



Universidade Federal  
de Campina Grande

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

PRODUÇÃO DE GÁS *IN VITRO* EM SUBSTRATOS COM NÍVEIS DE  
COPRODUTOS DO BIODIESEL E CAPIM BRACHIARIA

**JULIANA MARQUES FREIRE**

**PATOS – PB**

**2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**PRODUÇÃO DE GÁS *IN VITRO* EM SUBSTRATOS COM NÍVEIS DE  
CÓPRODUTOS DO BIODIESEL E CAPIM BRACHIARIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, como uma das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de mestre.

**Orientador:** Prof. Dr. Aderbal Marcos de Azevêdo Silva

**Coorientador:** Prof. Dr. Jose Morais Pereira Filho

**PATOS – PB/ BRASIL**

**2015**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSRT DA UFCG

F862p

Freire, Juliana Marques

Produção de gás *in vitro* em substratos com níveis de coprodutos do biodiesel e capim brachiaria / Juliana Marques Freire. – Patos, 2015.  
50f.

Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2015.

“Orientação: Prof. Dr. Aderbal Marcos de Azevedo Silva”

“Coorientação: Prof. Dr. José Morais Pereira Filho”

Referências.

1. Digestibilidade. 2. Fermentação ruminal. 3. Gases do efeito estufa.
4. Produção de gás. I. Título.

CDU 636.085



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**PROVA DE DEFESA DO TRABALHO DE DISSERTAÇÃO**

**TÍTULO: "Produção *in vitro* de gás em substratos com níveis de coprodutos do biodiesel e capim brachiaria"**

**AUTORA: JULIANA MARQUES FREIRE**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. ADERBAL MARCOS DE AZEVÊDO SILVA**

**JULGAMENTO**

**CONCEITO: APROVADO**

Prof. Aderbal Marcos de Azevêdo Silva  
Presidente

Prof. Severino Gonzaga Neto  
1º Examinador

Prof. Leilson Rocha Bezerra  
2º Examinador

Patos - PB, 24 de fevereiro de 2015

Prof. Onaldo Guedes Rodrigues  
Coordenador



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

ATA DA DEFESA PARA CONCESSÃO DO GRAU DE MESTRE EM ZOOTECNIA,  
REALIZADA EM 24 DE FEVEREIRO DE 2015 (Nº 115)

CANDIDATA: JULIANA MARQUES FREIRE

COMISSÃO EXAMINADORA: Prof. Aderbal Marcos de Azevêdo Silva, Dr.- Presidente -  
Orientador - UAMV/UFPG, Prof. Severino Gonzaga Neto, Dr. - Examinador Externo -  
CCA/UFPA, Prof. Leilson Rocha Bezerra, Dr. - Examinador - DZ/UFPI,  
(PORTARIA/COPZOO Nº 12/2014)

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Produção *in vitro* de gás em substratos com níveis de  
coprodutos do biodiesel e capim brachiaria"

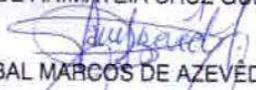
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Sistemas Agrosilvipastoris no Semi-Árido

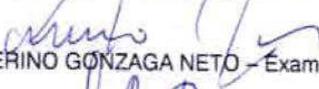
HORA DE INÍCIO: 10h:00min

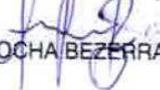
LOCAL: Sala de Reunião do Centro de Saúde e Tecnologia Rural/UFPG.

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, a candidata foi argüida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo demonstrado suficiência de conhecimento e capacidade de sistematização no tema de sua dissertação, sendo APROVADA, com modificações no texto, de acordo com as exigências da Comissão Examinadora, que deverão ser cumpridas no prazo máximo de 30 (trinta) dias. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata, que é assinada por mim, José de Arimateia Cruz Guedes, secretário, e os membros da Comissão Examinadora presentes. Patos, 24 de fevereiro de 2015.

  
JOSÉ DE ARIMATEIA CRUZ GUEDES – Secretário

  
ADERBAL MARCOS DE AZEVEDO SILVA – Orientador

  
SEVERINO GONZAGA NETO – Examinador Externo

  
LEILSON ROCHA BEZERRA – Examinador

JULIANA MARQUES FREIRE - Mestranda



## **A Vida do Viajante**

Minha vida é andar por este país

Pra ver se um dia descanso feliz

Guardando as recordações

Das terras onde passei

Andando pelos sertões

E dos amigos que lá deixei

Chuva e sol

Poeira e carvão

Longe de casa

Sigo o roteiro

Mais uma estação

E a alegria no coração

Minha vida é andar por esse país

Pra ver se um dia descanso feliz

Guardando as recordações

Das terras onde passei

Andando pelos sertões

E dos amigos que lá deixei

Mar e terra

Inverno e verão

Mostre o sorriso

Mostre a alegria

Mas eu mesmo não

E a saudade no coração

**Luiz Gonzaga**

**Dedico:**

Ao bom DEUS que me permitiu chegar até aqui, e me carregou no colo quando eu julgava não ter mais forças para seguir.

A meus pais (Antonio Marques Freire e Maria da Conceição Marques Freire) e irmãos (Andrea Cristina Marques, Jonas Marques Freire e Antonio Marques Freire Filho) que foram meu farol, iluminando e guiando meu caminho.

A minha amiga Joseane Pedro da Silva (*in memoria*), pelas palavras de sabedoria, amor, carinho e dedicação em mais de dez anos de amizade pura e verdadeira.

## AGRADECIMENTOS

Á **Deus** por sua fidelidade e amor incondicional.

A minha **família** por sua paciência, tolerância e fé.

Ao meu orientador Professor Dr. **Aderbal Marcos de Azevedo Silva**, pela oportunidade, dedicação e carinho durante todo o curso. Por seus ensinamentos, tanto dentro de sala de aula como sobre a vida.

Ao meu Coorientador Professor Dr. **José Morais Pereira Filho**, pelos conhecimentos repassados, pela compreensão e palavras de apoio.

A pesquisadora da EMBRAPA-CNPQ. **Dr<sup>a</sup>. Heloisa Carneiro** pelo repasse dos dados que conduziram esta pesquisa.

Ao secretário do mestrado de Zootecnia **Ari cruz** pela dedicação com todos os alunos, estando sempre disposto a ajudar.

A **Milenna Nunes, Simone Vieira e Fabíola Franklin** por sua contribuição na parte escrita.

Ao pessoal do LANA (Laboratório de Nutrição Animal), Otávio, Jaime e Célia.

Aos amigos que fiz durante o mestrado e minha estada em Patos: Fernanda Paula, Denise Bidler, Jean Gama, Joyanne Souza, Maria Vanubia, George Vieira, João Paulo, Dayane Morais, Maria do Carmo, Jovanna Pinheiro, Cléssio Paiva, Fabiano Lima, Gilmar Medeiros, Iranilda, Aristóteles e Álvaro Ramalho, Raquel Gouveia, Aluska, Auxiliadora e seus filhos Jefferson e Jacksuan. Vocês contribuíram de formas diferentes, mas tocaram meu coração em momentos decisivos... Amigos de Verdade se conhecem no dia- a- dia.

Aos meus queridos amigos de longa data que nunca me abandonaram: Lenice M. Menezes e Paulo Sérgio, Rosângela, Anaíra Santos, Clariana Santos, Rodrigo Cirino e Maria da Paz. Vocês foram à presença pura de DEUS na minha vida, suas palavras me fortaleceram e através do seu sorriso desfizeram minhas lágrimas.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vii
RESUMO GERAL .....	viii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
<b>CAPÍTULO 1 Degradabilidade e produção de gases <i>in vitro</i> de substratos de capim brachiaria com coprodutos da cadeia do biodiesel na alimentação de bovinos .....</b>	<b>3</b>
Resumo.....	4
Abstract.....	4
Introdução. ....	5
Material e Métodos.....	5
Resultados.....	8
Discussão.....	10
Conclusões.....	11
Referências.....	11
<b>CAPÍTULO 2 Fermentação ruminal e produção de AGVs e metano <i>in vitro</i> do capim brachiaria e coprodutos da indústria do biodiesel.....</b>	<b>15</b>
Resumo.....	16
Abstract.....	16
Material e Métodos.....	17
Resultados.....	20
Discussão.....	20
Conclusões.....	28
Referências.....	28
<b>Conclusão geral.....</b>	<b>30</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>31</b>

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

	<b>Degradabilidade e produção de gases <i>in vitro</i> de substratos de capim brachiaria com coprodutos da cadeia do biodiesel na alimentação de bovinos</b>	<b>Pagina</b>
Tabela 1	Composição química (g/kg) do capim brachiaria e dos quatro substratos resultantes da industrialização do biodiesel com base na matéria seca.....	6
Tabela 2	Médias e Equações de regressão para a digestibilidade, <i>in vitro</i> da matéria seca (DIVMS %) dose coprodutos em função dos níveis de substituição do capim brachiaria . .....	8
Tabela 3	Teores médios, probabilidade P e equações de regressão dos efeitos dependentes da produção de gás total (mL/g) de coprodutos da produção de biodiesel em diferentes níveis de substituição do capim brachiaria após 48 horas de incubação “ <i>in vitro</i> ” em meio de cultura.....	9

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 2

	<b>Fermentação ruminal e produção <i>in vitro</i> de AGVs e metano do capim brachiaria e coprodutos da indústria do biodiesel</b>	<b>Pagina</b>
Tabela 1	Composição química (%) do capim brachiaria e dos 4 substratos resultantes da industrialização do biodiesel com base na matéria seca .....	19
Tabela 2	Teores médios, probabilidade (P-value) e equações de regressão dos efeitos dependentes de CH <sub>4</sub> (mL/g) de coprodutos da produção de biodiesel em diferentes níveis de substituição do capim brachiaria após 48 horas de incubação “ <i>in vitro</i> ” em meio de cultura.	21
Tabela 3	Teores médios, probabilidade (P-value) e equações de regressão dos efeitos dependentes de CO <sub>2</sub> (mL/g) de coprodutos da produção de biodiesel em diferentes níveis de substituição do capim brachiaria após 48 horas de incubação “ <i>in vitro</i> ” em meio de cultura.....	23

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGVS	Ácidos Graxos Voláteis
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CH <sub>4</sub>	Metano
CHOT	Carboidratos Totais
CZ	Cinzas
DAMS	Digestibilidade Aparente na Matéria Seca
DMS	Digestibilidade da Matéria Seca
DIVMS	Digestibilidade <i>In vitro</i> na Matéria Seca
EE	Extrato Etéreo
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAD	Flavina-Adenina-Dinucleotídeo
FDA	Fibra e Detergente Ácido
FDN	Fibra em Detergente Neutro
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
G	Gramas
GEE	Gases do Efeito Estufa
ha	Hectare
H <sub>2</sub>	Hidrogênio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
kg	Quilograma
LIG	Lignina
MS	Matéria Seca
mL	Mililitro
NO <sub>2</sub>	Óxido Nitroso
NADH	Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina
NADPH	Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina
N-NH <sub>3</sub>	Nitrogênio Amoniacal
NRC	National Research Council
PB	Proteína Bruta
pH	Potencial Hidrogeniônico
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>

## RESUMO

Com o objetivo de avaliar a degradabilidade, produção de gás e a produção de AGVs e metano *in vitro* dos coprodutos da indústria do biodiesel (canola, nabo forrageiro, girassol, e mamona) em substituição ao capim brachiaria, desenvolveu-se, após 48 horas de incubação em meio de cultura *in vitro* a produção de gases em quatro níveis (0, 30, 50 e 70%). O inóculo para incubação *in vitro* foi obtido de três vacas da raça Holandesa com fistulas ruminais. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em um arranjo fatorial 4x 4, com os fatores representados pelos coprodutos e os níveis. Segundo os resultados todos os coprodutos estudados apresentaram efeito significativo ( $P < 0,05$ ) pelos níveis das dietas. O coproduto da canola ao final da incubação apresentou maior degradação, quando comparada aos demais coprodutos, porém apresentou elevada produção de gás, conseqüentemente sendo o coproduto mais eficiente. E a menor degradabilidade foi obtida com o coproduto da mamona. Os coprodutos avaliados podem ser utilizados na dieta de ruminantes, sendo potenciais fornecedores de proteína, proporcionando melhor aproveitamento energético. Com relação à produção de gases, ao substituir o capim brachiaria pelos coprodutos, aumentou-se a produção destes não sendo, porém inviável sua utilização para aumentar a energia da dieta, sem ocasionar distúrbios metabólicos. Sendo o coproduto da canola o que apresentou maior produção, enquanto que a menor produção foi observada com o coproduto da mamona.

