

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

SERGIO HOELDTKE JUNIOR

**AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO RUMINAL EM BOVINOS FISTULADOS
SUPLEMENTADOS COM NÍVEIS DE GLICEROL**

EVALUATION OF RUMEN FISTULATED CONTENTS IN CATTLE
SUPPLEMENTED WITH LEVELS OF GLYCEROL

Orientador: Prof. Leandro Lipinski

Co-Orientador: Prof. José Luis Moletta

CASTRO

2011

SERGIO HOELDTKE JUNIOR

**AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO RUMINAL EM BOVINOS FISTULADOS
SUPLEMENTADOS COM NÍVEIS DE GLICEROL**

**EVALUATION OF RUMEN FISTULATED CONTENTS IN CATTLE
SUPPLEMENTED WITH LEVELS OF GLYCEROL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para
obtenção de título de grau em bacharelado na
Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de
Zootecnia.

Orientador: Prof. Leandro Lipinski

Co-Orientador: Prof. José Luis Moletta

CASTRO

2011

1. INTRODUÇÃO

A utilização de energia para o desenvolvimento econômico mundial é um dos grandes problemas existentes nos dias de hoje, onde cerca de 90% da energia utilizada é proveniente de fonte fóssil, sendo este um recurso esgotável. Com isso, existe a necessidade de se buscar fontes alternativas de energia, como o biodiesel, por exemplo, sendo ele ambientalmente sustentável.

Atualmente a nutrição animal representa de 60 a 70% dos custos totais das propriedades, sendo que o milho e a soja são os principais ingredientes das dietas dos animais, com isso tem se buscado reduzir custos. O Brasil possui enorme quantidade de resíduos e subprodutos, da agricultura e agroindústria, com potencial de uso na alimentação de ruminantes. Dentre os diversos produtos que podem substituir o milho estão subprodutos derivados do biodiesel como, por exemplo, o glicerol, que pode chegar a custar duas vezes menos que o grão de milho.

O biodiesel é definido como um mono-alquil-éster de ácidos graxos, derivado de fontes renováveis, tais como óleos vegetais e gorduras animais, obtido através de um processo de transesterificação de óleos vegetais com alcoóis (metanol ou etanol) através da catalise básica, utilizando o hidróxido de sódio ou potássio como catalisadores ou ainda pela esterificação desses materiais na presença de catalisadores ácidos, na qual ocorre a transformação de triglicerídeos em moléculas menores de ésteres de ácidos graxos, e tendo como sub-produto a glicerina bruta, com teores de glicerol variando de 80 a 95% (Ramos et. al., 2000). Glicerina é o nome comercial de um líquido viscoso, incolor, inodoro, higroscópico e com sabor adocicado, quimicamente definido como glicerol ou propano – 1,2,3 – triol de fórmula $C_3H_5(OH)_3$ (IUPAC, 1993).

O glicerol é um composto tricarbóxico de alto conteúdo energético, sendo um eventual substituto de milho e outros concentrados energéticos ricos em carboidratos não-fibrosos na alimentação animal (DeFrain et al., 2004; Seller, 2008; Donkin et al., 2009). O glicerol é um substrato fermentável no rúmen (Remond et al., 1993; Bergner et al., 1995) e um precursor gliconeogênico via metabolismo hepático (Lin, 1977).

Quanto à variabilidade, o valor de energia metabolizável deste subproduto é de aproximadamente 3200 kcal/kg. As fontes de variação desta energia são a presença de umidade, minerais e óleo na glicerina resultante da produção de biodiesel, cuja variação ainda é uma realidade nesta etapa de desenvolvimento desta produção.

De acordo com o relato na literatura existe grande variação na composição da glicerina bruta, o conteúdo de glicerol pode variar de 30,5 (Paige, 2009) a 90% (Potu et al., 2009), e o teor de matéria seca de 70 (Shin et al., 2009) a 94% (Paige, 2009).

