No processo de produção de biodiesel, são gerados coprodutos, dentre os quais tem-se, principalmente, as tortas e os farelos, que eram descartados por serem considerados resíduos sem valor econômico, poluindo o meio ambiente. Esses coprodutos possuem características e níveis nutricionais (proteína e energia) variados, mas com potencial para alimentação animal e são de aquisição com baixo custo (OLIVEIRA et al., 2012), atribuindo aos coprodutos um novo contexto para substituição de alimentos mais comumente usados e estudados (milho, soja) ou para sua inclusão na dieta total com a consequente diminuição dos custos de alimentação.

A diminuição dos custos de alimentação sem o comprometimento da produção pecuária torna-se um fator que impulsiona o produtor rural a lutar contra os desafios do século, tornando-o mais competitivo, promovendo, dessa forma, o desenvolvimento das cadeias produtivas pecuárias e o consequente aumento global de produtos derivados da pecuária como carne e leite.

A avaliação de um alimento é determinada para conhecer sua habilidade de sustentar diferentes tipos e níveis de produção animal. Essa habilidade depende, principalmente, da digestibilidade do alimento, que é influenciada por suas características físicas e químicas. As técnicas para avaliar os alimentos podem ser classificadas como: i) Métodos biológicos, que usam animais (Métodos *in vivo* e *in situ*) e ii) Métodos de laboratório, que são caracterizados pela simulação do ambiente ruminal, utilizando líquido ruminal coletado de animais doadores (Método *in vitro*).

No método *in vivo*, é necessário um elevado número de animais, grande quantidade de alimentos, mão-de-obra, tempo, além das instalações em que serão alojados. Embora seja um método preciso, o custo para sua condução é oneroso, quando comparado com os métodos *in situ* e *in vitro*, que requerem poucos animais para as avaliações, reduzindo, assim, o número de animais e instalações e, conseqüentemente, os custos. O método *in situ*, requer trabalho intensivo para um bom desempenho, mesmo apresentando algumas desvantagens como a manipulação diária e o estresse do animal (MOULD et al, 2005). As avaliações *in vitro* surgem como uma alternativa (DAMIRAN et al., 2008), porque o número de animais necessários é reduzido, diminuindo os custos, e apresenta-se como um método confiável para a avaliação de alimentos.

Essa técnica, no entanto, depende, principalmente, da fonte de inóculo ruminal (AMMAR et al., 2008). Geralmente, o inóculo ruminal é obtido de animais fistulados, porém a cirurgia para fistular os animais é um procedimento de alto custo, que requer uma série de cuidados, além disso, as leis de proteção dos animais têm incrementado e estão cada vez mais rigorosas quanto à liberação para tais procedimentos. Em função disso, a obtenção de inóculo ruminal de animais abatidos em frigorífico surge como uma ótima alternativa para ensaios *in vitro* (CATTANI, 2011).

O inóculo ruminal usado em ensaios *in vitro*, contudo, representa a principal fonte de variação do mesmo, dependendo do animal, do consumo e da oferta de dieta e

de água, do ambiente ruminal, da produção de saliva, do tratamento pré-incubação, do método de coleta, da região geográfica dentre outros (MOULD et al., 2005). Os protozoários são os microrganismos do inóculo ruminal que mais variam pela distribuição geográfica, sendo que animais de uma região apresentam diferenças significativas no conteúdo de protozoários com animais de outra região (KULKARNI, 2013).

A principal fonte de variação do inóculo ruminal é o alimento (proporção, tipo e frequência de alimentação) que recebe o animal doador do inóculo ruminal ou das características físico-químicas desse alimento como o tamanho de partícula (TAF AJ et al., 2005), sendo a contagem de bactérias celulolíticas diminuída de  $10^7$  em dietas com feno a  $10^3$  em dietas onde o milho substituí o feno (MOULD et al., 2005).

A abundância, a composição microbiana e a atividade dos microrganismos no inóculo podem variar consideravelmente, dependendo da espécie (BROOKS et al., 2014), do método de colheita do conteúdo ruminal (BUENO et al., 2005), de variações fisiológicas e metabólicas do mesmo indivíduo, ou da dieta que recebe o animal doador (MOULD et al., 2005).

Há controvérsias se o animal doador do inóculo pode ou não exercer um efeito sobre os parâmetros de fermentação e as populações microbianas determinadas por ensaio *in vitro*. Não foram observadas diferenças significativas na digestibilidade aparente ou na digestibilidade verdadeira *in vitro* de alguns alimentos quando comparado inóculo ruminal obtido de novilhos alimentados com feno e inóculo ruminal obtido de vacas alimentadas com uma dieta 56% forragem e 44% grão (KING; PLAIZIER, 2006) e na produção de gás quando comparados o inoculo ruminal obtido de vacas Holstein em lactação e o inoculo ruminal obtido de ovinos Santa Inês (BUENO et al., 2005), ao passo que outros autores encontraram diferenças significativas tanto na digestibilidade, na produção de AGV's, na concentração de amônio (MOULD et al., 2005) e na produção de gás (VAN GELDER et al., 2005).

A variabilidade influenciada pelo estado fisiológico do indivíduo doador do inoculo ruminal pode ser diminuída pela mistura do conteúdo do rúmen de vários animais.

Há, também, alguma controvérsia sobre o momento ideal de amostragem de conteúdo ruminal para a preparação de inóculos (MOULD et al., 2005).

Na avaliação *in situ* e *in vitro* é necessária, a utilização de animais previstos de cânula ruminal, abomasal, omasal, duodenal e/ou ileal, e a constante manipulação dos animais, que afeta o bem-estar animal e vá contra as leis sobre cuidado dos animais como citado por Mutimura et al. (2013), marcado até como inaceitável por Chaudhry e Mohamed (2012).

Muitos experimentos foram feitos comparando diferentes fontes de inóculo ruminal como fluido ruminal e fezes de ovino (VÁRADYOVÁ; BARAN; ZELENÁK, 2005), fluido ruminal e fezes de búfalo (CUTRIGNELLI et al., 2005), fluido ruminal obtido de búfalos e fluido ruminal obtido de ovinos (CALABRÒ et al., 2005), fluido ruminal obtido de caprinos e fluido ruminal obtido de ovinos (AMMAR et al., 2008), diferentes métodos de conservação do inoculo ruminal (HERVÁS et al, 2005; DENEK; CAN; AVCI, 2010), dentre outros, tendo se encontrado diferenças significativas ou não.

Para não requerer de animais canulados, diminuir os custos da cirurgia de canulação e cuidado dos animais canulados e, não contrariar leis sobre o bem-estar animal, Chaudhry e Mohamed (2012) propuseram a utilização do conteúdo ruminal de animais abatidos como fonte de inoculo ruminal em ensaios *in vitro*.

Tendo em consideração as observações descritas, foi formulada a hipótese que o inóculo ruminal obtido de animais abatidos em frigorífico pode substituir ao inóculo ruminal obtido de animais fistulados nas análises de digestibilidade e parâmetros de fermentação ruminal em ensaio *in vitro* de coprodutos gerados na cadeia de produção de biodiesel.

Neste contexto, Objetivou-se avaliar o inóculo ruminal obtido de animais abatidos em frigorífico nas análises de digestibilidade e parâmetros de fermentação ruminal em ensaios *in vitro*. Os resultados levarão á utilização de tecnologias de avaliação dos alimentos que levam em consideração o bem-estar animal.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Digestibilidade *in vitro***

O uso de animais fistulados é contraria à posição do bem-estar animal, já que os animais usados estão expostos a estresse durante a preparação, a avaliação e a recuperação dos procedimentos experimentais. Embora o pesquisador tente reduzir o

manejo dos animais e melhorar as condições de comodidade do animal ainda tem-se levantado questões éticas e morais sobre o bem-estar animal (MOULD et al., 2005)

Além disso, os altos custos associados à capacidade analítica limitada da técnica *in situ*, levaram ao desenvolvimento de técnicas *in vitro* com vantagens importantes, como a menor manipulação dos animais, diminuindo o estresse animal.

A função de um sistema *in vitro* é reproduzir as condições ruminais sem comprometer as características da fermentação ruminal, como o pH. As técnicas *in vitro* podem ser classificadas como: i) Os métodos utilizados para medir a digestibilidade de alimentos para animais; ii) métodos que medem a produção de gás a partir da fermentação de alimentação. Esses sistemas têm feito o possível para diminuir as variáveis que provocam variação e conseqüentemente melhorar o estudo dos processos na dinâmica ruminal, como o metabolismo do nitrogênio (CALSAMIGLIA; STERN; FIRKINS, 1995), os ácidos graxos e a biohidrogenação (QIU et al., 2004); o impacto de diversos fatores sobre a fermentação e o crescimento microbiano (BACH et al., 2008), o efeito do pH e da relação de alimentos:tampão de diferentes compostos naturais como óleos essenciais (CASTILLEJOS; CALSAMIGLIA; FERRET, 2006) e coprodutos como farelo de girassol (GARCÍA et al., 2006) e torta de oliva (MOLINA-ALCAIDE et al., 2009).

## **2.2 Parâmetros da fermentação ruminal**

### **2.2.1 Ácidos graxos voláteis.**

No rúmen, a produção de ácidos graxos voláteis, depende da composição da dieta, da atividade microbiana, do pH do meio, da frequência de ingestão de alimentos, da taxa de passagem, dentre outros fatores (KNAPP et al., 2014).

Segundo Bannink et al. (2006) os ácidos graxos voláteis são, em quantidade, os maiores produtos da fermentação do rúmen, sendo que o acetato, o butirato (obtidos, principalmente, da fermentação de carboidratos fibrosos e usados, principalmente, no metabolismo do animal, como precursores da síntese de ácidos graxos de cadeia longa) e o propionato (obtido, principalmente, da fermentação de carboidratos não fibrosos e principal precursor de glicose) representam 95% dos ácidos graxos voláteis do fluido ruminal.

Os ácidos graxos voláteis são usados pelo animal como a principal fonte de energia, sendo que o ruminante depende dos ácidos graxos voláteis para suprir 80% as necessidades energéticas de manutenção (ALUWONG; KOBO; ABDULLAHI, 2010)

No que diz respeito à composição da dieta, tem-se observado que as proporções dos ácidos graxos voláteis (acetato:propionato:butirato) presentes no fluido ruminal é de 70:20:10 em dietas que contêm apenas forragens, 60:30:10 em dietas que misturam concentrado e forragens e 50:40:10 em dietas que contêm só concentrado (ALUWONG; KOBO; ABDULLAHI, 2010), deduzindo, por conseguinte, que na medida em que se incrementa o concentrado na dieta, diminui-se a proporção acetato:propionato indicando que quando se incrementam os níveis de concentrado na dieta, incrementam-se os níveis de propionato no fluido ruminal.

A variação na produção dos ácidos graxos voláteis que depende da população de microrganismos, é também altamente dependente do tipo de dieta e carboidrato que chega a ser fermentado. É assim que em dietas com alto conteúdo de grão (alimentos que geralmente contêm mais carboidratos não fibrosos comparados aos estruturais), é impulsionado o crescimento de bactérias que produzem propionato e afetando o crescimento de bactérias que produzem acetato (ELLIS et al., 2008), diminuindo, assim, a proporção acetato:propionato.

Segundo Moreira et al. (2009), a produção de gás é classificada como direta ou indireta mas sempre relacionada com os AGV's.

A produção direta de gás esta diretamente relacionada com a fermentação do alimento pelas bactérias ruminais e a produção de produtos finais como os AGV's e a produção indireta esta relacionada ao tamponamento dos AGV's pelo bicarbonato com a consequente liberação de CO<sub>2</sub> (CATTANI, 2011).

### **2.2.2 Potencial de hidrogênios (pH).**

O pH no rúmen está no faixa de 5,5 a 7,0 e; varia em função da composição da dieta (com tendência a 5,5 em dietas com um alto conteúdo de carboidratos não fibrosos rapidamente fermentáveis e com tendência a 7,0 em dietas com maior conteúdo de carboidratos fibrosos de lenta fermentação), do horário do dia, do número de refeições, dentre outros fatores. Longos períodos de pH baixo podem afetar negativamente o consumo de alimento, a degradação de nutrientes (DIJKSTRA et al., 2012) e a

população bacteriana; segundo Lu (2013), o  $\text{pH} \leq 6,0$  inibe o crescimento e a fermentação das bactérias celulolíticas.

Dois mecanismos de regulação do pH ruminal podem ser observados: o primeiro é a capacidade tampão da saliva, mediante bicarbonatos e fosfatos; o segundo é a absorção dos ácidos graxos de cadeia curta a través do epitélio ruminal na sua forma não dissociada, a forma dissociada é absorvida mediante canais transportadores (LU, 2013).

O valor do pH tem uma relação negativa com a concentração dos ácidos graxos voláteis, ou seja, enquanto se incrementa a concentração dos ácidos graxos voláteis, diminui-se o pH do meio ruminal, essa acidez é dependente da dissociação dos ácidos graxos voláteis, representada pelo valor do pKa (DIJKSTRA et al., 2012).

O valor do pKa do ácido láctico é 3,86 e dos principais ácidos graxos voláteis é: ácido acético pKa = 4,76; ácido propiónico pKa = 4,87 e ácido butírico pKa = 4.82 (DIJKSTRA et al., 2012).

### **2.2.3 Nitrogênio amoniacal.**

No rúmen, as bactérias começam a degradação do alimento. Com relação à proteína, o primeiro passo da degradação é a hidrólise pelas proteases para peptídeos e aminoácidos, o segundo passo é pela ação de peptidases e enzimas desaminadoras para cadeias carbônicas e amônia. Os responsáveis por essa degradação são os microrganismos ruminais que degradam compostos nitrogenados (ABDOUN; STUMPF; MARTENS, 2007).

