



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  
MESTRADO EM ZOOTECNIA**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS COPRODUTOS DE BIODIESEL EM  
SUBSTITUIÇÃO A SILAGEM DE MILHO.**

**FABÍOLA FRANKLIN DE MEDEIROS**

**PATOS – PB**

**2014**

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

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS COPRODUTOS DE BIODIESEL EM  
SUBSTITUIÇÃO A SILAGEM DE MILHO.**

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, Área de concentração Mestrado em Zootecnia, para obtenção do título de mestre.

**Fabíola Franklin de Medeiros**

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

**Co-orientadora:** Dr<sup>a</sup>. Heloísa Carneiro

**PATOS – PB**

**2014**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSRT DA UFCG

M488a Medeiros, Fabíola Franklin de  
Avaliação *in vitro* dos coprodutos de biodiesel em substituição a silagem de milho. / Fabíola Franklin de Medeiros. – Patos, 2014.  
44f.

Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2014.

"Orientação: Prof. Dr. Aderbal Marcos de Azevêdo Silva"

"Coorientação: Dra. Heloísa Carneiro"

Referências.

1. Ruminantes. 2. Produção de gás. 3. Coprodutos. Título.

CDU 636.084



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: "Avaliação *in vitro* dos coprodutos de biodiesel em substituição a silagem de milho"**

**AUTORA: FABÍOLA FRANKLIN DE MEDEIROS**

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

**JULGAMENTO**

**CONCEITO: APROVADO**

Prof. Aderbal Marcos de Azevêdo Silva  
Presidente

Prof. Leilson Rocha Bezerra  
1º Examinador

Prof. José Morais Pereira Filho  
2º Examinador

Patos - PB, 26 de fevereiro de 2014

Prof. Onaldo Guedes Rodrigues  
Coordenador

**Dedico,**

A minha filha Maria Fernanda,

Pois sua existência me dar forças para continuar.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus acima de tudo, pois sem a sua benção não chegaria em lugar nenhum.

A meus pais, sei que vocês se sentiam mal quando eu estava crescendo e não podiam me dar muitas coisas, mais vocês me deram a principal, acreditaram em mim.

Ao meu marido pela paciência e carinho. O seu apoio foi essencial.

Ao meu tio José Genuíno pela ajuda e carinho. O senhor tornou possível o que era um sonho distante. Obrigada.

Ao meu orientador pela confiança, paciência e ensinamentos.

A Dra. Heloísa Carneiro e a Embrapa Gado de Leite pela confiança na realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Leilson R. Bezerra pela contribuição na redação.

A minha amiga Alânia Vilar por sempre me escutar e me apoiar quando precisei, você é a irmã que eu não tive.

A minha amiga doutoranda Maísa Cordão, por sempre me esclarecer algo no qual eu tivesse dúvida.

A minha equipe de pesquisa, estudo e amizade durante o mestrado Dário Ricelle Carvalho de Araújo, Raissa Kiara Oliveira de Moraes, Milenna Nunes Moreira, Simone Vieira Alves, Lívia e Adeylson, pelo apoio, parceria e amizade que construímos durante esse trabalho, que possamos realizar novas conquistas na nossa jornada.

A Ari Cruz Guedes pelo apoio a todos os alunos da pós-graduação.

A todos os professores da pós-graduação pelos ensinamentos e exemplos adquiridos durante esses dois anos.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>06</b>
<b>CAPÍTULO I Degradabilidade e produção de gás <i>in vitro</i> de coprodutos da cadeia do biodiesel.....</b>	<b>08</b>
Resumo.....	09
Abstract.....	09
Introdução. ....	10
Material e Métodos.....	11
Resultados.....	13
Discussão.....	15
Conclusões.....	17
Referências.....	18
<b>CAPÍTULO II Potencial de Fermentação ruminal e produção de metano e dióxido de carbono de coprodutos do biodiesel.....</b>	<b>21</b>
Resumo.....	22
Introdução. ....	23
Material e Métodos.....	24
Resultados.....	26
Discussão.....	30
Conclusões.....	32
Referências.....	33
Tabelas e Figuras.....	35
<b>2 CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>44</b>

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

### CAPITULO 1

<b>Tabela 1-</b> Composição química da silagem de milho e dos concentrados testados (coprodutos) na base da matéria seca.....	12
<b>Tabela 2-</b> Percentual da degradabilidade <i>in vitro</i> (48h) dos coprodutos do biodiesel em diferentes níveis de substituição pela silagem de milho.....	14
<b>Tabela 3-</b> Produção de Gás (ml/g/48h) em diferentes níveis de substituição dos coprodutos do biodiesel pela silagem de milho.....	15

### CAPITULO 2

<b>Tabela 1-</b> Composição química da silagem de milho e dos concentrados testados (coprodutos) na base da matéria seca.....	36
<b>Tabela 2-</b> Produção de Acetato, Propionato e butirato ( $\mu\text{mol/mL}$ ) dos coprodutos do biodiesel em diferentes níveis de substituição pela silagem de milho.....	38
<b>Tabela 3</b> - Produção de $\text{CH}_4$ e $\text{CO}_2$ (mL/gMS), dos coprodutos do biodiesel em diferentes níveis de substituição pela silagem de milho.....	39
<b>Tabela 4</b> - pH dos coprodutos do biodiesel em diferentes níveis de substituição pela silagem de milho.....	40
<b>Tabela 5</b> - Produção de $\text{NH}_3$ (mg/dL) dos coprodutos do biodiesel em diferentes níveis de substituição pela silagem de milho.....	41
<b>Figura 1</b> – Influência da relação forragem: coprodutos sobre a relação de (Acetato: proprionato) e a produção de $\text{CH}_4$ .....	41
<b>Figura 2</b> – Influência da relação forragem: coprodutos sobre a produção de $\text{CH}_4$ .....	42
<b>Figura 3-</b> Produção de $\text{CH}_4$ e $\text{CO}_2$ do coproduto de algodão em substituição a silagem.....	43



## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil está entre os maiores produtores e consumidores de biodiesel do mundo, com uma produção anual, em 2012, de 2.717.483 bilhões de m<sup>3</sup> e uma capacidade de 20.567,8 bilhões de m<sup>3</sup>. Entre os coprodutos gerados pela diversidade de materiais graxos utilizados na cadeia do biodiesel, os coprodutos de algodão, girassol, moringa, mamona, pinhão manso entre outros podem apresentar características desejáveis a um concentrado proteico de boa qualidade para alimentação de ruminantes. Porém o domínio da tecnologia de utilização dos diversos tipos de coprodutos do biodiesel na alimentação animal ainda é escasso dependendo do coproduto, dessa forma o conhecimento do mesmo pode maximizar a produtividade pecuária e agregar valores ao processo produtivo do biodiesel.

Além disso, o aumento dos gases de efeito estufa (GEE) na pecuária é motivo de preocupação em todo o mundo. Isto porque essas emissões, predominantemente de metano (CH<sub>4</sub>), liberados pela eructação dos ruminantes a pastejo estão entre os principais contribuintes. O constante aumento nas populações de animais leva a uma demanda global por alimentos, assim emissões irão aumentar constantemente. Tornando-se necessário o conhecimento do comportamento emissivo desses alimentos quando ingeridos pelos animais.

Portanto o manejo alimentar visando melhor eficiência alimentar com à mitigação de metano tornou-se o mais atual foco das pesquisas mundiais na área de nutrição de ruminantes, em virtude das pressões exercidas por ambientalistas e exigências do mercado consumidor internacional. Além do seu reflexo no impacto ambiental, a redução da produção de metano no rúmen proporciona um aumento na eficiência de aproveitamento de energia e redução nos custos com alimentação dos animais.

A determinação dos AGV's principalmente acetato e propionato na análise dos alimentos utilizados para mitigar metano é de grande importância visto que o acetato fornece carbono e hidrogênio para a formação do metano e o propionato não fornece carbono e compete pelo hidrogênio com as metanogênicas. Sendo assim para mitigar metano com o manejo alimentar é necessário que o alimento forneça mais propionato do que acetato.

Dessa forma a técnica *in vitro* semiautomática de produção de gases apresenta grande potencial em descrever a cinética de fermentação ruminal de alimentos, além de estimar a taxa e a extensão de degradação de suas frações, por meio da quantificação dos resíduos em diferentes tempos, além disso dispensa o uso de grande quantidade de animais sendo eticamente correta.

Milhões de toneladas de coprodutos de biodiesel estão sendo lançados no meio ambiente e uma procura para melhor utilização deste subproduto merece atenção da comunidade científica para seu melhor destino e otimização na alimentação de ruminantes. Devido ao grande número de animais ruminantes, estes poderão se beneficiar destes coprodutos como suplemento proteico e mitigador de metano entérico.

Diante do exposto o objetivo dessa pesquisa foi estimar a degradabilidade, produção de gás, de metano ( $\text{CH}_4$ ) e dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), de Acetato, Propionato, Butirato, pH e  $\text{NH}_3$  da silagem de milho e de níveis crescentes dos coprodutos (0, 30, 50, 70%) e determinar qual o coproduto melhor atende as necessidades de bovinos com menor produção de metano quando fornecido em substituição a silagem de milho.

## **CAPÍTULO I**

### **Degradabilidade e produção de gases *in vitro* de fontes proteicas alternativas na alimentação de ruminantes**

(Este artigo será submetido a revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,  
estando escrito dentro das normas da revista, em anexo).

## Degradabilidade e produção de gases *in vitro* de fontes proteicas alternativas na alimentação de ruminantes

### Degradability and *in vitro* gas production of alternative protein sources in ruminant feed

Fabiola Franklin de Medeiros<sup>\*</sup>, Aderbal Marcos de Azevedo Silva<sup>2</sup>, Heloisa Carneiro<sup>3</sup>, Dário Ricelle Carvalho de Araújo<sup>1</sup>, Raissa Kiara Oliveira de Moraes<sup>1</sup>, Milenna Nunes Moreira<sup>1</sup>, Leilson Rocha Bezerra<sup>4</sup>

<sup>\*</sup>Students of the Post-Graduation Program in Zootecnie, Federal University of Campina Grande, Patos, Paraíba State, Brazil, email: vet.fabiolafranklin@gmail.com

<sup>2</sup>Department of Zootecnia, University Federal of Campina Grande, Paraíba, 6490000, Brazil. email: silvaama@gmail.com

<sup>3</sup>Doctor Researcher in EMBRAPA Dairy Cattle, e-mail: heloisa@cnpqgl.embrapa.br

<sup>4</sup>Department of Zootecnia, University Federal of Piauí, Bom Jesus, PI, 6490-000, Brazil. email: [leilson@ufpi.edu.br](mailto:leilson@ufpi.edu.br)

#### Resumo

Objetivou-se avaliar a degradação e produção de gás de diferentes fontes proteicas geradas na cadeia produtiva do biodiesel em substituição a silagem de milho. Os tratamentos foram: coprodutos de *Gossypium hirsutum*, *Ricinus communis*, *Moringa oleifera*, *Jatropha curcas*, *Helianthus annuus*. Os produtos foram analisados mediante a técnica semiautomática de produção de gases *in vitro*. O coproduto de moringa apresentou maior taxa de degradação, quando comparada aos demais alimentos, porém apresentou baixa produção de gás, tornando-se mais eficiente, sendo indicado como o melhor nível 27,06% de substituição pela silagem de milho. Os coprodutos de mamona e de algodão produziram a maior quantidade de gás em 48 h de incubação. Todos os coprodutos estudados podem ser utilizados na dieta de ruminantes como alimento proteico até 30% de substituição pela silagem de milho.

Palavras-chave: coprodutos do biodiesel, produção de gás, rúmen, taxa de degradação

#### Abstract

This study aimed to assess the degradation and gas production of different protein sources generated in the biodiesel production chain replacing corn silage. The treatments were: byproducts *Gossypium hirsutum*, *Ricinus communis*, *Moringa oleifera*, *Jatropha curcas*,

*Helianthus annuus*. The products were analyzed by semi-automated technique of gas production *in vitro*. The coproduct moringa showed higher degradation rate compared to other foods, but showed low gas production, making it more efficient, being nominated as the best level of 27.06% by replacing corn silage. The byproducts of castor oil and cottonseed produced the largest amount of gas in 48 h of incubation. All studied byproducts can be used in the diet of ruminants as a protein food up to 30% by substitution of corn silage.

Keywords: biodiesel byproducts, gas production, rumen degradation rate.

### **Introdução**

Na estação seca, em sistemas semi-intensivo, há a necessidade de suplementação para suprir as exigências nutricionais do rebanho, pois nesse período, boa parte das pastagens apresenta baixa produção de matéria seca, bem como valor nutricional reduzido. Devido a essa estacionalidade da produção de volumosos, como alternativa tem sido utilizado forragens conservadas como silagens e também os resíduos ou coprodutos do biodiesel visto que o Brasil está entre os maiores produtores e consumidores de biodiesel do mundo, com uma produção anual, em 2012, de 2.717.483 bilhões de m<sup>3</sup> e uma capacidade de 20.567,8 bilhões de m<sup>3</sup>, segundo a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2012).

A maioria dos coprodutos ou farelos das oleaginosas que vêm sendo utilizadas para produção de biodiesel no Brasil são passíveis de utilização na alimentação animal, porém, cada uma com suas particularidades no que diz respeito a cuidados antes de serem fornecidas aos animais, devido a alguns fatores tóxicos ou antinutricionais que possuem, quantidades máximas dentro da formulação das dietas dos animais e práticas de armazenamento (Abdalla et al., 2008).

