

**RESPOSTA DE VACAS LEITEIRAS À
SUBSTITUIÇÃO DE MILHO POR
GLICERINA BRUTA**

OZANA DE FÁTIMA ZACARONI

2010

OZANA DE FÁTIMA ZACARONI

**RESPOSTA DE VACAS LEITEIRAS À SUBSTITUIÇÃO DE MILHO
POR GLICERINA BRUTA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador
Prof. Marcos Neves Pereira

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Zacaroni, Ozana de Fátima.

Resposta de vacas leiteiras à substituição de milho por glicerina
bruta / Ozana de Fátima Zacaroni. – Lavras: UFLA, 2010.

43 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Marcos Neves Pereira.

Bibliografia.

1. Bovino leiteiro. 2. Glicerol . 3. Nutrição animal. 4. Resíduo de
biodiesel. 5. Desempenho. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 636.2142

OZANA DE FÁTIMA ZACARONI

**RESPOSTA DE VACAS LEITEIRAS À SUBSTITUIÇÃO DE MILHO
POR GLICERINA BRUTA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 23 de fevereiro de 2010

Prof. José Cleto da Silva Filho	UFLA
Renata Apocalypse Nogueira Pereira	EPAMIG
Profa. Sueli de Fátima Costa	UFLA

Prof. Marcos Neves Pereira
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

Aos meus pais, Israel e Aparecida,
Ao meu irmão, Israel,
A minha irmã, Ana Beatriz, e
Ao meu namorado, João Lincoln,
DEDICO.

“Para aqueles que acreditaram em mim quando eu não mais acreditava em mim
mesmo,
Para aqueles que com seu sorriso removeram a sombra do meu rosto,
Para aqueles que trocaram, sem regatear, sua alegria sincera pelos meus pesares,
Para aqueles cujo amor e cujo riso me deram asas e um céu azul para voar,
Para aqueles por quem minha gratidão será sempre pequena, nesta vida ou na
próxima
Para meus amigos”,
OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado forças para mudar o que poderia ser mudado.

Ao meu namorado, João Lincoln por fazer parte da minha vida e pelo incentivo e apoio na realização deste curso.

À minha mãe, Aparecida por me ter ensinado a ser guerreira.

Ao meu orientador, professor Marcos Neves Pereira, pela competência com que desempenha a orientação e pelo exemplo profissional.

À minha amiga, Renata, pela atenção, carinho, pela disponibilidade em ajudar e principalmente por ser meu modelo.

À Fazenda São Francisco, pela acolhida e por tornar possível a realização deste trabalho, principalmente Renata e Kiko, e os funcionários César, Daniel e Alexandre que sempre, com disponibilidade e atenção ajudaram na condução do experimento.

Ao Grupo do Leite, pela ajuda indispensável na condução do experimento, pois, sem o Grupo seria impossível a realização do mesmo, em especial os bolsistas, Gilson, Naína e Sancho, que sempre gentilmente ajudaram nos tratamentos, ordenhas e coletas.

Ao Zé Ricardo, por todo o tempo, atenção e paciência gastas na análise estatística dos dados e pela alegria de viver.

Ao Flávio Junqueira e Gustavo Andrade, pela amizade e apoio nos momentos difíceis.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Medicina Veterinária por permitir a realização deste curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Nutron Alimentos, pelo financiamento deste projeto.

Aos colegas de pós-graduação, Gilson, Leandra, Luciene, Nilson e Sancho, pela convivência, amizade e ajuda no experimento, no laboratório e formatação dos dados.

Às vacas Alegria, Aloha, Anete, Aranda, Áurea, Bambina, Beauty, Celebridade, Chuva, Elaine, Emma, Farra, Flora, Lorena, Mara, Melody, Névoa e Sayonara que mesmo sem saber, doaram parte de suas vidas para meu aprendizado.

A todos as pessoas que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	I
ABSTRACT	III
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Obtenção de biodiesel e glicerina	3
2.2 Glicerina na alimentação animal.....	5
2.2.1 Glicerina para gado jovem.....	5
2.2.2 Glicerina para vacas periparturientes.....	7
2.2.3 Glicerina para vacas em lactação.....	10
2.3 Absorção e metabolismo intermediário do glicerol	13
2.4 Metabolismo do glicerol no rúmen.....	15
2.5 Intoxicação por metanol.....	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5 CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

RESUMO

ZACARONI, Ozana de Fátima. **Resposta de vacas leiteiras à substituição de milho por glicerina bruta** 2010. 43 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A resposta de vacas leiteiras à substituição total de milho maduro finamente moído por glicerina bruta foi avaliada. Dezoito vacas Holandesas formaram seis grupos de três animais com base na ordem de parto e produção diária de leite. Um grupo foi formado por primíparas. Dentro de cada grupo, as vacas foram aleatoriamente alocadas a uma sequência de três tratamentos em Quadrados Latinos 3×3 com períodos de 28 dias. As vacas foram alimentadas individualmente com dieta completa. Os tratamentos foram: Dieta basal (Controle), dieta basal acrescida de um aditivo em teste, ou substituição de milho no Controle por mistura isoprotéica de glicerina bruta e farelo de soja (Glicerina). Apenas o contraste Controle vs. Glicerina será discutido. A conteúdo dietética de glicerina bruta foi 12,3% da matéria seca e o teor de milho no Controle foi 14,8%. A glicerina bruta continha 6,3% de umidade, 76,2% de glicerol e 8800 ppm de metanol na matéria natural. A substituição de amido de milho por glicerina bruta deprimiu a produção diária de leite de 23,4 para 21,3 kg ($P=0,02$), sem afetar o consumo ($P=0,85$), resultando em queda na eficiência alimentar ($P=0,01$). A secreção diária de lactose foi menor na Glicerina ($P=0,01$), havendo também tendência fraca de queda na secreção láctea de proteína ($P=0,13$). A concentração plasmática de glicose foi menor na Glicerina ($P=0,03$). Na Glicerina houve aumento na proporção molar e no teor de butirato no fluido ruminal ($P<0,05$) e queda na proporção de acetato ($P=0,01$), sem afetar a de propionato ($P=0,18$), resultando em queda na relação entre acetato e propionato ($P=0,04$). O consumo de matéria orgânica digestível (CMOD) não diferiu ($P=0,29$), apesar da digestibilidade aparente da matéria orgânica no trato digestivo total ter sido maior na Glicerina ($P=0,02$). Houve queda na relação entre a secreção diária de energia no leite e o CMOD na Glicerina ($P=0,01$). Não houve evidência de mudança na síntese relativa de proteína microbiana estimada pela excreção diária de alantoína na urina ($P=0,87$) ou na eficiência de síntese microbiana estimada pela relação entre a alantoína excretada e o CMOD ($P=0,64$). A ingestão por unidade de tempo foi maior na Glicerina ($P=0,03$), o tempo de ruminação não diferiu ($P=0,36$). A substituição total de milho por glicerina bruta reeduzir a produção de leite e a eficiência alimentar, menor

* Comitê Orientador: Marcos Neves Pereira – UFLA (Orientador), Nadja Gomes Alves – UFLA e Renata Apocalypse Nogueira Pereira – EPAMIG.

disponibilidade de glicose para síntese mamária de lactose foi um mecanismo plausível na resposta.

ABSTRACT

ZACARONI, Ozana de Fátima. **Response of dairy cows to the replacement of corn by crude glycerin**. 2010. 43 p. Dissertation (Master in Veterinary Science) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

The response of dairy cows to the total replacement of finely ground mature corn by crude glycerin was evaluated. Eighteen Holstein cows formed six groups of three animals based on parity and milk yield. One group was formed by primiparous. Within each group, cows were randomly assigned to a sequence of three treatments in 3x3 Latin Squares with 28-day periods. Cows were individually fed on total mixed rations. Treatments were: Basal diet (Control), basal diet added of an additive in test, or replacement of corn in Control by an isoproteic mixture of crude glycerin and soybean meal (Glycerin). Only the contrast Control vs. Glycerin will be discussed. The dietary content of crude glycerin was 12.3% of dry matter and the content of corn in Control was 14.8%. The crude glycerin contained 6.3% moisture, 76.2% of glycerol, and 8800 ppm of methanol on an as fed basis. The replacement of corn starch by crude glycerin decreased daily milk yield from 23.4 to 21.3 kg ($P=0.02$), without affecting intake ($P=0.85$), resulting in lowered feed efficiency ($P=0.01$). The daily secretion of lactose was reduced on Glycerin ($P=0.01$), and there was a weak trend for decreased milk protein secretion ($P=0.13$). Plasma glucose concentration was smaller on Glycerin ($P=0.03$). Glycerin increased rumen fluid molar proportion and content of butyrate ($P<0.05$), and decreased the proportion of acetate ($P=0.01$), without affecting propionate ($P=0.18$), resulting in lowered acetate to propionate ratio ($P=0.04$). Intake of digestible organic matter (IDOM) did not differ ($P=0.29$), although total tract apparent digestibility of organic matter was greater on Glycerin ($P=0.02$). There was a decreased ratio of daily milk energy secretion to IDOM on Glycerin ($P=0.01$). There was no evidence for a change in the relative synthesis of rumen microbial protein estimated by the daily excretion of urinary allantoin ($P=0.87$), or in the efficiency of microbial synthesis estimated by the ratio of excreted allantoin to IDOM ($P=0.64$). Ingestion per unit of time was greater on Glycerin ($P=0.03$), rumination time did not differ ($P=0.64$). The total replacement of corn by crude glycerin reduced milk yield and feed efficiency, decreased glucose availability

* Guidance Committee: Prof. Marcos Neves Pereira – UFLA (Major professor), Prof. Nadja Gomes Alves – UFLA and Renata Apocalypse Nogueira Pereira – EPAMIG.

for the mammary synthesis of lactose was a plausible mechanism for the response.

1 INTRODUÇÃO

A União Europeia produz anualmente cerca de 1,35 milhões de toneladas de biodiesel a partir de gordura, o que adicionado à produção do Brasil e dos Estados Unidos representa cerca de 90% da produção mundial (Buainain, 2008). O Brasil está entre os maiores produtores e consumidores de biodiesel do mundo, com uma produção anual em 2009, de 1,6 bilhões de litros (ANP, 2010). A expectativa do Ministério de Minas e Energia é que a produção de biodiesel seja suficiente para substituir 5% do óleo diesel consumido no país, gerando uma necessidade anual ao redor de 3,3 bilhões de litros (Biodieselbr, 2009).

Pelas técnicas atualmente utilizadas, cada litro de biodiesel produzido gera aproximadamente 79 g do subproduto glicerina bruta, contendo quantidades variáveis de glicerol, catalizador, sabões, água e álcool, normalmente metanol (Thompson & He, 2006). Apesar de a glicerina purificada ser um composto valioso industrialmente, a purificação pode ser antieconômica e insuficiente para consumir o crescimento projetado na produção mundial de glicerina de biodiesel. O uso de glicerina bruta na alimentação animal pode ser uma maneira de aumentar a eficiência biológica e financeira da produção de biodiesel.

