



RONALDO FRANCISCO DE LIMA

**SUBSTITUIÇÃO DE MILHO POR GLICERINA
BRUTA NA DIETA DE BOVINOS**

**LAVRAS - MG
2014**

RONALDO FRANCISCO DE LIMA

SUBSTITUIÇÃO DE MILHO POR GLICERINA BRUTA NA DIETA DE BOVINOS

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Nutrição e Produção de Ruminantes, para obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Marcos Neves Pereira

**LAVRAS - MG
2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Lima, Ronaldo Francisco de.

Substituição de milho por glicerina bruta na dieta de bovinos /
Ronaldo Francisco de Lima. – Lavras : UFLA, 2014.
119 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Marcos Neves Pereira.

Bibliografia.

1. Metanol. 2. Amido. 3. Acidose metabólica. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.208552

RONALDO FRANCISCO DE LIMA

SUBSTITUIÇÃO DE MILHO POR GLICERINA BRUTA NA DIETA DE BOVINOS

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Nutrição e Produção Animal, para obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 14 de agosto de 2014

Dr. Gustavo Augusto Andrade	IF Sul de Minas
Dr. Raimundo Vicente de Sousa	UFLA
Dra. Renata Apocalypse Nogueira Pereira	EPAMIG
Dr. Sandro César Salvador	UFLA

Dr. Marcos Neves Pereira
Orientador

**LAVRAS – MG
2014**

*À minha mãe Norma, ao meu pai Geraldo, ao meu irmão Rodrigo e à minha
esposa Renata,*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde e sabedoria.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade concedida para realização do doutorado.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Aos membros da banca de avaliação professores Sandro César Salvador, Raimundo Vicente de Souza, Gustavo Augusto Andrade e Renata Apocalypse Nogueira Pereira.

Ao Prof. Marcos Neves Pereira pela orientação e ensinamento.

Ao Grupo do Leite que sempre está presente nos experimentos.

A todos que contribuíram para a realização do tão sonhado Doutorado.

“Compreender que há outros pontos de vista é o início da sabedoria”

Thomas Campbell

RESUMO

O glicerol na glicerina de biodiesel pode substituir o amido de milho como substrato energético para ruminantes. Avaliou-se a glicerina bruta, rica em metanol (7,3% de metanol e 70,2% de MS na MN), na alimentação de bovinos. No Experimento 1, 36 novilhas mestiças Holandês-Zebu (177 ± 56 kg) foram alimentadas com 0% (T0), 5,6% (T6) ou 11,9% (T12) de glicerina bruta na MS da dieta, e 15,2%, 7,8% ou 0% de milho finamente moído, respectivamente. A composição das dietas foi (% da MS): 69,6 \pm 1,3 de silagem de cana de açúcar, 14,2 \pm 0,3 de farelo de soja, 1,0 de ureia, 12,6 \pm 0,4 de PB e 49,0 \pm 0,7 de FDN. As novilhas foram blocadas pelo peso vivo e receberam um tratamento por 91 d, após um período de padronização de 14 d. Os dados foram obtidos ao longo do tempo e o valor da mesma variável no final do período de padronização foi usado como covariável no modelo estatístico. Contrastes linear (T0 vs. T12) e quadrático (T6 vs. T0+T12) compararam tratamentos. Aumento no teor de glicerina na dieta induziu queda linear no consumo de MS (CMS) nos dois primeiros dias do período experimental ($P < 0,05$), e tendência de queda quadrática no CMS ($P = 0,13$) e no consumo de MO digestível ($P = 0,10$) ao longo do experimento. A glicerina reduziu de forma quadrática o peso vivo ajustado para o peso no final do período de padronização ($P = 0,03$), o perímetro torácico ($P = 0,09$) e o escore de condição corporal ($P = 0,02$), mas não houve efeito detectável sobre o ganho de peso ($P > 0,38$): 306 g/d no T0, 343 g/d no T6 e 254 g/d no T12. Houve tendências de variação quadrática ($0,10 < P < 0,15$) nas digestibilidades aparentes no trato digestivo total da MS, MO e FDN, maiores no T6 e menores no T0. O pH ruminal aumentou ($P < 0,01$) e o teor de protozoários no fluido foi reduzido ($P = 0,07$) pela glicerina, ambos de forma linear. Não houve efeito de tratamento sobre a relação entre o teor de alantoína e o de creatinina na urina ($P > 0,49$). O menor teor de N-ureico no plasma foi observado no T6 e o maior no T0 ($P = 0,05$ para contraste quadrático). A glicerina reduziu linearmente o teor de glicose no plasma sanguíneo ($P = 0,02$) e aumentou os teores de metanol ($P = 0,02$) e formato ($P < 0,01$). Houve tendência de queda linear no teor plasmático da enzima aspartatoaminotransferase com maior teor de glicerina na dieta ($P = 0,13$), sem afetar a gama-glutamiltransferase ($P > 0,26$). Os tempos diários de ruminação e de mastigação foram maiores no T6 e menores no T0 ($P < 0,05$ para contraste quadrático), mas a atividade mastigatória por unidade de CMS não diferiu entre tratamentos ($P > 0,35$). Houve variação linear em parâmetros descrevendo o balanço ácido-básico do sangue venoso, sugerindo que a glicerina induziu acidose metabólica. O Experimento 2 avaliou parâmetros ruminais e sanguíneos de vacas não lactantes após a infusão matinal pela cânula ruminal (0,5% do peso vivo) de milho finamente moído (M), milho moído, reidratado e ensilado (MR), glicerol puro (G) ou glicerol com 7,2% de metanol (GM). Glúten de milho foi acrescido aos tratamentos G e GM para