O conteúdo proteico destes coprodutos é relativamente alto (35%) em média, com variação de 14 a 60%, sugerindo a utilização como fonte de proteína para os animais (Abdalla et al., 2008). O teor de extrato éter (EE) também varia consideravelmente (3 a 24%) de óleo na dieta, pode auxiliar na mitigação de metano entérico pelos ruminantes (Morgavi et al., 2012). Além disso, de acordo com Oliveira et al., (2012), o uso das coprodutos oriundas da produção de biodiesel para a alimentação de ruminantes é vantajoso para o produtor rural, pois pode reduzir os custos com a alimentação, quando em substituição a concentrados convencionais, geralmente mantém a produtividade e a qualidade dos produtos, desde que as dietas sejam bem balanceadas para atender as exigências nutricionais dos animais. E embora

em alguns casos possa haver queda na produtividade, esta é compensada pelos menores custos de produção, sem prejuízos a rentabilidade da atividade.

Os métodos de avaliação de alimentos para ruminantes têm se desenvolvido consideravelmente nos últimos anos, contribuindo para o aperfeiçoamento de técnicas laboratoriais já existentes, bem como a produção de técnicas mais precisas (Moron et al., 2001). A técnica *in vitro* semiautomática de produção de gases apresenta grande potencial em descrever a cinética de fermentação ruminal de alimentos, além de estimar a taxa e a extensão de degradação de suas frações solúveis e insolúveis, por meio da quantificação dos resíduos em diferentes tempos (Getachew et al., 1998; Pell e Schofield., 1993).

Diante do exposto, objetivou-se avaliar a inclusão de fontes proteicas alternativas (coprodutos do biodiesel) na porção concentrada da dieta de ruminantes em substituição a silagem de milho por meio da determinação da degradabilidade da matéria seca, bem como a produção de gases *in vitro* da coproduto do algodão, mamona, moringa, girassol e pinhão manso.

## **Material e Métodos**

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.

Os substratos utilizados para incubações *in vitro* foram a silagem de milho (controle) e os coprodutos da industrialização do biodiesel: algodão (*Gossypium hirsutum*), mamona (*Ricinus communis*), moringa (*Moringa oleifera*), pinhão manso (*Jatropha curcas*), girassol preto (*Helianthus annuus*).

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.

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  $100 - (\% \text{ PB} + \% \text{ EE} + \% \text{ Cinzas})$  descrita por Sniffen et al. (1992).

**Tabela 1-** Composição química da silagem de milho e dos concentrados testados (coprodutos) na base da matéria seca.

Silagem e coprodutos	MS (g/kg)	PB (g/kg)	FDN (g/kg)	FDA (g/kg)	LIG (g/kg)	EE (g/kg)	MM (g/kg)	DIVMS (g/kg)	CHOT (g/kg)	CNF (g/kg)
Silagem milho	842,7	62,5	469,3	314,5	29,7	22,2	51,7	607,0	863,6	394,3
Algodão	929,1	549,9	303,6	207,7	32,1	40,3	68,3	595,6	341,5	37,9
Moringa	901,2	577,6	202,7	80,5	10,3	84,8	49,8	791,3	287,8	85,1
Pinhão Manso	920,7	356,9	391,4	334,5	43,4	110,6	79,5	571,3	453,0	61,6
Girassol Preto	901,1	342,6	390,1	243,6	34,3	32,1	54,9	582,3	570,4	180,3
Mamona	912,6	420,2	423,3	383,4	154,4	43,8	42,3	497,1	493,6	70,3

MS: Matéria seca; PB: proteína bruta; FDN: fibra detergente neutro; FDA: fibra detergente ácida; LIG: lignina; EE: extrato etéreo; MM: Matéria mineral; DIVMS digestibilidade; CHOT: carboidratos totais.

Foram formulados tratamentos, substituindo a silagem de milho (controle) pelos coprodutos nas seguintes proporções 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 matéria 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.

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 (Cisteína, 0,1 N NACH, Na<sub>2</sub>S<sub>9</sub>H<sub>2</sub>O, Água destilada)).

Foi utilizado o líquido ruminal e solução tampão (Vitti et al., 1999) em uma proporção de 5:1. O inóculo (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.

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.

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.

O delineamento estatístico utilizado para avaliar a produção cumulativa de gases e a degradabilidade da matéria seca foi inteiramente ao acaso num arranjo fatorial 5 x 4 (coprodutos e níveis de substituição).

A produção de gás total e a degradabilidade da MS foram submetidos a uma análise de variancia (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).

## 2. Resultados

Os coprodutos avaliados apresentaram elevado teor de proteína bruta, (Tab. 1), destacando o coproduto de algodão e o coproduto de moringa dentre os coprodutos que apresentam maior teor proteico (549,9 e 577,6 g/kg) e menor quantidade de fibra (303,6 e 202,7 g/kg), respectivamente.

Quanto a degradabilidade da MS, o efeito dos fatores principais foram dependentes (Tab 2).

**Tabela 2-** Percentual da degradabilidade *in vitro* (48h) dos coprodutos do biodiesel em diferentes níveis de substituição pela silagem de milho.

Coprodutos	Níveis de substituição				Equação de regressão	R <sup>2</sup>	P
	0%	30%	50%	70%			
Algodão	50.4	48.3 <sup>AB</sup>	46.4 <sup>A</sup>	45.8 <sup>B</sup>	$\hat{Y} = 50.3202 - 0.0689x$	0.67	0.0011
Mamona	50.4	44.3 <sup>B</sup>	38.4 <sup>B</sup>	30.5 <sup>D</sup>	$\hat{Y} = 51.4293 - 0.2806x$	0.96	<.0001



Moringa	50.4	47.1 <sup>AB</sup>	49.3 <sup>A</sup>	56.3 <sup>A</sup>	$\hat{Y} = 50.4524 - 0.2652x + 0.0049x^2$	0.89	<.0001
Girassol	50.4	51.7 <sup>A</sup>	48.9 <sup>A</sup>	49.1 <sup>B</sup>	$\hat{Y} = 50.0542$	0,33	0,1575
Pinhão	50.4	44.4 <sup>B</sup>	41.2 <sup>B</sup>	37.6 <sup>C</sup>	$\hat{Y} = 50.2336 - 0.1823x$	0.80	<.0001

\*Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey.

Analizando os coprodutos, dentro dos níveis de substituição pela silagem de milho ao nível de 30%, o coproduto do girassol apresentou a maior média de degradabilidade da matéria seca diferindo do coproduto da mamona, do pinhão e do coproduto da moringa, sendo semelhante ao coproduto do algodão ( $P > 0,05$ ).

Ao nível de 50% de substituição da silagem de milho pelos coprodutos do biodiesel, estes diferiram entre si ( $P < 0,05$ ), o coproduto do algodão, moringa e do girassol foram semelhantes obtendo a maior degradabilidade, já o coproduto da mamona e pinhão manso foram semelhantes apresentando menor degradabilidade. Ao nível de 70% de substituição o co-produto da moringa apresentou a maior degradabilidade diferindo dos demais coprodutos. O algodão e girassol apresentaram degradabilidade semelhantes ( $P > 0,05$ ), seguida do pinhão e da mamona que apresentou a menor taxa de degradabilidade da matéria seca.

Observando os níveis de substituição da silagem de milho pelos coprodutos do biodiesel, verifica-se que o modelo de regressão que melhor explica a degradabilidade do coproduto da moringa foi quadrático, sendo 27,06% o ponto máximo que promoveu maior degradabilidade (61,22%). Para o coproduto do algodão, mamona e pinhão o modelo de regressão que melhor explica a degradabilidade da matéria seca é linear, a cada 1% do coproduto em substituição a silagem de milho, diminuía 0,07 % (coproduto do algodão), 0,28% (coproduto da mamona), 0,18 (coproduto do pinhão) na degradabilidade. O coproduto do girassol não apresentou um modelo de regressão significativo (Tab. 2).

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

**Tabela 3-** Produção de Gás (ml/g/48h) em diferentes níveis de substituição dos coprodutos do biodiesel pela silagem de milho.

Coproductos	Níveis de substituição				Equação de regressão	R <sup>2</sup>	P
	0%	30%	50%	70%			
Algodão	130.2	104.2 <sup>B</sup>	116.1 <sup>A</sup>	122.7 <sup>A</sup>	$\hat{Y} = 118.3208$	0,49	0.4957
Mamona	130.2	123.3 <sup>A</sup>	103.5 <sup>AB</sup>	85.1 <sup>B</sup>	$\hat{Y} = 135.0692 - 0.6538x$	0.87	0.0001
Moringa	130.2	105.6 <sup>B</sup>	84.1 <sup>B</sup>	68.2 <sup>B</sup>	$\hat{Y} = 130.8068 - 0,8999x$	0.96	<.0001
Girassol	130.2	112.8 <sup>AB</sup>	103.6 <sup>AB</sup>	106.9 <sup>A</sup>	$\hat{Y} = 130.6279 - 0.8793x + 0.0076x^2$	0.90	<.0001
Pinhão	130.2	102.5 <sup>B</sup>	88.0 <sup>B</sup>	83.7 <sup>B</sup>	$\hat{Y} = 126.79966 - 0.68415x$	0.84	<.0001

\*Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey.

Avaliando os coprodutos dentro dos níveis de substituição, ao nível de 30% a mamona foi o coproduto que produziu maior quantidade de gás em 48 horas de incubação sendo semelhante ao coproduto do girassol, diferindo das demais. Ao nível de 50%, o algodão foi o coproduto que produziu mais gás, semelhante à mamona e ao girassol e diferindo do coproduto da moringa e do coproduto do pinhão. Ao nível de 70% de substituição semelhante ao de 50%, o coproduto do algodão também foi o que obteve a maior produção acumulativa de gás, não diferindo do coproduto do girassol (Tab. 3).

O coproduto do girassol foi afetado ( $P < 0,05$ ), pelos níveis de substituição da silagem de milho pelos coprodutos, apresentando resposta quadrática, sendo estimado o ponto mínimo de produção de gás em 62,8%. O coproduto de algodão, não foi afetado ( $P > 0,05$ ) pelos níveis de substituição.

Os coprodutos de mamona, moringa e pinhão foram influenciados de forma linear decrescente, a cada 1 unidade percentual de coproduto da mamona, moringa ou do pinhão em substituição a silagem de milho reduzia (0,65%, 0,899%, e 0,68%), respectivamente na produção cumulativa de gás total (Tab. 3).

### 3. Discussão

O farelo de soja, alimento considerado padrão como fonte proteica, apresenta 479g/kg de PB, 1,62g/kg de EE e 140,6 g/kg de FDN (Valadares filho et al., 2006). Dessa forma, os dados da composição química apresentados (Tab. 1), demonstram que o teor de proteína bruta dos coprodutos testados nesta pesquisa, são semelhantes ou até superiores ao do farelo de soja em termos de proteína bruta. O problema é que os teores de FDN, Lig e EE, também são superiores, o que diminui a degradabilidade quando da substituição na dieta, podendo até causar problemas de faunação ruminal devido ao poder deletério dos ácidos graxos insaturados presentes na maioria dos extratos oleaginosos vegetais (Silva et al., 2013; Xin e Yu., 2013). A presença de lignina contribui para aumentar a fração indigerível, reduzindo, dessa forma, a fração potencialmente digerível (Mizubuti et al., 2011). Os maiores teores de lignina na base seca foram encontrados no coproduto de mamona, girassol e pinhão manso (154,4; 34,3 e 43,4 g/kg respectivamente), e o menor na coproduto de moringa (10,3 g/kg).

Essa diferença entre outros fatores justifica a não utilização desses coprodutos em substituição total ao farelo de soja, mas demonstra que em nível de teor de PB, os coprodutos podem substituir parcialmente os derivados da soja, dessa forma a utilização dos coprodutos de algodão ou moringa em substituição a silagem de milho pode reduzir o uso de

suplementação proteica, o que irá reduzir os custos com a aquisição dos concentrados comerciais (Andrade Junior e Martins, 2013).

Após 48 horas de incubação, o coproduto da moringa ( $P < 0,05$ ) foi o coproduto com maior degradabilidade, isto pode ser justificado por apresentar o menor teor de FDN e lignina, e não apresentar compostos antinutricionais (Tab. 1). Essa maior taxa de degradação sugere que a coproduto de moringa causa menor efeito de repleção ruminal, quando comparada aos outros alimentos estudados. Já os coprodutos de mamona e pinhão apresentaram a menor taxa de degradabilidade, o que pode estar relacionada ao elevado teor de fibra respectivamente e gordura desses coprodutos, pois segundo Lana (2007), para não afetar a fermentação ruminal o máximo de lipídios insaturados recomendado na ração é de 5%. Podendo provocar um grande efeito de repleção ruminal, limitando o consumo de matéria seca e prejudicando a produção animal que exigem uma grande demanda nutricional. Este resultado está de acordo com Palma et al., (2013) que relataram maior degradabilidade ruminal para o coproduto da moringa e menor para o coproduto da mamona e justificaram esses resultados com a diferença no teor de FDN desses coprodutos.

Além disso, tanto a mamona como o pinhão manso possuem compostos tóxicos e antinutricionais. A ricina é uma proteína encontrada exclusivamente no endosperma das sementes de mamona, promove a morte da célula por inibição da síntese proteica (Biodiesel, 2013). Dessa forma ocorre a morte ou inibição dos microrganismos ruminais, diminuindo a degradação do alimento (Oliveira et al., 2010). A toxidez do coproduto do pinhão manso se deve principalmente à presença de inibidores de tripsina que são substâncias antinutricionais que interfere o processo fisiológico de digestão através da interferência das enzimas pancreáticas proteolíticas, levando à redução da digestibilidade da proteína da dieta. Portanto, a sua utilização para a alimentação animal depende da destoxificação deste coproduto (Bomfim et al., 2009).