O glicerol é um composto tricarbóxico de alto conteúdo energético, sendo um eventual substituto de milho e outros concentrados energéticos ricos em carboidratos não-fibrosos na alimentação animal (DeFrain et al., 2004; Seller, 2008; Donkin et al., 2009). O glicerol é um substrato fermentável no rúmen (Remond et al., 1993; Bergner et al., 1995) e um precursor gliconeogênico via metabolismo hepático (Lin, 1977). O uso de glicerol na prevenção e tratamento de cetose em vacas leiteiras é conhecido de longa data (Johnson et al., 1955; Goff & Horst, 2001), entretanto existe pouca informação sobre a utilização de glicerina bruta na dieta de ruminantes, especialmente em altas inclusões dietéticas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta em desempenho e digestibilidade de vacas leiteiras à substituição total de milho maduro finamente moído por glicerina bruta.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Obtenção de biodiesel e glicerina

A denominação biodiesel pode ser utilizada para qualquer combustível obtido a partir de fonte renovável, de origem animal ou vegetal, que substitua o óleo de petróleo nos motores de ciclo diesel (Feliciano Filho & Pereira Júnior, 2007). O biodiesel é obtido de quatro formas clássicas a partir de triglicerídeos: Uso direto de óleos vegetais, microemulsões, craqueamento térmico (pirólise) ou transesterificação (Ma & Hanna, 1999), sendo a última técnica a mais utilizada.

A transesterificação ou alcoólise é uma reação reversível, na qual triglicerídeos provenientes de óleos vegetais ou gorduras animais reagem com álcool, gerando o biodiesel composto por uma mistura de ésteres, e a glicerina, rica em glicerol (Geris et al., 2007). Como a reação é reversível, o álcool é adicionado em excesso para deslocar a reação no sentido dos produtos. Os alcoóis utilizados são o metanol, etanol, propanol ou butanol, sendo os dois primeiros os mais frequentes. O metanol é mais eficiente relativamente aos demais alcoóis por apresentar menor tempo de reação, menor consumo de eletricidade, por utilizar menos equipamentos para sua fabricação e por ser mais barato. Os ésteres metílicos são também mais facilmente separáveis da glicerina.

A reação de transesterificação pode ser catalisada por ácido, base ou enzima (Fukuda et al., 2001). Os catalisadores utilizados são os ácidos sulfúrico e sulfônico, as bases NaOH, KOH, carbonatos e alcóxidos ou as enzimas lipases. A catálise mais usada é a alcalina, por apresentar a maior eficiência de conversão dos óleos em metil ésteres e por ocorrer mais rapidamente que as catálises ácida ou enzimática.

A mistura de ésteres é separada da glicerina por centrifugação ou em tanque de separação. As soluções resultantes são então purificadas, gerando uma glicerina rica em glicerol e contaminantes como sabões, álcool e catalisadores

(Feliciano Filho & Pereira Júnior, 2007). Durante a purificação o excesso de álcool é removido da glicerina e da mistura ésteres, e à solução de glicerina são adicionados ácidos para transformar os sabões em ácidos graxos livres e para neutralizar o excesso de bases catalizadoras. O produto resultante da purificação é a glicerina bruta, também denominada glicerina loira, que pode ser submetida a outros processos de purificação para venda como glicerina bidestilada, livre de contaminantes e mais valorizada no mercado. Cinquenta litros de biodiesel resultam em aproximadamente 5 kg de glicerina bruta com diferentes concentrações de glicerol, catalisadores, sais e metanol (Thompson & He, 2006).

Glicerina é o nome comercial de um líquido viscoso, incolor, inodoro, higroscópico e com sabor adocicado, quimicamente definido como glicerol, ou propano-1,2,3-triol de fórmula $C_3H_5(OH)_3$ (IUPAC, 1993). O termo é muito utilizado na literatura como sinônimo de glicerol, apesar da glicerina ser composta por proporções variáveis de glicerol e outros compostos. Quanto maior o conteúdo em glicerol, mais pura é a glicerina, e maior o valor comercial. A glicerina purificada, contendo mais de 99% de glicerol, tem várias aplicações, tais como: Emulsificante, amaciante, plastificante, estabilizante e umectante em pães, sorvetes e tabaco; em loções para a pele; em preparações cosméticas e farmacêuticas; como meio de proteção para congelamento de células sanguíneas, esperma, córneas e outros tecidos; em tintas de impressão, gomas e resinas em tintas e revestimento; como anti-congelante e como matéria-prima para nitroglicerina (Trigo et al., 2008).

De acordo com o relatado na literatura existe grande variação na composição da glicerina bruta, o conteúdo de glicerol pode variar de 30,5 (Paige, 2009) a 90% (Potu et al., 2009). Já o conteúdo de metanol em amostras de glicerina bruta nos Estados Unidos variou de 100 ppm a 11500 ppm (Dasari, 2007). O teor de matéria seca pode variar de 70 (Shin et al., 2009) a 94% (Paige, 2009). Hansen et al. (2009) caracterizaram onze amostras de glicerina bruta

oriundas de sete plantas diferentes na Austrália e encontraram que o conteúdo de glicerol variou de 38,4 a 96,5%, e o de metanol variou de <0,01 a 13,94%, o teor de matéria seca (MS) entre 83,9 a 100%.

2.2 Glicerina na alimentação animal

A glicerina purificada é um ingrediente seguro para alimentação animal, diferentemente da glicerina bruta rica em contaminantes, dentre eles o metanol. A toxidez do metanol para animais já foi relatada na literatura (Nie et al., 2007), mas a susceptibilidade de bovinos precisa ser definida. O FDA (Food and Drug Administration) nos EUA considera que glicerina com mais de 150 ppm de metanol é insegura para alimentação animal, enquanto o governo alemão definiu como limite máximo 5000 ppm (Seller, 2008).

A utilização da glicerina bruta na alimentação de suínos e aves tem sido avaliada. Concentrações dietéticas de glicerina bruta entre 5 e 10% têm sido recomendadas para estes animais (Kijora et al., 1995; Simon et al., 1996; Cerrate et al., 2006). Em dietas para frangos de corte, a substituição de milho por glicerina bruta em até 10% da MS da ração não afetou negativamente o consumo, o ganho de peso ou a conversão alimentar (Simon et al., 1996). A adição de 3 ou 6% de glicerina bruta com 90,7% de glicerol na dieta de suínos tendeu a aumentar o ganho diário de peso (Groesbeck et al., 2008). Lammers et al. (2008) estimaram o conteúdo de energia metabolizável da glicerina bruta contendo 87% de glicerol, 9% de umidade e 0,028% de metanol para galinhas poedeiras. Os autores obtiveram um valor 14% superior ao do milho em grão e cerca de metade do valor do óleo de soja.

2.2.1 Glicerina para gado jovem

A substituição parcial de lactose por glicerol puro em sucedâneo de leite para bezerros foi avaliada por Drackley et al. (2008). Vinte e quatro bezerros

Holandeses, machos e fêmeas, receberam 1,5% do peso vivo de sucedâneo de leite com 40% de lactose ou sucedâneo com 15% de glicerol na primeira semana de vida e 2% do peso vivo da segunda a sexta semana. Os sucedâneos continham teor similar de proteína, gordura, minerais e vitaminas e foram hidratados para obtenção de 15% de sólidos no produto final. O período experimental foi de 56 dias e os tratamentos foram fornecidos três vezes ao dia, do dia 3 de vida até o dia 49. No dia 43 a quantidade de sucedâneo foi reduzida pela metade e oferecida uma vez ao dia. A partir do dia 36 os bezerros começaram a receber concentrado e o desmame ocorreu com 49 dias. O peso dos bezerros no dia 35 foi 66,9 kg no Controle e 64,9 kg no sucedâneo com glicerol ($P=0,28$). Não foi detectada diferença entre tratamentos na estatura e na incidência de diarreia e pneumonia. Os autores concluíram que a substituição de 37,5% da lactose no sucedâneo de leite por glicerol foi adequada.

A substituição de milho maduro moído por 0, 3 e 6% de glicerina bruta em um concentrado com cerca de 19% de proteína bruta foi avaliada em 90 bezerras Holandesas, com peso inicial de $86,1 \pm 0,86$ kg, por um período de 112 dias após a desmama (Golombeski et al., 2009). O consumo diário dos concentrados foi 2,72 kg. O ganho diário de peso até 84 dias de aplicação dos tratamentos foi 1,0 kg na dieta com 6% de glicerina, e 0,96 e 0,97 kg nos tratamentos 0 e 3%, respectivamente ($P=0,05$). A eficiência alimentar, mensurada pela relação entre o consumo e o ganho de peso, foi pior na dieta sem glicerina ($P<0,01$), sugerindo que a substituição de milho por até 6% de glicerina foi adequada para bezerros no período pós-desmama.

Ilse & Anderson (2009) avaliaram o efeito do teor de glicerina bruta (85% de glicerol) na dieta de bovinos confinados. Os autores avaliaram dietas contendo 0, 6, 12 e 18% de glicerina na MS em substituição a milho amassado. Foram utilizados 198 garrotes pesando 283 ± 15 kg no início do confinamento, aleatoriamente alocados em dezesseis currais, perfazendo quatro currais por

tratamento. Durante os 30 primeiros dias experimentais o consumo diário de MS respondeu quadraticamente aos tratamentos ($P=0,05$), sendo 9,2; 9,6; 9,6 e 8,8 para os teores 0, 6, 12 e 18% de glicerina, respectivamente. Não foi detectado efeito de tratamento sobre o ganho de peso ($P=0,78$) e a eficiência alimentar ($P=0,92$). Em um segundo experimento, 132 novilhas Angus com $414,3 \pm 15,1$ kg receberam as mesmas dietas por 102 dias. O consumo de MS caiu linearmente nos animais recebendo os mesmos teores dietéticos de glicerina, 12,8, 12,7, 12,6 e 11,9 ($P=0,05$). Também não foi detectado efeito de tratamento sobre o ganho de peso ($P=0,26$) e a eficiência alimentar ($P=0,22$).

2.2.2 Glicerina para vacas periparturientes

Nos anos 50 foi proposta a utilização de glicerol como preventivo de cetose para vacas leiteiras (Johnson et al, 1954). Este autor relatou que a administração oral de 2 kg de glicerol foi mais efetiva no tratamento de cetose do que a mesma quantidade de propileno glicol. A partir da década de 70 foi preconizado o uso da glicerina na prevenção, e não apenas no tratamento de cetose (Fisher et al., 1971; Fisher et al., 1973). Cinquenta e duas vacas Holandesas foram divididas em quatro grupos de acordo com a data de parto e receberam dietas com 0, 3 (174 g/d) ou 6% (374 g/d) de glicerol ou 3% de propileno glicol (174 g/d) durante oito semanas da lactação (Fisher et al, 1973). Os animais que receberam o tratamento 6% de glicerol perderam menos peso e permaneceram mais tempo em balanço energético positivo que aqueles nos outros tratamentos.

Goff & Horst (2001) avaliaram o efeito da suplementação com glicerina sobre a glicose sanguínea de vacas não lactantes. Três vacas por tratamento receberam 1, 2 ou 3 litros de glicerina (80% de glicerol) por sonda esofágica. Amostras de sangue foram coletadas a cada hora por oito horas consecutivas e 24 horas após a aplicação dos tratamentos. A glicose sanguínea 30 minutos após

a infusão aumentou 16, 20 e 25% relativamente ao basal nos tratamentos 1, 2 e 3 litros, respectivamente. O teor sanguíneo de glicose permaneceu elevado por oito horas após a infusão, mas retornou ao nível basal após 24 horas, mostrando a capacidade gliconeogênica aguda do glicerol infundido em dose única no rúmen.