obter o mesmo teor de N de M e MR. Quatro vacas mestiças Holandês-Zebu (576±35 kg) receberam uma sequência dos tratamentos em Quadrado Latino 4 x 4 com períodos de 5 d. Amostras do sangue jugular e do fluido ruminal foram obtidas simultaneamente a intervalos de 2 h por 24 h após as infusões. Contrastes avaliaram tratamentos: C1=M+MR vs. G+GM, C2= G vs. GM, e C3=M vs. MR. O CMS foi 17,6 kg/d no M, 17,0 kg/d no MR, 15,2 kg/d no G e 15,2 kg/d no GM ($P=0,03$ para C1). A degradação ruminal *in situ* de MS de alfafa, silagem de milho, silagem de cana e tiftonem 6, 12 e 24 h de incubação foi inibida pela glicerina ($P<0,01$ para C1). O pH ruminal médio ($P=0,12$ para C1) e máximo ($P=0,04$ para C1) foram menores no milho do que no glicerol. O glicerol aumentou os teores de amônia no rúmen 6 e 8 h após a infusão e o de N-ureico no plasma 8, 12, 14, 16 e 20 h, mas o glicerol reduziu a amônia ruminal 2 h após a infusão ($P<0,01$ para C1). O teor de glicose no plasma foi aumentado pelo glicerol, devido ao maior teor 2, 4 e 6 h após as infusões ($P<0,01$ para C1). Não houve efeito sobre parâmetros sanguíneos descrevendo o balanço ácido-básico do sangue venoso ($P>0,25$). A substituição de milho por glicerina bruta na dieta de novilhas reduziu o teor plasmático de glicose, enquanto a infusão de glicerol no rúmen de vacas aumentou a glicose no plasma. Não foram observados sintomas clínicos de intoxicação por metanol quando novilhas foram alimentadas com glicerina bruta por 91 dias (224 mg de metanol/kg de peso vivo) ou vacas receberam infusões de glicerol e metanol no rúmen (207 mg de metanol/kg de peso vivo). A substituição parcial de milho por glicerina bruta foi uma alternativa viável, mas a substituição completa deprimiu o consumo e o desempenho de novilhas.

Palavras-chaves: biodiesel, bovinos, glicerol, glicose, metanol.