O tratamento de 70% de coproduto da moringa promoveu menor ( $p < 0,05$ ) produção de gases ao final de 48 horas de incubação, o que pode ser explicado pelo maior conteúdo de proteína deste alimento, como indica a (Tab. 1), que resultaria na formação de bicarbonato de amônio, a partir de  $\text{CO}_2$ , reduzindo a sua contribuição para a produção de gás (Cieslak et al., 2013). Além disso, as sementes de moringa têm demonstrado efeito bactericida contra algumas cepas gram-positivas e gram-negativas, sugerindo o uso das sementes como fontes de agentes antibacterianos (Costa et al., 2009). A presença de toxinas, como as proteínas catiônica polieletrólito em coprodutos de moringa, que foram mostrados para expor propriedades antibacterianas e se ligam fortemente com micróbios ruminais, poderá vir a dar

uma explicação. Em níveis baixos, estas proteínas podem proteger as proteínas para a alimentação animal de degradação no rúmen, mas, em níveis elevados destas proteínas podem inibir a fermentação do rúmen (Makkar et al., 2007; Palma et al., 2013). Isso explica a diminuição na produção de gás, o que resultaria na diminuição da população bacteriana do rúmen, diminuindo a participação na fermentação, sabe-se que essa redução de gases é benéfica do ponto de vista ambiental e energético para os ruminantes, tornando o coproduto de moringa mais eficiente em relação à sustentabilidade.

A maior produção cumulativa de gás no tempo de 48 horas ocorreu com o uso dos coprodutos da mamona (30%) e do algodão (50 e 70%) de acordo com a (Tab. 3). Em relação aos demais demonstra melhor disponibilidade de nutrientes para os microrganismos ruminais *in vitro*. Esse tempo é considerado limite para a permanência de grãos no rúmen para vacas em lactação com taxa de passagem de 4 a 6,5% h<sup>-1</sup> e dessa maneira promoveria maior disponibilidade de energia fermentável no rúmen agindo em sincronia com a proteína degradável (Cieslak et al., 2013), resultando em maiores produções de leite.

#### **4. Conclusão**

A introdução de coproduto de moringa na dieta de ruminantes proporciona redução na emissão de gases poluentes ao meio ambiente, e conseqüentemente melhor aproveitamento de energia pelos ruminantes. O nível de substituição de 27,06% da moringa pela silagem de milho é o mais recomendado.

Os demais coprodutos utilizados até 30% de substituição pela silagem de milho, não prejudicaram a degradabilidade da MS, sendo necessário estudos mais detalhados em relação ao processo de detoxificação da mamona e do pinhão.

#### **5. Agradecimentos**

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

#### **6. Referências**

ABDALLA, A.L; SILVA FILHO, J.C; GODÓI, A.R. et al. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. *R. Bras. Zootec*, Viçosa, MG, v.37, p. 260-258, 2008.

ANDRADE JÚNIOR, P.P; MARTINS, C.A. Biodiesel and its strategic role in the Brazilian energy matrix: A Literature Review. *Engineering Research*, v.4, n. 5, p. 1-18, 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS - ANP. Boletim Mensal do Biodiesel, Outubro de 2012. Brasília, DF, 2012.

BIODIESELBR.COM. Tudo sobre biodiesel. Curitiba, 2013. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/biodiesel/biodiesel.htm>. Acesso em: 20 de maio de 2013.

BOMFIM, M.A.D; SILVA, M.M.C; SANTOS, S.F.D. Potencialidades da utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de caprinos e ovinos. *Rev. Tecnol. Ciên. Agropec.* João Pessoa, v.3, n.4, p.15-26, 2009.

CIESLAK, 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.

COSTA, R.A; PEIXOTO, J.R.O; SILVA, G.C; VIEIRA, G.H.F. Redução de enterobactérias em amostras de água tratadas com sementes de Moringa oleifera. In: Anais Encontro Nacional de Moringa, Aracaju, SE, 3p., 2009.

GETACHEW, G; BLÜMMEL, M.; MAKKAR, H.P.S. et al. In vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Anim. Feed. Sci. technol.* v.72, p.261-281, 1998.

LANA, R.P. Nutrição e alimentação animal: mitos e realidades. 2.ed.Viçosa:UFV, 2007, 344p.

MAKKAR, H.P.S; FRANCIS, G; BECKER, K. Bioactivity of phytochemicals in some lesser-known plants and their effects and potential applications in livestock and aquaculture production systems. *Animal*, v.9, p.1371-1391, 2007.

MIZUBUTI, I.Y; RIBEIRO, E.L.D.A; PEREIRA, E.S. et al. Cinética de fermentação ruminal in vitro de alguns coprodutos gerados na cadeia produtiva do biodiesel pela técnica de produção de gás. *Ciênc. Agrár, Lond*, v.32, n. 1, p.2021-2028, 2011.

MORGAVI, D.P; MARTIN, C; JOUANY, J.P; RANILLA, M.J. Rumen protozoa and methanogenesis: not a simple cause-effect relationship. *The British Journal of Nutrition*, v. 107, p.388-397, 2012.

MORON, I.R; TEIXEIRA, J.C; BUENO FILHO, J.S.S. et al. Cinética de degradação ruminal da matéria seca de alimentos concentrados e volumosos através das técnicas in vitro e in situ. *Ciênc. Agrotec*, v.25, n.5, p.1185-1194, 2001.

OLIVEIRA, R.L; LEÃO, A.G; RIBEIRO, O.L. et al. Biodiesel by-products used as ruminant feed. *Rev Colomb CiêncPecu*, v. 25, p.625-638, 2012.

OLIVEIRA, A.S; CAMPOS, J.M.S; OLIVEIRA, M.R.C. et al. Nutrient digestibility, nitrogen metabolism and hepatic function of sheep fed diets containing solvent or expeller castorseed meal treated with calcium hydroxide. *Anim. Feed. Sci. Technol*, v.158, p.15-28, 2010.

OLIVEIRA, A.S. Coprodutos da extração de óleo de sementes de mamona e de girassol na alimentação de ruminantes. 2008. 166f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

PALMA, S.M.O; MEALE, S.J; PEREIRA, L.G.R.A. et al. *In Vitro* fermentation, digestion kinetics and methane production of oilseed press cakes from biodiesel production. *Asia. Aust. J. Anim. Sci.*, v. 26, n. 8, p.1102-1110, 2013.

PELL, A.N; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. *J. Dairy. Sci*, v.76, n.9, p.1063-1073, 1993.

SAS. Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., SAS User's Guide, Cary, USA: SAS Inst., 2003.

SILVA, E.C; FERREIRA, M.A; VÉRAS, A.S.C. et al. Replacement of corn meal by corn germ meal in lamb diets. *Pesq Agropec Bras*, v.48, n.4, p.442-449, 2013.

SILVA, D.J; QUEIROZ, A.C. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. Viçosa, MG: Editora UFV. 2002. 165 p.

SNIFFEN, C.J.O; CONNOR, J.D; VAN SOEST, P.J. et al. net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. II - Carbohydrate and protein availability. *J. Anim. Sci*, Champaign, v. 70, n. 11, p. 3562-3577, 1992.

TILLEY, J.M.A; TERRY, R.A.A. Two stage technique for *in vitro* digestion of forages crops. *J. Brit. Grassl. Soc.* Aberystwyth, v.18, p.104-111, 1963.

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

VALADARES FILHO, S.C; PAULINO, P.V.R; MAGALHÃES, K.A; Exigências nutricionais de zebuínos e tabelas brasileiras de composição de alimentos. 1 ed. Viçosa: Suprema Gráfica Ltda – Universidade Federal de Viçosa, 2006.

VITTI, D.M.S; ABDALLA, A.L; FILHO, J.A.C. et al. Misleading relationships between *in situ* rumen dry mater disappearance, chemical analyzed and *in vitro* gás production and digestibility, of sugarcane baggage treated with varying levels of electron irradiation and ammonia. *Anim. Feed. Sci. technol.* p.145-153, 1999.

XIN, H; YU, P. Chemical Profile, Energy Values, and Protein Molecular Structure Characteristics of Biofuel/Bio-oil Co-products (Carinata Meal) in Comparison with Canola Meal. *J. Agric Food Chem*, v. 61, n.16, p.3926–3933, 2013.

## **CAPÍTULO II**

### **Potencial de Fermentação, Produção de Metano e Dióxido de Carbono de Coprodutos do Biodiesel**

(Após tradução para língua inglesa este artigo será enviado para a revista Asian Australasian Journal of Animal Science, estando escrito dentro das normas em anexo).



## Potencial de Fermentação, Produção de Metano e Dióxido de Carbono de Coprodutos do Biodiesel

Fabíola Franklin de Medeiros<sup>\*</sup>, Aderbal Marcos de Azevedo Silva<sup>2</sup>, Heloisa Carneiro<sup>3</sup>, Dário Ricelle Carvalho de Araújo<sup>1</sup>, Raissa Kiara Oliveira de Moraes<sup>1</sup>, Milena Nunes Moreira<sup>1</sup>, Leilson Rocha Bezerra<sup>4</sup>

<sup>\*</sup>Students of the Post-Graduation Program in animal science Zootecnie, Federal University of Campina Grande, Patos, Paraíba State, Brazil, email: vet.fabiolafranklin@gmail.com

<sup>2</sup>Department of Zootecnia, University Federal of Campina Grande, Paraíba, 6490000, Brazil. email: silvaama@gmail.com

<sup>3</sup>Doctor Researcher in EMBRAPA Dairy Cattle, e-mail: [heloisacarneiro@embrapa.br](mailto:heloisacarneiro@embrapa.br)

<sup>4</sup>Department of Zootecnia, University Federal of Piauí, Bom Jesus, PI, 6490-000, Brazil. email: [leilson@ufpi.edu.br](mailto:leilson@ufpi.edu.br)

**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 (Algodão, mamona, moringa, girassol e pinhão manso). Os produtos foram analisados mediante a técnica semi automática de produção de gases in vitro. O delineamento utilizado foi o inteiramente ao acaso, com seis repetições para cada coproduto avaliado em quatro diferentes níveis. Nas condições experimentais deste trabalho, foram verificados diferentes potenciais para produção de gases entre os ingredientes. O coproduto do algodão foi o ingrediente de maior potencial de produção de acetato, butirato, CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>. O coproduto da moringa foi o de menor potencial para produção de acetato, butirato, CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> em relação à matéria seca degradada, e de maior potencial na produção de proprionato, podendo ser considerado, entre os coprodutos avaliados, o de menor impacto ao ambiente, sem prejuízos a fermentação ruminal. (**Palavras chave:** Gases poluentes, Biodiesel, Mitigação, Ruminantes).

## Introdução

O rebanho bovino do Brasil é estimado em cerca de 213 milhões de cabeças (IBGE, 2011), em contínuo crescimento e com avanços nos índices de produtividade. Diante desses números, a pecuária tem sido apontada como uma das atividades que prejudica o meio ambiente. Esta contribui negativamente com emissões de metano por meio da fermentação entérica e do manejo de dejetos de animais.

A fermentação do alimento ingerido, no rúmen, é um processo anaeróbio efetuado pela população microbiana ruminal, em que os carboidratos celulolíticos são convertidos em ácidos graxos de cadeia curta, os quais são utilizados pelo animal como fonte de energia. Os principais AGVs são o ácido acético, propiônico e butílico. As proporções usuais são 60 a 70% ácido acético, 15 a 20 ácido propiônico e 10 a 15 ácido butílico. A concentração de ácido propiônico aumenta quando a dieta tem grande quantidade de açúcares solúveis ou amido, e diminui quando os animais são alimentados com feno de baixa qualidade (Reece, 1996).

A produção de acetato e butirato, predominante durante a fermentação de carboidratos fibrosos, resulta em liberação líquida de  $H_2$  e favorece a metanogênese. Já a formação de propionato é uma via competitiva de utilização de  $H_2$  no rúmen, reduzindo a disponibilidade de substrato para a metanogênese. Bactérias metanogênicas presentes no rúmen, obtêm energia para seu crescimento ao utilizar  $H_2$  para reduzir  $CO_2$  e formar metano ( $CH_4$ ), o qual é eructado para a atmosfera (Cottle et al., 2011). Assim, a produção de metano, depende do balanço de  $H_2$  no rúmen, sendo influenciada pelas taxas de produção de acetato e propionato (Hegarty, 2001). O metano apresenta potencial de aquecimento global 23-25 vezes maior que o  $CO_2$  e o tempo de vida na atmosfera é de 9 a 15 anos, sendo sua taxa de crescimento anual de 7,0% (IPCC, 2006).

Muitos fatores influenciam a produção de  $CH_4$  entérico dos ruminantes, inclusive o tipo de carboidrato fermentado, o sistema digestivo do animal e a quantidade de alimentos consumidos. Diante do exposto, pesquisadores têm desenvolvido tecnologias para reduzir a emissão de metano, através da melhoria das práticas de manejo alimentar, manipulação ruminal, por meio de suplementação com monensina, lipídios, ácidos orgânicos e compostos de plantas (Berchielli et al., 2012).