**Palavras chaves:** Digestibilidade, Fermentação ruminal, Gases do efeito estufa, Produção de gás, Proteína

## ABSTRACT

Aimed to evaluate the degradability, gas production and the production of VFA and methane *in vitro* of the biodiesel industry by-products (canola, oilseed radish, sunflower, and castor) replacing Brachiaria grass, developed after 48 hours incubation in culture *in vitro* gas production in four levels (0, 30, 50 and 70%). The inoculum for *in vitro* incubation was obtained three Holstein cows with rumen fistulas. The experimental design was completely randomized in a factorial arrangement 4x 4, with the factors represented by the by-products and levels. According to the results all by-products studied had a significant effect ( $P < 0.05$ ) by levels of diets. The canola by-product to the end of incubation showed higher degradation compared to the other by-products, but showed high gas production, thus being the most efficient by-product. And the lower degradability was obtained with the by-product of castor oil. The evaluated by-products can be used in the diet of ruminants with protein potential suppliers, providing better energy utilization. With regard to gas production, to replace the grass Brachiaria by by-products, was increased production of these not being, but their use impractical to increase dietary energy without causing metabolic disorders. Being the by-product of canola showed the highest production, while the lowest production was observed with the by-product of castor oil.

**Keywords:** Digestibility, Ruminal fermentation, Greenhouse gases, Gas Production, Protein

## INTRODUÇÃO GERAL

A pecuária brasileira possui grande destaque no cenário mundial devido seu amplo rebanho bovino comercial, estimado pela FAO (2011) em aproximadamente 209,5 milhões de cabeças. Pesquisas da Embrapa e do IBGE (2011) demonstram que o agronegócio da bovinocultura gera cerca 7,5 milhões de empregos, com crescimento do rebanho de 1,9% ao ano, utilizando 172 milhões de hectares, com uma taxa de ocupação de 1,2 cabeças/há. Em todo o mundo a pecuária beneficia milhões de pessoas, pois esta atividade está entre as mais importantes do agronegócio.

Em vista da magnitude do plantel nacional e seu contínuo crescimento, esta atividade tem estado em evidência devido à contribuição negativa dos ruminantes quanto à produção de gases que prejudicam o meio ambiente.

Dentre os gases que promovem o efeito estufa podemos citar o dióxido de carbônico ( $\text{CO}_2$ ), o óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) e o metano ( $\text{CH}_4$ ). De acordo com o levantamento realizado pela USEPA- Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (2011), a fermentação entérica contribuiu em 2009 com 20,4% das emissões de  $\text{CH}_4$ , sendo esta considerada a segunda maior fonte de gases nocivos ao ambiente.

De acordo com Zotti & Paulino (2009), dentre as fontes emissoras de  $\text{CH}_4$  tem-se os aterros sanitários, uso de combustíveis fósseis, práticas agrícolas e a fermentação entérica dos ruminantes.

A metanogênese em ruminantes ocorre através da fermentação ruminal dos alimentos ingeridos e de acordo com Rivera et al. (2010) e Abdalla et al. (2012), pode ser relacionada ao consumo e à digestibilidade do alimento e as características dos animais como espécie, tamanho e idade. As principais reações do processo fermentativo são a formação dos ácidos graxos voláteis, sendo estes a fonte primária de energia

metabolizável, as células microbianas fornecedoras de aminoácidos metabolizáveis para manutenção e síntese de leite e os gases ( $\text{CO}_2$  e  $\text{CH}_4$ ), os quais são eliminados através da eructação e respiração (Fellner, 2009; Martin et al., 2009).

Com a crescente procura por alternativas alimentares que possam substituir as pastagens e reduzir as emissões de metano uma nova gama de alimentos alternativos tem possibilitado elevar o valor nutricional das dietas de baixo custo, como tortas e farelos provenientes da cadeia do biodiesel (Moreira et al., 2014).

Para que o emprego destes produtos seja viável, torna-se importante avaliar a sua constituição em relação à saúde e o desempenho dos animais (Azevedo et al., 2013). Com a utilização destes materiais, dar-se novas possibilidades a cadeia do biodiesel, mesmo que estes coprodutos necessitem de estudos sobre as melhores formas de armazenamento e possíveis efeitos nocivos ao organismo dos animais.

Deste modo a busca por alternativas alimentares que reduzam a emissão de gases do efeito estufa sem reduzir a produtividade dos sistemas tornou-se uma das expectativas da pecuária mundial.

## **CAPÍTULO 1**

**Degradabilidade e produção de gases *in vitro* de substratos de capim  
brachiaria com coprodutos da cadeia do biodiesel na alimentação de  
bovinos**

**Degradabilidade e produção de gases *in vitro* de substratos de capim brachiaria com coprodutos da cadeia do biodiesel na alimentação de bovinos**

(Após tradução para língua inglesa este artigo será enviado para a revista Tropical Animal Health and Production Journal, estando escrito dentro das normas em anexo).

**Resumo:** Objetivou-se avaliar a degradabilidade e produção de gás *in vitro* em dietas com coprodutos gerados pela indústria nacional do biodiesel (mamona, canola, nabo forrageiro e girassol preto) em substituição ao capim brachiaria em quatro níveis (0, 30, 50 e 70%). O inóculo para incubação *in vitro* foi obtido de três vacas da raça Holandesa com fistulas ruminais. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em um arranjo fatorial 4 x 4, com os fatores representados pelos coprodutos e os níveis. Todos os coprodutos estudados apresentaram efeito significativo ( $P < 0,05$ ). A utilização do coproduto da mamona na dieta de ruminantes proporciona redução na emissão de gases poluentes ao meio ambiente, possibilitando o melhor aproveitamento de energia pelos ruminantes. O nível de substituição de 70% da mamona é o mais recomendado. Com relação à digestibilidade, os coprodutos da canola (*Brassica napus L.*), e do nabo forrageiro (*Raphanus sativus L.*), ao nível de 70% não prejudicaram a degradabilidade da MS com sua utilização.

**Palavras-chave:** Digestibilidade, Fermentação ruminal, Produção de gás, Proteína

**Abstract:** Aimed to evaluate the degradability and gas production *in vitro* in diets with by-products generated by the national biodiesel industry (castor, canola, oilseed radish and black sunflower) replacing grass *Brachiaria* in four levels (0, 30, 50 and 70%). The inoculum for *in vitro* incubation was obtained from three Holstein cows with rumen fistulas. The experimental design was completely randomized in a factorial arrangement of 4 x 4 with the factors represented by the by-products and levels. All by-products studied had a significant effect ( $P < 0.05$ ). The use of the castor by-product in ruminant diet provides a reduction in greenhouse gas emissions to the environment that makes the best use of energy by ruminants. The replacement level of 70% castor oil is the most recommended. Regarding the digestibility, the co-products of canola (*Brassica napus L.*) and wild radish (*Raphanus sativus L.*) at the level of 70% did not prevent degradation of DM with its use.

**Keywords:** Digestibility, Ruminal fermentation, Gas Production, Protein

## **Introdução**

No Brasil, grande quantidade de coprodutos da agroindústria tem potencial para utilização na alimentação de animais, entre tortas e farelos passíveis de serem empregados na dieta de ruminantes oriundos da cadeia do biodiesel (Van Cleef, 2008). Entre as principais oleaginosas cultiváveis no Brasil que podem ser utilizadas no processo de industrialização do biodiesel destacou-se: o girassol (*Helianthus annuus L.*), a mamona (*Ricinus communis L.*), o nabo forrageiro (*Raphanus sativus L.*), a canola (*Brassica napus L.*), (Petrobio, 2005; Storck Biodiesel, 2008).

Estudos e técnicas que caracterizem estes coprodutos, como a técnica de produção de gases *in vitro*, possibilita a identificação de coprodutos que sejam eficientes em substituição a alimentos convencionais. Estas técnicas são menos onerosas e facilitam o controle das condições experimentais sendo eficientes, reproduzíveis, e altamente correlacionadas com os resultados obtidos *in vivo* (Getachew et al., 1998). A produção de gases é diretamente proporcional à fermentação microbiana do alimento e, como pode ser medida a intervalos frequentes, permite avaliar o modo como ocorre o ataque microbiano na degradação do alimento no rúmen.

Apesar do valor nutritivo destes materiais, devemos considerar a necessidade de tratamentos visando à melhoria da qualidade destes alimentos. A maioria das tortas e farelos das oleaginosas que vêm sendo utilizadas para produção de biodiesel no Brasil é passível do uso na alimentação animal, porém, cada uma com suas particularidades, no que diz respeito a cuidados antes de serem ofertadas aos animais devido a alguns fatores tóxicos ou antinutricionais que possuem quantidades máximas dentro da formulação das dietas dos animais (Abdalla et al., 2008).

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de diferentes níveis de coprodutos da cadeia do biodiesel sobre a degradabilidade e produção total de gás *in vitro* em substituição ao capim brachiaria na dieta de bovinos.

## **Material e Métodos**

### **Local do experimento**

O experimento foi desenvolvido no Campo Experimental de Coronel Pacheco, de propriedade da Embrapa Gado de Leite – Centro Nacional Pesquisa Gado Leite, localizado na Zona da Mata de Minas Gerais-MG.

### **Material estudado**

Os substratos utilizados para incubações *in vitro* foram o capim brachiaria (*Brachiaria brizantha* aos 28 dias de corte) como controle e coprodutos resultantes da industrialização do biodiesel: mamona (*Ricinus communis L.*), canola (*Brassica napus L.*), girassol preto (*Helianthus annus L.*), e nabo forrageiro (*Raphanus sativus L.*).

#### Análises químicas dos alimentos

Os substratos compostos pelos coprodutos e pela forragem foram pré-secos em estufas de ventilação forçada a 55°C por 48 horas. Depois moídos em moinho do tipo Wiley dotado de peneira com perfurações de 1,0 mm para determinação da matéria seca (MS) em estufa a 105°C de acordo com os procedimentos gerais descritos por Silva e Queiroz (2002), proteína bruta (PB) pelo método Kjeldahl (2006); fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) pelo método Van Soest (1991); e de extrato etéreo (EE), onde a forragem e os coprodutos foram acondicionados em sacos XT4 (Ankon) e submetidos à extração pelo método oficial de alta temperatura da AOCS (2009), utilizando-se extrator XT10 (Ankon).