O teor de Nitrogênio amoniacal ( $\text{N-NH}_3$ ) é consequência do equilíbrio entre sua liberação, a partir da degradação dos compostos nitrogenados, e da sua utilização pelos microrganismos.

Mais de 50% de nitrogênio consumido é absorvido na forma de amônia, embora, no rúmen, encontrem-se presentes as duas formas  $\text{NH}_3$  e  $\text{NH}_4^+$ , e essa concentração é dependente do pH, sendo que, em pH menor que 7,0, a concentração de  $\text{NH}_4^+$  é maior que 99% no fluido ruminal (LU, 2013).

Da ureia total que circula no corpo em ruminantes, 90% é reciclado para o trato gastrointestinal e, além dos compostos nitrogenados do alimento, também a amônia é gerada na hidrólise da ureia reciclada que chega ao trato gastrointestinal por meio da

saliva (DIJKSTRA et al., 2012) e  $3,8 \text{ g.d}^{-1}$  de  $\text{N-NH}_3$  é produzido de fontes endógenas via reciclagem (ABDOUN; STUMPPFF; MARTENS, 2007).

A concentração de  $\text{N-NH}_3$  é indispensável para o crescimento bacteriano principalmente das bactérias celulolíticas, desde que associada a fontes de energia, e está diretamente relacionada à solubilidade da proteína da dieta e à retenção do N pelo animal (YAN et al., 2007).

A amônia é a fonte de nitrogênio para a maior parte das bactérias (90% de espécies bacterianas), promovendo o crescimento e sínteses de proteína microbiana, sendo que de 40% a 70% do nitrogênio microbiano é derivado da amônia produzida no rúmen e a síntese de proteína microbiana é saturada em concentrações ruminiais de  $3.6 \text{ mmol.L}^{-1}$  ou  $50 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NH}_3\text{-N}$  onde a reciclagem de ureia é menor (LU, 2013).

Sabe-se que a concentração de amônia é responsável pela modulação da reciclagem da ureia e estimula o transporte do sódio (LU, 2013).

A absorção da amônia não é só modulada pelas suas concentrações no fluido ruminal mas também pela concentração dos ácidos graxos de cadeia curta e do dióxido de carbono, efeito que pode ser explicado pela ação dos ácidos graxos de cadeia curta e do dióxido de carbono sobre o fluxo de sangue epitelial (ABDOUN; STUMPPFF; MARTENS, 2007).

### **2.3 Inóculo Ruminal**

A avaliação de alimentos pela técnica *in vitro* tem-se convertido numa opção viável para a avaliação de alimentos, tendo como vantagens o maior número de avaliações, custos relativamente menores, a automatização e a precisão de dados, a possibilidade de avaliação de alimentos que poderiam afetar a saúde animal e a alta correlação com estudos feitos *in vivo* (Mould et al., 2005).

Vários fatores influenciam o inóculo ruminal usado nas avaliações e dos fatores que podem ser controlados são atribuídos ao próprio animal (espécie animal, estado fisiológico, idade, frequência de alimentação, salivação), ao alimento (proporção forragem:concentrado, fonte de carboidratos não fibrosos, tipo de volumoso, apresentação e qualidade do alimento, conteúdo de gorduras ou óleos, uso de aditivos) e ao método de coleta (horário de coleta, quantidade e qualidade das fases do conteúdo ruminal, manutenção das condições anaeróbicas, tipo de tampão usado), e segundo



Bueno et al. (2005), algumas dessas variações podem ser diminuídas com a coleta de inóculo ruminal de vários animais e o preparo da equipe de coleta para uma padronização da coleta.

#### **2.4 Fontes de inóculo ruminal**

A obtenção do inóculo ruminal dá-se a partir de animais fistulados, mas o uso de animais fistulados não está positivamente ligado ao bem-estar animal, o que levou a buscar várias outras fontes alternativas de inóculo ruminal para essas avaliações, e segundo Mould et al. (2005) sempre apresentando variações que segundo os pesquisadores poderiam ser corrigidas por meio de equações matemáticas.

Então é preciso avaliar outras fontes de inóculo ruminal para realizar estes estudos *in vitro*, que são similares ao inóculo ruminal obtido de animais fistulados, é assim que o inóculo ruminal obtido do rúmen de animais abatidos em frigorífico surge como uma opção viável para as avaliações *In vitro* sendo que esse inóculo ruminal apresenta muita similaridade com o inóculo ruminal de animais fistulados e a obtenção desse inóculo ruminal não apresenta os custos de manutenção de animais fistulados nem encontra-se afetando o bem-estar animal.

Muitos experimentos foram feitos comparando diferentes fontes de inóculo ruminal ou métodos de conservação, para diminuir a manipulação constante de animais fistulados, conseqüentemente, diminuir o estresse e melhorar as condições de conforto do animal. Foram testadas algumas alternativas como, fezes de ovino comparada com conteúdo ruminal de ovinos como fonte de inóculo (VÁRADYOVÁ; BARAN; ZELENÁK, 2005), fezes de búfalo comparada com conteúdo ruminal de búfalos como fonte de inóculo (CUTRIGNELLI et al., 2005), fluido ruminal obtido de búfalos e fluido ruminal obtido de ovinos (CALABRÒ et al., 2005), fluido ruminal obtido de caprinos e fluido ruminal obtido de ovinos (AMMAR et al., 2008), diferentes métodos de conservação do inóculo ruminal (HERVÁS et al., 2005; DENEK; CAN; AVCI, 2010), dentre outros, tendo se encontrado diferenças significativas ou não.

## **2.5 Coprodutos derivados da produção de Biodiesel.**

### **2.5.1 Dendê**

O Dendê é uma fonte importante para a produção de biocombustíveis em regiões tropicais (SILVA et al., 2013)

Segundo Furlan Júnior et al. (2006) para cada 100 toneladas de cachos de frutos processados são obtidas 3 toneladas de torta de dendê.

De acordo com Sousa et al. (2010) a extração do óleo é realizada de duas formas: processo de extração por solvente e processo de extração mecânica. O primeiro processo dá-se pelo uso de solventes químicos, no entanto o resíduo obtido não possui uma boa palatabilidade para animais. O segundo processo consiste, resumidamente, na prensagem mecânica dos frutos, por uma prensa contínua, para a retirada do óleo do mesocarpo carnoso.

A produção de torta de dendê envolve a moagem do dendê seguida da prensagem, podendo ter ou não uma fase intermediária de escamação e cozimento. Durante o estágio de prensagem, o óleo de dendê cru é desviado para clarificação e a torta de dendê residual é esfriada e armazenada em depósito (SHARMILA et al., 2014).

Esses diferentes métodos de extração determinam diferenças nos seus conteúdos de óleo: 5% a 12% para torta de dendê extraída por prensagem e 0,5% a 3% para o tipo de farelo de dendê extraída por solvente (SHARMILA et al., 2014), não observando diferença no conteúdo de proteína entre os dois métodos de extração, com variação de 14,6% a 16,0 % com base na matéria seca.

Macome et al. (2012) relataram que, após a moagem e a extração do óleo de dendê, é gerada uma torta, que é lançada no ambiente e pode constituir um sério problema de impacto ambiental.

Por essa razão, tem-se pesquisado a utilização dessa cultura, principalmente na dieta animal, com finalidades diversas, destacando-se o aumento da produtividade e a redução dos custos da atividade agropecuária (FERREIRA et al., 2012).

Segundo Rahman et al. (2013), a torta de dendê é um alimento considerado de alta qualidade para alimentação animal e baixo custo, moderado no conteúdo proteico e energético e, com alta concentração de fibra.

Essa composição é compatível com aquela apresentada por forrageiras como o capim-tifton (*Cynodon spp.*) porquanto, este coproduto pode ser usado como alimento alternativo ao volumoso da dieta animal.

De acordo com Bringel et al. (2011), dentre os subprodutos agroindustriais, a torta de dendê se destaca como um subproduto fibroso, também chamado de fonte de fibra não forragem (FFNF), podendo ser uma estratégia interessante em períodos de seca, contribuindo para redução do custo de produção.

Segundo Bringel et al. (2011) a torta de dendê pode ser uma alternativa interessante para compor dietas de baixo custo para ruminantes, no entanto, há uma carência de pesquisas sobre essa alternativa alimentar.

Correia et al. (2012), contudo, observou que a dieta contendo torta de dendê proporcionou menor consumo de MS em relação às demais dietas contendo farelo de soja, torta de amendoim e torta de girassol. O autor justificou que esse comportamento decorre do alto teor de FDN da dieta com torta de dendê, em relação às outras dietas experimentais supracitadas.

Segundo Chanjula; Siritwathananukul; Lawpetchara (2011), apresentaram que níveis entre 20% e 30% de torta de dendê, podem ser utilizadas eficientemente por cabras alimentadas com feno sem afetar o consumo de alimento, digestibilidade, padrões de fermentação, metabolitos sanguíneos e utilização do nitrogênio.

Segundo Abubakr et al. (2013), reportaram que altos níveis de torta de dendê (80% na matéria seca), incrementam o consumo de alimento mas diminuem o ganho diário de peso e a qualidade de carcaça, em dietas para caprinos com 90% concentrado.

Já Silva et al. (2013), apresentou que a torta de dendê diminui a digestibilidade dos carboidratos não fibrosos e da proteína bruta, indicando que a torta de dendê, não potencial de uso na suplementação de vacas em pastoreio.

### **2.5.2 Glicerina**

O biodiesel é um mono-álquil éster de ácidos graxos, obtido pela transesterificação de óleos vegetais com álcoois, metanol ou etanol, por meio da catálise básica com Hidróxido de sódio ou Hidróxido de potássio; ou ainda pela esterificação desses materiais na presença de catalisadores ácidos (SERRANO, 2011), conseqüentemente os triglicerídeos são transformados em moléculas menores de ácidos

graxos esterificados, que têm como coproduto a glicerina bruta (THOMPSON; HE, 2006).

A glicerina possui três graus de pureza, sendo classificada pelo teor de glicerol como glicerina bruta com 90% de glicerol (SERRANO, 2011), glicerina de média pureza, entre 80% e 90% de glicerol, e glicerina de alta pureza, acima de 99% de glicerol, e é amplamente utilizada na indústria farmacêutica e alimentícia (STRADA, 2013).

Segundo Carvalho et al. (2010) a produção do coproduto glicerina corresponde a aproximadamente, 10% do volume total de biodiesel produzido, enquanto Oliveira et al. (2012) reportaram que o coproduto glicerol corresponde a aproximadamente, 10% – 13% do volume total de biodiesel produzido.

Cerca de 44% do glicerol que chega ao rúmen é fermentado pelos microrganismos, 43% é absorvido pelas papilas ruminais e 13% desaparecem por passagem com a digesta (KREHBIEL, 2008). O glicerol é absorvido diretamente pelo epitélio ruminal, metabolizado no fígado e direcionado para a gliconeogênese pela ação da enzima glicerol quinase, que o converte em glicose e parte do glicerol presente na corrente sanguínea pode ser removido por tecidos (DONKIN, 2008).

Parte do glicerol pode ser fermentada a propionato, no rúmen, que por sua vez é metabolizado a oxaloacetato, por meio do ciclo de Krebs, no fígado, e pode ser utilizado para formar glicose pela via gliconeogênica. Assim, a glicerina bruta apresenta potencial de aplicação como substrato gliconeogênico para ruminantes (CHANJULA; PAKDEECHANUAN; WATTANASIT, 2014).

O glicerol é um composto altamente degradado no rúmen, sendo que mais de 85% do glicerol desaparece no rúmen nas primeiras 2 horas depois da alimentação em animais adaptados a dietas contendo glicerol (DONKIN, 2008), com a consequente produção de ácidos graxos voláteis pelas bactérias ruminais, principalmente propionato, diminuindo, assim, a proporção de acetato:propionato. No entanto, existe a informação de que também podem ser produzidos lactato, succinato e acetato a partir do glicerol (OLIVEIRA; PRADO; MARQUES, 2011).

É sugerido que as bactérias da espécie *Selenomonas ruminantium* são as responsáveis pela maior fermentação do glicerol no rúmen (KREHBIEL, 2008).

Segundo Van Cleef et al. (2014), embora diminuindo a digestibilidade da fibra, até 30% de glicerina bruta (Base na matéria seca) podem ser incluídas na dieta de bovinos de corte, em dietas 30% forragem (Silagem de milho) e 70% concentrado como fonte energética, sem afetar o desempenho, nem as características de carcaça.

Segundo Krueger et al. (2010), a inclusão de 40% de glicerol (Base na matéria seca) não influenciou sobre a digestibilidade da fibra, porém, apresentou menor produção de ácido acético e manteve concentrações similares de ácido propiônico e ácido butírico, utilizando dietas 100% forragem em vacas leiteiras.

Segundo Wang et al. (2009), a inclusão de 300 gr de glicerol/animal/dia (Base na matéria seca) influenciou positivamente a digestibilidade dos nutrientes da dieta, porém, influenciou negativamente no pH e nas concentrações de nitrogênio amoniacal, porém, manteve concentrações similares de ácido propiônico e incremento as concentrações de ácido propiônico e ácido butírico, e apresentou um comportamento quadrático na excreção dos derivados de purinas, comparados com a dieta controle, utilizando dietas 60% forragem e 40% concentrado para gado de corte.