ABSTRACT

Glycerol in glycerin from biodiesel can substitute corn starch as an energy source for ruminants. We evaluated methanol rich, crude glycerin (7.3% methanol and 70.2% DM, as fed basis) as bovine feed. In Experiment 1, 36 Holstein-Zebu crossbred heifers (177 ± 56 kg) were fed 0% (T0), 5.6% (T6), or 11.9% (T12) of crude glycerin in diet DM, and 15.2%, 7.8% or 0% of finely ground corn, respectively. Diets composition were (% of DM): 69.6 ± 1.3 of sugarcane silage, 14.2 ± 0.3 of soybean meal, 1.0 of urea, 12.6 ± 0.4 of CP, and 49.0 ± 0.7 of NDF. Heifers were blocked by body weight and received a treatment for 91 d, after a 14-d standardization period. Data were obtained over time and the value of the same variable at the end of the standardization period was used as covariate in the statistical model. Linear (T0 vs. T12) and quadratic (T6 vs. T0 + T12) contrasts compared treatments. Increasing dietary glycerin content induced a linear decrease in DM intake (DMI) in the first two days of the experimental period ($P < 0.05$), and a quadratic trend for decline in DMI ($P = 0.13$) and digestible OM intake ($P = 0.10$) throughout the experiment. Glycerin quadratically reduced body weight adjusted for the weight at the end of the standardization period ($P = 0.03$), girth circumference ($P = 0.09$), and body condition score ($P = 0.02$), but had no detectable effect on weight gain ($P > 0.38$): 306 g/d on T0, 343 g/d on T6, and 254 g/d on T12. There were trends for quadratic variation ($0.10 < P < 0.15$) in total tract apparent digestibility of DM, OM, and NDF, highest on T6 and lowest on T0. Ruminal pH increased ($P < 0.01$) and the content of protozoa in the fluid was reduced ($P = 0.07$) by glycerin, both linearly. There was no effect of treatment on the ratio between the content of allantoin and creatinine in urine ($P > 0.49$). The lowest content of plasma urea-N was observed on T6 and the highest was on T0 ($P = 0.05$ for quadratic contrast). Glycerin linearly reduced the content of blood plasma glucose ($P = 0.02$) and increased the contents of methanol ($P = 0.02$) and formate ($P < 0.01$). There was a trend for a linear decrease in the plasma content of the enzyme aspartate aminotransferase with increased content of glycerin in the diet ($P = 0.13$), with no effect on gamma glutamyltransferase ($P > 0.26$). Rumination and chewing time per day were highest on T6 and lowest on T0 ($P < 0.05$ for quadratic contrast), but chewing activity per unit of DMI did not differ among treatments ($P > 0.35$). There were linear variations in parameters describing the acid-base balance in venous blood, suggesting that glycerin induced metabolic acidosis. Experiment 2 evaluated ruminal and blood parameters of non-lactating cows after the morning infusion through rumen cannula (0.5% of body weight) of finely ground corn (C), rehydrated and ensiled ground corn (MR), pure glycerol (G), or glycerol with 7.2% methanol (GM). Corn gluten meal was added to treatments G and GM to achieve similar N content to M and MR. Four crossbred Holstein-Zebu

cows (576 ± 35 kg) received a sequence of the treatments in a 4 x 4 Latin Square with 5-d periods. Samples of jugular blood and rumen fluid were obtained simultaneously at 2-h intervals for 24 h after infusions. Contrasts evaluated treatments: C1 = M + MR vs. GM + G, C2 = G vs. GM, and C3 = M vs. MR. The DMI was 17.6 kg/d on M, 17.0 kg/d on MR, 15.2 kg/d on G, and 15.2 kg/d on GM ($P=0.03$ for C1). Ruminal *in situ* degradation of DM from alfalfa, corn silage, sugarcane silage, and Tifton at 6, 12, and 24 h of incubation was inhibited by glycerol ($P<0.01$ for C1). Mean ($P=0.12$ for C1) and maximum ($P=0.04$ for C1) ruminal pH on corn were lower than on glycerol. Glycerol increased the contents of ruminal ammonia 6 and 8 h post-infusions and plasma urea-N 8, 12, 14, 16, and 20 h, but glycerol reduced ruminal ammonia 2 h post-infusion ($P<0.01$ for C1). Plasma glucose content was increased by glycerol, due to the increased concentrations 2, 4, and 6 h after infusions ($P<0.01$ for C1). There were no treatment effects on blood parameters describing the acid-base balance in venous blood ($P>0.25$). The replacement of crude glycerin for corn in the diet of heifers reduced plasma glucose content, while the infusion of glycerol in the rumen of cows increased plasma glucose. Clinical symptoms of methanol toxicity were not observed when heifers were fed crude glycerin for 91 days (224 mg of methanol/kg of bodyweight) or cows received glycerol infusions in the rumen (207 mg of methanol/kg of bodyweight). The partial replacement of corn by crude glycerin was a viable alternative, but complete replacement depressed intake and heifer performance.