A DIVMS foi avaliada seguindo a metodologia proposta por Tilley e Terry (1963). Os carboidratos totais (CHOT) foram obtidos por intermédio da equação  $100 - (\% PB + \% EE + \% Cinzas)$  descrita por Sniffen et al. (1992).

**Tabela 1-** Composição química (g/kg) do capim brachiaria e dos quatro substratos resultantes da industrialização do biodiesel com base na matéria seca.

Ingrediente	MS (g/kg)	PB (g/kg)	FDN (g/kg)	FDA (g/kg)	LIG (g/kg)	EE (g/kg)	CZ (g/kg)	CNF (g/kg)	DIVMS (g/kg)
C. Brachiaria	870,8	122,2	556,2	277,7	34,7	32,2	86,1	203,3	652
Coproductos									
Nabo Forrageiro	935,6	393,7	217,1	137,1	69,6	284,1	50,6	54,5	644,8
Mamona	912,6	420,2	423,3	383,4	154,4	43,8	42,3	70,4	497,1
Girassol Preto	901,1	342,6	390,1	243,6	34,3	32,1	54,9	180,3	582,3
Canola	922,1	375,1	410,3	378,3	120,5	24,3	57,7	132,6	689

MS: Matéria seca; PB: proteína bruta; FDN: fibra detergente neutro; FDA: fibra detergente ácida; LIG: lignina; EE: extrato etéreo; CZ: Matéria mineral; CNF: carboidratos não fibrosos, DIVMS digestibilidade;

Foram formulados tratamentos, substituindo o capim brachiaria (controle) pelos coprodutos nas seguintes proporções 100/0, 70/30, 50/50 e 70/30% (volumoso/coproducto). Os ingredientes dos tratamentos após serem secos a 55°C durante 48 horas, posteriormente moídos a 1 mm. Em seguida pesados 0,5g de materia seca (MS) da amostra para um saco de ANKOM® (F57) com 6 repetições / tratamento, selados e colocados dentro de frascos de vidro de soro do tipo cor-âmbar de 50 mL, previamente lavados com água destilada, secos em estufa e identificados.

#### Preparação para o meio de cultura

Para a coleta do líquido ruminal, utilizaram-se três vacas da raça Holandesa com peso médio de 600 kg providas de fistulas no rumen, sendo então transferidos para garrafas térmicas previamente aquecidas a 39°C e levados imediatamente ao laboratório. No laboratório, o conteúdo ruminal foi homogenizado e filtrado em duas camadas de tecido de algodão, sendo mantido em banho-maria a 39°C sob saturação de CO<sub>2</sub>, até serem adicionadas as demais soluções (tampão, macro e micro minerais solução de resazurina e meio B) para meio de cultura.

Foi utilizado o líquido ruminal e solução tampão (Vitti et al., 1999) em uma proporção de 5:1. O inoculo (30 mL) foi então transferido para os frascos de incubação, posteriormente lacrados e colocados em um agitador orbital cremalheira fixado em 120 oscilações por minuto em uma incubadora a 39°C.

#### Determinação da produção de gás

Foram incubados 150 frascos, 6 destes contendo apenas o líquido ruminal e o meio de cultura tamponante como controle (brancos), utilizados para determinar a produção de gás proveniente do conteúdo ruminal para posterior correção da produção líquida de gases, os demais frascos corresponderam a seis repetições de cada tratamento.

Os perfis acumulativos de produção de gases *in vitro* de cada frasco foram medidos as 3, 6, 12, 24 e 48 horas após a incubação utilizando um aparelho de deslocamento de água graduado em mL.

#### Determinação da degradabilidade da matéria seca

Após as 48 horas da incubação os sacos de ANKOM ® com os resíduos foram removidos e colocados em gelo, para interromper a fermentação, em seguida lavados com água abundante e secos em estufa a 55°C durante 48 horas. A degradabilidade aparente da matéria seca (DAMS) foi obtida pela diferença de peso entre a matéria seca da amostra antes e após a incubação.

#### Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento estatístico utilizado para avaliar a produção cumulativa de gases e a degradabilidade da matéria seca foi inteiramente ao acaso num arranjo fatorial 4 x 4 (coprodutos e níveis de substituição).

A produção de gás total e a degradabilidade da MS foram submetidos a uma análise de variância (Proc Anova) do SAS onde aos efeitos dos fatores principais aplicou-se o teste Tukey (P<0,05) entre os coprodutos e destes dentro de cada nível de substituição e dos níveis de substituição dentro de cada

coproduto. Os resultados dos níveis crescentes foram interpretados estatisticamente através dos modelos de regressão pelo PROC REG (SAS, 2003).

## Resultados

A composição química e seus resultados analisados são apresentados na (Tab. 1), onde se observa o alto teor de proteína nos coprodutos, com destaque para a mamona e o nabo forrageiro (420,2 e 393,7 g/kg) respectivamente, este último ainda apresenta grande quantidade de extrato etéreo residual proveniente do processo de extração a frio ou prensagem. Em relação ao conteúdo de FDN destaca-se a mamona e a canola (523,3 e 410,3 k/kg) com os mais altos níveis.

Quanto à degradabilidade da MS, o efeito dos fatores principais foi dependente (Tab 2).

Houve efeito de interação dos tipos de coprodutos e dos níveis de substituição nos valores de DIVMS.

**Tabela 2-** Médias e Equações de regressão para a digestibilidade, in vitro da matéria seca (DIVMS %) dose coprodutos em função dos níveis de substituição do capim brachiaria.

Coproduto	Níveis de substituição				Equações de regressão	R <sup>2</sup>	Valor P
	0%	30%	50%	70%			
Nabo Forrageiro	52,76	61,40 <sup>A</sup>	62,20 <sup>A</sup>	65,36 <sup>AB</sup>	$\hat{Y}=53,947+0,172x$	0,81	< 0001
Mamona	52,76	46,10 <sup>B</sup>	41,16 <sup>C</sup>	35,50 <sup>C</sup>	$\hat{Y}=53,081-0,245x$	0,95	< 0001
Girassol preto	52,76	57,36 <sup>A</sup>	58,06 <sup>B</sup>	60,76 <sup>B</sup>	$\hat{Y}=53,151+0,109x$	0,86	< 0001
Canola	52,76	60,06 <sup>A</sup>	63,33 <sup>A</sup>	68,36 <sup>A</sup>	$\hat{Y}=52,941+0,218x$	0,95	< 0001

\*Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, R<sup>2</sup> = coeficiente de regressão e P = probabilidade.

Ao analisarmos os coprodutos dentro dos níveis de substituição verifica-se que ao nível de 30%, o coproduto nabo forrageiro apresentou maior média de degradabilidade na matéria seca, semelhante estatisticamente ao coproduto da canola e do girassol preto, superando a digestibilidade observada para o coproduto mamona.

Ao nível de 50% de substituição o coproduto da canola juntamente com o nabo forrageiro apresentou a maior digestibilidade diferindo do girassol preto e da mamona sendo o ultimo, o coproduto que apresentou a menor digestibilidade. Já no nível de 70% os coprodutos canola e nabo forrageiro, demonstram os maiores níveis de digestibilidade quando comparados aos demais, diferindo destes (P<0,01).

Observando os níveis de substituição do capim brachiaria pelos coprodutos do biodiesel, verifica-se que o modelo de regressão que melhor explica a degradabilidade do coproduto da canola foi o linear com aumento de 0,22% na digestibilidade da MS para o acréscimo de uma unidade percentual do coproduto. Foi observado o mesmo comportamento para os coprodutos de nabo forrageiro e de girassol preto que obtiveram aumento na digestibilidade de 17% e 11% respectivamente.

Para o coproduto da mamona à medida que aumentava sua participação por unidade percentual, reduzia-se 0,24% a degradabilidade.

Observa-se que o efeito dos fatores principais foi dependente para a produção cumulativa de gás em 48 horas de incubação (Tab. 3).

O subproduto canola ao nível de substituição de 30% apresentou uma maior quantidade de produção de gás em 48 horas de incubação, diferindo dos demais. Ao nível de substituição de 50%, as taxas de produção de gás de coprodutos da canola e do girassol preto foram elevadas, apesar de diferirem significativamente entre si, e dos demais derivados.

O subproduto da mamona mostrou uma menor produção de gás em todos os níveis avaliados. No nível de 70% de substituição, como nos demais, a canola apresentou a maior produção de gás e diferiu significativamente de todos os demais produtos.

**Tabela 3-** Teores médios, probabilidade P e equações de regressão dos efeitos dependentes da produção de gás total (mL/g) de coprodutos da produção de biodiesel em diferentes níveis de substituição do capim brachiaria após 48 horas de incubação “in vitro” em meio de cultura.

Coproduto	Níveis de substituição				Equações de regressão	R <sup>2</sup>	P
	0%	30%	50%	70%			
Canola	121,63	181,17 <sup>A</sup>	188,40 <sup>A</sup>	193,40 <sup>A</sup>	$\hat{Y}=122,587+2,492x-0,021x^2$	0,96	< 0001
Nabo Forrageiro	121,63	123,47 <sup>C</sup>	120,03 <sup>C</sup>	109,47 <sup>C</sup>	$\hat{Y}=121,508+0,272x-0,006x^2$	0,81	< 0002
Girassol preto	121,63	147,70 <sup>B</sup>	163,70 <sup>B</sup>	148,97 <sup>B</sup>	$\hat{Y}=120,548+1,534x-0,015x^2$	0,86	< 0001
Mamona	121,63	94,83 <sup>D</sup>	82,37 <sup>D</sup>	69,73 <sup>D</sup>	$\hat{Y}=119,850-0,738x$	0,98	< 0001

\*Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey e R<sup>2</sup> coeficiente de regressão e P

Quanto aos níveis de substituição do capim brachiaria dentro de cada coproduto, observou-se que o coproduto da mamona obteve um comportamento linear decrescente (P<,0001), ou seja, à medida que se aumentava uma unidade percentual desse coproduto, reduzia 0,74 mL/g na produção total desse gás.

Os coprodutos da canola, nabo forrageiro e do girassol preto descreveram um comportamento quadrático para a produção de gás. Para o coproduto da canola observa-se que 59,33% promoveu o ponto de máxima de 196,51mL na produção de gases, já para o coproduto de nabo forrageiro o nível de 22,66% promoveu ponto máximo de 124,58mL/g e o girassol preto no nível de 51,13% promoveu ponto de máxima de 159,75mL/g na produção total de gás.

## **Discussão**

Observando a composição química dos alimentos estudados (Tab. 1), nota-se elevado teor proteico, sendo semelhantes ou até superiores aos farelos convencionais, farelo de soja é considerado o alimento padrão como fonte proteica, pois apresenta em sua composição 479g/kg de PB, 1,62g/kg de EE e 140,6 g/kg de FDN (Valadares filho et al., 2006).

Analisando os coprodutos (Tab. 1), nota-se que a canola, o nabo forrageiro e o girassol preto demonstraram digestibilidade superior aos demais. Este desempenho possivelmente ocorreu em razão da menor lignificação da MS e menor concentração de fibra. Quanto ao coproduto da mamona, este apresentou a menor taxa de degradabilidade, podendo estar associado ao elevado teor de fibra e lignina em sua composição. A presença da lignina tende a aumentar a fração indigerível, reduzindo, desta forma, a fração potencialmente digerível (Mizubuti et al. , 2011).

Além disso, a mamona possui compostos antinutricionais. A ricina é uma proteína localizada unicamente no endosperma das sementes de mamona, a mesma promove a morte das células por inibição da síntese proteica, levando a morte ou inibição dos microrganismos ruminais, diminuindo a degradação do alimento (Oliveira et al., 2013).