### **2.5.3 Licurí.**

O Licurí – *Syagrus coronata* (Martius) Beccari – pertence à subfamília das Aracoideae e à família das Aracaceae, das quais 16 espécies concentram-se na região nordeste do Brasil (RAMALHO, 2008). Com, aproximadamente, 10 metros de altura e com folhas de 2 a 3 metros de comprimento, começa a frutificar aos seis anos, o licurí é capaz de suportar secas prolongadas sendo possível encontrar a palmeira em frutificação durante um longo período do ano, seus cachos têm, em média, 1300 unidades de frutos ricos em óleo. Trata-se de uma palmeira totalmente aproveitável, que vem sendo amplamente explorada desde os tempos coloniais, é uma das principais palmeiras nativas do Semiárido brasileiro, predominante nas regiões secas e semiáridas da Caatinga sendo na Bahia onde se encontram as maiores concentrações do Licurí (DRUMOND, 2007).

Altamente explorado pela indústria de extração de óleo, o óleo de licurí é considerado o melhor óleo brasileiro para a produção de sabões (RAMALHO, 2008).

A torta originada do resíduo obtido da extração do óleo serve como excelente alimento para animais, com um valor nutricional variado. Ramalho (2008) apresentou

valores de 19% de proteínas, 16% de celulose e 11% a 12% de óleo. Já Carrera et al. (2012) registrou valores da torta de licurí de 93,30% de matéria seca, 18,92% de proteína bruta, 16,59% de extrato etéreo e 52,18% de fibra em detergente neutro corrigido para cinza e proteína; Nogueira et al. (2013) encontraram valores para a torta de licurí de 16,93% de proteína bruta, 9,13% de extrato etéreo e 51,58 de fibra em detergente neutro corrigido para cinza e proteína; Borja et al. (2010) expressou valores de 23,6% de proteína bruta, 10,1% de extrato etéreo e 51,5% de fibra em detergente neutro, sendo caracterizada como um alimento proteico, mas com características energéticas e de fibra.

Segundo Borja et al. (2010), a torta de licurí apresentou potencial como alimento alternativo na alimentação de cabras, baseado no consumo y digestibilidade do alimento, quando incluso em até 45% da dieta, em dietas 50% forragem e 50% concentrado.

#### **2.5.4 Mamona**

A mamoeira (*Ricinus communis* L.) é uma planta pertencente à família Euforbiaceae, de fácil propagação e adaptação em diferentes condições climáticas, apresenta grande potencial de cultivo. O nordeste é a principal região produtora no Brasil, principalmente em áreas do semiárido, com importância social e econômica, devido à geração de emprego e de renda para a população (DINIZ et al., 2010).

A Torta de mamona consiste do resíduo da extração do óleo das sementes por prensado, o qual apresenta um grande potencial na nutrição animal como uma fonte proteica (GIONBELLI et al., 2014).

O farelo de mamona é obtido através da extração do óleo de mamona com emprego de solventes orgânicos, sendo, então, depois do processamento útil na alimentação de ruminantes e não ruminantes, com um conteúdo nutricional de qualidade (VIEIRA, 2011).

Da extração do óleo da semente da mamona, resultam aproximadamente 55% da massa viável como coproduto, sendo o farelo de mamona o principal coproduto (GIONBELLI et al., 2014).

O farelo de mamona é um potencial alimento substitutivo de fontes proteicas convencionais como o farelo de soja, em virtude de seu menor preço de mercado e

porque não compete diretamente com os alimentos destinados à alimentação de monogástricos, ou à alimentação humana (DINIZ et al., 2010).

A utilização do farelo de mamona como alimento para animais deve ser feita após sua destoxificação, em substituição a ingredientes mais onerosos da dieta. Em sua composição, o farelo de mamona destoxificado apresenta teores de 41,2% de proteína bruta, 2,62% de extrato etéreo, 32,84% de fibra, 7,65% de matéria mineral (VIEIRA, 2011).

A toxidez causada pela ricina presente no farelo de mamona é a única limitação, que pode ser solucionada pelo tratamento do farelo de mamona com autoclavagem em 15 psi ou com tratamento alcalino com hidróxido de cálcio em uma dose de 60 gr/Kg de farelo (DINIZ et al, 2010).

A utilização de dietas com elevada proporção de concentrado para ruminantes em terminação é uma alternativa para melhores respostas produtivas.

A disponibilidade deste coproduto, a necessidade de suplementação do rebanho nos períodos mais críticos do ano, a busca por melhor desempenho animal com a utilização de dietas nutricionalmente adequadas e os menores custos justificam a avaliação da utilização do farelo de mamona em dietas para ruminantes.

Segundo Oliveira et al. (2010), embora o tratamento com 40g de  $\text{Ca(OH)}_2$ /Kg de farelo de mamona na matéria fresca não desnatura toda a ricina presente, foi observado o incremento na taxa de degradação do FDN, na sínteses de proteína microbiana, na eficiência de utilização do nitrogênio e da energia pelos microrganismos ruminantes sem encontrar efeitos negativos sobre o fígado de ovinos.

Segundo Diniz et al. (2011), o farelo de mamona pode substituir o farelo de soja até em 100%, quando tratada com óxido de cálcio (60 gr/Kg de matéria natural) sem afetar as variáveis físicas e fisiológicas de gado de corte alimentados com dietas de 65% silagem de milho e 35% concentrado.

Já Gionbelli et al (2014), também relata que o farelo de mamona pode substituir em até 18% (Matéria seca) o farelo de soja, quando tratada com óxido de cálcio (60 gr/Kg de matéria natural) em dietas para ovinos em terminação, com 60% silagem de milho e 40% concentrado, sem afetar o desempenho animal.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local de realização dos experimentos

Os experimentos Foram conduzidos na Fazenda Experimental São Gonçalo - BA, pertencente à Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia (12° 23' 57.51" S, 38° 52' 44.66" W), no município de São Gonçalo dos Campos - BA, localizada a 108 km de Salvador, situada na mesorregião Centro-Norte Baiano e microrregião de Feira de Santana (Recôncavo Baiano), caracterizada por temperatura média anual de 26°C de temperatura, 85% de umidade relativa do ar e precipitação anual aproximada de 1200 mm. O experimento foi realizado entre os meses de setembro de 2014 e janeiro de 2015.

As análises químico-bromatológicas foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia.

#### 3.2 Animais e instalações

No presente experimento, foram usados animais fistulados e foi feita coleta de conteúdo ruminal de animais abatidos em frigorífico.

A utilização de animais fistulados no presente experimento foi aprovada pela comissão de ética da Universidade Federal de Bahia.

Foram utilizados cinco bovinos anelorados, adultos, castrados, com peso corporal médio de  $\pm$  320 kg, providos de cânula ruminal. Os animais foram alojados em baias individuais, com comedouro e bebedouro. Os animais foram adaptados a uma dieta para animais em manutenção (Tabela 1) durante sete dias e receberam uma ração composta por 40% de volumoso (feno de capim Tifton-85 - *Cynodon* sp) e 60% de concentrado (milho moído, farelo de soja, ureia e suplemento mineral). A alimentação foi realizada duas vezes ao dia, às 9 horas e às 17 horas.

Tabela 01 - Composição percentual dos ingredientes da dieta com base na matéria seca e composição químico-bromatológica da dieta dos animais fistulados.

<b>Ingredientes (%)</b>	
Feno de Tifton-85	40,00
Milho Moído	54,00



<b>Ingredientes (%)</b>	
Farelo de soja	4,80
Ureia	0,60
Mistura Mineral <sup>1</sup>	0,60
<b>Composição Químico-Bromatológica</b>	
Matéria seca	90,83
Proteína bruta (%MS)	10,21
Extrato etéreo (%MS)	2,20
Fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinza e proteína (%MS)	36,57
Fibra insolúvel em detergente ácido (%MS)	14,36
Lignina (%MS)	1,88
Celulose (%MS)	12,48
Hemicelulose (%MS)	22,21
Carboidratos Não fibrosos (%MS)	47,32
Cinzas (%MS)	3,70
Nutrientes digestíveis totais <sup>2</sup>	76,70

<sup>1</sup> Níveis de garantia (por kg em elementos ativos): cálcio (máx) 220,00g; (mín) 209,00g fósforo 163,00g; enxofre 12,00g; magnésio 12,50g; cobre 3.500,00mg; cobalto 310,00mg; ferro 1.960,00mg; iodo 280,00mg; manganês 3.640,00mg; selênio, 32,00mg; zinco 9.000,00mg; flúor máximo 1.630,00mg.

<sup>2</sup> Nutrientes digestíveis totais estimados segundo NRC (2001).

Os animais abatidos em frigorífico eram de ubicações desconhecidas assim como o tipo de alimentação que tinham.

### 3.3 Tratamentos e delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o Delineamento Inteiramente Casualizado – DIC, foi realizado um experimento referente à comparação de duas fontes de inoculo ruminal usadas para análise *in vitro* de dietas, contendo níveis de inclusão de quatro coprodutos oriundos da cadeia produtiva do biodiesel.

As dietas foram compostas por milho moído, farelo de soja, suplemento mineral, ureia, enquanto os coprodutos oriundos da cadeia produtiva de biodiesel foram torta de dendê, torta de licurí, farelo de mamona e glicerina bruta. Como volumoso, foi utilizado o feno de capim Tifton-85 - *Cynodon* sp. (Tabela 02). A glicerina bruta utilizada apresentava os teores de 26,60 (% massa) de água, 3,60 (% massa) de cinza, 43,40% (% massa) de glicerol e 2,6% (% massa) de álcool. O farelo de mamona foi destoxificada

usando 10,00 gramas de CaO por cada 1000,00 gramas de farelo mediante 30 minutos de autoclavagem.

Tabela 02 - Composição químico-bromatológica dos ingredientes usados para a formulação das dietas.

Componentes	Ingredientes					
	Feno de Tifton-85	Milho moído	Farelo de soja	Torta de dendê	Torta de licurí	Farelo de Mamona
MS	87,97	89,12	89,30	90,96	92,95	89,91
Cz (%MS)	7,33	1,37	7,52	2,47	5,10	8,20
PB (%MS)	8,66	7,97	48,97	10,45	30,19	38,11
EE (%MS)	1,26	4,22	1,58	11,24	7,25	0,23
FDNcp <sup>2</sup> (%MS)	68,95	11,37	12,84	49,47	33,31	52,81
FDA (%MS)	33,10	2,57	6,79	21,65	14,35	34,48
Lig (%MS)	4,01	0,46	1,05	9,97	5,66	22,89
Cel (%MS)	29,10	2,11	5,74	11,67	8,68	11,59
Hem (%MS)	35,84	8,80	6,05	27,82	18,95	18,33
CNF (%MS)	13,81	75,08	29,10	26,37	24,15	0,65
NDT <sup>1</sup> (%MS)	61,36	89,75	79,66	78,22	77,19	47,26

<sup>1</sup>Nutrientes digestíveis totais estimados segundo NRC (2001)

<sup>2</sup>Fibra insolúvel em detergente neutro corrigido para cinza e proteína.

A composição porcentual dos ingredientes nas dietas e os níveis de inclusão dos coprodutos nas dietas estão apresentados na tabela 03.

Tabela 03. Composição porcentual dos ingredientes nas dietas e os níveis de inclusão dos coprodutos nos dietas.

Ingredientes	Níveis de inclusão de torta de dendê (%)			
	0	7	14	21
Milho moído	46,49	40,63	34,77	28,91
Farelo de soja	10,51	9,37	8,23	7,09
Torta de dendê	0,00	7,00	14,00	21,00
Ureia	1,50	1,50	1,50	1,50
Mistura mineral <sup>1</sup>	1,50	1,50	1,50	1,50
Feno de Tifton-85	40,00	40,00	40,00	40,00

<b>Ingredientes</b>	<b>Níveis de inclusão de Glicerina Bruta (%)</b>			
	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>21</b>
Milho moído	25,50	16,67	8,33	0,00
Farelo de soja	23,50	24,83	26,17	27,50
Glicerina Bruta	0,00	7,00	14,00	21,00
Mistura mineral <sup>1</sup>	1,50	1,50	1,50	1,50
Feno de Tifton-85	50,00	50,00	50,00	50,00

<b>Ingredientes</b>	<b>Níveis de inclusão da torta de Licuri (%)</b>			
	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>21</b>
Milho moído	49,80	44,80	40,80	36,80
Farelo de soja	8,00	6,00	3,00	0,00
Torta de Licuri	0,00	7,00	14,00	21,00
Mistura mineral <sup>1</sup>	1,00	1,00	1,00	1,00
Ureia	1,20	1,20	1,20	1,20
Feno de Tifton-85	40,00	40,00	40,00	40,00

<b>Ingredientes</b>	<b>Níveis de inclusão do farelo de mamona (%)</b>			
	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>30</b>
Milho moído	27,24	24,68	22,12	18,50
Farelo de Soja	21,26	13,82	6,38	0,00
Farelo de Mamona	0,00	10,00	20,00	30,00
Mistura mineral <sup>1</sup>	1,50	1,50	1,50	1,50
Feno de Tifton-85	50,00	50,00	50,00	50,00

<sup>1</sup>Níveis de garantia (por kg em elementos ativos): cálcio (máx) 220,00g; (mín) 209,00g fósforo 163,00g; enxofre 12,00g; magnésio 12,50g; cobre 3.500,00mg; cobalto 310,00mg; ferro 1.960,00mg; iodo 280,00mg; manganês 3.640,00mg; selênio, 32,00mg; zinco 9.000,00mg; flúor máximo 1.630,00mg.

A composição químico-bromatológica das dietas esta apresentada na tabela 04.