A glicerina produzida na cadeia do biodiesel pode ser utilizada na alimentação animal. Segundo Berenchtein (2008) a glicerina pode ser utilizada como ingrediente energético nas rações de suínos em crescimento e terminação até o nível de 9% sem afetar o desempenho e as características de carcaça dos animais. Em aves, o glicerol pode ser utilizado como fonte de energia em dietas de alta produção, entretanto cuidados devem ser tomados em relação à possível concentração residual de metanol (Cerrate et al., 2006). Para vacas em alta produção de leite Schröder & Südekum (1999) utilizaram o glicerol como substância glicogênica. Os autores concluem que o glicerol melhorou o suprimento de energia e auxiliou na prevenção de problemas de Cetose. (Kaschinski, 2011) concluiu que a inclusão de glicerol ao nível de 20% do concentrado como fonte energética em substituição ao milho para borregas, não comprometeu o desempenho reprodutivo e não levou a alterações hepáticas.

O objetivo do presente trabalho foi observar as alterações da microbiota ruminal com a inclusão de diferentes níveis de glicerol na dieta.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado entre 27 de Julho a 02 de Setembro de 2011 no Instituto Agronômico do Paraná – IAPAR – Estação Experimental Fazenda Modelo, situada no município de Ponta Grossa – PR. Foram utilizados cinco bovinos machos, inteiros, da raça Purunã, com três anos de idade e fistulados no rúmen com um ano de idade. Os animais foram submetidos a cinco níveis de inclusão de glicerol na dieta, sendo: 15, 30, 45, 60 e 75% de glicerol em relação à quantidade de matéria verde (MV) da dieta total fornecida ao animal. Os níveis de glicerol eram alterados a cada semana, não havendo período de adaptação.

Os animais eram separados individualmente no confinamento, onde recebiam diariamente um único fornecimento às 9 horas 10 kg de silagem misturadas aos níveis de inclusão de glicerol e água em determinados períodos do dia. As coletas do conteúdo ruminal através da fistula foram realizadas quatro vezes no primeiro dia de inclusão de glicerol nos seguintes horários 2, 4, 8 e 12 horas após a ingestão do alimento, e nos seis dias restantes da semana foram realizadas uma única coleta 12 horas após a ingestão do alimento.

Foram coletados 250 ml de líquido ruminal de cada animal a cada coleta. Foi avaliado pH do líquido ruminal através do aparelho (Tonka pH-1500). Para a avaliação dos protozoários as características mais importantes como densidade de população e a intensidade de movimento desses microrganismos foram depositados gotas do líquido ruminal em uma lâmina com lamínula, previamente aquecida a 30°C, observando-se em microscópio óptico com aumento de 100 vezes (González et al., 2000). Sendo classificados através do sistema de cruces, sendo + raros, ++ moderados e +++ abundantes. Enquanto para a prova de determinação da atividade redutiva bacteriana, adicionou-se 1 ml de azul de metileno solução 0,03% em uma amostra de 20 ml do líquido ruminal testemunha (sem corante) do mesmo animal. A medição do tempo transcorrido era realizada desde a adição do corante na amostra até a sua degradação, ficando igual à amostra testemunha (Rosenberger 1993). A prova de sedimentação e flutuação consistia em deixar a amostra

do líquido ruminal em repouso até o momento do aparecimento de eventos de sedimentação e flutuação.

Para a avaliação da glicemia foi coletado uma gota de sangue da cauda do animal, e realizada leitura por um glucômetro portátil (Bayer Breeze 2), durante o início (4^a coleta), meio (7^a coleta) e fim (10^a coleta) da inclusão dos níveis de glicérol.

Os dados foram avaliados com auxílio do programa PASW- statistics 18, sendo utilizado a análise da variância e o teste de Tukey para comparação das médias, sendo um delineamento em blocos casualizado (DBC) com 5 tratamentos e 5 repetições.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A adição de glicerol misturada à silagem não alterou ($P>0,05$) o teor plasmático de glicose no animal, causando uma divergência da capacidade gliconeogênica do glicerol (Tabela 1). A ausência de resposta em glicose plasmática à suplementação com glicerol tem sido observada (Ogborn, 2006; Chung et al., 2007; Boyd et al., 2009; Osborne et al., 2009; Rico et al., 2009).