DeFrain et al. (2004) avaliaram a suplementação de glicerina bruta nos 21 dias anteriores à data prevista do parto até 21 dias pós-parto. Trinta vacas receberam os tratamentos: Controle (0,86 kg/d de amido de milho), baixa glicerina (0,43 kg/d de glicerina bruta e 0,43 kg/d de amido de milho) ou alta glicerina (0,86 kg/d de glicerina bruta). As dietas completas foram oferecidas três vezes ao dia e os tratamentos foram alocados uma vez ao dia sobre o alimento oferecido. A glicerina continha 80,2% de glicerol, 11,5% de sais, 6,6% de água e 1,3% de metanol. A suplementação com glicerina bruta reduziu o consumo de MS no pré-parto ($P=0,01$), vacas alimentadas com baixa e alta glicerina consumiram 17% menos que o controle. No pós-parto, houve tendência de interação entre tratamento e dia ($P=0,11$) para a variável peso corporal. Aos 21 dias de lactação, vacas alimentadas com baixa glicerina ganharam mais peso do que vacas alimentadas com alta glicerina. A produção de leite não diferiu entre tratamentos, apesar da tendência de menor conteúdo de energia ($P=0,09$) e gordura ($P=0,13$) e menor produção diária de gordura ($P=0,13$) nos tratamentos com glicerina. Houve tendência de menor teor de nitrogênio ureico no leite nos tratamentos contendo glicerina ($P=0,08$). Houve interação entre tratamento e dia pós-parto para a concentração plasmática de glicose ($P=0,01$). A glicose foi reduzida pela baixa inclusão de glicerina até sete dias de lactação, e foi mais baixa entre os dias 14 e 21 no tratamento alta glicerina. No tratamento glicerina alta também houve tendência de menor teor de amônia no fluido ruminal antes do parto ($P=0,12$). Os tratamentos com glicerina aumentaram a relação entre acetato e propionato no rúmen ($P<0,01$) e tenderam a aumentar tanto a

concentração de butirato quanto a de ácidos graxos voláteis (AGV) sete dias após o parto ($P=0,06$). Baseado nestes dados, a glicerina foi depressora de consumo, induziu menor teor de glicose plasmática e aumentou a concentração ruminal de butirato comparativamente a amido de milho.

Chung et al. (2007) avaliaram o efeito da suplementação de glicerina sólida nas primeiras três semanas de lactação sobre o desempenho de vacas leiteiras durante e três semanas após o final da suplementação. Trinta e nove vacas Holandesas, blocadas em pares com base na data do parto e produção de leite na lactação anterior, receberam zero ou 250 g/d de glicerina bruta (65% de glicerol) alocada sobre a dieta completa. A suplementação com glicerina tendeu a aumentar a produção diária de leite na sexta semana da lactação de 46 para 52 kg ($P=0,14$). Não foi detectado efeito de tratamento sobre o consumo, metabólitos sanguíneos e a produção e composição do leite durante as três primeiras semanas da lactação.

Wang et al. (2008) avaliaram o efeito da suplementação de vacas Holandesas do quarto ao 63^o dia pós-parto com glicerina purificada (99,8% de glicerol). Trinta e seis vacas foram blocadas por ordem e data do parto e receberam os tratamentos controle (sem glicerol), baixo glicerol (100 g/d), médio glicerol (200 g/d) ou alto glicerol (300 g/d) misturado manualmente a uma das três refeições diárias. O consumo de MS e a produção de leite não foram afetados pelos tratamentos. A produção diária de gordura tendeu ($P<0,10$) a ser mais baixa nas vacas alimentadas com glicerol durante os primeiros 42 dias de lactação e a produção de proteína tendeu ($P<0,09$) a decrescer linearmente com o aumento da quantidade de glicerol suplementado. A concentração plasmática de glicose aumentou linearmente ($P<0,01$) com aumento da suplementação de glicerol.

2.2.3 Glicerina para vacas em lactação

Schröder & Südekum (1999) avaliaram a inclusão de glicerina variando na pureza (TABELA 1) sobre a digestibilidade da dieta oferecida a ovinos e vacas leiteiras. Os autores avaliaram dois teores de amido na dieta de ovinos e teores de glicerina bruta de 10, 15 ou 20% da MS da dieta. Quando glicerina foi adicionada à dieta com baixo amido (40% de amido de trigo na MS) não houve efeito sobre as digestibilidades da matéria orgânica, do amido e da FDN, enquanto a inclusão de glicerina induziu queda na digestibilidade da FDN na dieta com alto amido (55% de amido de trigo na MS). Esses autores também avaliaram o efeito da substituição de amido de trigo por glicerina na dieta de garrotes. Quatro garrotes canulados no rúmen receberam dietas com 40% de forragem e com 60% de concentrado pelotizado contendo ou não 15% de glicerina variando na pureza. Não foi detectado efeito da glicerina sobre a digestibilidade, mas ocorreu queda na relação entre acetato e propionato no rúmen ($P<0,05$) e aumento na concentração de butirato ($P<0,05$) até três horas após a alimentação. Houve aumento induzido pela glicerina na ingestão de água, maior nos tratamentos com glicerina de baixa e média pureza.

TABELA 1 Composição da glicerina variando na pureza (Schröder & Südekum, 1999).

	Pureza da glicerina		
	Baixa	Média	Alta
Umidade, %	26,8	1,1	2,5
Composição (% da matéria seca ¹)			
Glicerol	63,3	85,3	99,8
Extrato etéreo	0,71	0,44	n.a. ²
P	1,05	2,36	n.a.
K	2,20	2,33	n.a.
Na	0,11	0,09	n.a.
Pb	0,0003	0,0002	n.a.
Metanol	26,7	0,04	n.a.

¹Concentrações de cádmio, mercúrio e arsenico estavam abaixo do limite de detecção.

²Não analisado

Donkin et al. (2009) avaliaram a substituição parcial de milho por uma mistura isoprotéica de glicerina purificada (99,5% de glicerol) e glúten de milho (6,25:1). Sessenta vacas Holandesas, com 173±47 dias em lactação, foram alocadas a um de quatro tratamentos, 0, 5, 10 ou 15% da MS de glicerina por 56 dias. A dieta controle continha 20% de milho maduro finamente moído e a dieta com 15% de glicerina continha 2,8% de milho. A produção diária de leite foi ao redor de 37 kg e não foi afetada por tratamento ($P>0,05$), variando de 36,4 kg no tratamento com 15% de glicerina a 37,3 kg no tratamento com 10%. Na última semana do período experimental os autores observaram uma queda modesta no consumo de MS no tratamento com 15% de glicerina ($P<0,05$ para a interação entre tratamento e semana experimental). O teor de N-ureico no leite foi 12,5 mg/dL no tratamento controle e 10,6 nos tratamentos com glicerina ($P<0,05$). Não foi detectado efeito de tratamento sobre o teor de sólidos do leite. O tratamento com 5% de glicerina reduziu a digestibilidade da FDN comparativamente ao controle, mas foi similar aos tratamentos 10 e 15%. Estes

dados sugerem que a substituição de milho por glicerina purificada, em inclusões dietéticas até 15% da MS, foi adequada.

Shin et al. (2009) avaliaram a substituição de milho moído por glicerina em dietas variando no tipo da forragem. Vinte e quatro vacas, com 116 ± 13 dias em lactação, foram alocadas a seis combinações possíveis de dois fatores por três períodos de 27 dias. Os fatores foram: Dieta com 37% de silagem de milho e 10% de feno de alfafa ou dieta com 25% de casca de algodão e 10% de feno de tifton em arranjo fatorial de tratamentos com 0, 5 e 10% de glicerina (90% de glicerol). A dieta com silagem de milho, alfafa e 0% de glicerina continha 17,6% de milho moído e a dieta com casca de algodão, tifton e 0% de glicerina 32,3%. No mesmo experimento, quatro vacas canuladas no rúmen foram alocadas a quatro tratamentos em Quadrado Latino 4x4 com períodos de 20 dias. Os tratamentos foram silagem de milho ou casca de algodão em arranjo fatorial com 0 ou 10% de glicerina. A relação entre a produção de leite e o consumo de MS foi menor nas dietas com 5% de glicerina. Aumento no teor dietético de glicerina reduziu linearmente a concentração de nitrogênio ureico no plasma, 16,1, 15,5 e 13,8 mg/dL, nos tratamentos 0, 5 e 10%, respectivamente. Não foi detectado efeito da suplementação com glicerina sobre a glicose plasmática e sobre o pH ruminal. Houve tendência de aumento na produção diária de leite de 34,4 para 35,6 kg quando a glicerina substituiu milho na dieta contendo silagem de milho, mas houve tendência de queda de 37,7 para 36,4 kg quando glicerina foi adicionada à dieta com casca de algodão. Os autores concluíram que teores dietéticos de até 10% de glicerina podem ser usados para vacas em lactação.

Rico et al. (2009) avaliaram a substituição de amido de milho ou melaço de cana por glicerina (42,5% de glicerol). Nove vacas Holandesas, com $112 \pm 8,6$ dias em lactação, receberam três tratamentos em Quadrados Latinos 3x3. Os tratamentos foram: Dieta com 4,29% de glicerina, dieta com 4,29% de melaço ou dieta com 4,33% de amido de milho. Houve tendência de queda na produção

de leite de 43,1 para 40,8 kg quando glicerina substituiu melação de cana ($P=0,08$) e não foi detectado efeito de tratamento sobre o consumo de MS. A substituição de amido ou açúcar por glicerina reduziu ($P<0,01$) o teor de proteína no leite.

A resposta em perfil de fermentação ruminal a aumento no teor dietético de glicerina foi avaliada por Boyd et al. (2009). Seis vacas em lactação receberam três tratamentos em Quadrados Latinos 3x3 com períodos de quatro semanas. Os tratamentos foram: Controle, 200 g de glicerina ou 400 g de glicerina. O consumo de MS foi 24,2 kg no Controle, enquanto foi 23,0 kg nos tratamentos com 200 e 400 g de glicerina ($P<0,01$). A produção diária de leite foi maior ($P<0,01$) no tratamento Controle do que no tratamento com 400 g de glicerina, sendo 37,2 e 35,8 kg respectivamente, mas não diferiu do tratamento com 200 g, de 37,2 kg. O teor de proteína no leite foi maior no tratamento com 400 g de glicerina ($P<0,01$) e o teor de gordura foi maior no Controle ($P<0,01$). A proporção molar de propionato no líquido ruminal aumentou e a de acetato diminuiu com a suplementação de 400 g de glicerina comparativamente ao Controle.