Tabela 04 - Composição químico-bromatológica das dietas.

<b>Componente</b>	<b>Níveis de inclusão de torta de dendê (%)</b>			
	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>21</b>
MS	89,53	89,32	89,48	87,30
Cz	4,37	4,34	4,32	4,67
PB	15,91	15,34	16,05	14,75
EE	1,20	1,53	2,15	3,65
FDNcp <sup>1</sup>	35,59	40,19	40,40	45,41
FDA	14,11	16,80	16,92	19,72
Lig	1,46	2,48	2,07	3,55

Cel	12,65	14,32	14,86	16,17
Hem	21,48	23,39	23,47	25,69
CNF	42,93	38,59	37,09	31,51
NDT <sup>2</sup>	76,42	73,39	75,78	74,10

Componente	Níveis de inclusão da Glicerina bruta			
	0	7	14	21
MS	90,07	87,36	84,87	80,96
Cz	6,43	6,41	6,59	5,80
PB	16,20	18,38	18,32	19,28
EE	1,04	2,22	3,10	4,16
FDNcp <sup>1</sup>	47,07	44,58	46,46	46,24
FDA	19,56	21,30	21,97	22,48
Lig	2,71	2,52	2,70	2,65
Cel	16,85	18,78	19,27	19,82
Hem	27,51	23,28	24,49	23,77
CNF	29,25	28,41	25,52	24,51
NDT <sup>2</sup>	69,60	73,36	75,09	71,65

Componente	Níveis de inclusão da torta de Licuri (%)			
	0	7	14	21
MS	89,91	89,99	89,84	89,77
Cz	4,52	4,46	4,25	4,79
PB	16,27	15,97	15,93	14,99
EE	0,83	1,59	1,62	2,20
FDNcp <sup>1</sup>	38,29	42,20	42,62	43,15
FDA	15,28	17,52	17,94	18,34
Lig	1,60	2,40	2,45	2,79
Cel	13,68	15,12	15,49	15,55
Hem	23,01	24,68	24,68	24,81
CNF	40,10	35,78	35,58	34,87
NDT <sup>2</sup>	72,75	73,45	73,30	72,81

Componente	Níveis de inclusão do farelo de mamona (%)			
	0	10	20	30
MS	89,95	89,76	90,00	90,37
Cz	5,96	6,09	6,20	6,60
PB	17,35	17,35	17,54	16,32
EE	0,94	0,74	0,65	0,46
FDNcp <sup>1</sup>	47,68	47,03	52,66	53,24
FDA	19,98	23,15	26,01	29,09

Lig	2,24	5,67	7,75	10,00
Cel	17,74	17,48	18,27	19,09
Hem	27,7	23,89	26,64	24,15
CNF	28,07	28,79	22,95	23,39
NDT <sup>2</sup>	70,12	64,03	60,08	56,83

<sup>1</sup> Fibra insolúvel em detergente neutro corrigido para cinza e proteína.

<sup>2</sup> Nutrientes digestíveis totais estimados segundo NRC (2001).

### 3.4 Manejo experimental

Duas horas antes da refeição de manhã, os animais providos de cânula ruminal eram levados para o brete, eram coletados 4 litros de conteúdo ruminal em garrafas térmicas pre-aquecidas (Eram colocados 2 litros de água, a 39° C e, a água era retirada da garrafa térmica segundos antes do começo da coleta) e constantemente purgadas com CO<sub>2</sub>, o conteúdo ruminal coletado era composto por uma fração sólida (Coletada de 6 pontos do rúmen) e uma fração líquida (Coletada com ajuda de uma bomba ao vácuo, com kitasato pre-aquecido e purgado constantemente com CO<sub>2</sub>) que tinham a mesma proporção, aproximadamente 2 litros de cada fração.

Nos animais abatidos em frigorífico, o conteúdo ruminal foi coletado na sala de lavagem do trato gastrointestinal, entre 7 a 15 minutos após a insensibilização dos bovinos. Com um jarro de 1,5 L pre-aquecido (Era colocado 1 litro de água, a 39° C e, a água era retirada da garrafa térmica segundos antes do começo da coleta) e purgado constantemente com CO<sub>2</sub>, eram coletados 4 litros de conteúdo ruminal (Note-se que o conteúdo ruminal que chegava na sala de lavagem encontrava-se totalmente misturado, processo ocasionado pela manipulação e vias de transporte do rúmen até a sua chegada na sala de lavagem) em garrafas térmicas pre-aquecidas (Eram colocados 2 litros de água a 39° C, a água era retirada da garrafa térmica segundos antes do começo da coleta) e constantemente purgadas com CO<sub>2</sub>.

Depois de colocado o conteúdo ruminal nas garrafas térmicas, o material coletado era levado para o seu processamento como inoculo ruminal. O material coletado foi homogeneizado na proporção 1:1 (fração sólida:fração líquida), durante 10 segundos, utilizando-se um liquidificador, pre-aquecido e constantemente purgado com CO<sub>2</sub>. Posteriormente, o material homogeneizado foi filtrado em quatro camadas de tecido de algodão (gaze) e utilizado nas incubações.

### 3.5 Variáveis estudadas

#### 3.5.1 Composição nutricional dos alimentos

As amostras dos alimentos utilizados para compor as dietas experimentais foram secos em estufa de circulação forçada de ar, a 55°C, durante 72 horas. Posteriormente, todos os alimentos foram processados em moinho de facas tipo Wiley, utilizando-se peneira com crivos de 1 mm e analisadas quanto aos teores de matéria seca (Método 967.03 - AOAC, 1990), proteína bruta (Método 981.10 - AOAC, 1990), extrato etéreo (Método 920.29 - AOAC, 1990) e cinzas (Método 942.05 -AOAC, 1990). Os componentes da parede celular, fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína (FDN<sub>cp</sub>), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina, foram determinados pelo método de Van Soest, Robertson e Lewis (1991). O nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN) e o nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) foram realizados segundo a metodologia descrita por Licitra et al. (1996). Os valores de PIDA e PIDN foram calculados multiplicando-se os valores de NIDA e NIDN por 6,25.

Os carboidratos não fibrosos foram estimados com a equação  $CNF = [100 - (\%PB + \%EE + \%MM + \%FDN_{cp})]$ , em dietas sem ureia e  $CNF = 100 - [(\%PB - \%PBu + \%U) + \%EE + \%MM + \%FDN_{cp}]$ , em que %PBu é a proteína bruta equivalente da ureia e %U é a quantidade de ureia na dieta.

Para a estimativa de Nutrientes Digestíveis Totais (NDT) dos alimentos foram utilizadas as seguintes equações do National Research Council – NRC (2001):

$$CNFVD = 0,98 \times (100 - [(FDN - PIDN) + PB + EE + MM]) \times PAF$$

$$PBVDf = PB \times \exp[-1,2 \times (PIDA/PB)]$$

$$PBVDc = [1 - (0,4 \times (PBIDA/PB))] \times PB$$

$$AGVD = EE - 1 \text{ (Se } EE < 1, \text{ então } AG = 0)$$

$$FDNVD = 0,75 \times (FDNn - L) \times [1 - (L/FDNn)^{0,667}]$$

$$NDT_{1x} (\%) = CNFVD + PBVD + (AGVD * 2,25) + FDNVD - 7$$

Em que: NDT = Nutrientes digestíveis totais; CNFVD = Carboidratos não fibroso verdadeiramente digestível; PBVDf = Proteína bruta verdadeiramente digestível de forragens; PBVDc = Proteína bruta verdadeiramente digestível de concentrados; AGVD = Ácidos graxos verdadeiramente digestíveis; FDNVD = Fibra insolúvel em detergente neutro verdadeiramente digestível; PBIDN = Nitrogênio insolúvel em

detergente neutro x 6,25; PAF = fator de ajuste do processamento; PBIDA = Nitrogênio insolúvel em detergente ácido x 6,25; AG = ácidos graxos; L = lignina; NDFn = FDN – PBIDN.

### **3.5.2 Determinação da digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da Fibra insolúvel em Detergente Neutro.**

A Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) das dietas foi feita no fermentador artificial Daisy<sup>II</sup>Fermenter ou rúmen artificial e estimada de acordo com Tilley e Terry (1963), modificado por Holden (1999).

As amostras foram pesadas em saquinhos de Tecido não tecido (TNT) -100 g/m cortados a um tamanho de 5,0 cm x 5,0 cm e selados a quente, conforme Casali et al. (2008), foram pesadas 0,5000 gramas de amostra (Variação de 0 a 9 na ultima casa). Foram colocados 26 saquinhos/jarro dos quais dois saquinhos não continham amostra, sendo os brancos utilizados em cada jarro para correção dos dados, os saquinhos com amostra foram colocados nos jarros (previamente aquecidos e purgados com CO<sub>2</sub>), sendo a distribuição de 26 saquinhos/jarro (dos quais dois saquinhos são sem amostra ou brancos), totalizando 104 saquinhos. Depois de colocar os saquinhos nos jarros, eram adicionados 1600 mL da solução tampão [(Para a preparação da solução tampão foram preparadas as soluções A e B: para a Solução A (g/litro): 10,0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 g MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O; 0,5 g NaCl; 0,1 g CaCl<sub>2</sub>2H<sub>2</sub>O; 0,5 g ureia. Para a solução B (g/100mL): 15,0 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 1,0 g Na<sub>2</sub>S9H<sub>2</sub>O. As soluções foram misturadas na relação 1:0,02; em que, para cada 1000 ml da Solução A, foram incrementados 20 ml da solução B, atingindo um valor de pH 6,8, a temperatura constante de 39 °C)] e 400 mL do inóculo ruminal, em todo o processo foi acrescentado CO<sub>2</sub> constantemente, para manter as condições similares do ambiente ruminal com a sua principal característica de anaerobiose. Após todo o procedimento descrito, os jarros foram colocados no rúmen artificial Daisy<sup>II</sup>Fermenter, a uma temperatura constante de 39 °C, durante 48 horas, além disso o rúmen artificial apresenta a característica de agitação continua.

Depois da incubação por 48 horas, era iniciando o segundo estágio do método da digestibilidade *in vitro*, ou o estagio ácido, em que foram adicionados 40 mL de ácido clorídrico (HCl) 6 N e 8 gramas de pepsina (1:10000) em cada jarro. Antes de ser utilizada, a pepsina foi dissolvida em 34 mL de H<sub>2</sub>O destilada, a 35 °C, por 5 minutos,

procurando manter o pH da solução entre 2,0 e 3,5 segundo Holden (1999). No segundo estágio foram mantidas as condições de temperatura (39°C) e agitação contínua por um período de 24 horas a mais. Terminadas as 24 horas de incubação, o conteúdo dos jarros foi drenado e os saquinhos foram lavados com água da torneira até a água sair limpa. Após os saquinhos serem lavados, foram pré-secos em estufas de circulação forçada de ar a 55 °C, por 24 horas, os saquinhos pré-secos foram posteriormente, levados a estufa de 105 °C, pelo tempo de 24 horas, e logo após foram pesados em balança de precisão.

Depois de secos foi feita a análise de FDN pelo método de Van Soest, Robertson e Lewis (1991)

A DIVMS foi calculada utilizando o resíduo após a incubação, através da

fórmula: 
$$DIVMS = 100 - \left[ W_3 \left( \frac{W_1 \times W_4}{W_2} \right) \right] \times 100$$
; em que, W1 é o peso da tara do filtro, W2 é o peso da amostra, W3 é o peso final do filtro e W4 é a correção com filtro em branco.

A DIVFDN foi calculada, também, utilizando o resíduo, após a incubação, através da fórmula: 
$$DIVFDN = 100 - \left[ W_7 \left( \frac{W_5 \times W_8}{W_6} \right) \right] \times 100$$
; em que W5 é o peso da tara do filtro, W6 é o peso do FDN da amostra, W7 é o peso final do filtro depois do FDN e W8 é a correção com filtro em branco.

### 3.5.3 Determinação *in vitro* do N-amoniaco e pH

Foram simuladas as condições ruminais utilizando os jarros do rúmen artificial Daisy<sup>II</sup>Fermenter. Para a coleta de amostras para determinação de N-amoniaco e pH, os jarros foram adaptados nas tampas, onde foram colocadas nas tampas um sistema de três vias para coletar o líquido ruminal tamponado (DIAZ, 2013).

Foram pesadas 10 g de amostra em cada jarro do rúmen artificial, junto com 1600 ml de solução tampão e 400 mL de inóculo ruminal. Em todo o processo era acrescentado CO<sub>2</sub> constantemente para manter as condições anaeróbias em um ambiente controlado a 39°C com agitação contínua.

No processo de incubação foram coletadas nos horários, 0h; 2h, 4h, 6h, e 8 horas amostras de líquido ruminal, sendo 20 mL de líquido ruminal tamponado.



O material coletado em cada horário, foi dividido em dois recipientes em quantidades iguais de 10 mL do líquido ruminal tamponado, uma das amostras foi utilizada para mensurar o potencial de hidrogênios (pH) das amostras em duplicata utilizando um pHmetro digital Digimed DM20. Na outra amostra com 10 mL de líquido ruminal tamponado foram adicionados 1 mL de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) 1:1, reduzindo o pH para interromper processo fermentativo e para evitar perdas de N-amoniaco por volatilização, as amostras eram armazenadas a  $-4^\circ C$  para posterior análise. As análises de amônia nas amostras do líquido ruminal tamponado coletado foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Ferner (1965) modificada por Vieira (1980), em aparelho micro-Kjeldahl, utilizando-se alíquota de 1 mL do líquido sobrenadante, a que se adicionaram 5 mL de água destilada e 5 mL de KOH 2N. Destilou-se em 50 mL de ácido bórico, até o volume de 100 mL, e titulou-se com HCl 0,005N.