A redução na produção de  $CH_4$  no rúmen está associado ao fornecimento de lipídios insaturados por exercer ação deletéria sobre as bactérias metanogênicas e protozoários e consumir  $H_2$  pelo processo de biohidrogenação (Wada et al., 2008), sendo que a intensidade com que ocorre a inibição da produção de  $CH_4$  pode ser determinada pela saturação da gordura utilizada e a quantidade suplementada.

A utilização de coprodutos oriundos da produção do biodiesel surgem como alternativa na alimentação de ruminantes, o que pode contribuir para o crescimento das atividades agropecuárias, em termos de

produtividade e rentabilidade. Esses coprodutos apresentam grande potencial, haja vista as consideráveis concentrações de proteína e lipídeos, que as caracterizam como alimentos proteicos ou energéticos, capazes de permitir o atendimento das exigências nutricionais destas frações pelos animais (Oliveira et al., 2012).

Desta forma, objetivou-se determinar os níveis ótimos de aplicação de coprodutos, na dieta de ruminantes, visando à busca de menores produções de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> entérico.

## **Material 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.

### ***Material estudado***

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.

Os substratos utilizados para incubações *in vitro* foram a silagem de milho (controle) e os coprodutos da industrialização do biodiesel: algodão (*Gossypium hirsutum*), mamona (*Ricinus communis*), moringa (*Moringa oleifera*), farelo de pinhão manso (*Jatropha curcas*) e girassol preto (*Helianthus annuus*).

Foram formulados tratamentos, substituindo a silagem de milho (controle) pelos coprodutos nas seguintes proporções 70/30, 50/50 e 70/30% (volumoso/coproduto). Os ingredientes dos tratamentos após serem secos a 55°C durante 48 horas, posteriormente moídos a 1 mm. Em seguida pesados 0,5g de matéria 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.

### ***Análise química***

Os substratos compostos pelos coprodutos e pela forragem foram pré-secos em estufas de ventilação forçada a 60°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 (2006); e de extrato etéreo (EE). 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).

### ***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 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 (Cisteína, 0,1 N NACH, NA<sub>2</sub>S<sub>9</sub>H<sub>2</sub>O, Água destilada).

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 conteúdo 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 Hrudely, 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 armazenado 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>a 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 5 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**

Todos os coprodutos avaliados apresentaram elevado teor de proteína bruta e extrato etéreo, destacando-se o coproduto de moringa por apresentar maior taxa de digestibilidade e menor quantidade de FDN, (Tabela 1).

A produção de acetato, propionato e butirato dos coprodutos em substituição a silagem de milho, apresentaram efeito dependente (Tabela 2).

Analizando os coprodutos dentro dos níveis de substituição pela silagem de milho, ao nível de 30% os coprodutos da moringa, mamona e pinhão manso foram semelhantes entre si, obtendo a maior média de produção de acetato e os demais, algodão e girassol apresentaram uma menor produção (p<0,05).

No nível de 50% de substituição, a maior produção de acetato foi obtida pelo coproduto do algodão, diferindo dos demais ( $p < 0,05$ ) e a menor pelos coprodutos da moringa, mamona e pinhão manso semelhantes entre si estatisticamente ( $p > 0,05$ ).

Ao nível de 70% de substituição o coproduto do algodão também obteve a maior produção ( $p < 0,05$ ) diferindo dos demais que obtiveram uma menor produção. A produção de acetato do coproduto da moringa com 70% de substituição pela silagem de milho, foi menor que o obtido em todos os níveis e coprodutos dos tratamentos.

Examinando os níveis de substituição da silagem de milho pelos coprodutos do biodiesel, verifica-se que o modelo de regressão que melhor explica a produção de acetato dos coprodutos do algodão, moringa e do girassol foi quadrático. Para o algodão, o ponto que representou máxima produção de acetato foi de 20,62% (30,68  $\mu\text{mol/mL}$ ). Do coproduto da moringa foi 2,38% o ponto que atingiu máxima produção de acetato (37,93  $\mu\text{mol/mL}$ ). E 29,47% o ponto que alcançou a máxima produção de acetato do coproduto do girassol (47,96  $\mu\text{mol/mL}$ ). Os coprodutos da mamona e do pinhão manso apresentaram comportamento linear decrescente, a cada 1% do coproduto da mamona em substituição a silagem de milho, diminuía 0,09  $\mu\text{mol/mL}$  e a cada 1% do coproduto do pinhão manso reduzia 0,10  $\mu\text{mol/mL}$  na produção de acetato.

Em relação a produção de proprionato analisando os coprodutos dentro dos níveis de substituição pela silagem de milho ao nível de 30%, o coproduto da moringa obteve a maior média de produção de proprionato e o coproduto da mamona a menor. Ao nível de 50% de substituição o coproduto da moringa e do girassol obtiveram as maiores médias e o coproduto da mamona e do pinhão manso as menores. O nível de 70% de substituição apresentou os coprodutos da moringa e do girassol como maiores produtores e a mamona e o pinhão manso novamente com menores médias na produção de proprionato.

Analisando os níveis de substituição da silagem de milho pelos coprodutos do biodiesel, identificou-se que o modelo de regressão que melhor explica a produção de proprionato do coproduto da moringa foi quadrático ( $p < 0,05$ ). Sendo observado 30,82% como o ponto de mínima produção (21,84  $\mu\text{mol/mL}$ ) de proprionato. Os coprodutos do algodão, mamona e do pinhão manso comportaram-se de modo linear decrescente ( $p < 0,05$ ), a cada 1% de substituição do coproduto do algodão reduzia 0,06  $\mu\text{mol/mL}$ , da mamona diminuía 0,11  $\mu\text{mol/mL}$  e o coproduto do pinhão manso reduzia 0,089  $\mu\text{mol/mL}$  na produção de proprionato. O coproduto do girassol não apresentou um comportamento de regressão significativo ( $p > 0,05$ ).

Analisando na produção de butirato, os coprodutos dentro dos níveis de substituição pela silagem de milho, ao nível de 30% e 50%, apenas o coproduto da moringa diferiu dos demais com uma menor média de

produção, ao nível de 70% os coprodutos do algodão e do girassol apresentaram as maiores produções sendo semelhantes entre si, e os coprodutos da moringa, mamona e pinhão manso obtiveram as menores produções de butirato.

Verificando os níveis de substituição da silagem de milho pelos coprodutos do biodiesel, evidenciou-se que o comportamento de regressão que melhor explica a produção de butirato dos coprodutos de algodão, moringa e do girassol, foi quadrático ( $p < 0,05$ ). Para o coproduto do algodão identificou-se 40% como o ponto de mínima produção de butirato ( $1,11 \mu\text{mol/mL}$ ), do coproduto da moringa foi observado 69,28% como o ponto de máxima produção  $3,82 \mu\text{mol/mL}$  e 64% o ponto de máxima produção  $7,03 \mu\text{mol/mL}$  de butirato pelo coproduto do girassol. O coproduto da mamona e do pinhão manso apresentaram um comportamento linear, a cada 1 unidade percentual substituída pela silagem de milho reduzia  $0,08$  e  $0,09 \mu\text{mol/mL}$  de butirato conseqüentemente (Tabela 2).

Quanto à produção de  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$ , a substituição da silagem de milho pelos coprodutos do biodiesel promoveu efeito dependente (Tabela 3).

Analisando os coprodutos, dentro dos níveis de substituição ao nível de 30%, o coproduto da mamona obteve a maior média de produção de  $\text{CH}_4$  ( $p < 0,05$ ), sendo semelhante ao coproduto do girassol ( $p > 0,05$ ) e diferindo do coproduto da moringa, pinhão manso e do algodão, que apresentaram comportamento semelhante ( $p < 0,05$ ).

Ao nível de 50% de substituição o coproduto do algodão obteve a maior média semelhante ao coproduto do girassol e diferindo dos demais, o coproduto da moringa apresentou a menor produção sendo semelhante ao coproduto do pinhão manso.

Ao nível de 70% o coproduto de algodão obteve novamente a maior produção diferindo dos demais, o coproduto da moringa apresentou-se como melhor mitigador de  $\text{CH}_4$ , em todos os níveis de substituição. Sendo o nível 50% de substituição o que promoveu maior mitigação em relação a 100% de silagem de milho.

Analisando os níveis de substituição dentro de cada coproduto, verifica-se que o modelo de regressão que melhor explica a produção de  $\text{CH}_4$ , dos coprodutos da moringa, algodão, girassol e pinhão manso foi quadrático. Para o coproduto da moringa, o ponto de máxima produção de  $\text{CH}_4$  foi 71,30% ( $11,53\text{mL/gMS}$ ), porém já que esse resultado ultrapassa o nível estudado é preferencial utilizar o modelo linear, o ponto de máxima produção de  $\text{CH}_4$  ( $30\text{mL/gMS}$ ) foi 30,1% para o coproduto do algodão, para o coproduto do girassol obteve 44,77 % como o ponto de máxima produção de  $\text{CH}_4$  ( $30,93\text{mL/gMS}$ ) e 59,7% foi o ponto de máxima produção de  $\text{CH}_4$

(22,83mL/gMS) para o coproduto do pinhão manso. Já o coproduto da mamona o modelo que melhor explica foi o linear decrescente, ou seja, a cada 1 unidade percentual do coproduto, diminuía 0,37 %, na produção de CH<sub>4</sub>.

Analizando os coprodutos, dentro dos níveis de substituição da silagem pelos coprodutos ao nível de 30% (Tabela 3), o coproduto da mamona obteve a maior média de produção de CO<sub>2</sub>, semelhante ao coproduto do girassol, diferindo dos coprodutos da moringa, do pinhão manso e do algodão (p<0,05).

Ao nível de 50% de substituição o coproduto do algodão obteve a maior média de produção de CO<sub>2</sub>, juntamente com o coproduto do girassol, diferindo dos demais coprodutos. Ao nível de 70% de substituição o coproduto do algodão obteve a maior média, diferindo dos demais e os coprodutos da mamona, moringa e pinhão manso obtiveram a menor média de produção de CO<sub>2</sub>. Todos os coprodutos demonstraram menor produção de CO<sub>2</sub> em relação ao grupo controle (100% silagem de milho) (Tabela 3).

Analizando os níveis de substituição dentro de cada coproduto, verifica-se que o modelo de regressão que melhor explica a produção de CO<sub>2</sub>, dos coprodutos da moringa, do algodão e do girassol foi quadrático, sendo 54,64% o ponto de mínima produção (83,82mL/gMS) do coproduto da moringa, 37,40% o ponto de mínima produção (100,47mL/gMS) do coproduto do algodão, 61,43% o ponto de mínima produção de CO<sub>2</sub> (131,73mL/gMS) do coproduto do girassol. Para o coproduto da mamona e do girassol o modelo que melhor explica foi o linear decrescente, ou seja, a cada 1 unidade percentual do coproduto, diminuía 1,84 % (mamona), 1,37% (pinhão manso) na produção de CO<sub>2</sub> (Tabela 3).

O pH também comportou-se de forma dependente com relação aos efeitos dos fatores principais (Tabela 4).

Analizando os coprodutos, dentro dos níveis de substituição da silagem de milho pelos coprodutos do biodiesel ao nível de 30%, o coproduto da moringa obteve a maior medição do pH semelhante ao coproduto do algodão, mamona e do pinhão manso e diferente do coproduto do girassol que obteve a menor média.

Ao nível de 50% o coproduto da mamona, pinhão manso, moringa e girassol demonstraram comportamento semelhante obtendo maiores médias de pH (p>0,05), diferindo do coproduto do algodão que obteve a menor média (p<0,05). Quando observou-se o nível com 70% de substituição o coproduto da mamona, semelhante ao da moringa e do pinhão manso obtiveram maiores médias em relação ao coproduto do girassol e algodão que foram semelhantes entre si na medição de pH.

Estudando os níveis de substituição dentro de cada coproduto, na aferição do pH, o coproduto do algodão apresentou um comportamento quadrático sendo 49% o ponto de máxima medição (5,85), os demais coprodutos apresentaram um modelo linear, a cada 1% de coproduto a mais na substituição, aumentava 0,0085 no pH com o



coproduto da mamona, 0,0078 com o coproduto da moringa, 0,0066 do girassol e 0,0076 no coproduto do pinhão manso.

A produção de  $\text{NH}_3$  ruminal com coprodutos do biodiesel em substituição a silagem de milho apresentou efeito dependente (Tabela 5).

Verificando os coprodutos em substituição a silagem de milho em níveis crescentes, observa-se que ao nível de 30%, o coproduto da moringa obteve a maior média de produção diferindo ( $p < 0,05$ ) do demais e o de algodão a menor, no nível de 50% de substituição o coproduto do girassol e da moringa obtiveram as maiores médias e o coproduto do pinhão manso a menor. Ao nível de 70% o coproduto do girassol e do pinhão manso obtiveram a maior e menor produção.

Observando os níveis dentro de cada coproduto, o do algodão descreveu um modelo quadrático com 8,36% o ponto que promoveu a menor produção de (6,33 mg/dL de  $\text{NH}_3$ ), os demais coprodutos apresentaram um modelo linear sendo a cada uma unidade percentual que aumentava nos níveis de substituição do coproduto pela silagem de milho aumentava 0,26 de  $\text{NH}_3$  para o coproduto da mamona, 0,34 da moringa, 0,48 do girassol e 0,23 com o coproduto de pinhão manso na medição de  $\text{NH}_3$ .