Avaliando a produção de gás, o coproduto da mamona promoveu a menor produção cumulativa de gases no final de 48 horas de incubação, pois a alta concentração proteica deste coproduto atua na formação de bicarbonato a partir de CO<sub>2</sub>, favorecendo a redução da produção de gás (Cieslak et al., 2013). Além disso, os fatores antinutricionais da ricina são capazes de se ligarem aos ribossomos, paralisando a síntese de proteínas e causar a morte das células (Severino, 2005), tornando-o altamente prejudicial aos microrganismos ruminais e explicando a redução na produção de gases.

A maior produção cumulativa de gás ocorreu com o coproduto da canola, seguido em menor intensidade pelo girassol preto e o nabo forrageiro. Lana (2007) enfatiza que o volume de gases

produzidos de um alimento em incubação reflete na produção de ácidos graxos de cadeia curta, que são a principal fonte de energia dos ruminantes.

O coproduto da canola demonstra-se com maior capacidade de disponibilizar nutrientes para os microrganismos ruminais *in vitro* em relação aos demais, isso pode ser explicado por apresentar elevado teor de FDN, e carboidratos fibrosos em sua composição química, logo produzindo acetato, CO<sub>2</sub> e hidrogênio no processo de fermentação que contribui para uma maior produção de gás. A reação é simples e se dá pela eliminação de hidrogênio a partir da combinação de H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> de acordo com a seguinte equação: CO<sub>2</sub>+ 4H<sub>2</sub> = CH<sub>4</sub> + 2H<sub>2</sub>O (Morgavi et al., 2012).

### **Conclusão**

A utilização do coproduto da mamona na dieta de ruminantes proporciona redução na emissão de gases poluentes ao meio ambiente, possibilitando o melhor aproveitamento de energia pelos ruminantes. O nível de substituição de 70% da mamona é o mais recomendado.

Com relação à digestibilidade, os coprodutos da canola (*Brassica napus L.*), e do nabo forrageiro (*Raphanus sativus L.*), ao nível de 70% não prejudicaram a degradabilidade da MS com sua utilização.

### **Agradecimentos**

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), a FAPEMIG (Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de Minas Gerais) e a EMBRAPA Gado de Leite pelo auxílio ao projeto de pesquisa.

### **Referencias**

Abdalla, A. L.; Silva Filho, J. C.; Godoi, A. R.; Carmo, C. A.; Eduardo, J. L. P, 2008. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. Revista Brasileira de Zootecnia. 37: 260- 258.

Abdalla, A.L.; Lovadine, H.; Sallam, S.M.A.H.; Bueno, I. C. S.; Tsai, S. M.; Figueira, A. V.O, 2012. *In vitro* evaluation, *in vivo* quantification, and microbial diversity studies of nutritional strategies for reducing enteric methane production. Tropical Animal Health and Production, 44: 953- 964.

American Oil Chemist Society (AOCS). Official and tentative methods of the American Oil Chemists' Society: including additions and revisions. 6. ed. Champaign, 2009.

Azevedo, R. A.; Bicalho, F. L.; Araújo, L.; Ribeiro Júnior, C. S.; Santos, A. C. R.; Jayme, D. G.; Geraseev, L. C., 2013. Technical and economic analysis of different levels of macauba cake in diets for dairy cows. *Archivos de Zootecnia*, 62: 147-150.

Biodieselbr.com. Tudo sobre biodiesel. Curitiba, 2008. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/biodiesel/biodiesel.htm>. Acesso em 20 de setembro de 2014.

Cielask, A.; Szumacher-Strabel, M.; Stochmal, A.; Oleszek, W. Plant components with specific activities against rumen methanogens. *Animal.*, v.7, n.2, p.253–265, 2013.

Fellner, V. Reactions in the Rumen—Limits and Potential for Improved Animal Production Efficiency. Disponível em: [http://animal.cals.arizona.edu/swnmc/Proceedings/2009/06Fellner\\_09.pdf](http://animal.cals.arizona.edu/swnmc/Proceedings/2009/06Fellner_09.pdf). Acesso em: 10/08/2014

Food And Agriculture Organization Of The United Nations- FAO. Agricultural Production: Livestock Primary. Disponível em:

<<http://faostat.fao.org/site/569/default.aspx#aanchor>>. Acesso em: 28/12/2014.

Getachew, G.; Blummel, M.; Makkar, H.P.S.; Becker, K, 1998. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, 72: 261-281.

Produção da Pecuária Municipal. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Pecuaria/Producao\\_da\\_Pecuaria\\_Municipal/2011/ppm2011.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2011/ppm2011.pdf). Acesso em: 10/12/2014

Lana, R. P., 2007. *Nutrição e alimentação animal: mitos e realidades*. Viçosa: UFV, 2.ed., 344p. Viçosa-MG.

Malafaia, G.C. As Interações entre os Agentes da Cadeia Produtiva da Pecuária de Corte no Brasil: implicações para a sustentabilidade. Disponível em: [http://www.pecuariasustentavel.org.br/gtps/SALSA-GTPS-UFV-EMBRAPA\\_EMBRAPA\\_GC\\_11.04.2011.pdf](http://www.pecuariasustentavel.org.br/gtps/SALSA-GTPS-UFV-EMBRAPA_EMBRAPA_GC_11.04.2011.pdf). Acesso em: 18/12/2014

Martin, C.; Morgavi, D.P.; Doreau, M, 2009. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal*, 4: 351- 365.

Mizubuti, I.Y.; Ribeiro, E.L.D.A.; Pereira, E.S.; Pinto, A. P.; Franco, A. L. C.; Syperreck, M. A.; Dórea, J. R. R.; Cunha, G. E.; Capelari, M. . G. M.; Muniz, E. B., 2011. Cinética de fermentação ruminal in vitro

de alguns coprodutos gerados na cadeia produtiva do biodiesel pela técnica de produção de gás. *Ciência Agrárias, Londrina.*, v.32: 2021-2028.

Morgavi, D.P. et al. Rumen protozoa and methanogenesis: not a simple cause-effect relationship. **British Journal of Nutrition**, vol. 107, p. 388-397, 2012.

Moreira, M. N.; Silva, A.M.A.; Carneiro, H.; Bezerra, L. R.; Oliveira, R. K.; Medeiros, F. F., 2014. *In vitro* degradability and total gas production of biodiesel chain byproducts used as a replacement for cane sugar feed. *Acta Scientiarum*, 36: 399-403.

Oliveira, J. S.; Antoniassi, J.; Freitas, S. C.; Muller, M. D., 2013. Composição química da glicerina produzida por usinas de biodiesel no Brasil e potencial de uso na alimentação animal. *Ciência Rural*, 43: 509-512.

Petrobio. Biodiesel: Viabilidade econômica. Ribeirão Preto, 2005. Disponível em:  
<http://www.plantebiodiesel.com.br/MANUAIS%20DO%20.pdf>. 28 de setembro de 2013.

Rivera, A.R.; Berchielli, T.T.; Messana, J. D.; Velasquez, P.T. Franco, A.V.M. Fernandes, L. B., 2010. Fermentação ruminal e produção de metano em bovinos alimentados com feno de capim-tifton 85 e concentrado com aditivos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39: 617-624.

Sas - Statistica Analysis System, 2003. Institute Inc. User's Guide, Cary, USA.

Silva, D. J.; Queiroz, A. C., 2002. *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. Editora UFV, Viçosa-MG.

Sniffen, C.J.; O'Connor, J. D.; Van Soest, P. J.; Fox, D. G., 1992. Russell JB. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. II - Carbohydrate and protein availability. *Journal of Animal Science*, Champaign, 70: 3562-3577.

United States Environmental Protection Agency- USEPA. Inventory of U.S. Greenhouse Gas Emissions and Sinks: 1990-2009. Washington: EPA, 2011. Disponível em:  
<http://www.usepa.gov/methane/intlanalyses.html>. Acesso em: 17/12/2014.

Valadares Filho, S.C.; Paulino, P.V.R.; Magalhães, K.A.1 ed. *Exigências nutricionais de zebuínos e tabelas brasileiras de composição de alimentos*. Viçosa: Suprema Gráfica Ltda – Universidade Federal de Viçosa, 2006.

Van Cleef, E.H.C.B. 2008. Tortas de nabo forrageiro (*Raphanus sativus*) e pinhão manso (*Jatropha curcas*): caracterização e utilização como aditivos na ensilagem de capim elefante. 77p. Dissertação (Mestrado) - UFV. Viçosa-MG.

Van-Soest, P.J. Nutricional Ecology of the Ruminant. Cornell University Press. Ithaca, 1991. 476 p.

Vitti, D. M.S.S.; Abdalla, A. L.; Silva Filho, J. C.; Del Mastro, N. L.; Maurício. R.; Owen, E.; Mould, F, 1999. Misleading relationships between in situ rumen dry matter disappearance, chemical analyzed and in vitro gas production and digestibility, of sugarcane bagasse treated with varying levels of electron irradiation and ammonia. *Animal Feed Science and Technology*, 79:145-153.

Zotti, C. A. ; Paulino, V. T, 2009. Metano na produção animal: emissão e minimização de seu impacto.

Instituto de Zootecnia APTA/SAA, Nova Odessa/SP. Disponível em:

<http://www.iz.sp.gov.br/pdfs/1259324182.pdf> . Acesso em: 10/12/2014.

## **CAPÍTULO 2**

**Fermentação ruminal e produção *in vitro* de AGVs e metano do capim  
brachiaria e coprodutos da indústria do biodiesel**

## **Fermentação ruminal e produção de AGVs e metano *in vitro* do capim brachiaria e coprodutos da indústria do biodiesel**

**(Após tradução para língua inglesa este artigo será enviado para a revista Tropical Animal Health and Production Journal, estando escrito dentro das normas em anexo).**

**Resumo:** Objetivou-se avaliar o potencial de produção dos gases metano (CH<sub>4</sub>) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e os subprodutos da fermentação ruminal: ácidos graxos voláteis, pH e amônia (AGVs, pH e NH<sub>3</sub>) *in vitro* dos coprodutos do biodiesel (Nabo Forrageiro, Mamona, canola e girassol preto). Os produtos foram analisados mediante a técnica semi automática de produção de gases *in vitro*. O delineamento utilizado foi o inteiramente ao acaso, num arranjo fatorial 4x4 (coprodutos e níveis de substituição). Nas condições experimentais deste trabalho, foram verificados diferentes potenciais para produção de gases entre os ingredientes. O coproduto do nabo forrageiro foi o ingrediente de maior potencial de produção de acetato, propionato e butirato. A maior produção de CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> em relação à matéria seca degradada foi obtida com o uso do coproduto da canola. O coproduto da mamona foi o de menor potencial para produção de acetato, butirato e propionato, podendo ser considerado, entre os coprodutos avaliados, o de menor impacto ao ambiente, sem prejuízos a fermentação ruminal.

**Palavras-chave:** Alimentos alternativos, Efeito estufa, Metanogênese, Meio ambiente

**Abstract:** Aimed to evaluate the production potential of methane gas (CH<sub>4</sub>) and carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) and by-products of ruminal fermentation: volatile fatty acids, pH and ammonia (AGVs, pH and NH<sub>3</sub>) *in vitro* of the biodiesel by-products (Nabo fodder, castor, canola and sunflower black). The products were analyzed by semi-automated technique *in vitro* gas production. The design was completely randomized in a factorial arrangement 4x4 (by-products and replacement levels). In the experimental conditions, they were verified different potentials for the production of gases between the ingredients. The by-product of oil radish was the ingredient of greatest production potential acetate, propionate and butyrate. The

increased production of CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> in relation to the degraded dry matter was obtained using the by-product canola. The by-product of castor oil was the least potential for producing acetate, propionate and butyrate, can be considered among the evaluated by-products, the less impact to the environment without damage to ruminal fermentation.