#### **3.5.4 Determinação dos Ácidos Graxos Voláteis (AGV)**

Parte do total de líquido ruminal coletado, 25 mL, foi utilizada para determinar a concentração dos ácidos graxos voláteis: acético, propiônico e butírico. As amostras foram coletadas nos horários, 0h; 2h, 4h, 6h e 8h após do início da incubação, tendo sido armazenadas em recipientes plásticos a  $-5^\circ C$ . As amostras foram descongeladas e centrifugadas a 15.000g ( $4^\circ C$ ), durante 50 minutos, foram pipetadas 20  $\mu L$ , e em seguida, analisadas em Cromatografia Líquida de Alto desempenho – HPLC (SHIMADZU, modelo SPD-10A VP acoplado ao Detector Ultra Violeta (UV) utilizando-se um comprimento de onda de 210 nm) e equipada com coluna SUPELCO C18 (medida de 30 cm x 7,9 mm de diâmetro, com fluxo de 0,8 ml/minuto, com pressão de 117 Kgf e com fase móvel de água em 1% de ácido sulfúrico).

#### **3.6 Análises estatísticas**

Os dados foram interpretados por análise de variância e quando significativas as médias foram comparadas pelo teste t - Student a 5% de probabilidade por meio do programa SAS (Statistical Analysis System, versão 9.2).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Digestibilidade *in vitro* da Matéria Seca

Na avaliação da DIVMS com respeito à fonte de inóculo ruminal (Tabela 05), tem-se observado que o uso da fonte de inóculo ruminal obtido de animais abatidos no frigorífico, comparada ao inóculo de animais fistulados, não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ), salvo para os tratamentos contendo níveis crescentes de inclusão de torta de dendê ( $p < 0,0001$ ) em que, para os níveis 7%, 14% e 21%, as DIVMS foram menores para as dietas incubadas com inóculo ruminal obtido de animais abatidos em frigorífico (82,88%; 79,95% e 76,27% respectivamente) comparadas às dietas incubadas com inóculo ruminal obtido de animais fistulados (86,48%; 83,94% e 81,46% respectivamente).

Tabela 05 - Digestibilidade da Matéria seca dos níveis de inclusão dos coprodutos gerados na cadeia de produção de biodiesel.

Coproducto	Nível de Inclusão	DIVMS (%)		EPM	Valor de p
		Animais Fistulados	Animais Abatidos		
Torta de Dendê	0%	88,13	88,07	0,1514	1,0000
	7%	86,48 <sup>a</sup>	82,88 <sup>b</sup>	0,2479	< 0,0001
	14%	83,94 <sup>a</sup>	79,95 <sup>b</sup>	0,2717	< 0,0001
	21%	81,46 <sup>a</sup>	76,27 <sup>b</sup>	0,3565	< 0,0001
Glicerina Bruta	0%	83,27	83,44	0,2550	1,0000
	7%	82,63	82,36	0,1690	1,0000
	14%	82,15	83,16	0,1599	0,9978
	21%	82,60	82,63	0,1159	1,0000
Torta de Licuri	0%	85,61	84,71	0,2290	0,9997
	7%	85,00	83,78	0,3345	0,9610
	14%	81,93	83,04	0,2665	0,9892
	21%	80,96	82,87	0,3041	0,1988
Farelo de Mamona	0%	82,17	81,19	0,1887	0,9985
	10%	79,08	78,40	0,1532	1,0000
	20%	75,92	74,37	0,3001	0,6577
	30%	71,39	70,25	0,2391	0,9850

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre colunas.

#### 4.2 Digestibilidade *in vitro* da Fibra insolúvel em detergente neutro (DIVFDN)

Na avaliação da fonte de inóculo ruminal, tem-se observado que o uso da fonte de inóculo ruminal obtido de animais abatidos no frigorífico comparado ao inóculo de animais fistulados não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ), salvo para os tratamentos contendo níveis crescentes de inclusão de torta de dendê ( $p < 0,0001$ ) onde para os níveis 7%, 14% e 21% as DIVFDN foram menores para as dietas incubadas com inóculo ruminal de animais abatidos em frigorífico (60,09%; 54,41% e 52,33% respectivamente) comparadas às dietas incubadas com inóculo ruminal de animais fistulados (68,48%; 63,48% e 62,76% respectivamente) apresentada na tabela 06.

Tabela 06 - Digestibilidade da fibra insolúvel em detergente neutro (DIVFDN) dos níveis de inclusão dos coprodutos gerados na cadeia de produção de biodiesel.

Coproducto	Nível de Inclusão	DIVFDN (%)		EMP	Valor de p
		Animais Fistulados	Animais Abatidos		
Torta de Dendê	0%	69,31	69,14	0,3914	1,0000
	7%	68,48 <sup>a</sup>	60,09 <sup>b</sup>	0,5779	< 0,001
	14%	63,48 <sup>a</sup>	54,41 <sup>b</sup>	0,6178	< 0,001
	21%	62,76 <sup>a</sup>	52,33 <sup>b</sup>	0,7161	< 0,001
Glicerina Bruta	0%	67,21	67,54	0,4999	1,0000
	7%	65,06	64,52	0,3400	1,0000
	14%	65,05	67,02	0,3132	0,9992
	21%	66,65	66,71	0,2223	1,0000
Torta de Licurí	0%	65,18	63,01	0,5538	0,9960
	7%	67,62	64,69	0,7318	0,8329
	14%	60,40	62,82	0,5845	0,9813
	21%	58,23	62,74	0,6641	0,0547
Farelo de Mamona	0%	65,16	63,23	0,3689	0,9995
	10%	58,58	57,22	0,3033	1,000
	20%	57,85	55,14	0,5254	0,9234
	30%	50,76	48,80	0,4114	0,9993

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre colunas.

### 4.3 Produção de ácidos graxos voláteis (AGV)

#### 4.3.1 Ácido Acético

Quando comparadas as concentrações médias de Ac. Acético das diferentes dietas incubadas com diferentes fontes de inóculo ruminal (Tabela 07), não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre fontes de inóculo ruminal.

Tabela 07 – Concentrações médias de ácido acético (média dos 5 horários de coleta) de diferentes dietas incubadas com duas fontes de inóculo ruminal.

Coproducto	Nível de Inclusão	Ácido Acético (ppm)		EPM	Valor de p
		Animais Fistulados	Animais Abatidos		
Torta de Dendê	0%	358,85	333,27	11,9116	0,9647
	7%	358,13	360,31	14,9932	1,0000
	14%	378,27	323,89	9,0927	0,3452
	21%	374,67	391,53	11,5418	0,9970
Glicerina Bruta	0%	385,66	366,26	14,4693	0,9913
	7%	316,83	356,50	9,5741	0,6995
	14%	355,07	351,02	9,0872	1,0000
	21%	341,52	405,92	13,9320	0,1308
Torta de Licuri	0%	335,28	359,66	9,3845	0,9353
	7%	368,13	354,64	9,5421	0,9979
	14%	336,42	384,24	8,3768	0,3012
	21%	342,38	381,69	13,8969	0,5547
Farelo de Mamona	0%	382,45	355,54	15,1766	0,9388
	10%	366,84	373,59	10,1644	1,0000
	20%	371,24	397,39	10,2754	0,9473
	30%	432,91	379,24	9,7112	0,2945

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre colunas.

#### 4.3.2 Ácido Propiônico

Quando comparadas as concentrações médias de Ácido Propiônico das diferentes dietas incubadas com diferentes fontes de inóculo ruminal (Tabela 08) foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre fontes de inóculo ruminal para uma dieta. A dieta com 0% de inclusão de glicerina bruta apresentou diferenças significativas ( $p = 0,0114$ ) entre médias, sendo a maior concentração quando a dieta foi

incubada com inóculo ruminais de animais fistulados (212,22 ppm) comparada com a mesma dieta incubada com inóculo ruminal de animais abatidos em frigorífico (161,93 ppm).

Tabela 08 – Concentrações médias de ácido propiônico (média dos 5 horários de coleta) de diferentes dietas incubadas com duas fontes de inóculo ruminal.

Coproducto	Nível de Inclusão	Ac. Propiônico (ppm)		EPM	Valor de p
		Animais Fistulados	Animais Abatidos		
Torta de Dendê	0%	180,95	139,83	7,4355	0,9647
	7%	175,16	180,20	3,4971	1,0000
	14%	194,14	154,08	8,4870	0,3452
	21%	196,01	188,05	6,8358	0,9970
Glicerina Bruta	0%	212,22 <sup>a</sup>	161,93 <sup>b</sup>	7,3890	0,0114
	7%	159,67	169,76	6,9434	0,9958
	14%	175,05	171,55	6,0521	1,0000
	21%	174,18	191,04	8,3139	0,9233
Torta de Licuri	0%	175,01	181,48	6,0812	0,9996
	7%	176,90	164,86	4,0611	0,9814
	14%	162,80	170,27	5,8207	0,9990
	21%	170,77	183,91	8,1627	0,9696
Farelo de Mamona	0%	189,23	191,63	4,2199	1,0000
	10%	214,47	180,95	6,2140	0,1467
	20%	186,29	163,97	8,0132	0,6336
	30%	201,87	187,00	6,6040	0,9331

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre colunas.

### 4.3.3 Relação Ácido Acético : Ácido Propiônico

Quando comparadas as médias da relação entre Ácido Acético : Ácido Propiônico das diferentes dietas incubadas com diferentes fontes de inóculo ruminal (Tabela 09) não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre fontes de inóculo ruminal.

Tabela 09 – Concentrações médias da relação entre Ácido Acético : Ácido Propiônico (média dos 5 horários de coleta) de diferentes dietas incubadas com duas fontes de inóculo ruminal.

Coproducto	Nível de Inclusão	Relação		EPM	Valor de p
		Acético:Propiônico			
		Animais Fistulados	Animais Abatidos		
Torta de Dendê	0%	2,05	2,40	0,1070	0,6160
	7%	2,07	2,00	0,0892	1,0000
	14%	2,03	2,17	0,1078	0,9964
	21%	1,92	2,15	0,0806	0,9487
Glicerina Bruta	0%	1,82	2,29	0,0877	0,1668
	7%	2,04	2,15	0,0827	0,9981
	14%	2,12	2,06	0,0945	1,0000
	21%	2,05	2,16	0,0945	0,9987
Torta de Licurí	0%	2,00	2,00	0,0882	1,0000
	7%	2,10	2,16	0,0568	0,9999
	14%	2,14	2,30	0,0948	0,9654
	21%	2,01	2,13	0,0596	0,9943
Farelo de Mamona	0%	1,88	1,99	0,0666	0,9986
	10%	1,74	2,06	0,0656	0,6202
	20%	2,19	2,37	0,1128	0,9621
	30%	1,96	2,33	0,0977	0,3830

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre colunas.

#### 4.3.4 Ácido Butírico

Quando comparadas as concentrações médias de Ácido Butírico das diferentes dietas incubadas com diferentes fontes de inóculo ruminal foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre fontes de inóculo ruminal para três dietas (Tabela 10).

A dieta com 7% de inclusão de torta de dendê apresentou diferenças significativas ( $p = 0,0446$ ) entre médias, sendo a maior concentração quando a dieta foi incubada com inóculo ruminal de animais fistulados (94,13 ppm), comparada com a mesma dieta incubada com inoculo ruminal de animais abatidos em frigorífico (80,00 ppm). A dieta com 21% de inclusão de torta de licurí apresentou diferenças significativas ( $p = 0,0032$ ) entre médias, sendo a maior concentração quando a dieta foi incubada com inóculo ruminais de animais fistulados (94,32 ppm), comparada com a mesma dieta incubada com inóculo ruminal de animais abatidos em frigorífico (77,43

ppm). A dieta com 10% de inclusão de farelo de mamona apresentou diferenças significativas ( $p = 0,0045$ ) entre médias, sendo a maior concentração quando a dieta foi incubada com inóculo ruminais de animais fistulados (98,36 ppm) comparada com a mesma dieta incubada com inóculo ruminal de animais abatidos em frigorífico (84,87 ppm).

Tabela 10 – Concentrações médias de ácido Butírico (média dos 5 horários de coleta) de diferentes dietas incubadas com duas fontes de inóculo ruminal.

Coproducto	Nível de Inclusão	Ácido Butírico (ppm)		EPM	Valor de p
		Animais Fistulados	Animais Abatidos		
Torta de Dendê	0%	81,76	79,14	2,0715	0,9989
	7%	94,13 <b>a</b>	80,00 <b>b</b>	2,4563	0,0446
	14%	84,58	79,49	2,3278	0,9456
	21%	84,39	82,37	2,2717	0,9998
Glicerina Bruta	0%	92,79	85,87	2,3255	0,5088
	7%	73,72	82,05	1,7378	0,2720
	14%	87,01	87,10	1,3460	1,0000
	21%	83,36	82,86	1,5340	1,0000
Torta de Licuri	0%	85,79	87,74	2,5489	0,9998
	7%	90,03	78,88	1,9548	0,1499
	14%	86,59	87,05	2,0932	1,0000
	21%	94,32 <b>a</b>	77,43 <b>b</b>	2,4910	0,0032
Farelo de Mamona	0%	85,41	84,00	1,6987	0,9999
	10%	98,36 <b>a</b>	84,87 <b>b</b>	2,1924	0,0045
	20%	87,42	85,88	0,9504	0,9998
	30%	89,68	88,73	2,0835	1,0000

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre colunas.