2.3 Absorção e metabolismo intermediário do glicerol

Aparentemente, grande parte do glicerol dietético é fermentada pelos microorganismos do rúmen (Remond et al., 1993). No entanto, tanto a quantidade suplementada quanto o método de administração, misturado à dieta ou por infusão intraruminal em dose única (drench), podem determinar a quantidade de glicerol que escapa da fermentação ruminal (Kijora et al., 1998; DeFrain et al., 2004; Linke et al., 2004). A proporção do ingerido fluindo do rúmen para o abomaso ou sendo absorvida pelo epitélio ruminal determina o poder gliconeogênico do glicerol (DeFrain et al., 2004). A proporção fermentada no rúmen cai quando glicerol é fornecido na forma de drench (Linke et al.,

2004). Quando 1,2 kg de glicerol foi infundido em dose única no rúmen de vacas não-lactantes, o fluxo de glicerol intacto para o abomaso foi de 7 a 18% do infundido, enquanto cerca de metade do infundido desapareceu por metabolismo microbiano no rúmen, sugerindo que ocorreu absorção direta pelo epitélio ruminal (Remond et al., 1993).

O glicerol absorvido pelo epitélio do rúmen precisa passar pelas proteínas integrais de membrana (MIP). Estas são componentes normais da membrana celular, responsáveis pelo equilíbrio osmótico. As MIP são encontradas em bactérias, fungos, insetos, plantas e mamíferos (Froger et al., 2001) e podem ser classificadas em dois subgrupos funcionais: aquaporinas e aquagliceroporinas. As aquaporinas são altamente específicas para conduzir água, por isso são chamadas de canais de água. As aquagliceroporinas são especializadas no transporte de glicerol.

As aquagliceroporinas AQP3, AQP7 e AQP9 foram descritas como uma classe de canais de água também permeáveis ao glicerol (Froger et al., 2001). A AQP3 é encontrada nas células epidermais e age como um canal de glicerol, mantendo a hidratação, a elasticidade e funcionando como uma barreira da pele (Hibuse et al., 2005). Estas proteínas são necessárias para o transporte de glicerol no intestino de camundongos e humanos, mas também são encontradas nos olhos, rins, estômago, baço e eritrócito (MacDougald & Burant, 2005). A AQP9 é uma aquagliceroporina específica do fígado e é negativamente regulada pela insulina ao nível de transcrição. Esta proteína funciona como porta de entrada no hepatócito, regulando a entrada do glicerol na célula para ser utilizado como substrato gliconeogênico durante o jejum. A AQP7 é encontrada em abundância no tecido adiposo e atua como um canal de glicerol para os adipócitos (Hibuse et al., 2005).

A maioria do glicerol no organismo é encontrada em triglicerídeos no tecido adiposo e é liberado para a corrente sanguínea por lipases durante a

lipólise. O glicerol presente na corrente sanguínea pode ser removido por tecidos contendo a enzima glicerol-quinase, responsável pela fosforilação do glicerol a glicerol-3-fosfato (Leningher, 2006). A fosforilação do glicerol é um passo inicial na síntese de glicose, triglicerídeos ou oxidação completa a CO₂. A glicerol-quinase é encontrada no fígado e nos rins, mas também no cérebro, adipócitos e músculos esquelético e cardíaco (Rahib et al., 2009).

O glicerol absorvido é normalmente assumido como sendo um substrato gliconeogênico em vacas leiteiras. A quinase do glicerol presente no fígado converte o glicerol e ATP em glicerol-3-fosfato e ADP ao nível de triose fosfato, direcionando o glicerol para gliconeogênese (Lin, 1977). Entretanto, a remoção hepática do glicerol presente na veia porta pode ser baixa. Existem relatos de aumento na concentração plasmática de glicerol em resposta a infusão do composto no rúmen sem ser observado aumento simultâneo na concentração de glicose plasmática (Krehbiel, 2008).

2.4 Metabolismo do glicerol no rúmen

Johns (1953) demonstrou que a fermentação ruminal *in vitro* ou *in vivo* de glicerol resultou na formação de propionato. Após duas horas de incubação ruminal menos de 80% da quantidade inicial de glicerol foi encontrada no fluido, cerca de 50% desapareceu com quatro horas de incubação e o desaparecimento foi total após 24 horas de fermentação. Garton et al. (1961) também não detectaram glicerol no meio de cultura após 24 horas de incubação *in vitro* em fluido ruminal de ovelha e o AGV predominante foi propionato. Bactérias anaeróbicas facultativas fermentam o glicerol, mas as mais importantes fermentadoras de glicerol parecem ser bactérias estritamente anaeróbicas como *Selenomonas ruminantium*, produtoras de propionato (Hobson & Mann, 1961).

Krehbiel (2008) relata que cerca de 13% do glicerol que chega ao rúmen desaparece por passagem com a digesta, 44% por fermentação e 43% por absorção pela parede. Baseado em observações *in vitro*, a espécie que mais metaboliza o glicerol foi a *Selenomonas* e os produtos finais são propionato, lactato, succinato e acetato. Entretanto, outros produtos da fermentação ruminal de glicerol têm sido relatados. A metabolização ruminal de glicerol, *in vitro* e *in vivo*, pode resultar em aumento pequeno na proporção molar de propionato e aumento na concentração de butirato, diferentemente de estudos clássicos onde foi observado aumento de propionato apenas (Johns, 1953; Garton et al., 1961). Quando ocorre aumento de butirato no rúmen, também tem sido detectado aumento de β -OH-butirato no sangue.

Kijora et al. (1998) observaram em garrotes que a infusão intraruminal de 200 g de glicerol, duas vezes ao dia, aumentou o glicerol plasmático de 0,06 para 0,19 mM. O desaparecimento ruminal do glicerol infundido ocorreu rapidamente após a infusão e não foi detectado glicerol na digesta duodenal. Mais de 85% do glicerol infundido desapareceu do rúmen em duas horas. Krehbiel (2008) sugere que a velocidade de desaparecimento de glicerol do rúmen aumenta em animais previamente adaptados a este substrato.

Remond et al. (1993) avaliaram a fermentação ruminal de glicerol em experimentos *in vitro* e *in vivo*. Duas vacas canuladas no rúmen receberam dietas baseadas em silagem de milho e duas vacas receberam dietas baseadas em feno gramínea, ambas sem a adição de glicerol. Após este período, uma solução aquosa contendo 80% de glicerol foi administrada diariamente no rúmen por duas semanas, objetivando obter uma massa diária de 240 g de glicerol infundido. Um animal recebendo cada forragem recebeu 1,2 kg de glicerol por mais duas semanas. Amostras de fluido ruminal para o ensaio *in vitro* foram obtidas nos dias 6 e 4 de fornecimento da dieta sem glicerol, nos dias 1, 3 e 10 após o início do fornecimento de glicerol, e no dia 24 para as duas vacas que

receberam a maior dose de glicerol. O desaparecimento ruminal de glicerol foi mensurado *in vivo* por amostragem da digesta omasal utilizando 200 g de polietileno glicol (PEG) em solução com um litro de água misturados com 240 g de glicerol (para mensurações dos dias 1, 3 e 10) ou 480 g (para mensurações no dia 24). As amostras foram obtidas imediatamente antes da administração do glicerol e do PEG, e 1, 2, 4, 6 e 7,5 horas depois da infusão. Em fermentadores contendo amido como substrato o desaparecimento de glicerol ocorreu rapidamente, enquanto o uso de celulose como substrato retardou o desaparecimento para 4 a 6 horas após o início da fermentação. A taxa de desaparecimento do glicerol foi 0,62 g/h quando amido foi o substrato fermentativo e 0,52 g/h quando o substrato foi celulose ($P<0,05$). Aumento na quantidade infundida de glicerol aumentou a velocidade de desaparecimento ruminal do glicerol. A adição de glicerol em fermentadores contendo celulose aumentou a produção de AGV durante as primeiras seis horas de incubação ($P<0,01$), mas não teve efeito nos fermentadores contendo amido. A infusão de glicerol reduziu a proporção de acetato e aumentou a proporção de propionato e butirato ($P<0,01$) no fluido *in vitro*.

Potu et al. (2009) avaliaram o efeito da substituição de milho por glicerol utilizando fermentadores contínuos. Os tratamentos foram: Dieta controle com 60% de forragem e 12% de milho, e dietas contendo 15%, 30% e 45% de glicerol em substituição ao milho. A digestibilidade da FDN foi menor nos tratamentos contendo 30 e 45% de glicerol ($P<0,05$). Estes tratamentos induziram queda na concentração de acetato no fluido ($P<0,05$) e aumento nos teores de butirato, valerato e isovalerato. A concentração de DNA de *Selenomonas ruminantium* também foi menor nestes tratamentos ($P<0,05$). Na inclusão de 45% de glicerol a concentração de DNA de *Butyrivibrio fibrisolvens* e de bactérias total foi reduzida ($P<0,05$), mas não foi detectada queda na concentração de DNA de *Ruminococcus albus*. Na dieta controle houve maior

concentração de C18:1, C18:2 e C18:1 trans ($P<0,05$). Os autores concluíram que a inclusão de glicerol até 15% não afetou negativamente a fermentação ruminal, mas inclusões mais elevadas podem deprimir a digestão fibrosa, o crescimento microbiano e a produção de acetato.

Rico et al. (2009) avaliaram a substituição milho ou melaço de cana por glicerina bruta (42,5% de glicerol) em cultivo contínuo. A inclusão dietética de glicerina foi de 4% em substituição ao milho ou ao melaço da dieta controle. Houve tendência ($P=0,07$) de aumento na relação entre acetato e propionato quando glicerina foi comparada ao melaço (2,8 vs 2,5). A proporção molar de butirato foi menor ($P<0,01$) na glicerina comparada com amido e melaço (13, 16 e 18% do total de AGV). A concentração de amônia foi mais alta ($P<0,01$) no tratamento com glicerina e a digestibilidade da MS menor ($P<0,05$) em relação ao amido, mas não diferiu do melaço.

Wang et al. (2009) alimentaram oito garrotes com cânula ruminal com dieta controle sem glicerol, e com 100, 200 e 300 g de glicerina por dia (99% de glicerol). A dieta controle continha 60% de palha de milho e 20,8% de milho maduro moído. A excreção de derivados purínicos na urina teve comportamento quadrático ($P=0,02$), sendo máxima na dose diária de 200 g de glicerina. A concentração de amônia no fluido ruminal caiu linearmente ($P=0,03$), sugerindo que a glicerina pode ter aumentado a eficiência de síntese microbiana ou a desaminação ruminal de aminoácidos.

2.5 Intoxicação por metanol

O metanol é um líquido volátil, translúcido e com odor fraco, ligeiramente mais adocicado que o etanol. As características clínicas da intoxicação de metanol aguda incluem acidose metabólica fórmica, toxicidade visual, coma e morte.

O metanol é transformado pela enzima álcool desidrogenase em formaldeído e este em formato ou ácido formico. O formato inibe a enzima citocromo oxidase, componente da cadeia transportadora de elétrons envolvida na síntese de ATP (Wallace et al., 1997). A citocromo oxidase é uma enzima vital no processo de geração de energia para o funcionamento celular, especialmente nos tecidos com alto metabolismo energético, como a retina e o cérebro (Parthasarathy et al., 2006).