TABELA 1. Níveis de glicose sanguínea em função dos níveis de inclusão de glicerol na silagem.

Períodos	Média Glicose (CONTROLE) mg/DL	Média Glicose (15% GLICEROL) mg/DL	Média Glicose (30% GLICEROL) mg/DL	Média Glicose (45% GLICEROL) mg/DL	Média Glicose (60% GLICEROL) mg/DL	Média Glicose (75% GLICEROL) mg/DL
0	52					
4 ^a Coleta		48^{NS}	40^{NS}	51^{NS}	61^{NS}	50^{NS}
7 ^a Coleta		61^{NS}	58^{NS}	50^{NS}	51^{NS}	49^{NS}
10 ^a Coleta		58^{NS}	64^{NS}	64^{NS}	38^{NS}	53^{NS}

*= Significativo ($P<0,05$) pelo teste de Tukey.

NS= Não Significativo ($P>0,05$) pelo teste de Tukey.

A concentração plasmática de glicose teve aumento numérico, quando observado individualmente (Figura 1). Isso ocorre devido à contribuição gliconeogênica que o glicerol possui para produção hepática de glicose. A inclusão de 60% de glicerol pode ser explicada devida queda na temperatura ambiente na semana do experimento, onde o teor de glicose cai devido à regulação de temperatura feita pelo organismo do animal. Também nem todo glicerol absorvido pelo fígado entra na via glicolítica, podendo seguir para o tecido adiposo, ou sendo perdido.

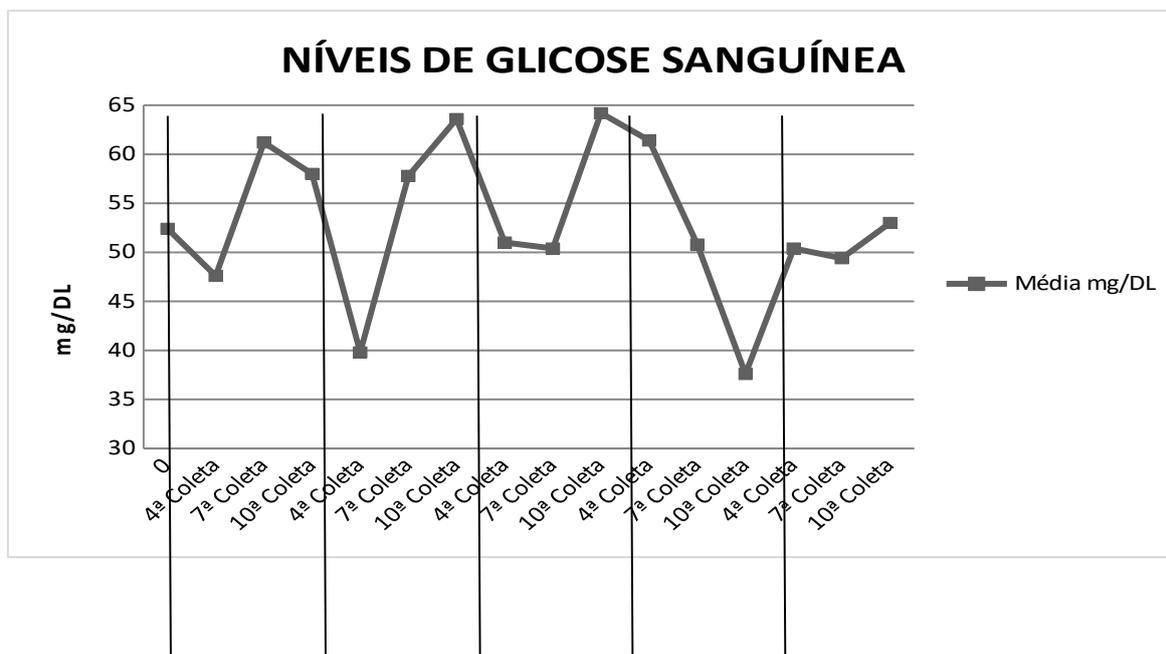


FIGURA 1. Nível de glicose sanguínea em função dos níveis de inclusão de glicerol.