### Discussão

Com relação aos ácidos graxos voláteis no rúmen, pode-se observar que a substituição de silagem de milho pelos coprodutos do algodão e girassol apresentaram maior proporção de acetato. Sabe-se que, quanto maior o teor de fibra de um ingrediente, maior será a porcentagem de acetato liberado com base na energia bruta (Gastaldi, 2003). Nesse estudo foi observado que o coproduto do algodão apesar de não apresentar o maior teor de fibra entre os coprodutos avaliados, foi o coproduto de maior potencial para produção de acetato, isso pode ser justificado por que os demais coprodutos, apresentam maior teor de fibra, porém possuem compostos tóxicos antinutricionais como a ricina e inibidores de tripsina que diminuem a digestibilidade, consequentemente a fermentação e a produção de gases. O coproduto do algodão também possuem elevado teor de EE, que na dieta auxilia na remoção de  $\text{H}_2^+$  livre no ambiente ruminal pelo processo de biohidrogenação, ao transformar ácidos graxos insaturados em saturados secretam duas moléculas de  $\text{H}_2^+$  para cada molécula de ácido graxo saturado formada, esse  $\text{H}_2^+$ , quando livre é utilizado pelas bactérias metanogênicas para a produção de  $\text{CH}_4$ . Quanto mais  $\text{H}_2^+$  é retirado do meio, maior proporção do NADH é convertida a  $\text{H}_2^+$  e maior é o rendimento de acetato (Kozloski, 2009).

Na produção de proprionato apenas os níveis 30 e 50% do coproduto da moringa, obtiveram uma maior produção em relação ao grupo controle em quanto os demais diminuíram. Esse comportamento pode ser explicado por que segundo Machado et al., (2011), a substituição de carboidratos fibrosos por carboidratos não fibrosos, obtidos por meio do aumento da relação concentrado volumoso ou pela utilização de forrageiras de melhor qualidade nutricional, favorece a produção de proprionato em detrimento do acetato. Fato esse verificado nessa pesquisa, quando substituiu a silagem de milho rica em fibra pelo coproduto da moringa com pouca fibra e elevado teor proteico.

A produção de butirato foi afetada com a substituição pelos coprodutos reduzindo a produção em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ). Isso pode está relacionado com o elevado teor proteico desses coprodutos que resultaria na formação de bicarbonato de amônio, a partir de  $\text{CO}_2$  e amônia, reduzindo, assim, a contribuição de  $\text{CO}_2$  para a produção total de gás.

A produção de gases provenientes da fermentação ruminal pode variar de acordo com a dieta utilizada, variando também a proporção de  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$  nele contido.

Nesse estudo foi observado que a relação acetato: proprionato foi proporcional a produção de metano (Figuras 1 e 2). Quando a relação aumentava, o mesmo comportamento ocorria com a produção de  $\text{CH}_4$ , tal comportamento ocorreu com o coproduto do algodão, mamona, do girassol e do pinhão manso e quando diminuía, foi observado com a inclusão do coproduto da moringa.

Este comportamento pode ser explicado pois segundo Moss et al., (2000), as formações de acetato e butirato promovem a produção de metano, enquanto a de propionato pode ser considerada uma competidora das vias de uso do hidrogênio livre no rúmen. Morgado et al. (2013) cita que os diferentes potenciais para produção de  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$  estão relacionados com a composição bromatológica dos alimentos, em que ingredientes rapidamente fermentáveis tendem a produzir menor quantidade de  $\text{CH}_4/\text{g}$  de matéria seca fermentada em comparação aos ingredientes com maior teor de fibra.

Como já era esperado a produção de  $\text{CO}_2$  reagiu a substituição da silagem de milho pelos coprodutos de forma semelhante a produção de acetato e  $\text{CH}_4$ , o coproduto do algodão obteve as maiores médias de produção (Figura 3), e o coproduto da moringa as menores, isso está relacionado com a diferença no teor de fibra desses coprodutos, sendo o coproduto da moringa de melhor qualidade nutricional por apresentar menor quantidade de fibra e maior digestibilidade (Tabela 1), o que está diretamente relacionado com a produção de acetato, já que na formação do mesmo o piruvato é degradado para  $\text{CO}_2$  (Kozloski, 2009).

Segundo Pedreira et al. (2005) a produção de  $\text{CH}_4$  é um processo fisiológico que visa evitar o acúmulo de  $\text{H}_2$  no organismo, pois este acúmulo pode culminar com queda do pH ruminal e consequente inibição do crescimento de microrganismos responsáveis pela degradação de fibras. No entanto, no presente estudo foi observado que o coproduto da moringa e da mamona diminuiu a produção de  $\text{CH}_4$  e aumentaram o pH ruminal de 5,6 (100% silagem de milho) em torno de 6,0 - 6,2, segundo Mould et al., (1983), pH ruminal abaixo de 6,2 reduz a atividade de bactérias celulolíticas e a digestão de palhas. Esse comportamento pode ser explicado para o coproduto da moringa, tendo em vista que o mesmo aumentou a produção de propionato, ocorrendo sequestro de  $\text{H}_2^+$  para a formação desse AGV, Já o coproduto da mamona apresenta alto teor de fibra o que justifica o maior aumento do pH.

Em relação ao teor de  $\text{NH}_3$ , a substituição da silagem de milho pelos coprodutos promoveu aumento em todos os tipos e níveis de utilização sendo os valores obtidos superiores ao nível ótimo de 10mg/dL, segundo Van Soest (1994). Esse aumento pode ser justificado pela grande quantidade de proteína encontrada nesses coprodutos (Tabela 1). Quanto maior o teor protéico da dieta, maior a produção de amônia e maiores as concentrações de uréia no soro e as perdas nitrogenadas pela urina. Neste caso, o efeito do maior consumo de nitrogênio pelos animais alimentados com as rações com coprodutos do biodiesel resultaria em maiores concentrações plasmáticas e excreção de ureia na urina. A excreção de ureia representa elevado custo biológico e desvio de energia para manutenção das concentrações corporais de nitrogênio em níveis não-tóxicos aos animais. A conversão da amônia em ureia custa ao animal 12 kcal/g de nitrogênio (Van Soest, 1994). Segundo LEE. et al., (2003) inferiram que alimentos com alto teor de proteína bruta tendem a produzir menor quantidade de metano, pois o  $\text{NH}_4$  resultante da degradação de fontes proteicas como farelo de oleaginosas podem combinar com o  $\text{CO}_2$  que é o substrato para a produção de  $\text{CH}_4$ , resultando em menor produção, o que pode explicar a baixa produção de metano e menor produção de  $\text{NH}_3$  para o coproduto da moringa em relação aos demais coprodutos, dessa forma a alta produção de  $\text{NH}_3$ , torna-se um fator limitante desses coprodutos, sendo aconselhável o uso de até 30% desses alimentos na dieta de ruminantes.

### **Conclusão**

Todos os coprodutos avaliados são passíveis de utilização como suplementação proteica na dieta de bovinos, sendo aconselhável o uso de até 30% para não interferir no processo de fermentação ruminal.

Dentre os coprodutos avaliados o coproduto da moringa destacou-se por promover mitigação de  $\text{CH}_4$ , obtendo níveis de pH e  $\text{NH}_3$  satisfatórios para a máxima fermentação ruminal, desta forma recomenda-se o uso

deste coproduto em substituição pela silagem de milho. A Substituição desse coproduto na dieta proporcionará um menor impacto ambiental.

### **Agradecimentos**

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

### **Referências**

Berchielli, T.T., J.D Messana., R.C Canesin. 2012. Produção de metano entérico em pastagens tropicais. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal. 13:954 - 968.

Cottle, D.J., J.V nolan., S.G Wiedemann. 2011. Ruminant enteric methane mitigation: a review. Animal Production Science, 51:491-514.

Gastaldi, K.A. 2003. Produção «*in vitro*» de metano, dióxido de carbono e oxigênio utilizando líquido ruminal de bovinos alimentados com diferentes rações. Ph.D. Tese (Doutorado em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

Hegarty, R. 2001. Greenhouse gas emissions from the Australian livestock sector what do we know, what can we do? Canberra: NSW Agriculture Australian Greenhouse Office.

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.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Pecuária Municipal 2011. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Pecuaria/Producao\\_da\\_Pecuaria\\_Municipal/2011/tabelas\\_pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2011/tabelas_pdf)> Acesso em: 20 de agosto de 2013.

IPCC. The SRES emission scenarios: the IPCC Data Distribution Centre. Disponível em: <<http://sedac.ciesin.columbia.edu/ddc/sres/index.html>>. Acesso em: 1 de novembro de 2013.

Kozloski, G.V. 2009. Bioquímica dos ruminantes. 2ª ed. Ufsm. Santa Maria, RS, 216p.

- Lee, H.J., Lee, S.C., Kim, J.D., Oh, Y.G., Kim, B.K., Kim, C.W., Kim, K.J. 2003. Methane production potential of feed ingredients as measured by in vitro gas test. *Asian-Australasian Journal of Animal Science* 16:1143-1150.
- Machado, F. S.; L. G. R. Pereira., J.R. Guimaraes., F. C. F Lopes., J. C. Carneiro., A.V. Chaves., M. M. Campos., M. J. F. Morenz. 2011. Emissões de metano na pecuária: conceitos, métodos de avaliação e estratégias de mitigação. *Embrapa Gado de Leite Documentos*, 147. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 92p.
- Morgado, E.S; J.M.B. Ezequiel., A.C.H.J. Junior., L. Galzerano. 2013. Potencial de produção de gás metano e dióxido de carbono in vitro dos ingredientes utilizados em dietas para ovinos. *Ciência Animal Brasileira*, 14: 413-417.
- Moss, A.R. J.P., C.J. Jouany., Newbold. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales de Zootechnie*, 49:231-253.
- Mould. F. L., E.R. Orskov. 1983. Manipulation of rumen fluid pH and its influence on cellulose in sacco, dry matter degradation and rumen microflora of sheep offered either hay or concentrate. *Animal Feed Science Technology*, 10:1-14.
- Oliveira, R.L., A.G. Leão., O.L. Ribeiro., M.S. Borja., A.A. Pinheiro., R.L. Oliveira., M.C.A. Santana. 2012. Biodiesel by-products used as ruminant feed. *Revista Colombiana de Ciências Pecuárias*, 25: 625-638.
- Pedreira, M.S.; S.G. Oliveira., T.T. Berchielli., O. Primavesi. 2005. Aspectos relacionados com a emissão de metano de origem ruminal em sistemas de produção de bovinos. *Archives of Veterinary Science*, 10: 24-32.
- Reece, W. O. 1996. *Fisiologia de animais domésticos*. São Paulo. Roca. SAS - statistical analysis system. Institute Inc. User's Guide, Cary, USA, 2003.
- Silva, D. J., A. C. Queiroz. 2002. *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. Editora UFV, Viçosa.
- 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.
- Wada, F.Y., I.N. Prado., R.R. Silva., J.L. Moletta., J.V. Visentainer., L.M. Zeoula. 2008. Grãos de linhaça e canola sobre o desempenho, digestibilidade aparente e característica de carcaça de novilhas nelore terminada em confinamento. *Ciência Animal Brasileira*, 9:883- 895.

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

**Tabela 1-** Composição química da silagem de milho e dos concentrados testados (coprodutos) na base da matéria seca.

<b>Silagem e coprodutos</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>MM (g/kg)</b>	<b>DIVMS (g/kg)</b>	<b>CHOT (g/kg)</b>	<b>CNF (g/kg)</b>
Silagem milho	842,7	62,5	469,3	314,5	29,7	22,2	51,7	607,0	863,6	394,3
Algodão	929,1	549,9	303,6	207,7	32,1	40,3	68,3	595,6	341,5	37,9
Moringa	901,2	577,6	202,7	80,5	10,3	84,8	49,8	791,3	287,8	85,1
Pinhão Manso	920,7	356,9	391,4	334,5	43,4	110,6	79,5	571,3	453,0	61,6
Girassol Preto	901,1	342,6	390,1	243,6	34,3	32,1	54,9	582,3	570,4	180,3
Mamona	912,6	420,2	423,3	383,4	154,4	43,8	42,3	497,1	493,6	70,3

MS: Matéria seca; PB: proteína bruta; FDN: fibra detergente neutro; FDA: fibra detergente ácida; LIG: lignina; EE: extrato etéreo; MM: Matéria mineral; DIVMS digestibilidade; CHOT: carboidratos totais.

**Tabela 2-** Produção de Acetato, Propionato e butirato ( $\mu\text{mol/mL}$ ) dos coprodutos do biodiesel em diferentes níveis de substituição pela silagem de milho.