Keywords: biodiesel, bovine, glucose, glycerol, methanol.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1	13
1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	Silagem de cana-de-açúcar	16
2.2	Glicerina	17
2.2.1	Produção de glicerina bruta a partir de biodiesel	18
2.2.2	Qualidade da glicerina bruta	19
2.3	Toxicidade do metanol	20
2.4	Glicerina na alimentação de bovinos leiteiros	24
2.5	Glicerina na alimentação de bovinos de corte	27
2.5.1	Metabolismo da glicerina no rúmen	30
2.5.2	Gliconeogênese e metabolismo hepático de glicerina	33
2.6	Equilíbrio Acidobásico Venoso	37
	REFERÊNCIAS	43
	CAPÍTULO 2 Substituição de milho por glicerina bruta na dieta de novilhas alimentadas com silagem de cana-de-açúcar ...	55
1	INTRODUÇÃO	59
2	MATERIAL E MÉTODOS	61
2.1	Análises estatísticas	66
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4	CONCLUSÕES	81
	REFERÊNCIAS	82
	CAPÍTULO 3 Comparação entre glicerina purificada aditivada mais metanol com milho moído e milho reidratado: parâmetros sanguíneos e ruminais	88
1	INTRODUÇÃO	91

2	METODOLOGIA	93
2.1	Análises estatísticas	96
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	97
4	CONCLUSÕES	113
	REFERÊNCIAS	114

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

A tendência mundial de substituição de combustíveis fósseis por biocombustíveis, como o biodiesel, torna pertinente o estudo sobre possíveis utilizações de seus resíduos industriais. Segundo o Ministério das Minas e Energia, o Brasil produziu 2,9 bilhões de litros de biodiesel em 2013 (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO - ANP, 2011). Para cada 50 litros de biodiesel são produzidos de 4 a 5 litros do subproduto glicerina bruta, (THOMPSON; HE, 2006). A glicerina é rica em glicerol, um composto tricarbônico de alto conteúdo energético, sendo um eventual substituto de milho na alimentação animal (DEFRAIN et al., 2004). Apesar do glicerol quimicamente puro ser um composto valioso industrialmente, a purificação pode ser antieconômica e insuficiente para consumir o crescimento projetado na produção mundial de glicerina bruta.

O uso de glicerol na prevenção e tratamento de cetose em vacas leiteiras é conhecido de longa data (JOHNSON, 1954; GOFF; HORST, 2001). Entretanto, existe pouca informação sobre a utilização de glicerina bruta contendo catalizadores, sais e metanol, na alimentação de ruminantes. As manifestações clínicas da intoxicação por metanol incluem distúrbios visuais, depressão do sistema nervoso central, disfunção respiratória e acidose metabólica (NIE et al., 2007).