Segundo Orskov (1986), o abaixamento do pH ruminal ocorre, principalmente, após a ingestão de alimentos, especialmente concentrados, devido à sua rápida taxa de fermentação. Os valores mínimos de pH foram encontrados entre 2 e 12 horas após alimentação (Figura 2). Trabue et al. (2007) sugeriram que 80% do glicerol é metabolizado no rúmen após 24 horas, e por ser fermentado principalmente a propionato, resulta no decréscimo da relação acetato:propionato no rúmen. Segundo Krehbiel (2008) além do aumento na produção de propionato há também produção de butirato no rúmen devido à inclusão de glicerol na dieta dos ruminantes. O decréscimo no pH é resultante do intenso processo de fermentação e ao consequente aumento da produção dos ácidos graxos de cadeia curta e lactato (Donkin, 2008).

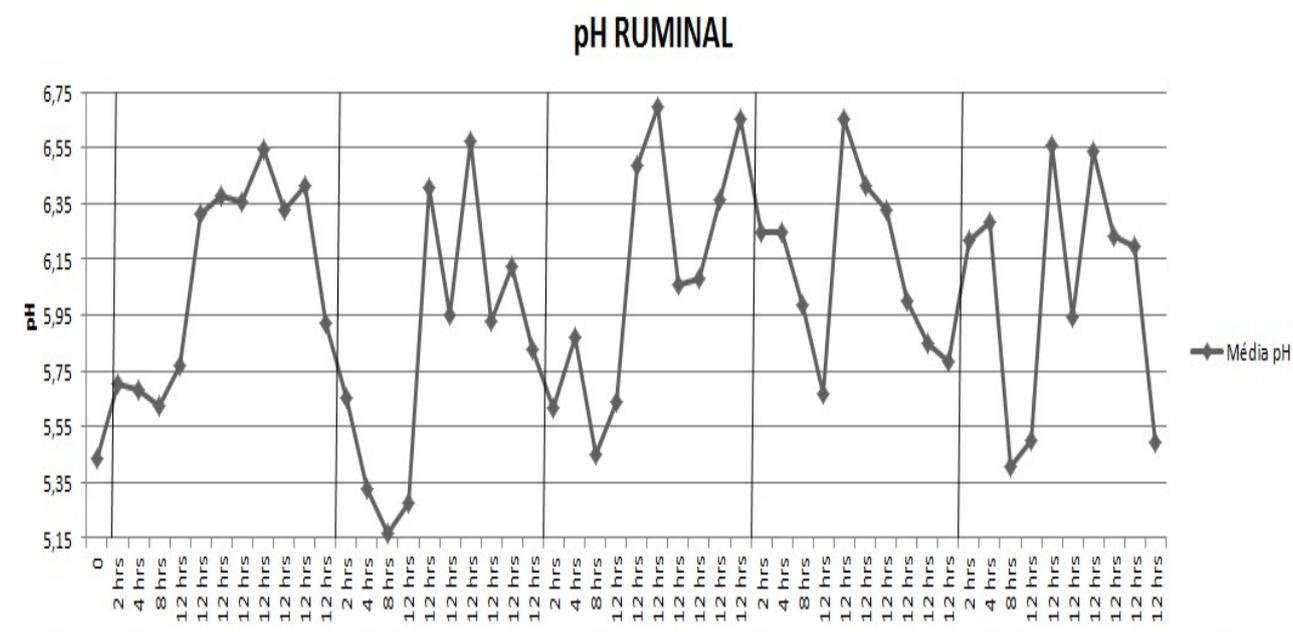


FIGURA 2. Alterações de pH com níveis de inclusão de glicerol.