#### 4.4 Nitrogênio Amoniacal – N-NH<sub>3</sub> (mg N-NH<sub>3</sub>/L)

Quando comparadas as médias de concentração de N-NH<sub>3</sub> das diferentes dietas incubadas com diferentes fontes de inóculo ruminal não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre fontes de inóculo ruminal (Tabela 11).

Tabela 11 – Concentrações médias de Nitrogênio Amoniacal (média dos 5 horários de coleta) de diferentes dietas incubadas com duas fontes de inóculo ruminal.

Coproducto	Nível de Inclusão	Nitrogênio Amoniacal (mg N-NH <sub>3</sub> /L)		EPM	Valor de p
		Animais Fistulados	Animais Abatidos		
Torta de Dendê	0%	131,25	136,55	13,0117	1,0000
	7%	162,40	135,10	15,0896	0,9763
	14%	137,90	133,70	13,3428	1,0000
	21%	126,35	123,95	11,7224	1,0000
Glicerina Bruta	0%	129,85	111,35	13,6961	0,9988
	7%	147,00	114,10	14,9563	0,9630
	14%	160,40	104,65	16,4440	0,6254
	21%	160,75	115,85	16,3779	0,8327
Torta de Licuri	0%	163,80	122,15	14,6400	0,8430
	7%	158,90	119,00	14,7439	0,8701
	14%	146,65	131,65	13,3952	0,9996
	21%	152,95	144,20	14,2761	1,0000
Farelo de Mamona	0%	116,55	120,40	11,4682	1,0000
	10%	130,20	124,95	12,7485	1,0000
	20%	152,45	141,10	14,9909	0,9999
	30%	169,35	131,40	15,2930	0,8842

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre colunas.

#### 4.5 Potencial de Hidrogênios (pH)

Quando comparadas as médias de pH das diferentes dietas incubadas com diferentes fontes de inóculo ruminal foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre fontes de inóculo ruminal, sendo em todos os casos o pH maior nas dietas incubadas com inóculo ruminal de animais abatidos em frigorífico (Tabela 12).

Tabela 12 – Concentrações médias de pH (média dos 5 horários de coleta) de diferentes dietas incubadas com duas fontes de inóculo ruminal.

Coproducto	Nível de Inclusão	pH		EPM	Valor de p
		Animais Fistulados	Animais Abatidos		
Torta de Dendê	0%	6,60a	6,80b	0,0286	< 0,0001
	7%	6,62a	6,81b	0,0261	< 0,0001



	14%	6,66a	6,81b	0,0181	< 0,0001
	21%	6,66a	6,82b	0,0189	< 0,0001
Glicerina Bruta	0%	6,61a	6,75b	0,0199	0,0001
	7%	6,66a	6,75b	0,0165	0,0309
	14%	6,62a	6,77b	0,0201	< 0,0001
	21%	6,57a	6,72b	0,0242	< 0,0001
	0%	6,65a	6,78b	0,0195	0,0007
Torta de Licuri	7%	6,64a	6,79b	0,0224	0,0002
	14%	6,68a	6,77b	0,0173	0,0475
	21%	6,67a	6,77b	0,0179	0,0272
	0%	6,61a	6,89b	0,0389	< 0,0001
Farelo de Mamona	10%	6,64a	6,88b	0,0328	< 0,0001
	20%	6,66	6,66	0,0129	1,0000
	30%	6,64	6,67	0,0149	0,9981

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre colunas.

## 5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, através da avaliação da fonte de inóculo ruminal, observou-se que o uso da fonte de inóculo de animais abatidos no frigorífico comparada ao inóculo de animais fistulados apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para alguns parâmetros de fermentação ruminal.

Os parâmetros que apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,0001$ ) quando foram incluídos níveis crescentes de inclusão de torta de dendê (7%, 14% e 21%) foram a digestibilidade in vitro da matéria seca (DIVMS) e a digestibilidade in vitro da fibra insolúvel em detergente neutro (DIVFDN) sendo que os valores foram menores para as dietas incubadas com inóculo ruminal obtido de animais abatidos em frigorífico comparadas às dietas incubadas com inóculo ruminal obtido de animais fistulados (Tabela 5 e 6), efeito que também foi observado na concentração de ácido propiônico no nível de 0% de inclusão de glicerina bruta (Tabela 8) em que se obteve o maior valor quando usado o inóculo ruminal de animais fistulados.

Os dados apresentados indicam que a diminuição na DIVMS foi devida à diminuição da qualidade da fibra proveniente da inclusão da torta de dendê, corroborada pela menor concentração de ácido butírico.

A alimentação dos animais doadores influencia sobre a população de bactérias presentes no inóculo ruminal como foi demonstrado por Martínez et al. (2010), sendo

maior o número de bactérias celulolíticas em dietas de 70% forragem e 30% concentrado e menor em dietas de 30% forragem e 70% concentrado. Essa variabilidade afeta as bactérias do rúmen quando o processo de transição de uma dieta para outra é muito curto, mas quando esse processo de transição é mais longo acontece a adaptação dos micro-organismos presentes no conteúdo ruminal, que se adaptam a compostos nutricionais que poderiam afetar o desempenho, como demonstrado por Hernandez-Sanabria et al. (2012).

Sabe-se que os lipídeos têm efeito negativo sobre o desempenho da população bacteriana principalmente Gram<sup>+</sup> quando o extrato etéreo das dietas é maior que 7% da matéria seca, efeito que poderia não ser significativo sobre os níveis de inclusão de torta de dendê no presente trabalho, tendo em consideração que o teor máximo de extrato etéreo é de 3,65% (base na MS).

Sharmila et al. (2014) relataram que a torta de dendê é um alimento rico em ácidos graxos insaturados, que têm efeito de toxidez sobre as bactérias. Sendo maior esse efeito em populações bacterianas não adaptadas, Maia et al. (2007) encontraram que as bactérias mais afetadas são as bactérias produtoras de ácido butírico, o que pode ser corroborado com a maior concentração de ácido butírico ( $p = 0,0446$ ) nas incubações com animais fistulados usando 7% de inclusão de torta de dendê no presente trabalho.

O efeito dos ácidos graxos insaturados sobre a concentração do ácido butírico poderia também ter acontecido na inclusão de 21% de torta de licurí, diminuindo assim a concentração do ácido. Segundo Raiol et al. (2012) as sementes de oleaginosas e os resíduos gerados na produção de biodiesel contêm importantes concentrações de ácidos graxos insaturados.

Quando incluído 10% de farelo de mamona na dieta também se observou diferença significativa entre fontes de inóculo ruminal, tendo em consideração que, nesse nível de inclusão, observou-se o maior teor de carboidratos não fibrosos (CNF) e que, segundo Alves et al. (2009), enquanto incrementam-se os teores de CNF, incrementam-se as concentrações de ácido butírico, explicando as diferenças entre fontes de inóculo ruminal pela possível falta de adaptação das bactérias presentes no inóculo ruminal de animais abatidos em frigorífico a dietas com maior proporção de

concentrado na dieta, como relatado por Hernandez-Sanabria et al. (2012) na adaptação das bactérias ruminais.

Segundo Bannink et al. (2006) e Ellis et al. (2008), as proporções dos ácidos graxos voláteis variam de acordo com a dieta do animal, o tipo de carboidrato que é fermentado e a população de bactérias ruminais presentes, enfatizando que numa dieta com maior proporção de forragem há uma proporção de acetato:propionato:butirato no fluido ruminal de 70:20:10. E, em dietas com maior proporção de grãos, a que apresenta, geralmente, um alto teor de carboidratos não fibrosos, promove-se o desenvolvimento das bactérias produtoras de propionato, incrementado a concentração do propionato e diminuindo sua proporção com o acetato.

Nas concentrações de ácido acético, não foram observadas diferenças significativas, demonstrando, assim, que compostos nutricionais ou a proporção de forragem:concentrado não influenciaram as principais bactérias produtoras de ácido acético nas duas fontes de inóculo ruminal utilizado, sendo esta similar nas duas fontes de inóculo ruminal.

Na concentração de ácido propiônico só uma dieta apresentou diferença significativa entre fontes de inóculo ruminal, a dieta com 0% de inclusão de glicerina bruta, o que também poderia ser explicado pelas diferenças em adaptação à proporção forragem:concentrado pelas bactérias ruminais, deduzindo uma menor população de bactérias que degradam carboidratos não fibrosos no inóculo de animais abatidos em frigorífico comparada com o inóculo ruminal de animais fistulados.

A variação na concentração de ácido propiônico numa das dietas não teve influencia sobre a proporção acetato:propionato da mesma quando comparadas as fontes de inóculo ruminal, sendo que não foi encontrada diferenças significativas entre as proporções acetato:propionato para nenhuma das dietas testadas quando comparadas as duas fontes de inóculo ruminal.

A amônia é gerada no rúmen como resultado de dois processos, degradação microbial dos compostos nitrogenados do alimento e hidrolise microbial da ureia. Segundo Brooks et al. (2014), as variações na concentração de nitrogênio amoniacal são devidas à alimentação e ao estado fisiológico dos animais doadores. No presente trabalho, não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de nitrogênio amoniacal entre fontes de inoculo ruminal ( $p > 0,05$ ) para nenhuma das

dietas avaliadas, tal fato indica que provavelmente existiram alterações na população de bactérias proteolíticas e utilizadoras de N, como as bactérias celulolíticas (Tabela 11).

Segundo Dijkstra et al. (2012), o incremento de ácidos graxos voláteis no ambiente ruminal tem correlação negativa com o pH do mesmo, e esse efeito, segundo Ellis et al. (2008), é mais pronunciado quando diminui a relação acetato:propionato, o que indica um incremento na dieta de carboidratos não fibrosos, essa mudança não só diminui o pH do ambiente ruminal, mas também proporciona um ambiente adequado para a proliferação de bactérias produtoras de ácido lático, o que pode diminuir mais o pH do ambiente ruminal, tendo em consideração que o pKa do ácido lático (3,86) é muito menor do que os ácidos graxos voláteis.

Diferenças significativas nas concentrações do pH quando avaliados diferentes níveis de amido e fibra na dieta e diferentes fontes de inoculo ruminal, foram observadas por Brooks et al. (2014) explicando que esse resultado era devido a uma maior produção de ácido lático.

No presente experimento o parâmetro pH apresentou diferenças significativas quando comparadas as fontes de inóculo ruminal, sendo que em muitos casos a concentração dos ácidos graxos voláteis, ou mesmo a relação acetato:propionato, não apresentaram diferenças significativas, indicando que as concentrações dos ácidos graxos voláteis acético, propiônico e butírico não tiveram influencia significativa no pH do liquido ruminal das incubações.

O ácido lático não foi avaliado no presente experimento, porém variações na produção de ácido lático poderiam explicar os resultados encontrados no presente experimento.

A diversidade da população bacteriana nas fontes de inóculo ruminal é variada e principalmente afetada pela alimentação dos animais doadores, sendo assim, o inóculo ruminal dos animais abatidos em frigorífico apresentaria uma menor proporção na população de bactérias lácticas comparado ao inóculo ruminal de animais fistulados.

A maior população de bactérias lácticas no inóculo ruminal de animais fistulados, explicaria o motivo do pH ser menor quando utilizado o inóculo ruminal obtido de animais fistulados, comparadas ao inóculo ruminal obtido de animais abatidos em frigorífico.

Note-se que a diminuição do pH no ambiente da incubação não foi menor a 6,00 em nenhum dos casos, dando a inferir que não houve efeito do pH sobre a população de bactérias fibrolíticas.

Diferenças nos parâmetros ruminais também foram encontradas por Chaudhry (2008), que atribuiu essas diferenças à alimentação dos animais antes da coleta do conteúdo ruminal e também ao estado fisiológico do animal doador.

Brooks et al. (2014) não encontraram diferenças significativas no crescimento bacteriano na comparação de inóculo ruminal de vacas leiteiras e veados mas os tempos nos quais foi atingido o crescimento máximo foi diferente, sendo entre 10 a 12 horas mais rápido no inóculo de vacas leiteiras. Os autores relataram que adaptar os animais doadores do inóculo ruminal às dietas, sugerido também por Broudiscou, Offner e Sauvant (2014), permite menor variação inicial da população microbiana do inóculo ruminal.

As diferenças encontradas são possivelmente explicadas por diferenças na alimentação dos animais doadores, essas diferenças também são encontradas nas análises *in vitro* onde são comparados o inóculo ruminal de bovinos fistulados e fezes de diferentes espécies.

## 6 CONCLUSÕES

O inóculo ruminal obtido do conteúdo ruminal de animais abatidos em frigorífico surge como uma opção viável para as avaliações *in vitro* de digestibilidade e parâmetros de fermentação ruminal dos coprodutos gerados na cadeia de produção do biodiesel, sendo que esse inóculo ruminal apresenta muita similaridade com o inóculo ruminal obtido do conteúdo ruminal de animais fistulados, obtendo como benefício que o presente inóculo ruminal alternativo não apresenta os custos de cirurgia e manutenção de animais fistulados nem se encontra afetando o bem-estar animal.

As dietas com níveis crescentes de inclusão de torta de dendê apresenta menor valor de digestibilidade *in vitro* da matéria seca, indicando um possível efeito da torta de dendê sobre a fonte de inoculo ruminal obtido de animais abatidos em frigorífico.