O potencial de intoxicação do metanol varia entre as espécies, em função da sua capacidade de metabolizar o formato. Como o formato é o metabólito tóxico, responsável pela acidose metabólica e degeneração neuronal, a rápida metabolização do formato determina a toxicidade em relação àquela espécie. (Black et al., 1985). O acúmulo de formato ocorre devido à deficiência na metabolização que em parte é relatado pela baixa de tetrahydrofolato e H4 folato hepática. A correlação entre H4 e a taxa de oxidação de formato é alta dentro de espécie e entre espécies. Humanos e macacos tem baixa H4 folato e por isso acumulam mais formato, além de baixa 10-formil H4 folato desidrogenase, enzima que cataliza a conversão de formato a CO₂ (Tephy, 1991) e por isso são mais sensíveis à intoxicação por metanol que outras espécies como os roedores e cães (Gonzales-Quevedo, 2002). Nos mamíferos o metanol é metabolizado a formaldeído no fígado através de uma via dependente de tetrahydrofolato (Eelis et al., 1982) formando ácido formico e dióxido de carbono (Gonzales-Quevedo, 2002)

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Dezoito vacas Holandesas, com 185 ± 88 dias em lactação no início do período experimental, foram alimentadas individualmente com dieta completa fornecida duas vezes ao dia e em quantidade suficiente para resultar em pelo menos 5% do oferecido como sobra diária. As vacas foram alojadas em confinamento total do tipo *tie stall* com camas de areia e foram ordenhadas três vezes ao dia.

As vacas formaram seis grupos de três animais, um grupo de primíparas e cinco grupos de múltíparas. As múltíparas foram então agrupadas com base na produção diária de leite. Dentro de cada grupo, as vacas foram aleatoriamente alocadas a uma seqüência de três tratamentos, em delineamento do tipo Quadrado Latino 3×3 , conduzidos simultaneamente, com períodos de 28 dias, sendo 21 dias de adaptação aos tratamentos. Os tratamentos foram: Dieta basal com milho maduro finamente moído (Controle), dieta onde o milho foi totalmente substituído por uma mistura isoprotéica de glicerina e farelo de soja (Glicerina), e produto em teste. Apenas a comparação entre o Controle e Glicerina será discutida (TABELA 2). O teor de glicerol da glicerina bruta (Almad Agroindústria Ltda, Diadema, SP) foi avaliado método ASTM D 6584-00E01 (ASTM, 2006), o conteúdo de metonol pelo método EN 14110.

As quantidades de dieta oferecida e a sobra alimentar de cada vaca foram mensuradas diariamente. Entre os dias 22 e 25 de cada período, amostras da silagem de milho, de cada ingrediente do concentrado e das sobras alimentares de cada vaca foram coletadas diariamente e congeladas. Uma amostra composta de cada período foi formada com base em quantidades idênticas de matéria natural. Estas amostras foram pré-secas em estufa ventilada por 72 horas a 55°C , trituradas em peneira de 1 mm em moinho do tipo Thomas-Willey, e uma sub-amostra foi desidratada a 100°C por 24 horas para

determinação do teor de MS. A proteína bruta (PB) foi analisada por um destilador a vapor do tipo Microkjeldhal (A.O.A.C., 1975). A determinação de extrato etéreo (EE) foi realizada segundo o A.O.A.C. (1990). As cinzas foram determinadas por incineração da amostra a 550°C por 8 horas. O teor de FDN foi analisado por um determinador de fibra TE-149 (TECNAL, Piracicaba, SP).

TABELA 2 Composição das dietas oferecidas em ingredientes e das dietas consumidas em nutrientes nos tratamentos Glicerina e Controle.

	Glicerina	Controle
	% da matéria seca	
Ingredientes		
Silagem de milho	27,6	27,7
Feno de tifton	6,1	6,2
Milho maduro moído fino		14,8
Glicerina bruta	12,3	
Farelo de soja	21,3	18,6
Polpa cítrica peletizada	19,4	19,4
Caroço de algodão	8,6	8,6
Premix ¹	4,7	4,7
	Nutrientes	
Proteína bruta	17,5	17,7
FDN ² total	32,4	34,4
FDN oriundo de forragem	18,7	19,0
Cinzas	9,7	9,3
Extrato etéreo	5,8	6,1
CNF ²	34,5	32,5
	% da matéria natural	
Matéria seca	49,9	49,6

¹Premix: 25% de bicarbonato de sódio, 25% de Megalac E (QGN, Nova Ponte, MG), 15% de calcário calcítico, 13% de farelo de soja, 8% de Nutronphós 150+ADE (Nutron Alimentos, Itapira, SP), 8% de NaCl, 6% de óxido de magnésio.

²FDN = Fibra em detergente neutro. CNF = Carboidratos não fibrosos = 100 – (PB + FDN + EE + Cinzas)

Amostras de seis ordenhas consecutivas foram obtidas nos dias 22 e 23 de cada período para determinação dos teores de proteína, gordura (Associação

Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa, Curitiba, PR). A produção diária de leite e o consumo de matéria seca (CMS) entre os dias 22 a 24 do período experimental foram utilizados para comparar tratamentos. A secreção diária de energia no leite foi calculada pela equação: $[(0,0929 \times \% \text{ de gordura}) + (0,0547 \times \% \text{ de proteína}) + (0,0395 \times \% \text{ de lactose})] \times \text{kg de leite}$ (NRC, 2001). As seguintes eficiências alimentares foram calculadas: Eficiência 1 pela relação entre a produção diária de leite e o CMS e Eficiência 2 pela relação entre a secreção diária de energia no leite e o CMS.

O peso vivo e a condição corporal de cada vaca foi mensurada no dia 28 de cada período com o intuito de descrever as unidades experimentais. A condição corporal foi avaliada visualmente em escala de 1 a 5 (Wildman et al., 1982). A condição corporal foi avaliada por três avaliadores independentes e o escore médio de cada vaca foi utilizado.

No dia 28 de cada período foi avaliada a atividade mastigatória por observação visual da atividade bucal de cada animal a cada cinco minutos por 24 horas contínuas. As atividades bucais consideradas foram de ingestão de alimento, de ingestão de água, de ruminação e de ócio. O tempo de mastigação em minutos por dia foi definido como a soma dos tempos de ingestão de alimento e de ruminação. A atividade mastigatória por unidade de matéria seca ingerida utilizou o CMS mensurado no dia da determinação da atividade bucal de cada animal.

A digestibilidade aparente no trato digestivo total da matéria seca, da matéria orgânica, da FDN e da matéria orgânica não-FDN foi determinada por mensuração da produção fecal por coleta total de fezes realizada por 8 horas ininterruptas nos dias 25 a 27 de cada período. A coleta de fezes em cada dia foi iniciada com oito horas de atraso com relação ao dia anterior, visando obter uma amostragem representativa das 24 horas do dia, sem causar distúrbio no consumo de alimentos e na produção de leite dos animais. Amostras das fezes de

cada vaca foram continuamente congeladas ao longo da coleta e formaram uma amostra composta ao final de cada período. Os compostos fecais foram desidratados e o teor de FDN e cinzas foram determinados como previamente descrito. O consumo diário de matéria orgânica digestível (CMOD) foi calculado multiplicando o consumo de matéria orgânica mensurado entre os dias 22 a 24 de cada período pela digestibilidade da matéria orgânica mensurada entre os dias 25 a 27. A Eficiência 3 foi calculada dividindo a secreção diária de energia no leite pelo CMOD.

Simultaneamente à coleta total de fezes foi realizada coleta total de urina para estimativa da excreção diária de alantoína, utilizada como medida relativa da síntese diária de proteína microbiana no rúmen. Ao volume de urina coletado foram imediatamente adicionados 10% de ácido sulfúrico a 10% e a amostra foi armazenada a 4°C. Uma amostra composta foi formada para cada vaca no final de cada período. As amostras compostas foram diluídas com água destilada na proporção 1:3 entre urina e água e congeladas a -20°C até a realização das análises. A alantoína foi analisada por procedimento colorimétrico semelhante ao sugerido por Chen & Gomes (1995). A excreção diária de alantoína dividida pelo CMOD foi utilizada como estimativa da eficiência de síntese de proteína microbiana.

No dia 27 de cada período foram obtidas amostras de fluido ruminal através de sonda flexível oro-gástrica com auxílio de uma bomba de sucção a vácuo acoplada a um Kitassato (Rosemberger, 1983). As amostras foram obtidas 12,6±0,4 horas após o fornecimento matinal de alimentos, sendo os animais amostrados aleatoriamente dentro de quadrado. O pH ruminal foi mensurado imediatamente. As amostras de fluido ruminal tiveram a fermentação inibida por congelamento em nitrogênio líquido e foram armazenadas sob congelamento para posterior análise de AGV. Após serem descongeladas, as amostras foram centrifugadas em temperatura de 4 °C a 8855 x g por 15 minutos. As amostras

foram analisadas por cromatografia gás-líquida (CP 3800 Gas Chromatography Varian, Varian Chromatography Systems, Palo Alto, EUA), com coluna capilar (CP-Wax 58 (FFAP) CB, Varian Analytical Instruments, Palo Alto, EUA).

No dia 28 de cada período amostras de sangue foram obtidas dos vasos coccígeos para dosagem de glicose, aleatoriamente dentro de quadrado. As amostras foram obtidas $12,2 \pm 0,1$ horas após a primeira refeição diária. O sangue foi colhido em tubos vacuolizados contendo 100 μ l de fluoreto de potássio. As amostras foram centrifugadas a 1000 x g por 15 minutos e o plasma foi congelado a -20 °C para posterior análise utilizando kit laboratorial (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Cat. 27).

Análise estatística

Os dados foram analisados pelo procedimento GLM do SAS (1985), com modelo contendo os efeitos de quadrado, vaca dentro de quadrado, período e tratamento. O contraste ortogonal com um grau de liberdade entre Glicerina e Controle comparou estes tratamentos. Valores de probabilidade abaixo de 0,05 foram considerados como significativos; entre 0,05 e 0,10 como tendência; e entre 0,10 e 0,15 como tendência fraca.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O conteúdo de energia bruta da glicerina, ajustado para o teor de umidade da amostra (TABELA 3), foi 4,28 kcal/g, típico de carboidratos e próximo ao valor de 4,3 kcal/g do glicerol (Maynard, 1984). Este fato sugere que a amostra continha maior teor de glicerol que a pureza mensurada laboratorialmente, de 76,2% da matéria natural. O teor de carboidratos não fibrosos não mensurados analiticamente, provavelmente glicerol, estimado por subtração da amostra fresca dos teores de umidade, glicerol, cinzas, PB e EE foi 13%. O teor de glicerol na amostra pode ter sido ao redor de 89,2% (76,2 + 13,0), denotando que a glicerina bruta utilizada tinha pureza alta. Paige (2009) observou que o teor de glicerol em 16 amostras de glicerina bruta da região centro-oeste dos Estados Unidos foi 30,5%, enquanto a média em 11 amostras analisadas por Hansen et al. (2009) na Austrália foi 72,4%, variando de 38,4 a 96,5%. Amostras de glicerina bruta com pureza em glicerol superior a 80% foram frequentemente relatadas na literatura (DeFrain et al., 2004; Linke et al., 2004; Ogborn et al., 2006; Mach et al., 2008; Potu et al., 2009; Shin et al., 2009).

TABELA 3 Composição da glicerina bruta na matéria natural (MN).