Os microrganismos ruminais são dependentes de um ambiente ideal para seu desenvolvimento e este deve ter temperatura entre 38 a 40°C e uma faixa de pH que varie entre 5,5 a 7,0 (Hoover, 1986). Para a avaliação microbiológica não foi observado efeito significativo ($P>0,05$) (Tabela 2). Os valores encontrados apresentaram densidade e motilidade satisfatórios.

TABELA 2. População dos protozoários em função das concentrações de glicerol de 15, 30, 45, 60 e 75% da dieta em relação ao controle.

PERÍODOS	MÉDIA PTZ. (CONTROLE)	MÉDIA PTZ. (15% GLICEROL)	MÉDIA PTZ. (30% GLICEROL)	MÉDIA PTZ. (45% GLICEROL)	MÉDIA PTZ. (60% GLICEROL)	MÉDIA PTZ. (75% GLICEROL)
0	++					
1ª Coleta		++NS	++NS	++NS	++NS	+++NS
2ª Coleta		++NS	+NS	++NS	+++NS	++NS
3ª Coleta		++NS	+NS	++NS	++NS	++NS
4ª Coleta		+NS	+NS	++NS	++NS	++NS
5ª Coleta		+NS	+NS	+++NS	++NS	++NS
6ª Coleta		++NS	+NS	+++NS	+++NS	++NS
7ª Coleta		++NS	+NS	+++NS	++NS	++NS
8ª Coleta		++NS	++NS	++NS	+++NS	++NS
9ª Coleta		++NS	++NS	++NS	++NS	++NS
10ª Coleta		+NS	+NS	++NS	++NS	++NS

*= Significativo ($P<0,05$) pelo teste de Tukey.

NS= Não Significativo ($P>0,05$) pelo teste de Tukey.

Classificação = + raro, ++ moderado, +++ abundante.

A população de protozoários do rúmen é mais sensível a mudanças no rúmen. Em condições de alcalose ou acidose ruminal esta população é a primeira a diminuir ou extinguir. A adição de glicerol nos níveis avaliados não causou alteração na população de protozoários.

O tempo de redução ao azul de metileno (TRAM) não teve alteração ($P>0,05$) com a inclusão de diferentes níveis de glicerol (Tabela 3). O tempo está relacionado com a qualidade do alimento ingerido e pode chegar a até 6 min, sendo que em animais que recebem alimento rico em carboidratos não estruturais esse tempo pode ser inferior a 1 min (Dirksen et al., 1993). Os valores encontrados no presente trabalho foram de 09 segundos a 144 segundos. Isso mostra que a microbiota ruminal estava ativa.

TABELA 3. Tempo de redução ao azul de metileno com função das concentrações de glicerol de 15, 30, 45, 60 e 75% da dieta em relação ao controle.

PERÍODOS	MÉDIA TRAM. (CONTROLE) seg.	MÉDIA TRAM. (15% GLICEROL) seg.	MÉDIA TRAM. (30% GLICEROL) seg.	MÉDIA TRAM. (45% GLICEROL) seg.	MÉDIA TRAM. (60% GLICEROL) seg.	MÉDIA TRAM. (75% GLICEROL) seg.
0	47					
1ª Coleta		39 ^{NS}	60 ^{NS}	41 ^{NS}	84 ^{NS}	37 ^{NS}
2ª Coleta		52 ^{NS}	144 ^{NS}	34 ^{NS}	36 ^{NS}	43 ^{NS}
3ª Coleta		45 ^{NS}	106 ^{NS}	36 ^{NS}	88 ^{NS}	79 ^{NS}
4ª Coleta		30 ^{NS}	37 ^{NS}	37 ^{NS}	101 ^{NS}	58 ^{NS}
5ª Coleta		96 ^{NS}	41 ^{NS}	51 ^{NS}	44 ^{NS}	21 ^{NS}
6ª Coleta		54 ^{NS}	30 ^{NS}	21 ^{NS}	18 ^{NS}	34 ^{NS}
7ª Coleta		33 ^{NS}	94 ^{NS}	24 ^{NS}	40 ^{NS}	21 ^{NS}
8ª Coleta		69 ^{NS}	59 ^{NS}	09 ^{NS}	15 ^{NS}	144 ^{NS}
9ª Coleta		93 ^{NS}	72 ^{NS}	12 ^{NS}	15 ^{NS}	41 ^{NS}
10ª Coleta		98 ^{NS}	84 ^{NS}	32 ^{NS}	114 ^{NS}	117 ^{NS}