**Keywords:** Alternative Food, Greenhouse effect, Methanogenesis, Environmen

## **Introdução**

A demanda crescente por alternativas alimentares que possibilitem a utilização de produtos que reduzam os impactos ambientais e os custos de produção tem permitido, através de pesquisas, conhecer o valor nutritivo de materiais os quais após seu beneficiamento na cadeia do biodiesel poderá tornar-se uma fonte alimentar de qualidade na dieta de ruminantes.

A indústria do biodiesel utiliza culturas oleaginosas para a extração de óleo (Abdalla et. al., 2008), e devido a esta extensa produção há uma grande quantidade de resíduos gerados. O potencial de utilização de alimentos com elevados teores de fibra para o ruminante possibilita um destino adequado para estes resíduos e ao mesmo tempo permite uma substituição das forrageiras comumente utilizadas por alimentos de baixo custo.

Os coprodutos despertam o interesse como fontes alternativas para a mitigação de metano originado no processo digestivo em ruminantes. Estes alimentos possuem em sua composição elementos capazes de agir sobre a microbiota ruminal de forma deletéria, sejam por sua elevada concentração de ácidos graxos, taninos ou carboidratos não estruturais.

Mesmo demonstrando aptidão para fazer parte da alimentação diária dos ruminantes, torna-se necessário conhecer, estimar avaliar seus efeitos sobre o desempenho e a saúde dos animais (Azevedo et al., 2013). Devido estes questionamentos, técnicas que simulam a fermentação ruminal (produção de gás *in vitro*) e testes específicos para os alimentos fornecidos têm sido desenvolvidas (Bueno et al., 2008).

O objetivo deste estudo foi avaliar a produção de AGVs e metano *in vitro* dos coprodutos da indústria do biodiesel (canola, nabo forrageiro, girassol, e mamona) em substituição ao capim brachiaria, após 48 horas de incubação em meio de cultura.

## **Materiais e Métodos**

### Local do experimento

O experimento foi conduzido no Campo Experimental de Coronel Pacheco, MG, de propriedade da Embrapa Gado de Leite - CNPGL, localizado na Zona da Mata de Minas Gerais.

### Materiais estudados

Amostras de, aproximadamente, 300 g de cada coproduto resultante do processamento da extração do óleo vegetal foram coletadas e enviadas ao Laboratório de Análise de Alimentos da Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora, MG. Para as análises químicas e as análises dos gases.

Foram utilizados como substratos para incubações *in vitro* o capim brachiaria (*Brachiaria brizantha*), como controle e coprodutos resultantes da industrialização do biodiesel: mamona (*Ricinus communis*), canola (*Brassica napus L.*), girassol preto (*Helianthus annuus*), e nabo forrageiro (*Raphanus sativus L.*).

Foram utilizadas misturas simulando dietas, substituindo capim brachiaria (controle) pelos coprodutos nas seguintes proporções 100/0, 70/30, 50/50 e 70/30% (volumoso/coproduto). Os ingredientes das dietas após serem pré-secos a 55°C durante 48 horas, foram moídos a 1mm. Em seguida pesados 0,5g de matéria seca (MS) da amostra para um saco de ANKOM® (F57) com seis repetições / tratamento, selados e colocados dentro de frascos de vidro de soro do tipo cor-âmbar de 50 mL, previamente lavados com água destilada, secos em estufa e identificados.

### Análises químicas dos alimentos

Os substratos compostos pelos coprodutos e pela forragem foram pré-secos em estufas de ventilação forçada a 60°C por 48h. Depois moídos em moinho do tipo Willey dotado de peneira com perfurações de 1,0 mm para determinação da matéria seca (MS) em estufa a 105°C de acordo com os procedimentos gerais descritos por Silva e Queiroz (2002), proteína bruta (PB) pelo Método Kjeldahl (AOC, 2006); fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) pelo método Van Soest (2006); e de extrato etéreo (EE) onde a forragem e os coprodutos foram acondicionados em sacos XT4 (Ankon) e submetidos à extração pelo método oficial de alta temperatura da AOCS (2009), utilizando-se extrator XT10 (Ankon). A DIVMS foi avaliada seguindo a metodologia proposta por Tilley

e Terry (1963). Os carboidratos totais (CHOT) foram obtidos por intermédio da equação  $100 - (\% \text{ PB} + \% \text{ EE} + \% \text{ Cinzas})$  descrita por Sniffen et al. (1992).

**Tabela 1-** Composição química (g/kg) do capim brachiaria e dos quatro substratos resultantes da industrialização do biodiesel com base na matéria seca.

<b>Ingrediente</b>	<b>MS (g/kg)</b>	<b>PB (g/kg)</b>	<b>FDN (g/kg)</b>	<b>FDA (g/kg)</b>	<b>LIG (g/kg)</b>	<b>EE (g/kg)</b>	<b>CZ (g/kg)</b>	<b>CNF (g/kg)</b>	<b>DIVMS (g/kg)</b>
C. Brachiaria	870,8	122,2	556,2	277,7	34,7	32,2	86,1	203,3	652
Coproductos									
Nabo Forrageiro	935,6	393,7	217,1	137,1	69,6	284,1	50,6	54,5	644,8
Mamona	912,6	420,2	423,3	383,4	154,4	43,8	42,3	70,4	497,1
Girassol Preto	901,1	342,6	390,1	243,6	34,3	32,1	54,9	180,3	582,3
Canola	922,1	375,1	410,3	378,3	120,5	24,3	57,7	132,6	689

MS: Matéria seca; PB: proteína bruta; FDN: fibra detergente neutro; FDA: fibra detergente ácida; LIG: lignina; EE: extrato etéreo; CZ: Matéria mineral; CNF: carboidratos não fibrosos, DIVMS digestibilidade;

#### Preparação do meio de cultura

Para a coleta do líquido ruminal, utilizaram-se três vacas da raça Holandesa com peso médio de 600 kg providas de fístulas no rúmen, sendo então transferidos para garrafas térmicas previamente aquecidas a 39°C e levados imediatamente ao laboratório. No laboratório, o conteúdo ruminal foi homogeneizado e filtrado em duas camadas de tecido de algodão, sendo mantido em banho-maria a 39°C sob saturação de CO<sub>2</sub>, até serem adicionadas as demais soluções (tampão, macro e micro minerais solução de resazurina e meio B) para o meio de cultura.

Para preparação do meio de cultura foi utilizado o líquido ruminal e solução tampão (Vitti et al., 1999) em uma proporção de 5:1. O inoculo (30 mL) foi então transferido para os frascos de incubação, posteriormente lacrados e colocados em um agitador orbital cremalheira fixado em 120 oscilações por minuto em uma incubadora a 39°C.

#### Amostragem para determinação de metano (CH<sub>4</sub>) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e pH

Após a última medição do gás no tempo de 48 horas pós-incubação, procedeu-se a coleta e armazenamento do gás proveniente de cada frasco, para determinação da concentração de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>. O

contido em cada frasco foi removido por meio de seringas plásticas de 30 cc e transferido imediatamente para frascos de cor âmbar de 20 cc a vacuo, para conservação das amostras. Posteriormente os frascos de fermentação foram abertos e feito a aferição do pH do meio de cultura utilizando um medidor de pH (Orion modelo 260A, Fisher Scientific, Toronto, ON, Canadá).

O percentual de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> foi determinado no Laboratório de Cromatografia da EMBRAPA - Gado de Leite, localizada na cidade de Juiz de Fora – MG, utilizando um aparelho de cromatografia gasosa (Fedorak e Hrudehy. 1983). A partir do percentual da produção de gases, foi calculado o seu volume correspondente à produção acumulada de gás em 24 e 48 horas do processo fermentativo, corrigido para cada uma grama de matéria seca degradada. Os resultados de metano e o dióxido de carbono foram expressos em mL/MS incubada.

Amostragem para determinação ácidos graxos voláteis (AGV<sub>s</sub>)

Para identificação e quantificação dos ácidos graxos voláteis (AGVs), foi coletada uma fração líquida do meio de cultura (10 mL) após a digestibilidade (48 horas) e adicionada ao meio 2 mL de ácido metafosfórico (20%) para conservação da amostra, em seguida amargenado em freezer até posteriores análises (Holtshausen et al. 2009).

Amostragem para determinação de nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>)

Para identificação e quantificação do nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>), foi coletado uma fração líquida do meio de cultura (10 mL) após a digestibilidade (48 horas) e adicionado ao meio 0,4 mL o ácido sulfúrico, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50% para conservação da amostra, em seguida armazenado em freezer até posteriores análises (Holtshausen et al., 2009).

Delineamento e análise estatística

O delineamento estatístico utilizado para avaliar a produção cumulativa de gases e a degradabilidade da matéria seca foi inteiramente ao acaso num arranjo fatorial 4 x 4 (coprodutos e níveis de substituição).

A produção de CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, AGV's, pH e NH<sub>3</sub> foram submetidos a uma análise de variância (Proc Anova) do SAS onde aos efeitos dos fatores principais aplicou-se o teste tukey (p<0,05) entre os coprodutos e destes dentro de cada nível de substituição e dos níveis de substituição dentro de cada coproduto. Os resultados dos níveis crescentes foram interpretados estatisticamente através dos modelos de regressão pelo PROC REG (Sas, 2003).

## Resultados

A composição química e seus resultados analisados são apresentados na tabela 1.

Os coprodutos avaliados expuseram elevado teor de proteína bruta (nabo forrageiro e a mamona), e elevado conteúdo de extrato (etéreo do nabo forrageiro), destacando-se o coproduto da canola por apresentar maior taxa de digestibilidade e menor quantidade de EE, (Tabela 1).

Os níveis de interação e substituição dos coprodutos para mensurar a produção de metano *in vitro* foram constatados no intervalo de tempo de 48 horas (Tabela 2).

Observou-se que em 30% houve diferença significativa entre os alimentos avaliados, sendo a maior produção de metano registrada para a canola. Aos níveis de 50 e 70%, a canola e girassol preto não diferiram entre si, sendo nestes registrados resultados superiores quando comparados ao nabo forrageiro e a mamona.

Através da substituição do capim brachiaria pelos coprodutos do girassol preto, nabo forrageiro e mamona observou-se um comportamento linear. Para o coproduto de girassol preto cada unidade percentual de substituição de capim brachiaria por esse coproduto, incidiu um acréscimo de 0,50 mL/g na produção de metano, enquanto que os coprodutos de nabo forrageiro e mamona apresentaram resposta linear decrescentes sendo 0,13 e 0,37mL/g de CH<sub>4</sub> respectivamente.

O coproduto da canola sofreu efeito ( $P < 0,05$ ) pelos níveis de substituição, apresentando resposta quadrática em relação à produção de metano sendo 62,5%, o ponto de mínima que promoveu (31,25mL) de produção de metano do coproduto da canola.

Analisando a produção de CO<sub>2</sub>, constatou-se efeito de interação dos coprodutos e dos níveis de substituição para a produção desse gás com o intervalo de tempo de 48 h (Tabela 2).