Alguns teores de amido dietético são requeridos para maximizar a fermentação ruminal (HALL; HEREJK, 2001). Portanto, quando glicerina bruta substitui completamente o milho do concentrado, em dietas baseadas em silagem de cana, o desempenho animal pode não ser satisfatório, pela ausência de amido na dieta. Com isso avaliou-se em dois experimentos o efeito da glicerina bruta na dieta de bovinos. O objetivo do primeiro experimento foi avaliar o ganho de peso, a digestibilidade, a eficiência alimentar, o equilíbrio acidobásico venoso e

a função hepática de novilhas alimentadas com silagem de cana e teores dietéticos crescentes de glicerina bruta, em substituição a milho finamente moído. O objetivo do segundo experimento foi avaliar parâmetros ruminais e sanguíneos de vacas que receberam pulsos ruminais de milho seco moído, milho reidratado, glicerina pura ou glicerina acrescida de 7,2% de metanol.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Silagem de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma gramínea tropical capaz de ter alta produção de matéria seca por hectare e alto conteúdo de sacarose, um carboidrato não fibroso de alta digestibilidade para ruminantes (PEREIRA, 2012). Nutricionalmente, a FDN da cana tem digestibilidade baixa comparada a outras forrageiras tropicais, o que pode limitar fisicamente o consumo de alimentos e reduzir o desempenho de vacas leiteiras (CORREA et al., 2003). Além disso, a cana possui baixo teor de proteína e minerais. No entanto a suplementação adequada tem propiciado seu uso por produtores de leite e em confinamentos de bovino de corte no Brasil (MILEN et al., 2009). A colheita diária, manual ou mecanizada da cana fresca pode ser inadequada à operação de algumas fazendas, sendo assim a prática da ensilagem da cana pode ser uma solução operacional para tornar mais abrangente o aproveitamento do potencial produtivo da forrageira. A cana-de-açúcar possui boas características químicas para ensilagem, pois é rica em carboidratos solúveis, tem baixo poder tamponante e tem teor de matéria seca ao redor de 30% (MCDONALD, 1981). Entretanto, devido ao seu alto teor de sacarose e ser rica em leveduras epífitas, a cana favorece o crescimento desses microrganismos, resultando em fermentação alcoólica. A fermentação alcoólica resulta em perda de MS, a maior parte na forma de carboidratos não fibrosos, aumentando 10 a 20 unidades percentuais no teor de FDN da forragem (MIRANDA et al., 2011). Segundo Zopollatto, Daniel e Nussio (2009), o teor de etanol médio de 19 silagens de cana foi de 7,8% da matéria seca, variando de 0,3 a 21,8%. Ao ensilar a cana se perde quantidade de alimento e valor energético da forragem quanto maior for o tempo de armazenamento, pois as leveduras não são totalmente inibidas por baixo pH e anaerobiose (ÁVILA et al., 2014). Vários

aditivos, como bactérias homo e heterofermentativas, inibidores químicos de leveduras ou sequestrantes de umidade, têm sido avaliados na ensilagem de cana, mas o efeito desses sobre a perda de MS e o teor FDN da silagem tem sido baixo (ZOPOLLATTO; DANIEL; NUSSIO, 2009). A inoculação com cepas de bactérias heterofermentativas do tipo *Lactobacillus buchneri* isoladas de silagem de cana aumentou a concentração de acetato e propionato e diminuindo a concentração de etanol e levedura (ÁVILA et al., 2009). Sendo assim, essa cepa pode ser um aditivo viável para a ensilagem da cana-de-açúcar.

É consenso a redução de consumo e da digestibilidade de nutrientes quando a cana-de-açúcar é ensilada. Balieiro Neto et al. (2009) encontraram menor consumo e digestibilidade aparente da matéria seca em carneiros, quando comparou a cana ensilada com inoculante e cana in natura. Essa redução do consumo e digestibilidade da MS podem ser explicadas pelo aumento nos teores de FDN e redução dos carboidratos não fibrosos (CNF).

O desempenho de animais alimentados com cana-açúcar *in natura* tem mostrado resultados inferiores ao de silagem de milho, porém satisfatório para recria de bovinos leiteiros (acima de 800 g) na maioria dos experimentos realizados, pois apesar da baixa digestibilidade do FDN que inibe o consumo de MS, a digestibilidade do CNF é alta (ANDRADE, 1999; GALLO, 2001), sendo uma alternativa viável para recria de novilhas leiteiras.