	% da MN
Glicerol	76,2
Umidade	6,29
Proteína bruta	0,29
Extrato etéreo	1,33
Cinzas	2,93
Fósforo	0,61
Sódio	0,81
Metanol	0,88
	mg KOH/g de MN
Índice de acidez	1,74
	kcal/g de MN
Energia Bruta	4,008

Apesar de o teor de cinzas da glicerina bruta ter sido baixo (Hansen et al., 2009; Paige, 2009), o teor de metanol foi acima do considerado seguro para uso na alimentação animal (TABELA 3). A amostra continha 8800 ppm de metanol (0,88% da amostra fresca), enquanto limites máximos de seguridade são 150 ppm nos Estados Unidos e 5000 ppm na Alemanha (Seller, 2008). A toxidez do metanol para animais foi relatada na literatura (Nie et al., 2007). Sintomas da intoxicação por metanol são neurológicos e associados a distúrbio da visão, estes últimos dependentes do acúmulo de ácido fórmico no organismo (Sebe et al., 2006). A capacidade de ruminantes de metabolizar formato sistemicamente não foi definida (Black et al., 1985).

O consumo de MS de glicerina neste experimento foi ao redor de 2,0 kg, decorrente do consumo diário de 16,7 kg (TABELA 4) de dieta com 12,3% de glicerina na MS (TABELA 2), ou cerca de 2,2 kg de glicerina bruta com 93,7% de MS. Logo, o consumo diário de metanol foi 19272 mg, ou 31,2 mg por kg de peso vivo nestes animais com 617 kg (TABELA 4). A DL_{50} e a dose letal mínima do metanol foram definidas como 7000 e 13000 mg/kg para ratos, coelhos e cães, e 2000 e 7000 mg/kg para primatas (EHC 196, 1997). Apesar da quantidade consumida de metanol ter sido aparentemente baixa, comparativamente ao letal, a possibilidade de intoxicação existiu neste experimento, já que a susceptibilidade de bovinos à intoxicação por metanol é desconhecida (Black et al., 1985). Entretanto, sintomas clínicos característicos da intoxicação por metanol não foram observados neste estudo de curta duração. A avaliação do potencial de intoxicação de vacas leiteiras por glicerina bruta contendo metanol deveria ser avaliada, preferencialmente em estudos de longo prazo e envolvendo alto número de unidades experimentais. O estudo de estratégias nutricionais capazes de detoxificar glicerina bruta em larga escala (Chaucheyras-Durany et al, 2008), a tornando mais apta ao uso na alimentação animal, também podem ser pertinentes.

TABELA 4 Desempenho de vacas leiteiras nos tratamentos Glicerina e Controle.

	Glicerina	Controle	EPM ¹	<i>P</i>
	kg d ⁻¹			
CMS ²	16,7	16,8	0,371	0,85
CMO ²	15,1	15,2	0,337	0,79
Leite	21,3	23,4	0,58	0,02
Gordura	0,750	0,797	0,027	0,24
Proteína	0,680	0,736	0,024	0,13
Lactose	0,942	1,050	0,028	0,01
Sólidos totais	2,571	2,792	0,079	0,06
	%			
Gordura	3,53	3,43	0,097	0,48
Proteína	3,24	3,15	0,063	0,32
Lactose	4,42	4,46	0,070	0,63
Sólidos totais	12,13	11,92	0,219	0,50
	kg			
Peso vivo	617	619	4,57	0,76
	1 a 5			
Condição corporal	3,60	3,63	0,050	0,71
	Mcal d ⁻¹			
Energia no leite	14,41	15,58	0,435	0,07
	Mcal kg ⁻¹			
Eficiência 1 ³	1,30	1,40	0,037	0,05
Eficiência 2 ³	0,87	0,93	0,030	0,14
Eficiência 3 ³	1,30	1,47	0,043	0,01

¹EPM = Erro padrão das médias

²CMS = Consumo de matéria seca. CMO = Consumo de matéria orgânica

³Eficiência 1 = Leite/CMS. Eficiência 2 = Energia no leite/CMS. Eficiência 3 = Energia no leite/Consumo de matéria orgânica digestível

Neste trabalho houve substituição total do milho oriundo do concentrado por glicerina (TABELA 3). A única fonte de amido na dieta Glicerina foi silagem de milho, mantida em inclusão dietética propositalmente baixa. A substituição de amido por glicerol deprimiu a produção de leite em cerca de 10%, sem induzir queda no consumo (TABELA 4). A secreção diária de lactose foi deprimida, havendo também tendência fraca de queda na secreção proteica.

Nestas vacas com produção diária ao redor de 20 kg a substituição de milho maduro finamente moído por glicerina bruta deprimiu a produção de leite e de sólidos, reduzindo a Eficiência 1.

TABELA 5 Digestibilidade aparente dos nutrientes no trato digestivo total de vacas leiteiras nos tratamentos Glicerina e Controle.

	Glicerina	Controle	EPM ¹	P
	% do ingerido			
DMS ²	73,8	70,1	0,47	0,10
DMO ²	74,1	70,8	1,01	0,02
DFDN ²	39,7	36,7	2,25	0,36
DMOnFDN ²	93,8	92,4	0,69	0,18
	kg d ⁻¹			
CMOD ³	11,2	10,7	0,31	0,29

¹EPM = Erro padrão das médias

²DMS = Digestibilidade da matéria seca. DMO = digestibilidade da matéria orgânica, DFDN = digestibilidade da fibra em detergente neutro. DMOnFDN = digestibilidade da matéria orgânica não-FDN

³CMOD = Consumo de matéria orgânica digestível

As estratégias alimentares avaliadas, substituição total de amido oriundo de milho do concentrado por glicerina bruta e o consumo diário de glicerina ao redor de 2 kg, são incomuns. Estes fatos podem explicar parcialmente o efeito negativo da glicerina sobre o desempenho animal (TABELA 4). Esta resposta é distinta de relatos publicados onde a produção de leite não foi deprimida pela substituição parcial de concentrados energéticos ricos em amido por glicerina ou em baixo consumo diário de glicerina, muitas vezes avaliado em vacas periparturientes (Fisher et al., 1973; Kahalili et al., 1997; Defrain et al., 2004; Bodarski et al., 2005; Ogborn, 2006; Chung et al., 2007; Wang et al., 2008; Shin et al., 2009). Entretanto, Boyd et al. (2009) também observaram que a suplementação de vacas leiteiras com 400 g de glicerina reduziu a produção diária de leite de 37,2 para 35,8 kg. O grau de impureza da glicerina também pode ser um fator na resposta negativa à glicerina. Donkin et al. (2009)

substituíram amido em uma dieta contendo 20% de milho maduro finamente moído por 5, 10 ou 15% da dieta de glicerina purificada (99,5% de glicerol). A inclusão crescente de glicerina à dieta não induziu queda na produção diária de leite, ao redor de 37 kg. O efeito de glicerinas variando em teor de contaminantes sobre o desempenho de vacas leiteiras não foi avaliado em um mesmo experimento. A interação entre a suplementação com glicerina e o tipo da forragem (Shin et al., 2009) também pode explicar a variabilidade entre experimentos na resposta em desempenho animal.

O consumo de energia, mensurado pelo CMOD, não diferiu entre tratamentos (TABELA 5), apesar da digestibilidade aparente da MO ter sido maior quando glicerol substituiu amido. Entretanto, uma menor proporção da matéria orgânica digerida foi secretada como energia no leite na Glicerina, já que houve queda na eficiência 3 (TABELA 4). Compreender este fato é importante para o uso racional da glicerina como alimento para vacas em lactação.

Uma explicação plausível para a queda na Eficiência 3 quando glicerol substituiu amido seria por maior perda energética na forma de metano. Para que esta hipótese seja coerente alguns pontos devem ser assumidos: 1) O CMOD é um indicador razoável da matéria orgânica fermentada a ácidos graxos voláteis no rúmen, similar entre tratamentos (TABELA 5). 2) A eficiência de utilização da energia metabolizável oriunda de ácidos graxos voláteis é similar na amplitude fisiológica de variação na relação entre os ácidos produzidos no rúmen (Orskov et al., 1979). 3) A perda urinária de energia foi similar entre estas unidades experimentais consumindo dietas isoprotéicas (TABELA 2). 4) A deposição de energia no ganho e o uso de energia para manutenção foi similar nestas vacas semelhantes em peso vivo e condição corporal (TABELA 4).

Entretanto, a hipótese de maior perda energética na forma de metano no tratamento Glicerina não é coerente ao perfil de fermentação ruminal mensurado

experimentalmente (TABELA 6). A substituição de milho por glicerina aumentou a proporção molar de butirato e reduziu a de acetato, sem afetar a de propionato. A queda na proporção molar de acetato parece não ter sido induzida por efeito depressor do glicerol sobre a digestão fibrosa (Potu et al., 2009), a se julgar pelo aumento numérico, e não significativo, na digestibilidade da FDN na Glicerina (TABELA 5). Apesar de estudos clássicos sugerirem que a metabolização ruminal de glicerol resulta em propionato (Johns et al., 1953; Garton et al 1961), estudos mais recentes têm demonstrado que a fermentação ruminal de glicerol também é capaz de aumentar a proporção de butirato e reduzir a proporção de acetato no fluido (Rémond et al., 1993; Krehbiel, 2008; Potu et al., 2009).

TABELA 6 Perfil de fermentação ruminal de vacas leiteiras nos tratamentos Glicerina e Controle.

	Glicerina	Controle	EPM ¹	P
	mM			
Acetato	50,8	60,1	3,68	0,09
Propionato	18,7	18,4	1,16	0,89
Butirato	17,5	14,5	1,04	0,05
AGV total ²	87,0	93,0	5,09	0,41
	% do AGV total			
Acetato	58,7	64,6	1,28	0,01
Propionato	21,5	19,8	0,88	0,18
Butirato	19,9	15,6	0,76	0,01
Acetato/Propionato	2,79	3,30	0,170	0,04
pH	6,53	6,41	0,074	0,29

¹EPM = Erro padrão das médias

²AGV total = Acetato + Butirato + Propionato

Houve queda na relação entre acetato e propionato com Glicerina (TABELA 6), o que mesmo associado a aumento na proporção molar de butirato, deveria reduzir a produção líquida de equivalentes reduzidos neste

tratamento (Hobson, 1997), reduzindo a perda energética na forma de metano, o oposto do acima pressuposto.

Outro mecanismo plausível para a queda na Eficiência 3 poderia ser proposto com base na menor concentração ruminal de AGV na Glicerina (TABELA 6), em um mesmo CMOD (TABELA 5). Este mecanismo assume que o acúmulo intraruminal de AGV seria um indicador razoável da absorção diária de energia na forma de acetato, propionato e butirato. Menor acúmulo ruminal de AGV em um mesmo CMOD sugere que menos matéria orgânica foi fermentada no rúmen quando glicerol substituiu amido, coerente ao aumento numérico, mas sem suporte estatístico ($P=0,29$), no pH ruminal neste tratamento (TABELA 6).