Os resultados na variação de pH indicam que o inóculo ruminal de animais fistulados apresenta uma maior variabilidade da população microbiana ruminal quando comparada com o inóculo ruminal de animais abatidos em frigorífico.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O baixo custo de alimentos a base de coprodutos gerados na cadeia de produção do biodiesel leva a uma conseqüente diminuição no custeio da alimentação para os ruminantes, além de favorecer a diminuição da poluição ambiental e melhorar a eficiência produtiva do produtor, mas são precisas avaliações desses coprodutos mediante técnicas de investigação.

A técnica *in vitro* para análise de alimentos surge como alternativa menos onerosa ou como uma metodologia que causa menor desconforto animal, porem ainda assim são usados animais fistulados como fonte de inoculo ruminal para esses ensaios.

Alternativas de fonte de inoculo ruminal são sempre procuradas, o presente trabalho apresentou a fonte de inoculo ruminal de animais abatidos em frigorífico como uma fonte alternativa para os ensaios *in vitro*, mas são necessárias mais avaliações para determinar um padrão de inoculo ruminal de animais abatidos em frigorífico que apresente características ótimas para os ensaios *in vitro*.

Para diminuir as variações e/ou os erros no uso de inoculo ruminal de animais abatidos em frigorífico por causas fisiológicas devido ao animal doador recomenda-se coletar o conteúdo ruminal de mais de cinco animais. Também é necessário adaptar os animais doadores do inoculo ruminal as dietas ou proporções de forragem:concentrado que permitam menor variabilidade dos microrganismos ruminais na avaliação das dietas em estudo.

Mais avaliações precisam ser feitas para poder utilizar o inoculo ruminal de animais abatidos em frigorífico como uma fonte confiável de inoculo ruminal para avaliação de alimentos com a metodologia *in vitro*.

## REFERÊNCIAS

- AOAC. (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). Official methods of analysis. 15.ed. Washington: AOAC, 1990.
- ABDOUN, K.; STUMPF, F.; MARTENS, H. Urea transport across the rumen epithelium is electrically silent and modulated by changes in pH. **Journal of Physiology and Biochemistry**. [S.l.], Vol. 63, Issue 1, Mar. 2007, p. 33.
- ABUBAKR, A. R.; ALIMONA, A. R.; YAAKUBA, H.; ABDULLAHB, N.; IVAN, M. Growth, nitrogen metabolism and carcass composition of goats fed palm oil by-products. **Small Ruminant Research**. Vol. 112, 2013, p. 91 - 96.
- ALVES, T. C.; FRANZOLIN, R.; RODRIGUES, P. H. M.; ALVES, A. C. Efeitos de dietas com níveis crescentes de milho no metabolismo ruminal de energia e proteína em bubalinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa, v. 38, n. 10, 2009, p. 2001-2006.
- ALUWONG, T.; KOBO, P. I.; ABDULLAHI, A. Volatile fatty acids production in ruminants and the role of monocarboxylate transporters: A review. **African Journal of Biotechnology**. [S.l.], Vol 9, No. 38, 2010, p. 6229–6232.
- AMMAR, H.; LÓPEZ, S.; ANDRÉS, S.; RANILLA, M. J.; BODAS, R.; GONZÁLEZ, J. S. In vitro digestibility and fermentation kinetics of some browse plants using sheep or goat rumen fluid as the source of inoculum. **Animal Feed Science and Technology**. [S.l.], Vol. 147, Issues 1-3, p. 90-104, Nov. 2008.
- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS - ANP. **Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis 2013**. Brasília, DF, 2013.
- BACH, A.; RUIZ M. M.; THRUNE M.; STERN M. D. Evaluation of the fermentation dynamics of soluble crude protein from three protein sources in continuous culture fermenters. **Journal of Animal Science**. Vol. 86, Issue 6, 2008, p. 1364-1371.
- BANNINK, A.; KOGUT, J.; DIJKSTRA, K.; FRANCE, J.; KEBREAB, E.; VAN VUUREN A. M.; TAMMINGA, S. Estimation of the stoichiometry of volatile fatty acid production in the rumen of lactating cows. **Journal of Theoretical Biology**. Vol. 238, Issue 1, 2006, p. 36-51.
- BORJA, M. S.; OLIVEIRA, R. L.; RIBEIRO, C. V. D. M.; BAGALDO, A. R.; CARVALHO, G. G. P.; SILVA, T. M.; LIMA, L. S.; BARBOSA, L. P. Effects of Feeding Licury (*Syagrus coronate*) Cake to Growing Goats. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**. Vol. 23, n° 11, 2010, p. 1436-1444.
- BRASIL. **Ministério de Minas e Energia**. Resolução n. 6, de 16 de Setembro de 2009. Estabelece em cinco por cento, em volume, o percentual mínimo obrigatório de adição

de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor final, de acordo com o disposto no art. 2º da Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, Brasília, 3. trim. 2009.

BRINGEL, L. M. L.; NEIVA, J. N. M.; ARAÚJO, V. L.; BOMFIM, A. D.; RESTLE, J.; FERREIRA, A. C. H.; LÔBO, R. N. B. Consumo, digestibilidade e balanço de nitrogênio em borregos alimentados com torta de dendê em substituição à silagem de capim - elefante. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa, v. 40, n. 9, Set. 2011, p. 1975-1983.

BROOKS, M. A.; HARVEY, R. M.; JOHNSON, N. F.; KOUTSOS, E. A.; KERLEY, M. S. Effect of Varying Dietary Starch and Fiber Levels and Inoculum Source (Mule Deer vs. Dairy Cow) on Simulated Rumen Fermentation Characteristics. **Zoo Biology**. Vol. 33, Issue 2, p. 110-120, Mar.-Apr. 2014.

BROUDISCOU, L. P.; OFFNER, A.; SAUVANT, D. Effects of inoculum source, pH, redox potential and headspace di-hydrogen on rumen in vitro fermentation yields. **Animal**. Vol. 8, Issue 6, 2014, p 931–937.

BUENO, I. C. S.; CABRAL FILHO, S. L. S.; GOBBO, S. P.; LOUVANDINI, H.; VITTI, D. M. S. S.; ABDALLA, A. L. Influence of inoculum source in a gas production method. **Animal Feed Science and Technology**. Vol. 123, Part 1, Sept. 2005, p. 95-105. (DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2005.05.003).

CALABRÒ, S.; LÓPEZ, S.; PICCOLO, V.; DIJKSTRA, J.; DHANOA, M. S.; FRANCE, J. Comparative analysis of gas production profiles obtained with buffalo and sheep ruminal fluid as the source of inoculum. **Animal Feed Science and Technology**. Vol. 123-124, Part 1, Sept. 2005, p. 51–65.

CALSAMIGLIA, S.; STERN, M. D.; FIRKINS, J. L. Effect of protein source on nitrogen metabolism in continuous culture and intestinal digestion In vitro. **Journal of Animal Science**. Vol. 73, Issue 6, 1995, p. 1819-1827.

CARRERA, R. A. B. VELOSO, C. M.; KNUPP, L. S.; JÚNIOR, A. H. S.; DETMANN, E.; LANA, R. P. Protein co-products and by-products of the biodiesel industry for ruminants feeding. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Vol. 41, n. 5, 2012, p. 1202-1211.

CARVALHO, M. V.; RODRIGUES, P. H. M.; LIMA, M. L. P.; ANJOS, I. A.; LANDELL, M. G. A.; SANTOS, M. V.; SILVA, L. F. P. Composição bromatológica e digestibilidade de cana-de-açúcar colhida em duas épocas do ano. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. Vol. 47, n. 4, 2010 p. 298-306.

CASALI, A. O.; DETMANN, E.; FILHO, S. C. V.; PEREIRA, J. C.; HENRIQUES, L. T.; FREITAS, S. G.; PAULINO, M. F. Influencia do tempo de incubação e do tamanho de partículas sobre os teores de compostos indigestíveis em alimentos e fezes bovinas obtidas por procedimentos in situ. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Vol. 37, n. 2, 2008, p. 335-342.



CASTILLEJOS, L.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A. Effect of essential oil active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in In vitro systems. **Journal of Dairy Science**. Vol. 89, Issue 7, 2006, p. 2649-2658.

CATTANI, M. *In situ and in vitro techniques for studying rumen fermentations: methodology and applications*. 2011, 111 f. Tese (Doutorado) – Dipartimento di scienze animali, Università Degli Studi di Padova, Pádua, 2011.

CHANJULA, P.; SIRIWATHANANUKUL, Y.; LAWPETCHARA, A. Effect of Feeding rubber seed kernel and palm kernel cake in combination on nutrient utilization, rumen fermentation characteristics, and microbial populations in goats fed on *Briachiararia humidicola* hay-based diets. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**. Vol. 24, 2011, p. 73 - 81.

CHANJULA, P.; PAKDEECHANUAN, P.; WATTANASIT, S. Effects of Dietary Crude Glycerin Supplementation on Nutrient Digestibility, Ruminal Fermentation, Blood Metabolites, and Nitrogen Balance of Goats. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**. Vol. 23, Issue 3, 2014, p. 365-374.

CHAUDHRY, A. S. Slaughtered cattle as a source of rumen fluid to evaluate supplements for in vitro degradation of grass nuts and barley straw. **The Open Veterinary Science Journal**. Vol. 2, Feb. 2008, p. 16–22.

CHAUDHRY, A. S.; MOHAMED R. A. I. Fresh or frozen rumen contents from slaughtered cattle to estimate in vitro degradation of two contrasting feeds. **Czech Journal of Animal Science**, 57, 2012 (6): 265–273

CORREIA, B. R.; OLIVEIRA, R. L.; JAEGER, S. M. P. L.; BAGALDO, A. R.; CARVALHO, G. G. P.; OLIVERIA, G. J. C.; LIMA, F. H. S., OLIVEIRA, P. A. Comportamento ingestivo e parâmetros fisiológicos de novilhos alimentados com tortas do biodiesel. **Arquivo Zootecnia**. Vol 61 (233), 2012, p. 79-89.

CUTRIGNELLI, M. I. CALABRÒ, S.; TUDISCO, R.; ZICARELLI, F.; GAZANEO, M.P.; PICCOLO, V. Comparison of buffalo rumen liquor and buffalo faeces as inoculum for the in vitro gas production technique. **Italian Journal of animal science: Proceedings of the 16th ASPA Congress, Torino, June 28-30, 2005**. Vol. 4, No. 2s, 2005, p. 319-321.

DAMIRAN, D., DELCURTO, T.; BOHNERT, D. W.; FINDHOLT, S. L. Comparison of techniques and grinding size to estimate digestibility of forage based ruminant diets. **Animal Feed Science and Technology**. Vol. 141, Issues 1–2, Mar. 2008, p. 15-35

DENEK, N.; CAN, A.; KONCAGÜL, S. Usage of slaughtered animal rumen fluid for dry matter digestibility of ruminant feeds. **Journal of animal and veterinary advances**. Vol. 5, Issue 6, 2006, p. 459-461.

DENEK, N; CAN, A; AVCI, M. Frozen rumen fluid as microbial inoculum in the two - stage in vitro digestibility assay of ruminant feeds. **South African Journal of Animal Science**. Vol. 40, Issue 3, 2010, p. 251-256.

DIAZ, T. G. **Avaliação *in vitro* da inclusão do líquido da casca da castanha de caju em dietas para ruminantes**. 2013. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá, 2013.

DIJKSTRA, J.; ELLIS, J. L.; KEBREAB, E.; STRATHE, A. B.; LÓPEZ, S.; FRANCE, J.; BANNINK, A. Ruminal pH regulation and nutritional consequences of low pH. **Animal Feed Science and Technology**. Vol. 172, 2012, p. 22–33.

DINIZ, L. L.; VALADARES FILHO, S. C.; CAMPOS, J. M. S.; VALADARES, R. F. D.; SILVA, L. D.; MONNERAT, J. P. I. S.; BENEDETI, P. B.; OLIVEIRA, A. S.; PINA, D. S. Effects of castor meal on the growth performance and carcass characteristics of beef cattle. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**. Vol. 23, nº 10, 2010, p. 1308–1318.

DINIZ, L. L.; VALADARES FILHO, S. C.; OLIVEIRA, A. S.; PINA, D. S.; SILVA, L. D.; BENEDETI, P. B.; BAIÃO, G. F.; CAMPOS, J. M. S.; VALADARES, R. F. D. Castor bean meal for cattle finishing: 1—Nutritional parameters. **Livestock Science**. Vol. 135, 2011, p. 153 - 167.

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

DRUMOND, M. A. **Licuri *Syagrus coronata* (Mart.) Becc.** Embrapa: Documentos 199. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2007, 16p.

ELLIS, J. L.; DIJKSTRA, J.; KEBREAB, E.; BANNINK, A.; ODONGO, N. E.; McBRIDE, B. W.; FRANCE, J. Aspects of rumen microbiology central to mechanistic modelling of methane production in cattle. **Journal of Agricultural Science**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, Vol. 146, Issue 2, Apr. 2008 p. 213–233.

FERREIRA, A. C.; OLIVEIRA, R. L.; BAGALDO, A. R.; CARVALHO, G. G. P.; SOUZA, R. N. V.; OLIVEIRA, P. A. Intake, digestibility and intake behaviour in cattle fed different levels of palm kernel cake. **Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia**. Vol. 17, 2012, p. 3105 - 3112.

FURLAN JR, J.; KALTNER, F.J.; AZEVEDO, G.F.P.; CAMPOS, I.A. **Biodiesel: Porque tem que ser dendê**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental; Palmas, 205 p. 2006.