Considerando a produção de CO<sub>2</sub> na substituição do capim brachiaria pelos coprodutos, observou-se que a canola aos 30 e 50% apresentou uma produção significativa diferindo dos demais ( $P < 0,05$ ). Quando em 70% de substituição o coproduto da canola e girassol preto não diferiram estatisticamente entre si mantendo a sua produção de CO<sub>2</sub> elevada. O coproduto da mamona manifestou uma menor produção do gás, juntamente com o nabo forrageiro nos níveis avaliados.

Observando a substituição do capim brachiaria, temos um efeito linear decrescente ( $P < 0,05$ ) quando utilizando o nabo forrageiro, para cada 1% do nível de substituição desse coproduto houve um

decréscimo de 0,139 mL/g na produção de CO<sub>2</sub> entérico, já para o coproduto da mamona a redução foi de 0,239mL/g na produção de CO<sub>2</sub> entérico.

O coproduto da canola proporcionou um efeito quadrático quando relacionado à produção de CO<sub>2</sub> para substituir o capim brachiaria, notadamente aumentava suas quantidades. Sendo 60,5% o ponto de máxima (219,62mL/g) de produção de CO<sub>2</sub> do coproduto da canola.

Verificou-se a influência sobre as proporções de N-NH<sub>3</sub> *in vitro* no intervalo de tempo de 48 horas utilizando coprodutos do biodiesel em substituição ao capim brachiaria.

**Tabela 2-** Produção de CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, N-NH<sub>3</sub> (mL/g) e pH, dos coprodutos do biodiesel em diferentes níveis de substituição pelo capim brachiaria.

Coproductos	Níveis de substituição				Equação de regressão	R <sup>2</sup>	P
	0%	30%	50%	70%			
<b>Produção de CH<sub>4</sub></b>							
Nabo Forrageiro	4,86 <sup>A</sup>	4,43 <sup>C</sup>	4,36 <sup>B</sup>	3,83 <sup>B</sup>	Y= 4,887 – 0,013x	0,630	0,0021
Mamona	4,86 <sup>A</sup>	3,50 <sup>D</sup>	3,06 <sup>B</sup>	2,13 <sup>C</sup>	Y= 4,808 – 0,037x	0,952	<0001
Girassol Preto	4,86 <sup>A</sup>	6,50 <sup>B</sup>	8,63 <sup>A</sup>	7,93 <sup>A</sup>	Y= 5,097 + 0,050x	0,778	0,0001
Canola	4,86 <sup>A</sup>	9,33 <sup>A</sup>	10,40 <sup>A</sup>	8,66 <sup>A</sup>	Y= 4,820 + 0,233x – 0,002x <sup>2</sup>	0,921	<0001
<b>Produção de CO<sub>2</sub></b>							
Nabo Forrageiro	25,20 <sup>A</sup>	21,00 <sup>BC</sup>	18,06 <sup>C</sup>	15,50 <sup>B</sup>	Y= 25,169 – 0,139x	0,91	<0001
Mamona	25,20 <sup>A</sup>	16,50 <sup>C</sup>	13,20 <sup>C</sup>	8,13 <sup>C</sup>	Y= 24,826 – 0,239x	0,97	<0001
Girassol Preto	25,20 <sup>A</sup>	24,40 <sup>B</sup>	28,83 <sup>B</sup>	24,96 <sup>A</sup>	Y= 25,235	-	NS
Canola	25,20 <sup>A</sup>	34,70 <sup>A</sup>	37,23 <sup>A</sup>	29,70 <sup>A</sup>	Y= 24,942+ 0,578x0.007x <sup>2</sup>	0,79	0,0009
<b>Produção de N-NH<sub>3</sub></b>							
Nabo Forrageiro	12,60 <sup>A</sup>	27,53 <sup>C</sup>	36,63 <sup>C</sup>	43,63 <sup>C</sup>	Y= 13,319 + 0,447x	0,972	<0001
Mamona	12,60 <sup>A</sup>	14,23 <sup>D</sup>	21,00 <sup>D</sup>	27,53 <sup>D</sup>	Y=12,425 – 0,015x +0,003x <sup>2</sup>	0,982	<0001
Girassol Preto	12,60 <sup>A</sup>	38,73 <sup>B</sup>	61,83 <sup>A</sup>	69,66 <sup>B</sup>	Y=11,874 +1,118x –0,003x <sup>2</sup>	0,969	<0001
Canola	12,60 <sup>A</sup>	52,26 <sup>A</sup>	57,40 <sup>A</sup>	75,36 <sup>A</sup>	Y= 17,131 + 0,860x	0,941	<0001
<b>pH dos Coprodutos do Biodiesel em Níveis de substituição</b>							
Nabo Forrageiro	6,36 <sup>A</sup>	6,43 <sup>B</sup>	6,50 <sup>B</sup>	6,60 <sup>B</sup>	Y= 6,352 + 0,003x	0,837	<0001
Mamona	6,36 <sup>A</sup>	6,60 <sup>A</sup>	6,70 <sup>A</sup>	6,80 <sup>A</sup>	Y= 6.385+ 0.006x	0,964	<0001
Girassol Preto	6,36 <sup>A</sup>	6,40 <sup>BC</sup>	6,40 <sup>B</sup>	6,50 <sup>B</sup>	Y= 6.353 + 0.001x	0,619	0,0024
Canola	6,36 <sup>A</sup>	6,30 <sup>C</sup>	6,33 <sup>B</sup>	6,40 <sup>C</sup>	Y= 6.365 – 0.003x + 0.00006x <sup>2</sup>	0,549	0,0276

\*Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A utilização do coproduto canola demonstra de forma crescente sua produção de N-NH<sub>3</sub> nos níveis avaliados de substituição. Quando ao nível de 30% a mesma diferiu dos demais significativamente,

sendo alcançada apenas pelo girassol preto em substituição de 50%, demonstrando estatisticamente que não houve diferença significativa. Ao nível de 70% o coproduto da canola proporcionou a máxima produção de N-NH<sub>3</sub>, ou seja, à medida que se aumentava a unidade percentual desse coproduto, aumentava 0,86 mL/g na produção de N-NH<sub>3</sub>, sendo este fato isolado dos demais.

As menores produções estiveram com os coprodutos de nabo forrageiro e mamona. Registrou-se a menor produção na utilização do coproduto mamona ao nível de 30% (P<0,05%). O nabo forrageiro apresentou comportamento crescente nas avaliações com um aumento de 0,48 mL/g de N-NH<sub>3</sub>.

Substituindo o capim brachiaria pelos coprodutos, para produção dos AGVs com o intervalo de tempo de 48 horas (Tabela 3), temos a produção de ácido acético onde observamos efeito (P<0,05)

**Tabela 3-** Produção de Acetato, Propionato e Butirato (mL/g) dos coprodutos do biodiesel em diferentes níveis de substituição em substituição ao capim Brachiaria.

Coproductos	Níveis de substituição				Equação de regressão	R <sup>2</sup>	P
	0%	30%	50%	70%			
<i>Produção de Acetato</i>							
Nabo	35,37 <sup>A</sup>	38,19 <sup>A</sup>	12,54 <sup>B</sup>	24,10 <sup>A</sup>	Y= 36.981 – 0.251x	0,404	0.0006
Forageiro							
Mamona	35,37 <sup>A</sup>	18,64 <sup>C</sup>	12,97 <sup>B</sup>	13,07 <sup>B</sup>	Y=35.420 – 0.751x + 0.006x <sup>2</sup>	0,952	<.0001
Girassol preto	35,37 <sup>A</sup>	31,66 <sup>B</sup>	30,14 <sup>A</sup>	24,01 <sup>A</sup>	Ŷ =37.9397-0.0081x-0.0017x <sup>2</sup>	0,85	0.0002
Canola	35,37 <sup>A</sup>	31,04 <sup>B</sup>	30,21 <sup>A</sup>	30,21 <sup>A</sup>	Y= 34.681 – 0.084x	0,639	0.0018
<i>Produção de Propionato</i>							
Nabo	16,61 <sup>A</sup>	17,01 <sup>A</sup>	5,37 <sup>B</sup>	11,18 <sup>A</sup>	Y= 17.032 – 0.119x	0,416	0.0234
Forageiro							
Mamona	16,61 <sup>A</sup>	8,60 <sup>C</sup>	5,58 <sup>B</sup>	5,61 <sup>C</sup>	Y= 16.657 – 0.361x + 0.002x <sup>2</sup>	0,958	<.0001
Girassol preto	16,61 <sup>A</sup>	11,83 <sup>B</sup>	10,64 <sup>A</sup>	8,29 <sup>B</sup>	Y= 16.182 – 0.115x	0,929	0.0036
Canola	16,61 <sup>A</sup>	10,64 <sup>BC</sup>	10,75 <sup>A</sup>	10,61 <sup>AB</sup>	Y= 16.486 – 0.247x + 0.002x <sup>2</sup>	0,923	0.1670
<i>Produção de Butirato</i>							
Nabo	7,25 <sup>A</sup>	8,32 <sup>A</sup>	2,57 <sup>B</sup>	4,70 <sup>A</sup>	Y= 7.811 – 0.055x	0,412	0,0245
Forageiro							
Mamona	7,25 <sup>A</sup>	3,74 <sup>C</sup>	2,59 <sup>B</sup>	2,34 <sup>C</sup>	Y= 7.255 – 0.151x + 0.001x <sup>2</sup>	0,956	<.0001
Girassol preto	7,25 <sup>A</sup>	5,34 <sup>B</sup>	5,20 <sup>A</sup>	3,50 <sup>BC</sup>	Y= 7.198 – 0.049x	0,876	<.0001
Canola	7,25 <sup>A</sup>	5,80 <sup>B</sup>	5,19 <sup>A</sup>	5,70 <sup>AB</sup>	Y= 7.288 – 0.076x + 0.0007x <sup>2</sup>	0,803	0,0007

Observa-se nesta avaliação que o nível de 30% demonstrou a maior média para todos os produtos em avaliação, quando comparando os demais níveis.

O nabo forrageiro (30%) diferiu dos demais significativamente apresentando a maior produção de ácido acético. O nível de 50% de substituição revelou que o coproduto da canola e do girassol preto apresentaram as maiores proporções de ácido acético, sendo estatisticamente semelhantes, diferindo do coproduto de nabo forrageiro e da mamona que foram idênticos ( $P>0,05$ ).

A produção de ácido acético em de 70% de substituição do capim brachiaria por coprodutos se manteve elevada quando do uso de girassol preto e de nabo forrageiro, o menor valor foi encontrado para o coproduto da mamona ( $P<0,05$ ).

O coproduto da canola foi afetado ( $P<0,05$ ) pelos níveis de substituição, descrevendo um comportamento linear decrescente, à medida que se aumentava a unidade percentual desse coproduto, reduzia-se 0,08 mL/g na produção de ácido acético pelo processo de fermentação ruminal. Os coprodutos de girassol preto e nabo forrageiro também descreveram resposta linear decrescente tendo reduções de 0,15 e 0,25 mL/g para cada unidade percentual na produção de ácido acético desses coprodutos.

O coproduto da mamona descreveu um modelo quadrático em relação à produção de ácido acético, estimando-se em 36,87% o ponto de mínima para o nível de substituição ao capim brachiaria que promoveu (21,75 mL/g) de produção de ácido acético.

Produção de ácido propiônico com a utilização de coprodutos do biodiesel quando em substituição ao capim brachiaria no intervalo de tempo de 48 horas (Tabela 3).

Quando em substituição de 30% do capim brachiaria pelos coprodutos nota-se que o nabo forrageiro diferiu significativamente dos demais utilizados ( $P<0,05$ ), sendo o coproduto da canola análoga ao do girassol preto ( $P>0,05$ ). Observamos também o coproduto da mamona o qual obteve menor produção diferindo estatisticamente do coproduto do nabo forrageiro ( $P>0,05$ ).