Alto desaparecimento ruminal de glicerol por absorção pela parede ou passagem com a digesta pode ter ocorrido (Kijora et al., 1998; Krehbiel, 2008). A baixa inclusão dietética de amido pode ter reduzido a taxa fracional de degradação do glicerol no rúmen e a alta inclusão dietética de glicerina pode ter aumentado a proporção do glicerol escapando da fermentação ruminal (Rémond et al., 1993). Parte significativa do CMOD pode ter sido composta por glicerol absorvido intacto (Froger et al., 2001) e metabolizado por rota não gliconeogênica. Tem sido demonstrado que a infusão intraruminal de glicerol é capaz de aumentar a concentração arterial de glicerol sem aumentar a glicose plasmática (Krehbiel, 2008). Este hipótese é suportada pela queda no teor de glicose plasmática na Glicerina (TABELA 7) e pela menor secreção diária de lactose no leite (TABELA 4), um mecanismo plausível para a menor produção de leite neste tratamento.

TABELA 7 Glicose plasmática, volume diário de urina e excreção diária de alantoína na urina de vacas leiteiras nos tratamentos Glicerina e Controle.

	Glicerina	Controle	EPM ¹	P
	mg dL			
Glicose	51,6	58,3	1,98	0,03
	L d ⁻¹			
Volume de urina	26,6	22,6	2,16	0,20
	mmoles d ⁻¹			
Alantoína	68,6	66,9	7,32	0,87
	mmoles kg ⁻¹			
Alantoína/CMOD ²	6,33	5,95	0,58	0,64

¹EPM = Erro padrão das médias

²Alantoína/CMOD = Excreção diária de alantoína na urina por consumo diário de matéria orgânica digestível

O efeito da suplementação de glicerina sobre o teor plasmático de glicose tem divergido, apesar da capacidade gliconeogênica do glicerol justificar o uso clássico do glicerol fornecido em dose única na prevenção e tratamento de cetose (Johnson, 1954; Goff & Horst, 2001). A ausência de resposta em glicose plasmática à suplementação com glicerol tem sido observada (Ogborn, 2006; Chung et al., 2007; Boyd et al., 2009; Osborne et al., 2009; Rico et al., 2009). DeFrain et al. (2004) observaram que vacas suplementadas no pós-parto com 0,86 kg de glicerina bruta contendo 80,2% de glicerol e 1,3% de metanol tiveram menor teor de glicose no plasma que o controle. Entretanto, Wang et al. (2008), suplementando 0, 100, 200 ou 300 g de glicerina purificada (99,8% de glicerol), e Donkin et al. (2009), avaliando inclusões dietéticas de 0, 5, 10 ou 15% de glicerina também purificada (99,5% de glicerol), observaram aumento linear na glicose plasmática em resposta à suplementação com glicerol. Não é claro se a diferença nas respostas é resultante da forma e quantidade suplementada, do perfil metabólico dos animais utilizados ou na pureza da glicerina. Avaliar a resposta de vacas leiteiras a glicerinas variando no teor de contaminantes parece ser pertinente.

Não houve evidência de queda na síntese relativa de proteína microbiana, estimada pela excreção diária de alantoína na urina, ou na eficiência de síntese microbiana, estimada pela relação entre alantoína e CMOD (TABELA 7). Como a participação da absorção de glicerol intacto pode ter sido uma proporção representativa do CMOD na Glicerina, a massa microbiana produzida por unidade de matéria orgânica fermentada no rúmen pode ter sido maior neste tratamento. Esta suposição é coerente ao aumento observado por Wang et al. (2009) na excreção de derivados purínicos na urina e queda na concentração de amônia no rúmen de garrotes suplementados com glicerina. Shin et al. (2009) também observaram queda no nitrogênio uréico no plasma em resposta à suplementação com glicerina. Glicerina pode ter induzido maior eficiência de síntese microbiana que o milho com textura dura do endosperma, maduro e finamente moído neste experimento.

A substituição de milho por glicerina aumentou a massa de dieta ingerida por unidade de tempo, sem afetar o tempo de ruminação (TABELA 8). Este fato sugere que palatabilidade não foi problema na dieta Glicerina, uma constatação pertinente devido à característica de líquido viscoso e com presença de contaminantes da glicerina bruta.

Schröder & Südekum (1999) observaram que glicerina de baixa pureza aumentou a ingestão de água por garrotes. Maior ingestão de água poderia induzir maior micção, ambientalmente indesejável. Entretanto, não houve suporte estatístico para o aumento numérico induzido pela glicerina no volume urinário (TABELA 7). Delineamentos utilizando maior número de unidades experimentais podem ser necessários para constatar esta possibilidade.

TABELA 8 Atividade mastigatória de vacas leiteiras nos tratamentos Glicerina e Controle.

	Glicerina	Controle	EPM ¹	<i>P</i>
	min d ⁻¹			
Ingestão	228	254	8,98	0,05
Ruminação	318	328	12,56	0,57
Mastigação ²	546	582	16,3	0,13
	min kg de consumo ⁻¹			
Ingestão	12,6	14,2	0,49	0,03
Ruminação	17,6	18,7	0,82	0,36
Mastigação	30,2	32,9	1,07	0,09

¹EPM = Erro padrão das médias

²Mastigação = Ruminação + Ingestão

5 CONCLUSÃO

A substituição total de milho grão finamente moído por glicerina bruta reduziu a produção de leite e induziu queda na eficiência alimentar, menor disponibilidade de glicose plasmática para síntese mamária de lactose foi um mecanismo plausível. A metabolização ruminal e sistêmica de glicerol associado a contaminantes como ingrediente de alta inclusão na dieta de vacas leiteiras diferiu do seu uso clássico como microingrediente gliconeogênico na prevenção e tratamento de cetose. O impacto de longo prazo da glicerina bruta sobre a saúde e a produtividade de vacas leiteiras precisa ser avaliado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Biodiesel**. Brasília, 2010. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=17680&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1266757031500>>. Acesso em: 18 fev. 2010.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Petroleum products and lubricants**: D6557-latest. West Conshohocken, 2006. 5 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 12. ed. Washington, 1975. v. 1, 1094 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15. ed. Virginia, 1990. v. 1, 1117 p.

BERGNER, H.; KIJORA, C.; CERESNAKOVA, Z.; SZAKACS, J. In vitro studies on glycerol transformation by rumen microorganisms. **Archives Tierernahrung**, Berlin, v. 48, n. 3, p. 245-256, 1995.

BIODIESELBR. **Biodiesel no Brasil**. Curitiba, 2009. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/biodiesel/brasil/biodiesel-brasil.htm>>. Acesso em: 18 jun. 2009.

BLACK, K. A.; EELLS, J. T.; NOKER, P. E.; HAWTREY, C. A. Role of hepatic tetrahydrofolate in the species difference in methanol toxicity. **Proceedings of the National Academy Science of the United States of America**, Washington, v. 82, n. 11, p. 38-54, June 1985.

BODARSKI, R.; WERTELECKI, T.; BOMMER, F.; GOSIEWSKI, S. The changes of metabolic status and lactation performance in dairy cows under feeding TMR with glycerin (glycerol) supplement at periparturient period. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities Animal Husbandry**, Madison, v. 8, n. 4, p. 1-9, Aug. 2005.

BOYD, J.; WEST, J. W.; BERNARD, J. K. Effects of increasing concentrations of dietary glycerol on ruminal environment and digestibility in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 1, p. 88, Jan. 2009. Abstract.

BUAINAIN, A. M. **Biodiesel no mundo**. Curitiba: BiodieselBr, 2008.
Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/biodiesel/mundo/biodiesel-nomundo.htm>>. Acesso em: 16 jun. 2008.

CERRATE, S.; YAN, F.; WANG, Z.; COTO, C.; SACAKLI, P.; WALDROUP, P. W. Evaluation of glycerin from biodiesel production as a feed ingredient for broilers chickens. **Poultry Science**, Amsterdam, v. 5, n. 6, p. 1001-1007, Dec. 2006.

CHEN, X. B.; GOMES, J. **Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives**: an overview of the technical details. Bucksburn: International Feed Resources Unit, 1995. 20 p.

CHUNG, Y. H.; RICO, D. E.; MARTINEZ, C. M.; CASSIDY, T. W.; NOIROT, V.; AMES, A.; VARGA, G. A. Effects of feeding dry glycerin to early postpartum holstein dairy cows on lactational performance and metabolic profiles. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 90, n. 8, p. 5682-5691, Aug. 2007.

DASARI, M. Crude glycerol potential described: while glycerol can be an attractive alternative energy source for animal feed, it has its own limitations in terms of lower energy content than oils and fats, impurities and possible effects on the metabolic activity of the animals. **Feedstuffs**, Minnetonka, v. 4, p. 16-19, Oct. 2007.

DEFRAIN, J. M.; HIPPEN, A. R.; KALSCHEUR, K. F.; JARDON, P. W. Feeding glycerol to transition dairy cows: effects on blood metabolites and lactation performance. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, n. 12, p. 4195-4206, Dec. 2004.

DONKIN, S. S.; KOSER, S. L.; WHITE, H. M.; DOANE, P. H.; CECAVA, M. J. Feeding value of glycerol as a replacement for corn grain in rations fed to lactating dairy cow. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 10, p. 5111-5119, Oct. 2009.

DRACKLEY, J. K. Opportunities for glycerol use in dairy diets. In: STATE DAIRY NUTRITION AND MANAGEMENT CONFERENCE, 4., 2008, Dubuque. **Proceedings...** Dubuque: SDN, 2008. 1 CD-ROM.

EELLS, J. T.; SALZMAN, M. M.; LEWANDOWSKI, M. F.; MURRAY, T. G. Formate-induced alterations in retinal function in methanol-intoxicated rats. **Toxicology Applied Pharmacology**, New York, v. 140, n. 1, p. 58-69, Sept. 1996.

FELICIANO FILHO, W.; PEREIRA JUNIOR, J. Introdução ao biodiesel. **Informativo CRQ-IV**, Pinheiros, v. 84, n. 4, p. 14-15, mar./abr. 2007.

FISHER, L. J.; ERFLE, J. D.; LODGE, G. A.; SAUER, F. D. Effects of propylene glycol or glycerol supplementation of the diet of dairy cows on feed intake, milk yield and composition, and incidence of ketosis. **Canadian Journal Animal Science**, Ottawa, v. 53, n. 2, p. 289-296, June 1973.

FISHER, L. J.; ERFLE, J. D.; SAUER, F. D. Preliminary evaluation of the addition of glucogenic materials to the rations of lactating cows. **Canadian Journal Animal Science**, Ottawa, v. 51, n. 3, p. 721-727, Dec. 1971.

FROGER, A.; ROLLAND, J. P.; BRON, P.; LAGRÉE, V.; LE CAHÉREC, F.; DESCHAMPS, S.; HUBERT, J. F.; PELLERIN, I.; THOMAS, D.; DELAMARCHE, C. Functional characterization of a microbial aquaglyceroporin. **Microbiology**, New York, v. 147, n. 5, p. 1129-1135, May 2001.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 92, n. 5, p. 405-416, 2001.

GARTON, G. A.; LOUGH, A. K.; VIOQUE, E. Glyceride hidrólisis and glycerol fermentation by sheep rumen contents. **Journal of General Microbiology**, London, v. 25, p. 215-225, 1961.

GERIS, R.; SANTOS, N. A. C.; AMARAL, B. A.; MAIA, I. S.; CASTRO, V. D.; CARVALHO, J. R. M. Biodiesel de soja: reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1369-1373, set./out. 2007.