2.2 Glicerina

A glicerina é o termo comercial para definir 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). A glicerina purificada tem várias aplicações, tais como emulsificante, amaciante, plastificante, estabilizante e umectante em pães, sorvetes e tabaco; em loções

para a pele e em inúmeras preparações cosméticas e farmacêuticas; como meio de proteção para congelamento de microrganismos, células sanguíneas, esperma, córneas e outros tecidos; em tintas de impressão, gomas e resinas em tintas e revestimento; como mistura anticongelante, e como matéria-prima para nitroglicerina (TRIGO et al., 2008).

2.2.1 Produção de glicerina bruta a partir de biodiesel

Atualmente, boa parte da glicerina produzida mundialmente é subproduto da produção de biodiesel. O biodiesel pode ser produzido 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 como produto o éster (biodiesel) e a glicerina rica em glicerol (GERIS et al., 2007). A reação pode ser catalisada por ácido, base ou enzima. Como a reação é reversível, o álcool é adicionado em excesso para deslocar a reação no sentido dos produtos. Os álcoois utilizados podem ser metanol, etanol, propanol ou butanol, sendo os dois primeiros os mais utilizados. O metanol, em relação aos demais álcoois é mais reativo, mais eficiente, apresenta menor tempo de reação, menor consumo de eletricidade, utiliza menos equipamentos para sua fabricação e é mais barato que o etanol. Os ésteres metílicos são também mais fáceis de serem separados da glicerina (GERIS et al., 2007).

O catalisador para a reação de transesterificação pode ser um ácido (H_2SO_4 e ácidos sulfônicos), uma base (NaOH, KOH, carbonatos ou alcóxidos) ou uma enzima (lipases). A catálise mais usada é a alcalina por apresentar a maior eficiência de conversão dos óleos em metil ésteres e por ocorrer de

maneira mais rápida que as catálises ácida ou enzimática (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001). Na sequência, o biodiesel deverá ser separado do glicerol utilizando-se uma centrífuga ou um tanque de separação, já que são substâncias imiscíveis. Este glicerol ainda estará contaminado por sabões, metanol e catalisador. Em seguida, o glicerol passa por processos de purificação, adicionando-se um ácido para transformar o sabão em ácidos graxos livres e para neutralizar o catalisador e, só então, é retirado o excesso de álcool. Este glicerol será vendido no mercado como glicerina bruta, ou sofrerá outros processos de purificação para atender especificações mais rigorosas, de maior valor agregado e vendido como glicerina bidestilada (FELICIANO FILHO; PEREIRA JÚNIOR, 2007).

2.2.2 Qualidade da glicerina bruta

A pureza da glicerina, ou teor de glicerol, está em detrimento ao teor dos contaminantes ou resíduos de óleos e isso dependerá da eficiência de cada indústria de biodiesel. A avaliação de sete amostras de glicerina bruta variou de 75,2 a 86,9% de glicerol, 1,1 a 13,1% de gordura e 0,01 a 13,9% metanol (THOMPSON; HE, 2006). A purificação pode resultar em produtos com 99% ou mais de glicerol para a indústria de cosméticos e farmacêuticos. O valor da glicerina é ditado por seu conteúdo de impurezas residuais como catalisadores, sais e metanol, que podem causar problemas no uso deste ingrediente para a alimentação animal. O nível de sal na glicerina bruta, que são formados devido à adição de catalisadores, varia muito. Há relatos na literatura de 3,57 a 11,5 % de sais (DEFRAIN et al., 2004).

O glicerol é considerado um ingrediente seguro para alimentação animal. Entretanto, o nível de contaminantes da glicerina bruta oriunda da indústria de biodiesel deve ser considerado. O teor de metanol é particularmente

importante e pode variar de quantidades irrisórias a 26,7% (SCHRODER; SUDEKUM, 2014). O FDA (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos sugere que glicerina com teor de metanol acima de 150 mg/kg é considerada não segura para alimentação animal, já o governo da Alemanha considera um teor de metanol de até 5000 mg/kg de glicerina como seguro (SELLERS, 2008). No Brasil ainda não existe uma legislação sobre os teores desse contaminante.