*= Significativo ($P<0,05$) pelo teste de Tukey.

NS= Não Significativo ($P>0,05$) pelo teste de Tukey.

A comparação de tempo de sedimentação entre o grupo com diferentes níveis de inclusão de glicerol, com o grupo controle não teve diferença significativa ($P>0,05$). Os valores encontrados para tempo de sedimentação nos grupos com inclusão de glicerol estão dentro do padrão fisiológico para bovinos que é de 4 a 8 minutos (Garry, 1993).

4. CONCLUSÃO

Através do exame laboratorial do líquido ruminal conclui-se que a utilização de até 75% de glicerol em relação à matéria verde (MV) fornecida ao animal como suplemento, não é suficiente para ter uma alteração significativa na microbiota ruminal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERENCHTEIN, B. **Utilização de glicerol na dieta de suínos em crescimento e terminação.** 2008. 45 p. Dissertação (Mestrado em agronomia, Programa Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- BERGNER, H.; KIJORA, C.; CERESNAKOVA, Z.; SZAKACS, J. In vitro studies on glycerol transformation by rumen microorganisms. **Archives Tierernahrung**, Berlin, v.48, n.3, p.245 - 256, 1995.
- BOYD, J.; WEST, J.W.; BERNARD, J.K. Effects of increasing concentrations of dietary glycerol on ruminal environment and digestibility in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n.1, p.88, Jan 2009. Abstract.
- CERRATE, S.; YAN, F.; WANG, Z.; COTO, C.; SAKAKLI, P.; WALDROUP, P.W. Evaluation of glycerine from biodiesel production as a feed ingredient for broilers. **International Journal of Poultry Science**, Faisalabad, v. 5, n.11, p. 1001-1007, 2006.
- CHUNG, Y.H.; RICO, D.E.; MARTINEZ, C.M.; CASSIDY, T.W.; NOIROT, V.; AMES, A.; VARGA, G.A. Effects of feeding dry glycerin to early postpartum holstein dairy cows on lactational performance and metabolic profiles. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 90, n. 8, p. 5682-5691, Aug. 2007.
- DEFRAIN, J.M.; HIPPEN, A.R.; KALSCHUR, K.F.; JARDON, P.W. Feeding glycerol to transition dairy cows: effects on blood metabolites and lactation performance. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.87, n.12, p.4195 – 4206, Dec. 2004.
- DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H.D.; STÖBER, M. Exame Clínico dos Bovinos. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1993, 419p.
- DONKIN, S.S. Glicerol from biodiesel production: the new corn for dairy cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, suplemento especial, p.280-286, 2008.