Coprodutos	Níveis de substituição				Equação de regressão	R <sup>2</sup>	P
	0%	30%	50%	70%			
<b><i>Produção de Acetato</i></b>							
Algodão	37.729 <sup>A</sup>	34.458 <sup>B</sup>	41.500 <sup>A</sup>	47.900 <sup>A</sup>	$\hat{Y}=37.4384-0.2186x+0.0053x^2$	0.80	0.0006
Mamona	37.729 <sup>A</sup>	35.803 <sup>AB</sup>	35.360 <sup>BC</sup>	30.534 <sup>C</sup>	$\hat{Y}=38.34690-0.09308x$	0.69	0.0007
Moringa	37.729 <sup>A</sup>	37.087 <sup>A</sup>	32.167 <sup>C</sup>	29.418 <sup>C</sup>	$\hat{Y}=37.9397-0.0081x-0.0017x^2$	0.85	0.0002
Girassol	37.729 <sup>A</sup>	34.854 <sup>B</sup>	35.837 <sup>B</sup>	41.377 <sup>B</sup>	$\hat{Y}=37.8106-0.2299x+0.0039x^2$	0.76	0.0014
Pinhão manso	37.729 <sup>A</sup>	36.401 <sup>A</sup>	32.634 <sup>C</sup>	30.507 <sup>C</sup>	$\hat{Y}=38.3611-0.1078x$	0.65	0.0014
<b><i>Produção de Propionato</i></b>							
Algodão	19.636 <sup>A</sup>	18.297 <sup>B</sup>	16.709 <sup>B</sup>	15.173 <sup>B</sup>	$\hat{Y}=19.8595-0.0641x$	0.76	0.0002
Mamona	19.636 <sup>A</sup>	15.996 <sup>C</sup>	14.617 <sup>C</sup>	11.455 <sup>C</sup>	$\hat{Y}=19.65040-0.11265x$	0.96	<.0001
Moringa	19.636 <sup>A</sup>	22.386 <sup>A</sup>	20.342 <sup>A</sup>	18.3 <sup>A</sup>	$\hat{Y}=19.7511+0.1418x-0.0024x^2$	0.71	0.0036
Girassol	19.636 <sup>A</sup>	18.815 <sup>B</sup>	18.628 <sup>BA</sup>	19.208 <sup>A</sup>	$\hat{Y}=19.0719$	-	0.1670
Pinhão manso	19.636 <sup>A</sup>	18.624 <sup>B</sup>	15.470 <sup>BC</sup>	13.646 <sup>BC</sup>	$\hat{Y}=20.19723-0.08941x$	0.79	0.0001
<b><i>Produção de Butirato</i></b>							
Algodão	12.414 <sup>A</sup>	7.928 <sup>AB</sup>	9.822 <sup>A</sup>	10.305 <sup>A</sup>	$\hat{Y}=12.2197-0.1841x+0.0023x^2$	0.54	0.0282
Mamona	12.414 <sup>A</sup>	10.599 <sup>A</sup>	8.674 <sup>A</sup>	6.712 <sup>BC</sup>	$\hat{Y}=12.66258-0.08166x$	0.85	<.0001
Moringa	12.414 <sup>A</sup>	6.850 <sup>B</sup>	4.449 <sup>B</sup>	4.267 <sup>C</sup>	$\hat{Y}=12.4573-0.2494x+0.0018x^2$	0.94	<.0001
Girassol	12.414 <sup>A</sup>	8.394 <sup>AB</sup>	7.531 <sup>AB</sup>	7.082 <sup>AB</sup>	$\hat{Y}=12.3763-0.1666x+0.0013x^2$	0.83	0.0004
Pinhão manso	12.414 <sup>A</sup>	9.656 <sup>AB</sup>	7.712 <sup>AB</sup>	5.937 <sup>BC</sup>	$\hat{Y}=12.4153-0.0929x$	0.85	<.0001

\*Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de tukey (p<0,05).

**Tabela 3** - Produção de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> (mL/gMS), dos coprodutos do biodiesel em diferentes níveis de substituição pela silagem de milho.

Coproducto	Níveis de substituição				Equação de regressão	R <sup>2</sup>	P
	0%	30%	50%	70%			
<b><i>Produção de CH<sub>4</sub></i></b>							
Algodão	42.317 <sup>A</sup>	27.450 <sup>B</sup>	38.410 <sup>A</sup>	49.657 <sup>A</sup>	$\hat{Y} = 41.7159 - 0.7760x + 0.0129x^2$	0.60	0.0157
Mamona	42.317 <sup>A</sup>	41.403 <sup>A</sup>	24.150 <sup>B</sup>	18.760 <sup>BC</sup>	$\hat{Y} = 45.4774 - 0.3685x$	0.80	<.0001
Moringa	42.317 <sup>A</sup>	25.250 <sup>B</sup>	10.587 <sup>C</sup>	12.940 <sup>C</sup>	$\hat{Y} = 43.0358 - 0.8841x + 0.0062x^2$	0.92	<.0001
Girassol	42.317 <sup>A</sup>	32.377 <sup>AB</sup>	30.967 <sup>AB</sup>	34.800 <sup>B</sup>	$\hat{Y} = 42.3558 - 0.5104x + 0.0057x^2$	0.85	0.0002
Pinhão	42.317 <sup>A</sup>	28.213 <sup>B</sup>	22.743 <sup>BC</sup>	23.680 <sup>BC</sup>	$\hat{Y} = 42.4360 - 0.6567x + 0.0055x^2$	0.87	<.0001
<b><i>Produção de CO<sub>2</sub></i></b>							
Algodão	187.663 <sup>A</sup>	125.317 <sup>B</sup>	142.803 <sup>A</sup>	170.020 <sup>A</sup>	$\hat{Y} = 186.2901 - 3.0596x + 0.0409x^2$	0.68	0.0059
Mamona	187.663 <sup>A</sup>	163.927 <sup>A</sup>	94.490 <sup>B</sup>	66.060 <sup>C</sup>	$\hat{Y} = 197.26981 - 1.84626x$	0.90	<.0001
Moringa	187.663 <sup>A</sup>	117.490 <sup>B</sup>	70.223 <sup>B</sup>	97.410 <sup>BC</sup>	$\hat{Y} = 190.4031 - 3.9011x + 0.0357x^2$	0.90	<.0001
Girassol	187.663 <sup>A</sup>	147.643 <sup>AB</sup>	132.090 <sup>AB</sup>	133.160 <sup>B</sup>	$\hat{Y} = 187.9460 - 1.8305x + 0.0149x^2$	0.96	<.0001
Pinhão	187.663 <sup>A</sup>	127.557 <sup>B</sup>	99.653 <sup>B</sup>	95.067 <sup>C</sup>	$\hat{Y} = 178.77542 - 1.36774x$	0.89	<.0001

\*Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de tukey (p<0,05).



**Tabela 4** - pH dos coprodutos do biodiesel em diferentes níveis de substituição pela silagem de milho.

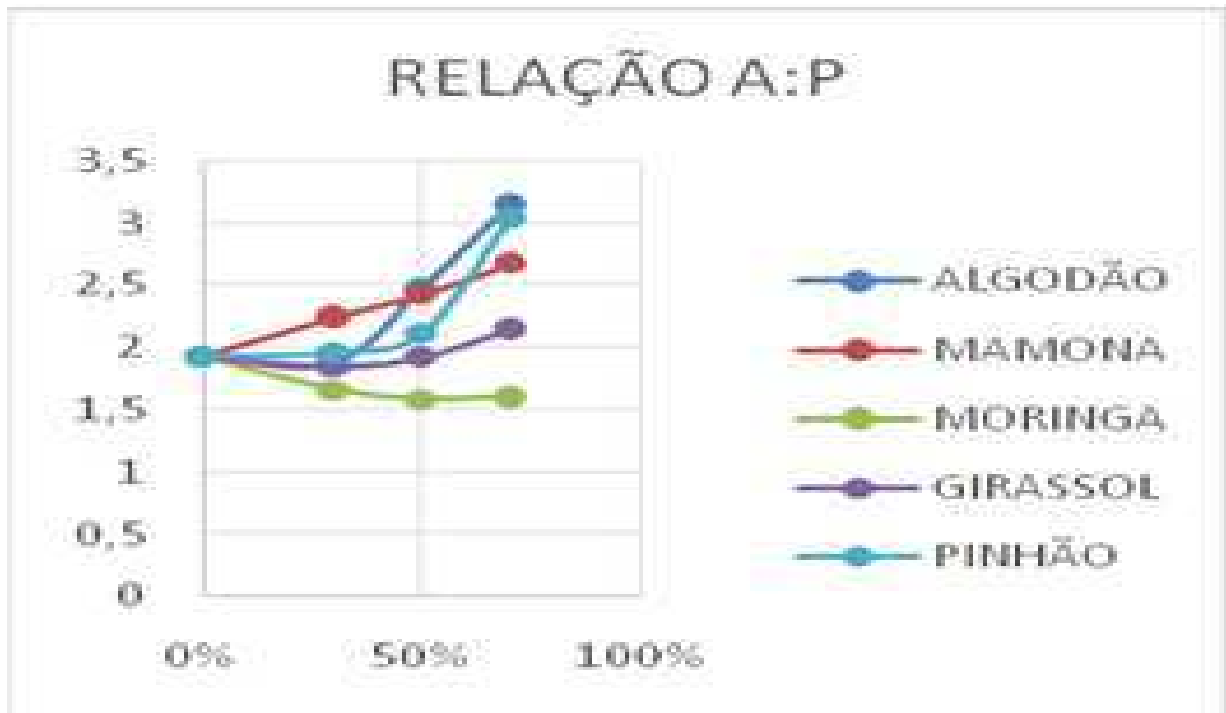
Coprodutos	Níveis de substituição				Equação de regressão	R <sup>2</sup>	P
	0%	30%	50%	70%			
Algodão	5.600 <sup>A</sup>	5.866 <sup>AB</sup>	5.866 <sup>B</sup>	5.933 <sup>B</sup>	$\hat{Y}=5.6076+0.0098x-0.0001x^2$	0.86	0.0001
Mamona	5.600 <sup>A</sup>	5.833 <sup>AB</sup>	6.000 <sup>A</sup>	6.200 <sup>A</sup>	$\hat{Y}=5.58941+0.00850x$	0.98	<.0001
Moringa	5.600 <sup>A</sup>	5.900 <sup>A</sup>	6.066 <sup>A</sup>	6.133 <sup>BA</sup>	$\hat{Y}=5.63178+0.00782x$	0.93	<.0001
Girassol	5.600 <sup>A</sup>	5.733 <sup>B</sup>	5.966 <sup>AB</sup>	6.033 <sup>B</sup>	$\hat{Y}=5.58567+0.00660x$	0.90	<.0001
Pinhão	5.600 <sup>A</sup>	5.833 <sup>AB</sup>	6.000 <sup>A</sup>	6.133 <sup>BA</sup>	$\hat{Y}=5.60312+0.00769x$	0.93	<.0001

\*Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de tukey (p<0,05).

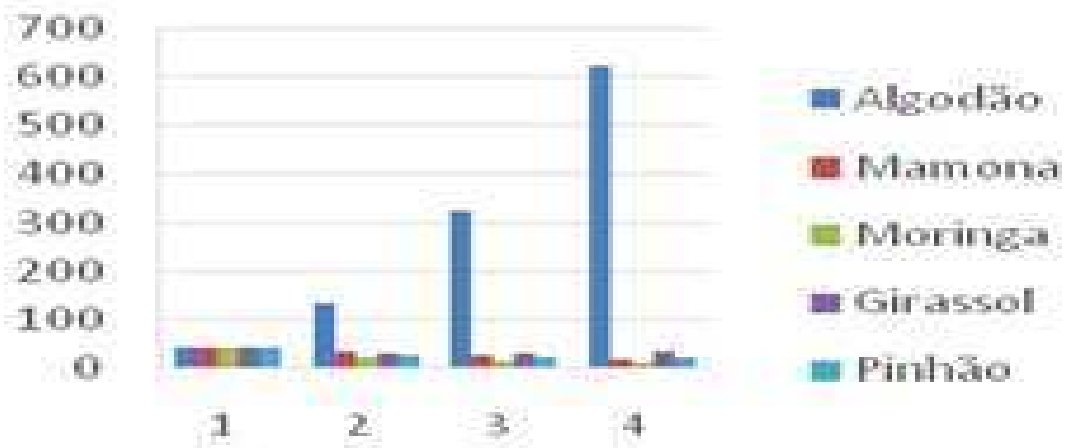
**Tabela 5** - Produção de NH<sub>3</sub>(mg/dL) dos coprodutos do biodiesel em diferentes níveis de substituição pela silagem de milho.