GIONBELLI, T. R. S.; VELOSO, C. M.; GIONBELLI, M. P.; NOVAIS, M. A. S.; SILVA, A. L.; ESPECHIT, C. J. B.; CAMPOS, J. M. S.; VALHADARES FILHO, S. C.; PEREIRA, O. G.; CUNHA, C. S.; ALCÂNTARA, P. H.; VIRGÍNIO JUNIOR, G. F.; DUARTE, M. S. Utilization of castor bean meal treated with calcium hydroxide, fed wet or dry, by lambs. **Livestock Science**. Vol. 168, 2014, p. 76 - 83.

HERNANDEZ-SANABRIA, E.; GOONEWARDENE, L. A.; WANG, Z.; DURUNNA, O. N.; MOORE, S. S.; GUAN, L. L. Impact of feed efficiency and diet on the adaptive variations in the bacterial community in the rumen fluid of cattle identified by PCR-DGGE and quantitative Real Time PCR analysis. **Applied Environmental Microbiology**. Vol. 78, Issue 4., Feb. 2012, p. 1203–1214.

HERVÁS, G.; FRUTOS, P.; GIRÁLDEZ, F. J.; MORA, M. J.; FERNÁNDEZ, B.; MANTECÓN, A. R. Effect of preservation on fermentative activity of rumen fluid inoculum for in vitro gas production techniques. **Animal Feed Science and Technology**. Vol. 123-124, part 1 Sept. 2005 p. 107-118.

HOLDEN, L. A. Comparison of methods of in vitro matter digestibility for ten feeds. **Journal Dairy Science**. Savoy, v. 82, n. 8, 1999, p. 1791-1794.

KING, J.; PLAIZIER, J. C. Effects of source of rumen fluid on In vitro dry matter digestibility of feeds determined using the DAISY<sup>II</sup>INCUBATOR. **Canadian Journal of Animal Science**. Ottawa, Vol. 86, Issue 3, Sept. 2006, p. 439-441.

KNAPP, J. R.; LAUR, G. L.; VADAS, P. A.; WEISS, W. P.; TRICARICO, J. M. Enteric Methane in Dairy Cattle Production: Quantifying the Opportunities and Impact of Reducing Emissions. **Journal of Dairy Science**. Vol. 97, Issue 6, Apr. 2014, p. 3231-3261.

KREHBIEL, C. R. Ruminal and physiological metabolism of glycerin. **Journal of Animal Science**. Vol. 86 (Suppl. 2, Abstr.), 2008, p. 392.

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

KULKARNI, S. A. Description of protozoan ciliate *Entodinium simplex* (dogiel, 1925) from the rumen of indian cattle, (*Bos indicus*). **Indian Streams Research Journal**. Solapur, v. 03, n. 7, ago. 2013, p. 01-04.

LICITRA, G.; HERNANDEZ, T. M.; VAN SOEST, P.J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminants feeds. **Animal Feed Science and Technology**, Vol. 57, n. 4, 1996, p. 347-358.

LU, Z. **Urea transport in sheep rumen epithelium *in vitro* modulation by luminal ammonia and ph**. 2013. These (Doktorat) – Freien Universität Berlin.

LUCENA, T. K. **Impactos do uso de biodiesel na economia brasileira: uma análise pelo modelo insumo-produto**. 2008, p. 102. Dissertação, Programa de Pós-Graduação em Ciências Econômicas, Universidade Federal Fluminense.

MACOME, F. M.; OLIVEIRA, R. L.; ARAUJO, G. G. L.; BARBOSA, L. P.; CARVALHO, G. G. P.; GARCEZ NETO, A. F.; SILVA, T. M. Respostas de ingestão e fisiológicas de cordeiros alimentados com torta de dendê (*Elaeis guineensis*). **Archivos de Zootecnia**. Córdoba, v. 61, n. 235, set. 2012, p. 335-342.

MAIA, M. R. G.; CHAUDHARY, L.C.; FIGUERES, L.; WALLACE, R. J.; Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. **Ant Van Leeuw**. Vol. 91, 2006; p. 303–314.

MARTIN, E. C. S. **Evaluación de la fermentación y la microbiota ruminal promovidas por dietas convencionales y no convencionales em caprino y em sistemas *in vitro***. 2011. Tesis (Doctorado) – Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Nutrición Animal, Universidad de Granada, 2011.

MARTÍNEZ, M. E.; RANILLA, M.J.; TEJIDO, M. L.; SARO, C.; CARRO, M. D. Comparison of fermentation of diets of variable composition in the rumen of sheep and rusitec fermenters: II. Protozoa populations and diversity of bacterial communities. **Journal Dairy Science**. Vol. 93, p. 3699–3712.

MARTÍN-GARCÍA, A. I.; YÁÑEZ RUIZ, D.; MOUMEN, A.; MOLINA-ALCAIDE, E. Effect of polyethylene glycol, urea and sunflower meal on olive (*Olea europaea* var. *europaea*) leaf fermentation in continuous fermenters. **Small Ruminant Research**. Vol. 61, 2006, p. 53–61.

MIRANDA, E. E.; CRISCUOLO, C.; QUARTAROLI, C. F. Desenvolvimento rural – Gestão territorial. **Revista Agroanalysis (FGV)**. São Paulo-SP, jul. 2006, p. 40.

MOLINA-ALCAIDE, E.; PASCUAL, M. R.; CANTALAPIEDRA-HIJAR, G.; MORALES-GARCÍA, E. Y.; MARTÍN-GARCÍA, A. I. Effects of concentrate replacement by feed blocks on ruminal fermentation and microbial growth in goats and single-flow continuous-culture fermenters. **Journal of Animal Science**. Vol. 87, Issue 4, 2009, p. 1321-1333.

MOREIRA, P. C.; REIS, R. B.; REZENDE, P. L. P.; MENDONÇA, A. C.; WASCHECK, R. C.; MARTINS, A. F. Produção de ácidos graxos voláteis, avaliada pela técnica semiautomática *in vitro*, na dieta de ruminantes com diferentes fontes de carboidratos na fração volumosa. **Ciência Animal Brasileira**. Vol. 10, n. 2, jul. 2009, p. 413-424.

MOULD, F. L.; KLIEM, K. E.; MORGAN, R.; MAURICIO, R. M. *In vitro* microbial inoculum: a review of its function and properties. **Animal Feed Science and Technology**. Vol. 123-124, set. 2005, p. 31-50.

MUTIMURA, M.; MYAMBI, C. B.; GAHUNGA, P.; MGHENI, D. M.; LASWAI, G. H.; MTENGA, L. A.; GAHAKWA, D.; KIMAMBO, A. E.; EBONG, C. Rumen liquor from slaughtered cattle as a source of inoculum for *in vitro* gas production technique in forage evaluation. **Agricultural Journal**. Vol. 8, n. 4, ago. 2013, p. 173-180.

NOGUEIRA, A. S. **Torta de licurí na alimentação de ovinos**. 2013. 105 f. Tese (Doutorado em Scientiae) – Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2001.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7.ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 2001. 381p.

OLIVEIRA, S. A.; CAMPOS, J. M. S.; OLIVEIRA, M. R. C.; BRITO, A. F.; VALADARES FILHO, S. C.; DETMANN, E.; VALADARES, R. F. D.; SOUZA, S. M.; MACHADO, O. L. T. Nutrient digestibility, nitrogen metabolism and hepatic function of sheep fed diets containing solvent or expeller castorseed meal treated with calcium hydroxide. **Animal Feed Science and Technology**. Vol. 158, 2010, p. 15 - 28.

OLIVEIRA, M. G.; PRADO, I. N.; MARQUES, J. A. Glycerol and essential oils, new alternative technologies used in ruminants nutrition. **Magistra**. Cruz das Almas, Vol. 23, n. 3, jul.-set. 2011, p. 75-81.

OLIVEIRA, R. L.; LEÃO, A. G.; RIBEIRO, O. L.; BORJA, M. S.; PINHEIRO, A. A.; OLIVEIRA, R. L.; SANTANA, M. C. A. Co-productos de biodiésel utilizados en la alimentación de rumiantes. **Revista Colombiana Ciencias Pecuarias**, Medellín, Vol. 25, n. 4, dez. 2012, p. 625-638.

QIU, X.; EASTRIDGE, M. L.; GRISWOLD, K. E.; FIRKINS, J. L. Effects of substrate, passage rate, and pH in continuous culture on flows of conjugated linolenic acid and trans C18:1. **Journal of Dairy Science**. Vol. 87, Issue 10, 2004, p. 3473-3479.

RAIOL, L. C. B.; KUSS, F.; SILVA, A. G. M.; SOARES, B. C.; SOUZA, K. D. S.; COLODO, J. C. N.; JÚNIOR, J. B. L.; ÁVILA, S. C. Nutrient intake and digestibility of the lipid residue of biodiesel from palm oil in sheep. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa, v. 41, n. 11, nov. 2012, p. 2364-2368.

RAMALHO, C. I. **Estrutura da vegetação e distribuição espacial do licurí (*Syagrus coronata* (mart) Becc.) em dois municípios do centro norte da Bahia, Brasil**. 2008. 161 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal da Paraíba, Areia. 2008.

SAS Institute. SAS/STAT User's guide, Version 9.2. **SAS Institute Inc.**, Cary, NC. 2008

SEGALA, C. Z. S.; SILVA, I. T. Apuração dos custos na produção de leite em uma propriedade rural do município de Irani/SC. **Custos e Agronegócios online**. [S.l.], v. 3, n. 1, jan.-jun., 2007.

SERRANO, R. D. C. **Glicerina bruta e ureia de liberação lenta na alimentação de bovinos de corte**. 2011. 63 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Paraná. 2011.

SHARMILA, A.; ALIMON, A. R.; AZHAR, K.; NOOR, H. M.; SAMSUDIN, A. A. Improving Nutritional Values of Palm Kernel Cake (PKC) as Poultry Feeds: A Review. **Malaysian Journal of Animal Science**. Vol. 17, Issue 1, jun. 2014, p. 1-18.

SILVA, R. L. N. V.; OLIVEIRA, R. L.; LEO, A. G.; CARVALHO, G. G. P.; FERREIRA, A. C.; PINTO, L. F. B.; PEREIRA, E. S. Palm kernel cake for lactating cows in pasture: intake, digestibility, and blood parameters. **Italian Journal of Animal Science**. Vol. 12, 2013, p. 257 - 264.

SODER, K. J.; SAPORITO, L. S.; STOUT, W. L. Effect of by-product gypsum application rate to grass pasture, grass hay and corn silage on fermentation by rumen microorganisms in continuous culture. **Animal Science and Technology**. [S.l.], Vol. 132, Issues 3-4, 2007, p. 331-340.

SOUSA, J. P. L.; SANTOS NETA, E. R.; MACIEL, R. P.; SOUSA, J. T. L.; RODRIGUES, K. F.; VAZ, R. G. M. V. Uso da torta de dendê em dietas para animais de produção. **PUBVET**. Londrina, v. 4, n. 6, 2010, 111. ed., Art. 751.

STRADA, E. S. O. **Glicerina de baixa pureza em suplementos para bovinos não castrados terminados em pastagens**. 2013. 132 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Bahia. 2013.

TAF AJ, M.; ZEBELI, Q.; JUNCK, B.; STEINGASS, H.; DROCHNER, W. Effects of particle size of a total mixed ration on in vivo ruminal fermentation patterns and inocula characteristics used for in vitro gas production. **Animal Feed Science and Technology**. [S.l.], Vol. 123–124, Part 1, Sept. 2005, p. 139-154.

THOMPSON, J. C; He, B. B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstock. **Applied Engineering in Agriculture**. [S.l.], Vol. 22, Issue 2, 2006, p. 261–265.

TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. **Current Contents/Journal of the British Grassland Society**. Vol. 18, 1983, p.104-111.

VAN CLEEF, E. H. C. B.; EZEQUIEL, J. M. B.; D'AUREA, A. P.; FÁVARO, V. R.; SANCANARI, J. B. D. Crude glycerin in diets for feedlot Nellore cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Vol. 43, n° 2, 2014, p. 86 – 91.

VAN GELDER, A. H.; HETTA, M.; RODRIGUES, M. A. M.; BOEVER, J. L.; HARTIGGH, H.; RYMER, C.; VAN OOSTRUM, M.; VAN KAATHOVEN, R.; CONE, J. W. Ranking of *In vitro* fermentability of 20 feedstuffs with an automated gas production technique: Results of a ring test. **Animal Feed Science and Technology**. Vol. 123-124, part 1, Sept. 2005, p. 243-253.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**. [S.l.], 1991, v. 74, n. 10, p.3583-3597.

VÁRADYOVÁ, Z.; BARAN, M.; ZELENÁK, I. Comparison of two in vitro fermentation gas production methods using both rumen fluid and faecal inoculum from sheep. **Animal Feed Science and Technology**. Vol. 123-124, part 1, Sept. 2005, p. 81-94

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

VIEIRA, Marieta Maria Martins et al. Comportamento ingestivo de ovinos alimentados com rações contendo quatro níveis de inclusão do farelo de mamona. **Revista Ceres (Impr.)**, Viçosa, Vol. 58, n. 4, ago. 2011, p. 444-451.

WANG, C.; LIU, Q.; HUO, W. J.; YANG, W. Z.; DONG, K. H.; HUANG, Y. X.; GUO, G. Effects of glycerol on rumen fermentation, urinary excretion of purine derivatives and feed digestibility in steers. **Livestock Science**. Vol. 121, 2009, p. 15 – 20.

YAN, T.; FROST, J. P.; KEADY, T. W.; AGNEW, R. E.; MAYNE, C.S. Prediction of nitrogen excretion in feces and urine of beef cattle offered diets containing grass silage. **Journal of Animal Science**. Vol. 85, n. 8, 2007, p. 1982-1989.