GOFF, J. P.; HORST, R. L. Oral glycerol as an aid in the treatment of ketosis/fatty liver complex. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 1, p. 153, Jan. 2001. Abstract.

GOLOMBSKI, G.; RAETH-KNIGHT, M.; ZIEGLER, B.; LARSON, R.; ZIEGLER, D.; CHESTER-JONES, H.; LINN, J. Performance of post-weaned holstein heifer calves fed grain mixes with glycerin as an energy source. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 1, p. 87, Jan. 2009. Abstract.

GONZALES-QUEVEDO, A. **Toxicidad por metanol y su efecto sobre las vías visuales**. Habana: Instituto de Neurología y Neurocirugía, 2002. 222 p.

GROESBECK, C. N.; MCKINNEY, L. J.; DEROUCHEY, J. M.; TOKACH, M. D.; GOODBAND, R. D.; DRITZ, S. S.; NELSSSEN, J. L.; DUTTLINGER, A. W.; FAHRENHOLZ, A. C.; BEHNKE, K. C. Effect of glycerol on pellet mill production and nursery pig growth performance. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, n. 9, p. 120-132, Sept. 2008.

HANSE, C. F.; HEMANDEZ, A.; MULLAN, B. P.; MOORE, K.; TREZONA-MURRAY, M.; KING, R. H.; PLUSKE, J. R. A chemical analysis of samples of crude glycerol from the production of biodiesel in Australia, and the effects of feeding crude glycerol to growing-finishing pigs on performance, plasma metabolites and meat quality at slaughter. **Animal Production Science**, Amsterdam, v. 49, n. 2, p. 154-161, Jan. 2009.

HIBUSE, T.; MAEDA, N.; FUNAHASHI, T.; YAMAMOTO, K.; NAGASAWA, A.; MIZUNOYA, W.; KISHIDA, K.; INOUE, K.; KURIYAMA, H.; NAKAMURA, T.; FUSHIKI, T.; KIHARA, S.; SHIMOMURA, L. Aquaporin 7 deficiency is associated with development of obesity through activation of adipose glycerol kinase. **Proceedings of the National Academy Science of the United States of America**, Washington, v. 102, n. 2, p. 10993-10998, Aug. 2005.

HOBSON, P. N.; MANN, O. S. The isolation of glycerol-fermenting and lipolytic bacteria from the rumen of the sheep. **Journal of General Microbiology**, London, v. 25, p. 227-240, 1961.

HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. **The rumen microbial ecosystem**. 2. ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997. 719 p.

ILSE, B. R.; ANDERSON, V. L. Effect of glycerol in feedlot diets on animal performance. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 1, p. 89, Jan. 2009. Abstract.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY.
Nomenclature of organic chemistry: recommendations. Washington, 1993.
Disponível em: <<http://www.iupac.org/Publications>>. Acesso em: 10 fev. 2010.

JOHNS, A. T. Fermentation of glycerol in the rumen of the sheep. **New Zealand Journal Science Technology**, Wellington, v. 35, n. 4, p. 262-269, 1953.

JOHNSON, R. B. The treatment of ketosis with glycerol and propylene glycol. **Annual Report**, New York, v. 44, n. 1, p. 6-21, Jan. 1954.

KHALILI, H.; VARVIKKO, T.; TOIVONEN, V.; HISSA, K.; SUVITIE, M.
The effects of added glycerol or unprotected free fatty acids or a combination of the two on silage intake, milk production, rumen fermentation and diet digestibility in cows given grass silage based diets. **Agricultural Food Science Finland**, Jokioinen, v. 6, n. 5/6, p. 349-362, 1997.

KIJORA, C.; BERGNER, H.; KUPSCH, R. D.; HAGEMAN, L. Glycerol as feed component in diets of fattening pigs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 47, n. 4, p. 345-360, Jan. 1995.

KREHBIEL, C. R. Ruminal and physiological metabolism of glycerin. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 1, p. 392, Jan. 2008. Abstract.

LAMMERS, P. J.; KERR, B. J.; HONEYMAN, M. S.; STALDER, K.;
DOZIER, W. A.; WEBER, T. E.; KIDD, M. T.; BREGENDAHAL, K.
Nitrogen-corrected apparent metabolizable energy value of crude glycerol for laying hens. **Journal of Poultry Science**, Champaign, v. 87, n. 1, p. 104-107, Jan. 2007.

LIN, E. C. C. Glycerol utilization and its regulation in mammals. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 46, p. 765-766, 1977.

LINKE, P. L.; DEFRAIN, J. M.; HIPPEN, A. R.; JORDON, W. Ruminal and plasma responses in dairy cows to drenching or feeding glycerol. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, n. 1, p. 343, Jan. 2004. Abstract.

MA, F.; HANNA, M. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 70, n. 1, p. 1-15, Oct. 1999.

MACDOUGALD, O. A.; BURANT, C. F. Obesity and metabolic perturbations after loss of aquaporin 7, the adipose glycerol transporter. **Proceedings of the National Academy Science of the United States of America**, Washington, v. 102, n. 2, p. 10759-10760, Aug. 2005.

MACH, N.; BACH, A.; DEVANT, M. Effects of crude glycerin supplementation on performance and meat quality of Holstein bulls fed high-concentrate diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 4, p. 632-638, Apr. 2009.

MAYNARD, L. A.; LOOSLI, B. S.; HINTZ, H. F. **Nutrição animal**. 3. ed. Rio de Janeiro: F. Bastos, 1984. 726 p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7. ed. rev. Washington: National Academy, 2001. 381 p.

NIE, C. L.; WANG, X. S.; LIU, Y.; PERRET, S.; HE, R. Q. Amyloid like aggregates of neuronal tau induced by formaldehyde promote apoptosis of neuronal cells. **Neuroscience**, Oxford, v. 8/9, n. 1, p. 1-16, Jan. 2007.

OGBORN, K. L. **Effects of method of delivery of glycerol on performance and metabolism of dairy cows during the transition period**. 2006. 90 p. Dissertation (Master in Animal Science) - Cornell University, Ithaca.

ORSKOV, E. R.; GRUBB, D. A.; SMITH, J. S.; WEBSTER, A. J. F.; CORRIGALL, W. Efficiency of utilization of volatile fatty acids for maintenance and energy retention by sheep. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 41, n. 2, p. 541-551, Feb. 1979.

OSBORNE, V. R.; ODONGO, N. E.; CANT, J. P.; SWANSON, K. C.; MCBRIDE, B. W. Effects of supplementing glycerol and soybean oil in drinking water on feed and water intake, energy balance, and production performance dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 2, p. 698-707, Feb. 2009.

PAIGE, G. **Variation in the chemical composition of crude glycerin**: the knowledge bank at OSU. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1811/37082>>. Acesso em: 18 jan. 2010.

POTU, R. B.; ABUGHAZALEH, A. A.; HASTINGS, D.; ABOEL-NOR, S.; IBRAHIM, S. The effects of feeding glycerol on rumen fermentation and bacteria. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 1, p. 89, Jan. 2009. Abstract.

RAHIB, L.; SRIRAM, G.; HARADA, M. K.; LIAO, J. C.; DIPPLE, K. M. Transcriptomic and network component analysis of glycerol kinase in skeletal muscle using a mouse model of glycerol kinase deficiency. **Molecular Genetics and Metabolism**, Amsterdam, v. 3, n. 1, p. 106-112, Feb. 2009.

RÉMOND, B.; SOUDAY, E.; JOUANY, J. P. In vitro and in vivo fermentation of glycerol by rumen microbes. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 41, n. 2, p. 121-132, Apr. 1993.

RICO, D. E.; CHUNG, Y. H.; MARTINEZ, C. M.; CASSIDY, T.; HEYLER, K. S.; VARGA, G. A. Effects of replacing starch or sugar with glycerin in diets for dairy cows on production and blood metabolites. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 1, p. 87, Jan. 2009a. Abstract.

RICO, D. E.; CHUNG, Y. H.; MARTINEZ, C. M.; CASSIDY, T.; HEYLER, K. S.; VARGA, G. A. Effects of replacing starch or sugar with glycerin on ruminal fermentation during continuous culture. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 1, p. 89, Jan. 2009b. Abstract.

SCHRÖDER, A.; SÜDEKUM, K. H. Glycerol as a by-product of biodiesel production in diets for ruminants. In: NEW HORIZONS FOR AN OLD CROP, 10., 1999, Canberra. **Proceedings...** Canberra: Internation Rapeseed, 1999. p. 241.

SEBE, A.; SATAR, S.; UZUN, B.; TOPAL, M.; YESILAGAC, H.; AVCI, A. Intracranial hemorrhage associated with methanol intoxication. **Mount Sinai Journal of Medicine**, New York, v. 73, n. 8, p. 1120-1122, Dec. 2006.

SELLERS, R. S. Glycerin as a feed ingredient, official definition(s) and approvals. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, n. 1, p. 392, Jan. 2008. Abstract.

SHIN, J. H.; KIM, S. C.; WANG, D.; ADESOGAM, A. T.; STAPLES, C. R. Glycerol supplementation for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 1, p. 88, Jan. 2009. Abstract.

SIMON, A.; BERGENER, H.; SCHWABE, M. Glycerol-feed ingredient for broiler chickens. **Archives of Animal Nutrition**, Montreux, v. 49, n. 2, p. 103-112, Feb. 1996.

STATISTICAL ANALYSIS SOFTWARE INSTITUTE. **SAS® user's guide: statistics**. 5. ed. Cary, 1985. 1290 p.

TEPHLY, T. R. Minireview: the toxicity of methanol. **Life Science**, Elmsford, v. 48, n. 11, p. 1031-1041, Nov. 1991.

THOMPSON, J. C.; HE, B. B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstock. **Applied Engineering in Agriculture**, Saint Joseph, v. 22, n. 2, p. 261-265, Apr. 2006.

TRIGO, I. L. A.; MARTINI, A. M. de; FRANCISCO, F.; HUSAMI, M. S. **Biodiesel, barriers, potentials and impacts**. Disponível em: <http://www.esru.strath.ac.uk/EandE/Web_sites/0607/Biodiesel/glycerinep.htm>. Acesso em: 19 maio 2008.

WALLACE, K. B.; EELLS, J. T.; MADEIRA, V. M.; CORTOPASSI, G.; JONES, D. P. Mitochondriamediated cell injury: symposium overview. **Fundamental and Applied Toxicology**, Akron, v. 38, n. 1, p. 23-37, July 1997.

WANG, C.; LIU, Q.; YANG, W. Z.; DONG, K. H.; HUANG, Y. X.; GUO, G. Effects of glycerol on rumen fermentation, urinary excretion of purine derivatives and feed digestibility in steers. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 121, n. 1, p. 15-20, May 2009.

WANG, C.; LIU, Q.; YANG, W. Z.; HUO, W. J.; DONG, K. H.; HUANG, Y. X.; YANG, X. M.; HE, D. C. Effects of glycerol on lactation performance, energy balance and metabolites in early lactation Holstein dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 151, n. 1, p. 12-20, May 2008.

WILDMAN, E. E.; JONES, G. M.; WAGNER, P. E.; BOMAN, R. L.; TROUTT JUNIOR, H. F.; LESCH, T. N. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 65, n. 2, p. 495-501, Feb. 1982.