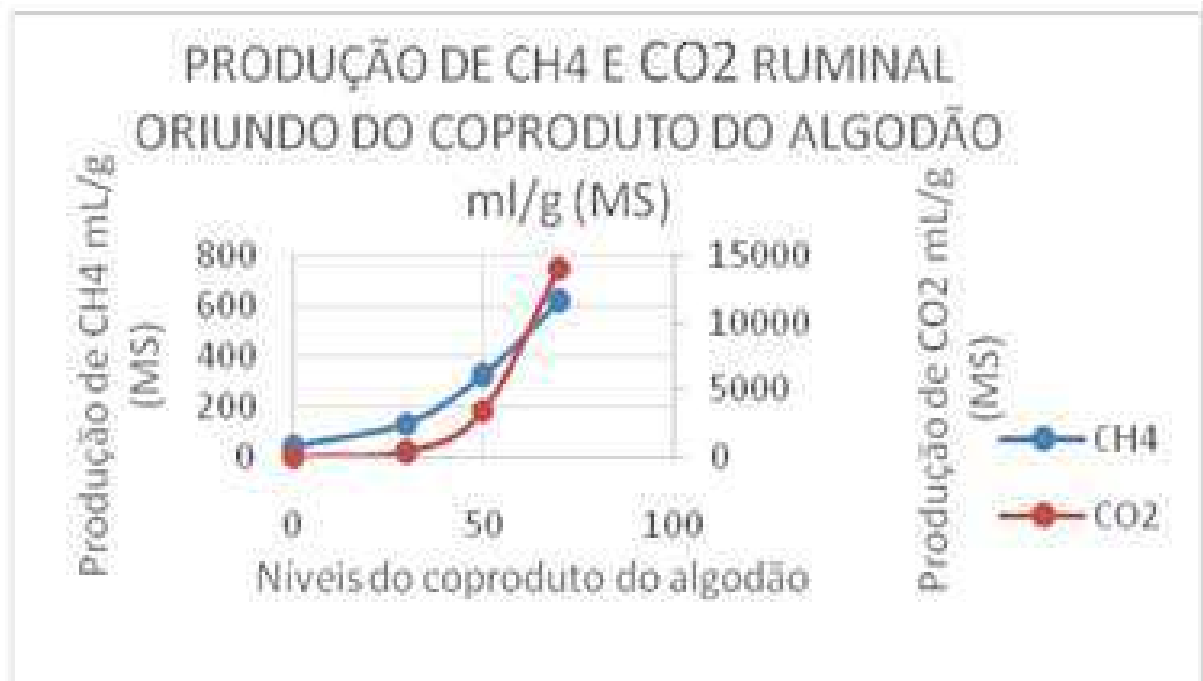
Coprodutos	Níveis de substituição				Equação de regressão	R <sup>2</sup>	P
	0%	30%	50%	70%			
Algodão	6.533 <sup>A</sup>	7.800 <sup>D</sup>	21.533 <sup>B</sup>	26.367 <sup>C</sup>	$\hat{Y}=5.8301+0.0602x+0.0036x^2$	0.90	<.0001
Mamona	6.533 <sup>A</sup>	17.267 <sup>B</sup>	19.133 <sup>BC</sup>	25.900 <sup>C</sup>	$\hat{Y}=7.30530+0.26408x$	0.94	<.0001
Moringa	6.533 <sup>A</sup>	23.100 <sup>A</sup>	24.167 <sup>BA</sup>	31.73 <sup>B</sup>	$\hat{Y}=8.55389+0.34212x$	0.91	<.0001
Girassol	6.533 <sup>A</sup>	16.333 <sup>B</sup>	25.900 <sup>A</sup>	40.833 <sup>A</sup>	$\hat{Y}=4.40935+0.47975x$	0.95	<.0001
Pinhão	6.533 <sup>A</sup>	12.667 <sup>C</sup>	15.767 <sup>C</sup>	23.367 <sup>C</sup>	$\hat{Y}=5.94081+0.23047x$	0.95	<.0001

\*Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de tukey (p<0,05).



## PRODUÇÃO DE CH<sub>4</sub> ML/G (MS)





### Lista de Legenda de Figuras

<b>Figura 1</b> – Influência da relação forragem: coprodutos sobre a relação de (Acetato: proprionato) e a produção de CH <sub>4</sub> .....	41
<b>Figura 2</b> – Influência da relação forragem: coprodutos sobre a produção de CH <sub>4</sub> .....	42
<b>Figura 3</b> - Produção de CH <sub>4</sub> e CO <sub>2</sub> do coproduto de algodão em substituição a silagem.....	43

## 7. CONCLUSÃO GERAL

Todos os coprodutos avaliados podem ser utilizados como volumoso proteico em substituição a silagem de milho, já que apresentam teor de proteína acima de 30%, destacando-se o coproduto de moringa por conter maior teor proteico e menor quantidade de fibra, além de mostra-se mais eficiente visto que promoveu maior degradabilidade com menor produção de gás total,  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$  em relação aos outros coprodutos avaliados, o que demonstra que a introdução de coproduto de moringa na dieta de ruminantes pode proporcionar uma redução na emissão de gases poluentes ao meio ambiente, e consequentemente um melhor aproveitamento de energia pelos ruminantes.

Evidenciou-se nesse estudo que é desaconselhável o uso unicamente de silagem de milho ou associada ao coproduto de algodão em vacas leiteiras por ocasionar queda brusca de pH podendo ocorrer uma acidose ruminal. Entre os níveis estudados é aconselhável o uso de até 30% de coproduto em substituição a silagem de milho para não interferir no processo de fermentação ruminal, em virtude da alta produção de  $\text{NH}_3$  desses coprodutos.

Foi observado que os diferentes potenciais para produção de  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$  estão relacionados com a composição bromatológica dos alimentos, em que ingredientes com baixos teores de fibra tendem a produzir menor quantidade de  $\text{CH}_4$ , em comparação aos ingredientes com maior teor de fibra. A Substituição desses alimentos na dieta proporcionará um menor impacto ambiental.

## **ANEXOS**



## INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences)

### Política Editorial

O periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science), ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins. Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ.

Reprodução de artigos publicados A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados. A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <[www.abmvz.org.br](http://www.abmvz.org.br)>. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis nos endereços [www.scielo.br/abmvz](http://www.scielo.br/abmvz) ou [www.abmvz.org.br](http://www.abmvz.org.br).

Orientação para tramitação de artigos f Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação online do ABMVZ no endereço [www.abmvz.org.br](http://www.abmvz.org.br). f Apenas o autor responsável pelo artigo deverá preencher a ficha de submissão, sendo necessário o cadastro do mesmo no Sistema. f Toda comunicação entre os diversos atores do processo de avaliação e publicação (autores, revisores e editores) será feita exclusivamente de forma eletrônica pelo Sistema, sendo o autor responsável pelo artigo informado, automaticamente, por e-mail, sobre qualquer mudança de status do artigo. f A submissão só se completa quando anexado o texto do artigo em Word e em pdf no campo apropriado. f Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridas no texto e também enviadas, em separado, em arquivo com extensão jpg em alta qualidade (mínimo 300dpi),

zipado, inserido no campo próprio. f Tabelas e gráficos não se enquadram no campo de arquivo zipado, devendo ser inseridas no corpo do artigo. f É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no mesmo submetido. f O ABMVZ comunicará via eletrônica a cada autor, a sua participação no artigo. Caso, pelo menos um dos autores não concorde com sua participação como autor, o artigo será recusado.

Tipos de artigos aceitos para publicação:

f Artigo científico É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa. Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências. O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas e figuras. O número de Referências não deve exceder a 30.

f Relato de caso Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada. Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências. O número de páginas não deve exceder a 10, incluindo tabelas e figuras. O número de Referências não deve exceder a 12.

f Comunicação É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico. O texto, com título em português e em inglês, Autores e Filiação deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para “Artigo científico”, embora seguindo aquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um “Abstract” e quando redigida em inglês deve conter um “Resumo”. O número de páginas não deve exceder a 8, incluindo tabelas e figuras. O número de Referências não deve exceder a 12.

Preparação dos textos para publicação Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o Webster’s Third New International Dictionary. Para ortografia em português adota-se o Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa, da Academia Brasileira de Letras.

Formatação do texto f O texto deve ser apresentado em Microsoft Word, em formato A4, com margem 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), em fonte Times New Roman tamanho 12 e em espaçamento entrelinhas 1,5, em todas as páginas, com linhas numeradas. f Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo f Título. Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 150 dígitos. f Autores e Filiação. Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. O autor para correspondência e seu e-mail devem ser indicados com asterisco. Nota: 1. o texto do artigo em Word deve conter o nome dos autores e filiação. 2. o texto do artigo em pdf não deve conter o nome dos autores e filiação. f Resumo e Abstract. Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 2000 dígitos incluindo os espaços, em um só parágrafo. Não repetir o título e incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação. Atenção especial às conclusões. f Palavras-chave e Keywords. No máximo cinco. f Introdução. Explicação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência e relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, suficientes para balizá-la. f Material e Métodos. Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Não usar subtítulos. Nos trabalhos que envolvam animais e organismos geneticamente modificados deverá constar, obrigatoriamente, o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança, quando for o caso. f Resultados. Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados. 9 Tabela. Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas. Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (menor tamanho aceito é 8).

9 Figura. Qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de

ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. As fotografias e desenhos com alta qualidade em formato jpg, devem ser também enviadas, em um arquivo zipado, no campo próprio de submissão. Nota: 9 Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências. 9 As tabelas e figuras devem preferencialmente, ser inseridas no texto no parágrafo seguinte à sua primeira citação. f Discussão. Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer das partes). f Conclusões. As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada. f Agradecimentos. Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados. f Referências. As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética. Evitar referenciar livros e teses. Dar preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. São adotadas as normas ABNT/NBR-6023 de 2002, adaptadas conforme exemplos:

Como referenciar: 1. Citações no texto f Citações no texto deverão ser feitas de acordo com ABNT/NBR 10520 de 2002. A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos: 9 autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88) 9 dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974) 9 mais de dois autores: (Ferguson et al., 1979) ou Ferguson et al. (1979) 9 mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson et al. (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson et al., 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

f Citação de citação. Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão citado por e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

f Comunicação pessoal. Não fazem parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores et al.): ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. Am. J. Vet. Res., v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. Not. Med. Vet., n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores et al.): DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. Anais... São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Univer: Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores et al.): QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Nota: f Artigos que não estejam rigorosamente dentro das normas acima não serão aceitos para avaliação. f O Sistema reconhece, automaticamente, como “Desistência do Autor” artigos em diligência ou “Aguardando diligência do autor”, que não tenha sido respondido no prazo dado pelo Sistema.

Taxas de submissão e de publicação: f Taxa de submissão. A taxa de submissão de R\$30,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal. Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados. Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor. f Taxa de publicação. A taxa de publicação de R\$70,00, por página impressa em preto e R\$220,00 por página impressa em cores será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal.

Recursos e diligências: f No caso de o autor encaminhar resposta a diligências solicitadas pelo ABMVZ, ou documento de recurso, o mesmo deverá constar como a(s) primeira(s) página(s) do texto do artigo somente na versão em Word. f No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso, o mesmo deve ser feito pelo e-mail [abmvz.artigo@abmvz.org.br](mailto:abmvz.artigo@abmvz.org.br).

## Manuscript Submission - Guide for Authors Asian Australasian

- 1) Manuscripts must be prepared in double space with Times New Roman font (size 10) and submitted via on-line system([www.ajas.info](http://www.ajas.info)). All pages should be numbered consecutively in the top right hand corner, beginning with the title page.
- 2) The lines on all pages, including those pages for REFERENCES and figure-legends, must be numbered consecutively in the left margin, beginning with number one at the top of the title page. A 2.5 cm margin on both sides of the page is desirable. The type should be large enough to be easily read (i.e. a font size of at least 10 points).
- 3) Tables, typed double-spaced, should be as few and as simple as is feasible. Each table should be on a separate sheet. Weights and measures must be expressed in the metric system and temperatures in the celsius (centigrade) scale.
- 4) The legends for figures should be typed on a separate sheet. Photographs should be carefully prepared so that clear image can be printed. Use large letters and numbers, especially for figures that are to be published in one column in the journal.
- 5) Manuscripts will be edited in the order received and accepted papers will be published in the order submitted if at all possible.
- 6) Authors whose native language is not English are strongly encouraged to have their papers proof read, prior to submission, to improve the English content of their paper.
- 7) It is important to indicate in the text that the protocol for the animal research has been approved by a suitably constituted ethics committee of the institute. Refer to the provisions of the Declaration of Helsinki (as revised in Seoul, 2008), available at WMA Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. AJAS retains the right to reject any manuscript on the basis of unethical conduct of animal studies.
- 8) Authors must declare, if any, financial support or relationships that may pose conflict of interest.

### 1) TITLE

### PAGE

The first page of each manuscript starts with the title of the paper which should be typed in bold-faced print using both upper and lower case letters and set in the center of the page. Although the title should be as brief as possible, include the species involved in the research when applicable. Abbreviations are not permitted in the title. The names of the authors follow and you may choose to use either initials (first and middle) or full name(s) and last name but you should be consistent and use the same format for all authors. Indications of professorial rank or other professional titles should not be used. Naming an author on a paper implies that the person named is aware of the research reported and agrees with and accepts responsibility for any results or conclusions reported. The address of the institution where the research was conducted follows and the address should include the name of the institution, city, country and zip code. This should be typed on as few lines as possible using upper and lower case letters. When a paper has several authors from different institutions, key the author to the address with superscript Arabic numerals and present the additional addresses as footnotes at the bottom of the page. Addresses for reprints

and changes of address should also be given as footnotes and should be keyed using the same number system as for addresses. Footnotes on the first page and other text pages are referenced sequentially by superscript numbers. A running head (an abbreviated title consisting of no more than 45 characters plus spaces) should also appear centered on the title page. Also include the phone number, fax number, and E-mail address of the contact author on the title page.

2) **ABSTRACT**

The abstract, consisting of no more than 400 words, appears on a separate page following the title page. The word ABSTRACT (aligned with the left margin) is printed in bold face print using capital letters and should be followed by a colon. The text of the abstract should start on the same line immediately following the colon. The abstract should summarize pertinent results in a brief but understandable form. The abstract should start with a clear statement of the objectives of the experiment and must conclude with one or two sentences that highlight important conclusions. References are never cited in the abstract. Abbreviations that appear in the abstract that are not included in the standard abbreviation listing found in each issue of AJAS must be defined before they are first used.

3) **KEY**

**WORDS**

At the end of the abstract, list up to six key words that best describe the nature of the research. The term "Key Words" is typed in bold-faced print followed by a colon. The first letter of each key word is capitalized and key words are separated by commas. The entire line should be centered on the page and surrounded by brackets. Key words should include the species, variables tested, and the major response criteria. Key words must be selected from the most recent issues of the CAB Thesaurus (available from C.A.B. International, 845 North Park Avenue, Tucson, AZ 85719; Telephone: 800-528-4841.) American spelling of words is used. Key words form the basis for the subject index, which is published in the last issue of each volume of AJAS. Because major words in the title are not used in the subject index, appropriate words from the title (or synonyms) should be listed as key words.