- DONKIN, S.S.; KOSER, S.L.; WHITE, H.M.; DOANE, P.H.; CECAVA, M.J. Feeding value of glycerol as a replacement for corn grain in rations fed to lactating dairy cow. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.92, n.10, p. 5111 – 5119, Oct. 2009.
- GARRY, F.B. Indigestão em ruminantes, In: Smith B.P (ed.) Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais: Moléstias em Equinos, Bovinos, Ovinos e Caprinos. Manole: São Paulo, 1993, p.750-783.
- GONZÁLEZ, F.H.D., J. BARCELLOS, H.O. PATIÑO e L.A. RIBEIRO. 2000. **Perfil metabólico em ruminantes. Seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Editora UFRGS. Porto Alegre/RS. 106 p.
- HOOVER, W.H. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 6, p. 2755-2766, 1986.
- INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **Nomenclature of organic chemistry: recommendations**. Washington, 1993. Disponível em: <<http://www.iupac.org/Publications>>. Acesso em: 15 jul. 2011.
- KACHINSKI, M.B. Avaliação do consumo e dos metabólitos sanguíneos de ovinos suplementados com glicerol na dieta, 2011.
- KREHBIEL, C.R. Ruminal and physiological metabolism of glycerin. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 1, p.392, Jan.2008. Abstract.
- LIN, E.C.C. Glycerol utilization and its regulation in mammals. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 46, p. 765-795, 1977.
- OGBORN, K. L. 2006. **Effects of method of delivery of glycerol on performance and metabolism of dairy cows during the transition period**. MS Thesis. Cornell University, Ithaca, NY.

- ORSKOV, E.R.; GRUBB, D.A.; SMITH, J.S; WEBSTER, A.J.F.; CORRIGALL, W. Efficiency of utilization of volatile fatty acids for maintenance and energy retention by sheep. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 41, n.2, p. 541-551, Fev. 1979.
- OSBORN, V.R.; ODONGO, N.E.; CANT, J.P.; SWANSON, K.C.; MCBRIDE, B.W. Effects of supplementing glycerol and soybean oil in drinking water on feed and water intake, energy balance, and production performance dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n.2, p. 698-707, Feb 2009.
- PAIGE, G. **Variation in the chemical composition of crude glycerin**: the knowledge bank at OSU. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1811/37082>>. Acesso em: 14 out 2011.
- POTU, R.B.; ABUGHAZALEH, A.A; HASTINGS, D.; ABOEL-NOR, S.; IBRAHIM, S. The effects of feeding glycerol on rumen fermentation and bacteria. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.92, n.1, p.89, Jan. 2009. Abstract.
- RAMOS, L.P. **Aproveitamento integral de resíduos agrícolas a agro-industriais**. <http://blog.cca.ufscar.br/lamam/files/2010/07/artigo_pretratamento.pdf>. Acesso em: 23 jul. 2011.
- RÉMOND, B.; SOUDAY, E.; JOUANY, J. P. In vitro and in vivo fermentation of glycerol by rumen microbes. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.41, n.2, p.121 – 132, Apr. 1993.
- RICO, D.E.; CHUNG, Y.H.; MARTINEZ, C.M.; CASSIDY, T.; HEYLER, K.S.; VARGA, G.A. Effects of replacing starch or sugar with glycerin on ruminal fermentation during continuous culture. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 1, p.89, Jan. 2009b. Abstract.
- ROSENBERGER, G. **Exame clínico dos bovinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993.

- SCHRÖDER, A. and SÜDEKUM, K. H. 1999. **Glycerol as a byproduct of biodiesel production in diets for ruminants.** In New Horizons for Old Corp. Proc 10th Int. Rapeseed Congr., Canberra, Australia, September 26-29, Paper No. 241. N. Wratten and P.A. Salisbury, ed. The Regional Institute Ltd., Gosford, New South Wales, Australia.
- SELLERS, R.S. Glycerin as a feed ingredient, official definition(s) and approvals. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.91, n.1, p. 392, Jan. 2008. Abstract.
- SHIN, J.H.; KIM, S.C.; WANG, D.; ADESOGAM, A.T.; STAPLES, C.R. Glycerol supplementation for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.92, n.1, p.88, Jan. 2009. Abstract.
- TRABUE, S.; SCOGGIN, K.; TJANDRAKUSUMA, S. et al. Ruminant fermentation of propylene glycol and glycerol. **Journal Agricultural of Food Chemistry**, v.55, p.7043-7051, 2007.