A canola e girassol preto em 50% de substituição ao capim brachiaria exibiu a maior produção de ácido propiônico, não diferindo entre si ( $P>0,05$ ), a menor produção foi verificada para o coproduto da mamona, esta sendo análoga aos resultados apresentados pelo nabo forrageiro.

Considerando 70% de substituição o coproduto do nabo forrageiro apresentou maior produção de ácido propiônico, sendo semelhante ao coproduto da canola, a menor produção foi verificada para o coproduto da mamona ( $P<0,05$ ).

A substituição do capim brachiaria pelo coproduto de nabo forrageiro e de girassol preto causou efeito linear decrescente ( $P < 0,05$ ) ocorrendo reduções de 0,12 mL/g para cada unidade percentual na produção de ácido propiônico dos dois coprodutos.

Já o coproduto de nabo forrageiro apresentou um comportamento quadrático, sendo o nível de 45% o ponto de mínima que promoveu (12,15 mL/g) na produção de ácido propionato.

Foi analisado efeito ( $P < 0,05$ ) de interação dos níveis de substituição ao capim brachiaria pelos coprodutos para a produção do ácido butírico no intervalo de tempo de 48 horas (Tabela 3).

A produção de ácido butírico, dentro dos níveis de substituição, apresentou maior proporção a 30% com o uso do nabo forrageiro, os coprodutos da canola e do girassol preto foram equivalentes entre si. Para o nível 50%, os coprodutos da canola e do girassol preto obtiveram maiores índices de ácido butírico ( $P < 0,05$ ), sendo equiparados entre si ( $P > 0,05$ ). O coproduto da mamona proporcionou a menor produção desse AGV ( $P < 0,05$ ).

Avaliando o nível de 70% de substituição o coproduto da canola e de nabo forrageiro apresentaram máximas produções de ácido butírico quando comparados aos demais coprodutos tornando-os semelhantes entre si ( $P < 0,05$ ).

Para a produção de ácido butírico, os coprodutos de nabo forrageiro e de girassol preto descreveram comportamento linear decrescente, ou seja, à medida que se aumentava a porcentagem desse coproduto, reduzia-se 0,05 mL/g/48h na produção de ácido butírico pelo processo de fermentação microbiana para esses coprodutos.

Os coprodutos da canola e da mamona descreveram um modelo quadrático em relação à produção de ácido butírico quando se aumentava suas quantidades nos níveis, sendo 60,5% o nível que promoveu o ponto de máxima (219,62 mL/g) de produção de ácido butírico para o coproduto da canola, para o coproduto da mamona foi verificado no nível 56% ponto de máxima de (62,75 mL/g).

O pH ruminal é um parâmetro muito importante para estudo de fermentação ruminal, dessa forma observou-se neste estudo que ocorreu interação dos níveis de substituição pelos coprodutos para a variável pH ruminal com o intervalo de tempo de 48 horas (Tabela 3).

Ao o nível de 30%, o coproduto da mamona apresentou um elevado pH ruminal ( $P < 0,05$ ), sendo o coproduto nabo forrageiro e girassol preto análogos estatisticamente e a canola apresentando menor pH.

No nível de 50% de substituição ao capim brachiaria o coproduto da mamona seguiu proporcionando o maior pH ruminal ( $P<0,05$ ), e os menores valores de pH foram verificados para os coprodutos de nabo forrageiro, girassol preto e da canola ( $P<0,05$ ).

Já no nível de 70% de substituição ao capim brachiaria o coproduto da mamona mostrou-se precursor da elevação do pH ruminal, sendo o coproduto de nabo forrageiro semelhante ao coproduto do girassol preto, o menor pH ruminal foi verificado para o coproduto da canola ( $P<0,05$ ).

Os coprodutos da mamona, de girassol preto e de nabo forrageiro promoveram comportamento linear crescente proporcionaram aumentos de (0,06; 0,03 e 0,01) no pH desses coprodutos.

Os coprodutos da canola descreveu um modelo quadrático em relação ao pH quando se aumentava suas quantidades nos níveis, sendo 60,5% o nível que promoveu o ponto de máxima (219,62mL/g) de produção de ácido butírico para o coproduto da canola.

## **Discussão**

Um dos principais produtos resultantes do processo fermentativo anaeróbico ruminal é a produção de metano (Martinez et al., 2010). Dessa forma, temos que a composição da dieta atua de forma significativa quando a mesma tem como base a forragem, pois grandes proporções de carboidratos estruturais geram elevadas quantidades de  $CH_4$  (Archimed et al., 2011).

Com a utilização dos coprodutos esperava-se redução nos níveis de produção de metano, mas ao substituir o capim brachiaria pelo girassol preto e a canola tivemos uma produção de metano elevada, a qual esta relacionada com o teor de carboidratos fibrosos contidos nesses alimentos, Berchielli et al., (2006) afirmaram que com o desaparecimento da porção potencialmente digestível ocorre redução da digestão de um polímero. Deste modo, torna-se necessário maior tempo de exposição aos microrganismos para a digestão e produção de AGVS, como consequência produção de gás metano.

Quando analisamos a resposta da substituição do capim brachiaria pelos coprodutos da mamona e nabo forrageiro, notou-se que sua utilização ocasionou os mais baixos níveis de produção de metano, estando relacionada a compostos antinutricionais como a ricina, sendo nocivo aos microrganismos ruminais, e à elevada quantidade de ácidos graxos poli-insaturados presentes em sua composição quando comparado aos demais.

Considerando que a produção de CO<sub>2</sub> está relacionada aos teores de carboidratos presentes nas dietas, e a síntese de proteína que necessita de cadeias de carbono como precursores, observam-se os elevados teores de FDN e CHOT apresentados pela canola e pelo girassol preto os quais forneceram elevados níveis de CO<sub>2</sub> e N-NH<sub>3</sub>. Da mesma forma que observamos redução na produção de metano *in vitro* relacionado ao teor de lipídeos insaturados presentes nos coprodutos da mamona (43,2 g/kg) e do nabo forrageiro (284,1 g/kg), registraram-se com a utilização destes alimentos os menores níveis de CO<sub>2</sub> e N-NH<sub>3</sub>, quando em substituição ao capim brachiaria.

Devido a sua característica deletéria aos microrganismos ruminais, os ácidos graxos insaturados são convertidos a ácidos graxos saturados pelo mecanismo conhecido como biohidrogenação, o qual através da adição de hidrogênio nas insaturações, permite a redução de sua toxicidade e utilização (Palmquist & Mattos, 2006). A utilização dos lipídeos saturados nas dietas após a biohidrogenação promove efeito redutivo da amônia ruminal e a eliminação de H proveniente da fermentação de CHO, ocorrendo aumento na produção ruminal de propionato e redução da metanogênese (Oliveira 2009).

Avaliando o coproduto da mamona para a produção de ácido acético, propiônico e butírico nos níveis, nota-se que estes obtiveram resultados inferiores aos demais, sendo justificado pela presença de ricina, a qual diminui a digestibilidade e conseqüentemente a produção de gases. Com relação aos demais alimentos estudados, a canola proporcionou uma produção elevada e estável de ácido acético e propiônico, mesmo não possuindo em sua composição a maior quantidade de carboidratos fibrosos, mas por não possuir fatores antinutricionais em sua composição.

O nabo forrageiro quando em substituição de 30% nas avaliações para AGVS revela um diferencial quando comparado aos demais alimentos, pois neste nível mesmo possuindo elevado teor de lipídeos em sua composição assumi valores superiores aos demais. Araújo et al. (2012) concluíram que o nível de inclusão de forragem eleva a produção dos gases, demonstrando o efeito da fibra sobre a dinâmica ruminal.

Com relação à produção de ácido butírico a produção foi afetada com a substituição pelos coprodutos reduzindo a produção em relação ao grupo controle. Isso pode estar relacionado com o elevado teor proteico desses coprodutos que resultam na formação de bicarbonato de amônio, a partir de CO<sub>2</sub> e amônia, reduzindo, assim, o aporte de CO<sub>2</sub> para a produção total de gás.

Os resultados encontrados para a produção de AGVS confirma que os constituintes dos coprodutos avaliados colaboraram diretamente com os resultados obtidos.

Kosloski (2002) afirma que o padrão da fermentação ruminal, e a quantidade de AGV produzido pelo ruminante variam entre outros fatores, com o tipo de carboidrato presente na dieta e que a camada cuticular da superfície de grãos e forragens, assim como a lignina da parede celular dos vegetais, a camada proteica que envolve os grânulos de amido e o excesso de gordura da dieta representam barreiras á atividade hidrolítica bacteriana.

Avaliando o pH, temos que o coproduto da canola proporcionou seus menores níveis com a sua utilização. Esse comportamento pode ser explicado para o coproduto da canola, tendo em vista que o mesmo aumentou a produção de propionato, ocorrendo sequestro de  $H_2^+$  para a formação desse AGV. Orskov (1988) propôs que, em situações de pH ruminal abaixo de 6,2, ocorre redução na digestão da fibra devido à sensibilidade das bactérias fibrolíticas e o ponto ótimo da digestão da fibra ocorre em valores de pH entre 6,7 e 7,1.

### **Conclusão**

Ao substituir o capim brachiaria pelos coprodutos, observa-se que os mesmos podem ser utilizados na dieta de bovinos.

Dentre os coprodutos avaliados o coproduto da mamona destacou-se por promover mitigação de  $CH_4$ , obtendo níveis de pH e  $NH_3$  satisfatórios para a máxima fermentação ruminal, desta forma indica-se o uso deste coproduto em substituição ao capim brachiaria . A Substituição desse coproduto na dieta proporcionará um menor impacto ambiental.

### **Referencias**

Abdalla, A. L.; Silva Filho, J. C.; Godoi, A. R.; Carmo, C. A.; Eduardo, J. L. P, 2008. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. Revista Brasileira de Zootecnia. 37: 260- 258.

American Oil Chemist Society (AOCS). Official and tentative methods of the American Oil Chemists' Society: including additions and revisions. 6. ed. Champaign, 2009.

Araújo, D. R. C.; Carneiro, H.; Silva, A. M. A.; Silva, U. L.; Bernardi, T. M, 2012. Avaliação da degradabilidade in vitro, ácidos graxos voláteis e perdas energéticas através da produção total de gases,

metano e dióxido de carbono de quatro espécies forrageiras em bovinos e ovinos, *Revista Ciência e Produção animal*, 14: 203- 206.

Archimède, H.;Eugène, M.; Marie Magdeleine, C.; Boval, M.; Martin, C.; Morgavi, D. P.; Lecomte, P.; Doreau, M, 2011. Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and legumes. *Animal Feed Science and Technology*, 166-1667:59-64.

Azevedo, R. A.; Bicalho, F. L.; Araújo, L.; Ribeiro Júnior, C. S.; Santos, A. C. R.; Jayme, D. G.; Geraseev, L. C, 2013. Technical and economic analysis of different levels of macauba cake in diets for dairy cows. *Archivos de Zootecnia*, 62: 147-150.

Berchielli, T. T.; Pires, A. V.; Oliveira Metabolismo, S. G, 2006. *Nutrição de Ruminantes*. Funep. 1°. Ed. cap. 7, p. 192. Jaboticabal-SP.