4) **HEADINGS**

Major headings (INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION [or RESULTS AND DISCUSSION], and REFERENCES) are centered and appear in roman type, with the entire heading capitalized using bold-faced type. Major headings of review papers or papers from symposia may deviate from this standard format; however, all papers must contain an abstract, key words, and an introduction. Abbreviations should be avoided in headings.

First subheadings appear at the left margin on a separate line in bold-faced print and are not followed by punctuation. Only the first word is capitalized. First subheadings are used when subsections below major headings consist of several paragraphs, especially if some or all of the paragraphs begin with a second subheading. Second subheadings appear at the beginning of the first line of a paragraph. They are italicized and followed by a period. They do not require labeling (a, b, c, etc.). Second subheadings may be used with or without first subheadings; generally second subheadings introduce sections three to four paragraphs in length or longer sections below a first subheading.

5) **INTRODUCTION**

The introduction starts on a new page following the abstract. The introduction briefly justifies the research and specifies the hypotheses to be tested. Extensive discussion of relevant literature should be included in the discussion of results, not in the introduction. To minimize length and avoid redundancy, generally no more than three references should be cited to support a specific concept.

6) **MATERIALS AND METHODS**

- (1) General: A clear description or specific original reference is required for all biological, analytical, and statistical procedures used in the experiment. All modifications of procedures must be explained. Diets, animals (breed, sex, age, body weight, and weighing conditions [i.e., with or without restriction of feed and (or) water]), surgical techniques, measurements, and statistical models should be described clearly and fully. Brand names and company names and locations for all substances and equipment referred to in the text should be included in parentheses within the text, not in footnotes.
- (2) Statistics: Biology should be emphasized, but the use of incorrect or inadequate statistical methods to analyze and interpret biological data is not acceptable. Consultation with a statistician is recommended. Statistical methods commonly used in the animal sciences need not be described in detail, but adequate references should be provided. The statistical model, classes, blocks, and experimental unit must be designated. Any restrictions used in estimating parameters should be defined. Reference to a statistical package without reporting the sources of variation (classes) and other salient features of the analysis, such as covariance or orthogonal contrasts, is not sufficient. A statement of the results of statistical analysis should justify the interpretations and conclusions. When possible, results of similar experiments should be pooled statistically. Do not report a number of similar experiments separately.

## 7) RESULTS

Results (may be combined with discussion) should be presented in tabular form when feasible. The text should explain or elaborate on the tabular data, but numbers should not be repeated extensively within the text. Sufficient data, all with some index of variation attached, should be presented to allow the reader to interpret the results of the experiment.

## 8) DISCUSSION

The discussion (may be combined with results) should interpret the results clearly and concisely in terms of biological mechanisms and should integrate literature results with the research findings to provide the reader with a broad base on which to accept or reject the hypotheses tested. Results and references to tables and figures already described in the RESULTS section should not be repeated in the DISCUSSION section.

## 9) IMPLICATIONS

**(Optional)**

This section, consisting of no more than 1,000 characters plus spaces in one paragraph, follows the discussion and should explain in lay terms, without abbreviations, acronyms, or citations, what the findings of this research imply for animal production and (or) biology. Though some speculation is permitted, this section should also caution the reader against over extrapolation of results. For manuscripts with direct applications, this section will consist of an interpretive summary. If results have no implications, this should be stated.

## 10) REFERENCES

The Harvard (author, date) system of referencing is used (examples are given below).

- (1) Reference citations in the text: Black (1971) or (Black, 1971); Dickerson et al. (1974) or (Dickerson et al., 1974); Smith and Jones (1977) or (Smith and Jones, 1977).
- (2) Groups of references cited in a sentence in the text must be listed in chronological order as in the previous sentence.
- (3) REFERENCES lists should be typed in alphabetical order.
- (4) Refrain from citing unnecessary references. Less than 30 references are recommended.

Samples of reference citations.

### **Standard Journal Articles:**

JJensen, M. S., S. K. Jensen and K. Jakobsen. 1997. Development of digestive enzymes in pigs with emphasis on lipolytic activity in the stomach and pancreas. *J. Anim. Sci.*

75:437-445.

Jin, C. F., J. H. Kim, H. K. Moon, W. T. Cho, Y. K. Han and I. K. Han. 1998a. Effects of various carbohydrate sources on the growth performance and nutrient utilization in pigs weaned at 21 days of age. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 11:285-292.

Jin, C. F., J. H. Kim, I. K. Han, H. J. Jung and C. H. Kwon. 1998b. Effects of various fat sources and lecithin on the growth performance and nutrient utilization in pigs weaned at 21 days of age. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 11:176-184.

**Journal Article with a Subtitle :**

Ackerson, R. C. 1981. Osmoregulation in cotton in response to water stress: 1. Alterations in photosynthesis, translocation and ultrastructure. *Plant Physiol.* 67:484-488.

**Online article not yet published in an issue :**

An online article that has not yet been published in an issue can be cited by its Digital Object Identifier (DOI).

Devendra C. 2013. Investments on Pro-poor Development Projects on Goats: Ensuring Success for Improved Livelihoods. *Asian Australas. J. Anim. Sci.*, 2013 <http://dx.doi.org/10.5713/ajas.2013.r.01>

**Citation from web sites :**

Sample size calculation. Grapentine Co. Inc. <http://www.grapentine.com/calculator.htm>. Accessed December 6, 2005

**Abstracts and Supplements :**

Mahan, D. C., E. M. Weaver and L. E. Russell. 1996. Improved postweaning pig performance by adding NaCl or HCl to diets containing animal plasma. *J. Anim. Sci.* 74(Suppl. 1):58(Abstr.).

Smith, J. W., M. D. Tokach, R. D. Goodband, J. L. Nelssen, W. B. Nessmith, K. Q. Owen and B. T. Richert. 1995. The effect of increasing zinc oxide supplementation on starter pig growth performance. *J. Anim. Sci.* 73(Suppl. 1):72(Abstr.).

**Journal Article Accepted but not yet Published :**

Li, D. F., J. L. Nelssen, P. G. Reddy, F. Bleccha, R. D. Klemm, D. W. Giesting, J. D. Hancock, G. L. Allee and R. D. Goodband. 1999. Measuring suitability of soybean products for early-weaned pigs with immunological criteria. *J. Anim. Sci.* (In press).

**Standard Book :**

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th edn. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia.

National Research Council. 1998. Nutrient Requirements of Swine. 10th Ed. National Academy Press, Washington, DC.

SAS Institute Inc. 1989. SAS/STAT User's Guide: Version 6. 4th edn. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina.

Snedecor, G. W. and W. C. Cochran. 1989. Statistical Methods. 8th Ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa.

Steel, R. G. D. and J. H. Torrie. 1980. Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach. 2nd edn. McGraw-Hill Book Company, New York, New York.

**Chapter in an Edited Book :**

Cranwell, P. D. and P. J. Moughan. 1989. Biological limitations imposed by the digestive



system to the growth performance of weaner pigs. In: Manipulating Pig Production II (Ed. J. L. Barnett and D. P. Hennessy). Australasian Pig Science Association, Werribee, Australia. pp. 140-159.

Cromwell, G. L. 1991. Antimicrobial agents. In: Swine Nutrition (Ed. E. R. Miller, D. E. Ullrey and A. J. Lewis). Butterworth-Heinemann, Stoneham, Massachusetts. pp. 297-314.

Mayes, P. A. 1990. Digestion and absorption. In: Harpers Biochemistry, 22nd Ed. (Ed. R. K. Murray, D. K. Granner, P. A. Mayes and V. W. Rodwell). Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut. pp. 580-590.

#### **Thesis :**

Thacker, P. A. 1981. Effects of Dietary Propionate on Lipid Metabolism in Growing Swine. Ph.D. Thesis, University of Alberta, Edmonton, Alberta.

Trottier, N. L. 1995. Protein Metabolism for the Lactating Sow. Ph.D. Thesis, University of Illinois, Urbana, Illinois.

#### **Conference Proceedings :**

Goodband, R. D., M. D. Tokach, S. S. Dritz and J. L. Nelssen. 1995. Practical nutrition for the segregated early weaned pig. In: Proceedings of the 1995 Saskatchewan Pork Industry Symposium, Saskatoon, Saskatchewan. pp. 15-22.

Shurson, J., L. Johnston, J. E. Pettigrew and J. Hawton. 1995. Nutrition and the early weaned pig. Proceedings of the Manitoba Swine Seminar. Vol. 9:21-32.

#### **Research Reports etc .:**

Lutz, T. L. and T. S. Stahly. 1996. Dietary folic acid needs of high lean growth pigs. Iowa State University 1997 Swine Research Report. pp. 4-6. Unpublished Memos, Letters, Personal Communications (Cited in Text Only) (L. G. Campbell, pers. comm., University of Saskatchewan, Saskatoon, SK). (A. J. Smith, unpubl. data).

### **11) TABLES**

Tables are used to present numerical data in a self-explanatory manner. They should be intelligible without consulting the text and should not duplicate data already given in the text or in illustrations. Any abbreviation used in a table must be defined in that table. Tables should be typed double-spaced with each table on a separate sheet. Place tables immediately after the list of figure legends or references if there are no figures. Paginate the tables in series with the text.

All tables should be cited in the text. Arabic numerals are used to number tables. The table number (i.e. Table 4.) is typed in bold face followed by a period. The title of the table continues on the same line with only the first letter capitalized. Do not use a period at the end of the title. Column headings should have the first letter of each word capitalized while the names of variables are typed with only the first letter capitalized (i.e. Average daily gain).

For numerals less than 1, insert a zero to the left of the decimal point (columns should be set up so that decimal points are aligned if possible). If there are no data for a particular entry, insert a dash. If an explanation is necessary, use an abbreviation in the body of the table (e.g. ND) and explain clearly in footnotes what the abbreviation means. Care should be taken to ensure that greater accuracy is not implied in the table than is possible from a particular analysis and only significant figures should be used. It is exceedingly rare where accuracy greater than two decimal places is obtained.

References to footnotes in a table are specified by superscript numbers, independently for each table. Superscript letters are used to designate statistical significance. Use a lower case p to indicate probability values (i.e. p0.05).

Presentation of pooled standard errors, the general basis for statistical comparisons of means is recommended when variance is homogeneous. These should be presented in a separate column or row. Standard errors can be attached to each mean by  $\pm$  signs when variance or SE are heterogeneous (e.g. unbalanced experiments or unequal numbers of observation treatment means). The pooled standard error is the preferred estimate of experimental error because presenting individual standard errors tends to clutter up the table.

For diet composition, present major ingredient inclusion levels as a percentage of the total rather than in g/kg of diet.

## 12) FIGURES

Figures should be placed at the end of the manuscript with each figure placed on a separate page. Figure legends should be typed (double spaced) on a separate page.

Prepare figures to fit one column (8cm wide), or full-page width (17 cm wide). A minimum type size of 8 points (Times New Roman) is recommended so as to be readable at final publication size.

For multiple lines tables, please use solid, long-dash, short-dash, and dotted lines, and avoid gray or shaded lines as these will not reproduce well. Lines with different symbols for the data points may also be used to distinguish curves. Also remove unnecessary backgrounds and grid lines from graphs. Each axis should have a description and a unit.

For bar charts, please use different fill patterns if needed (black, white, gray, and stripes). Identify curves and data points using the following symbols ( $\bullet$ ,  $\circ$ ,  $\blacksquare$ ,  $\square$ ,  $\blacklozenge$ ,  $\diamond$ ,  $\blacktriangle$ ,  $\triangle$ ,  $+$ , and  $\times$ ). Symbols should be defined in the figure legend or in a key on the figure.

Preferred format for figures are Word, EPS, JPEG, PDF, and TIFF. If figures are to be reproduced in grayscale (black and white), submit in grayscale. If figures are to appear in color in the print journal, files must be submitted in CMYK color (not RGB). Minimum resolution is 300 dpi for color and grayscale figures and 600 dpi for line art.

Photomicrographs must have their unmagnified size designated either in the caption or with a scale bar on the figure. Reduction for publication can make a magnification power designation (e.g.,  $\times 100\times$ ) inappropriate.

Prepare legend to provide sufficient information and all abbreviations and symbols used in the figure should be defined in the legend.

## 13) USE OF NUMBERS

Follow the rules given below for writing numbers:

- (1) In general, spell out numbers one through nine and use numerals for 10 and above.
- (2) Use Arabic numerals with abbreviated units of measure: 2 g, 5 d, \$4.00, 3% and numerical designations in the text: exp 1, group 3, etc.
- (3) Use Arabic numerals to express time and date: 08:00 h, 3 Sept. 1985, etc.
- (4) In a series using some numbers less than 10 and some more than 10 use numerals for all (i.e. 2 Holsteins, 6 Charolais and 15 Friesians).
- (5) When writing a large number ending in several zeros, use a word for part of the number (i.e. 1.8 million rather than 1,800,000).
- (6) When two numbers appear adjacent to each other, spell out the first (i.e. ten 2-d-old chicks rather than 10 2-d-old chicks).
- (7) Do not begin a sentence with a numeral. Spell it out or rearrange the sentence.
- (8) Use the 24-h clock system: 09:30, 13:40 h, etc. Give day length in quantitative hours (e.g. 2 h 16 min). Abbreviate the terms hour (h), minute (min) second (s) and year (yr) when used with a number in the text but spell them out when they are used alone.
- (9) Do not use a hyphen to indicate inclusiveness (e.g. use 12 to 14 mg or wk 3 and 4 not 12-14 mg or wk 3-4).