Bueno, I. C. S.; Vitti, D. M. S. S.; Louvadini, H.; Abdalla, A. L, 2008. A new approach for in vitro bioassay to measure tannin biological effects based on a gas production technique. *Animal Feed Science and Technology*, 41:153-170.

Kozloski, G. V, 2002. *Bioquímica dos ruminantes*. Editora da UFSM, 1.ed. 85 p., Santa Maria- RS.

Holtshausen, L., A.V. Chaves, K.A. Beauchemin., S.M. Mcginn., T.A Mcallister., N.E Odongo., P.A. Cheeke., C. Benchaar. 2009. Feeding saponin-containing *Yucca shidigera* and *Quillaja saponaria* to decrease enteric methane production in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 92: 2809-2821.

Oliveira, R.L.; Bagaldo, A.R.; Ladeira, M.M.; Barbosa, M.A.A.F.; Oliveira, R. L.; Jaeger, S.M.P.L, 2009. Fontes de lipídeos na dieta de búfalas lactantes: consumo, digestibilidade e N-uréico plasmático. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38:553-559.

Orskov, E. R, 1988. *Nutrición proteica de los ruminantes*. Acribia. Zaragoza,178 pp.1988.

Palmquist, D.L.; Mattos, W.R.S. *Metabolismo de lipídeos*. In: *Nutrição de Ruminantes*. 1. ed. Jaboticabal: Telma Teresinha Berchielli, Alexandre Vaz Pires e Simone Gisele de Oliveira, 2006. cap. 10, p. 292

Sas - *Statistica Analysis System*, 2003. Institute Inc. User'sGuide, Cary, USA.

Silva, D. J.; Queiroz, A. C, 2002. *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. Editora UFV, Viçosa-MG.

Sniffen, C.J., J.D. O'Connor., P.J. Van Soest., D.G. Fox., J.B. Russell. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. II - Carbohydrate and protein availability. Journal of Animal Science, Champaign, 70:3562-3577.

Van Soest, P.J. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. 2ª ed. Ithaca. Cornell University Pres.

Vitti, D. M.S.S.; Abdalla, A. L.; Silva Filho, J. C.; Del Mastro, N. L.; Maurício. R.; Owen, E.; Mould, F, 1999. Misleading relationships between in situ rumen dry mater disappearance, chemical analyzed and in vitro gas production and digestibility, of sugarcane baggage treated with varying levels of electron irradiation and ammonia. Animal Feed Science and Technology, 79:145-153.

### **Conclusão Geral**

Conclui-se que a técnica *in vitro* de produção de gás é uma alternativa para avaliar alimentos que possuam características que venham a contribuir para o perfeito funcionamento do metabolismo animal, gerando mínimas perdas energéticas na forma de gases, sobretudo daqueles considerados nocivos ao meio ambiente, CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>.

O uso coprodutos procedentes da industrialização do biodiesel em substituição ao capim brachiaria forma uma alternativa para a alimentação de ruminantes, pois são considerados alimentos proteicos e energéticos, que serão transformados em produto animal.

Torna-se desejável a realização de mais pesquisas na área de nutrição animal, visando à mitigação de CH<sub>4</sub> e dos gases que contribuem para o do efeito estufa, conseqüentemente promover uma eficiente produção sem comprometer o consumo.

A qualidade da dieta possui destaque entre as técnicas para mitigação atualmente estudadas assim, juntamente com um manejo que promova o bem estar animal contribuíram para redução da produção desses gases.

## **ANEXOS**

### **GUIDELINES FOR CONTRIBUTORS**

Tropical Animal Health and Production

**Impact Factor: 0,970**

#### Types of articles

Manuscripts should be presented preferably in Times New Roman font, double spaced, using A4 paper size. Please use the automatic page and line numbering function to number the pages and lines in your document and number the lines in a single continuous sequence.

**Regular Articles:** Articles should be as concise as possible and should not normally exceed approximately 4000 words or about 8 pages of the journal including illustrations and tables. Articles should be structured into the following sections;

(a) Abstract of 150-250 words giving a synopsis of the findings presented and the conclusions reached. The Abstract should be presented as a single continuous paragraph without subdivisions.

(b) Introduction stating purpose of the work

(c) Materials and Methods

(d) Results

(e) Discussion (conclusions should be incorporated in the discussion!)

(f) Acknowledgements

(g) Statement of Animal Rights

(h) Conflict of Interest Statement

(i) References

**Short Communications and Technical Notes:** Short Communications and Technical Notes should not normally exceed approximately 2000 words or about 4 pages of the journal, including illustrations, tables and references. An abstract of 150-250 words should be included and a minimum number of sub-headings may be included if it adds clarity to the article.

Short Communications report original scientific data.

Technical Notes describe innovative methodologies.

**Reviews:** Review articles will be welcomed. However, authors considering the submission of review articles are advised to consult the Editor-in-Chief in advance.

**Correspondence:** Letters on topics relevant to the aims of the Journal will be considered for publication by the Editor-in-Chief who may modify them.

It is the authors responsibility to ensure that submitted manuscripts comply with journal format as indicated in the current instructions to authors and free sample articles on the [springer.com](http://springer.com) journal homepage.

**Ethical standards**

Manuscripts submitted for publication must contain a statement to the effect that all human and animal studies have been approved by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments.

It should also be stated clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under study should be omitted.

These statements should be added in a separate section before the reference list. If these statements are not applicable, authors should state: The manuscript does not contain clinical studies or patient data.

The editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned requirements. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned requirements

## Manuscript Submission

### *Manuscript Submission*

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

## Title page

### *Title Page*

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

### *Abstract*

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

### *Keywords*

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

### *Text Formatting*

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- [LaTeX macro package \(zip, 182 kB\)](#)

### *Headings*

Please use no more than three levels of displayed headings.

### *Abbreviations*

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

### *Footnotes*

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

### *Acknowledgments*

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

### *Please note:*

Use the automatic page and line numbering function to number the pages and lines in your document.

### References

- 1. All publications cited in the text should be presented in the list of references. The typescript should be carefully checked to ensure that the spelling of the authors' names and dates are exactly the same as in the reference list.
- 2. In the text, refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed, if necessary, by a short reference to appropriate pages. Examples: 'Peters (1985) has shown that . . . . "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1984, pp. 12--16)'
- 3. If reference is made in the text to a publication by three or more authors, the abbreviation et al. should be used. All names should be given in the list of references.
- 4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically by authors' surname(s) and chronologically by author. If an author in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications by the single author, arranged according to publication dates; publications of the same author with co-authors. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1986a, 1986b, etc.
- 5. Use the following system for arranging each reference in the list:
  - For journal articles:

Ahl, A.S., 1986. The role of vibrissae in behaviour: a status review, *Veterinary Research Communications*, 10, 245--268
  - For books:

Fox, J.G., Cohen, B.J. and Lowe, F.M., 1984. *Laboratory Animal Medicine*, (Academic Press, London)

- For a paper in published symposia proceedings or a chapter in multi-author books:

Lowe, K.F. and Hamilton, B.A., 1986. Dairy pastures in the Australian tropics and subtropics. In: G.T. Murtagh and R.M. Jones (eds), *Proceedings of the 3rd Australian conference on tropical pastures*, Rockhampton, 1985, (Tropical Grassland Society of Australia, St. Lucia; Occasional Publication 3), 68--79

- For unpublished theses, memoranda etc:

Crowther, J., 1980. Karst water studies and environment in West Malaysia, (unpublished PhD thesis, University of Hull)

- For Online documents:

Doe J. Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects*. Royal Society of Chemistry. 1999. [http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document](http://www.rsc.org/dose/title%20of%20subordinate%20document). Accessed 15 Jan 1999

- 6. Do not abbreviate the titles of journals mentioned in the list of references.
- 7. Titles of references should be given in the original language, except for the titles of publications in non-Latin alphabets, which should be transliterated, and a notation such as '(in Russian)' or '(in Greek, with English abstract)' added.
- 8. Citations of personal communications should be avoided unless absolutely necessary. When used, they should appear only in the text, using the format: 'E. Redpath, personal communication, 1986' and should not appear in the Reference List. Citations to the unpublished data of any of the authors should not be included unless the work has already been accepted for publication, in which case a reference should be given in the usual way with "in press" in place of the volume and page numbers.

#### Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

#### Artwork and Illustrations Guidelines

##### *Electronic Figure Submission*

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

##### *Halftone Art*

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.
- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

#### *Color Art*

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

#### *Figure Lettering*

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

#### *Figure Numbering*

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

### *Figure Captions*

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

### *Figure Placement and Size*

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

### *Permissions*

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

### *Accessibility*

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

#### Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

#### *Submission*

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

#### *Audio, Video, and Animations*

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

#### *Text and Presentations*

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

#### *Spreadsheets*

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

#### *Specialized Formats*

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

### *Collecting Multiple Files*

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

### *Numbering*

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM\_3.mpg”, “ESM\_4.pdf”.

### *Captions*

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

### *Processing of supplementary files*

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

### *Accessibility*

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

### *Ethical Responsibilities of Authors*

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining

integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

- The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”).
- A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).
- No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author’s own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

**Important note:** the journal may use software to screen for plagiarism.

- Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.
- Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

In addition:

- Changes of authorship or in the order of authors are not accepted **after** acceptance of a manuscript.
- Requesting to add or delete authors at revision stage, proof stage, or after publication is a serious matter and may be considered when justifiably warranted. Justification for changes in authorship must be compelling and may be considered only after receipt of written approval from all authors and a convincing, detailed explanation about the role/deletion of the new/deleted author. In case

of changes at revision stage, a letter must accompany the revised manuscript. In case of changes after acceptance or publication, the request and documentation must be sent via the Publisher to the Editor-in-Chief. In all cases, further documentation may be required to support your request. The decision on accepting the change rests with the Editor-in-Chief of the journal and may be turned down. Therefore authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission.

- Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

- If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note.
- The author's institution may be informed.

#### Compliance with Ethical Standards

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" before the References when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the Instructions for Authors carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

#### Disclosure of potential conflicts of interest

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- Honoraria for speaking at symposia
- Financial support for attending symposia
- Financial support for educational programs
- Employment or consultation
- Support from a project sponsor
- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- Multiple affiliations
- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest

- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found

- [here](#):

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

**Funding:** This study was funded by X (grant number X).

**Conflict of Interest:** Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Research involving human participants and/or animals

#### *1) Statement of human rights*

When reporting studies that involve human participants, authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional and/or national research ethics committee and

have been performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study.

The following statements should be included in the text before the References section:

**Ethical approval:** “All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.”

For retrospective studies, please add the following sentence:

“For this type of study formal consent is not required.”

## *2) Statement on the welfare of animals*

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been followed, and that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted (where such a committee exists).

For studies with animals, the following statement should be included in the text before the References section:

**Ethical approval:** “All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.”

If applicable (where such a committee exists): “All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.”

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements:

“This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.”

#### Informed consent

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. Hence it is important that all participants gave their informed consent in writing prior to inclusion in the study. Identifying details (names, dates of birth, identity numbers and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scientific purposes and the participant (or parent or guardian if the participant is incapable) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning.

The following statement should be included:

**Informed consent:** “Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.”

If identifying information about participants is available in the article, the following statement should be included:

“Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.”

After acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

*Open Choice*

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

- Springer Open Choice

*Copyright transfer*

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

*Offprints*

Offprints can be ordered by the corresponding author.

*Color illustrations*

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

### *Proof reading*

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

### *Online First*

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

Does Springer provide English language support?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer publishes in:

- [Edanz English editing for scientists](#)

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

- [Edanz English editing for scientists](#)