2.3 Toxicidade do metanol

O metanol é um líquido volátil, translúcido e com odor fraco, ligeiramente mais adocicado que o etanol. É usado na produção industrial de compostos orgânicos sintéticos e constituinte de um grande número de solventes comerciais (INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY - IUPAC, 2012).

O composto metanol é pouco tóxico a animais. A toxicidade do metanol é causada por seus metabolitos (WILLIAMS; HATCH, 1997). A oxidação do metanol a formaldeído ocorre principalmente no fígado, onde se metaboliza 90% do álcool metílico através da enzima álcool desidrogenase. O formaldeído é então oxidado a ácido fórmico, por ação da enzima formaldeído desidrogenase e é convertido a dióxido de carbono e água por meio da 10-formil tetrahidrofolato síntese (JACOBSEN; MCMARTIN, 1986). A enzima 10-formil tetrahidrofolato sintetase é dependente de folato. Sendo assim a deficiência de folato pode determinar o tempo de eliminação do formato do organismo.

A intoxicação por metanol em primatas é caracterizada por acidose metabólica grave e toxicidade ocular acentuada (RÖE, 1955; MCMARTIN et al., 1975; MARTIN-AMAT et al. 1977; MARTIN-AMAT et al., 1978; NIE et al., 2007). Essa acidose metabólica é resultante da conversão de metanol a ácido

fórmico (álcool desidrogenase) e seu acúmulo no sangue (MCMARTIN et al., 1975; MARTIN-AMAT et al., 1977). Esses autores observaram queda no teor de bicarbonato no sangue em resposta ao aumento no teor de formato na tentativa de tamponamento sanguíneo.

A intoxicação por metanol na espécie humana causa um grau variado de disfunções neurológicas. Necrose bilateral do putâmen (raramente com hemorragia), lesões focais hipotalâmicas e cerebelares e desmielinização subcortical da substância branca têm sido descritos na literatura (SEBE et al., 2006). Os distúrbios visuais ocorrem entre 18 e 48 horas após a ingestão de metanol. Tanto a intoxicação aguda quanto a crônica provocam disfunção da retina e lesão do nervo ótico com sequelas clínicas em modelos animais experimentais (SEBE et al., 2006). Após administração de doses de 3g/kg de peso vivo, uma síndrome foi produzida em macacos caracterizando por um período de latência de 8 a 12 horas, seguido por acidose metabólica, lesão ocular, coma e morte (MCMARTIN et al, 1975; BAUMBACH et al., 1977).

Macacos mantidos em regime experimental com concentrações sanguíneas de formato em torno de 10 mEq/L e valores de pH do sangue arterial variando de 7,1 a 7,3 tiveram edema do disco óptico e perda da resposta pupilar à luz (MARTIN-AMAT et al., 1977). MCMartin et al. (1977) e Makar e Tephly (1977) mostram que a intoxicação por metanol não está associada com o formaldeído, pois não houve aumento de formaldeído nos fluidos corporais, com isso espera-se que o formato não seja convertido a formaldeído *in vivo* uma vez que foi rapidamente metabolizado a CO₂ em ratos (PALESE; TEPHLY, 1975) e macacos (MCMARTIN et al., 1977).

O formato produz toxicidade além da acidose. Quando formato foi infundido em pH fisiológico em macacos, houve mudança no reflexo pupilar, edema e lesões do disco ótico caracterizado por inchaço intra-axonal e perturbação mitocondrial (MARTIN-AMAT et al., 1978). O mecanismo da

toxicidade do metanol está relacionado com a inibição da fosforilação oxidativa baseada na inibição da atividade da citocromo oxidase C (MARTIN-AMAT et al., 1977; NICHOLLS, 1975). O ácido fórmico liga na posição livre do ferro heme da citocromo oxidase C inibindo sua ligação com O_2 e, conseqüentemente, transporte final de elétrons para a formação de água (NICHOLLS, 1975). As concentrações inibitórias de ácido fórmico à citocromo oxidase nesses estudos variaram de 5-30 mM de formato no sangue (NICHOLLS, 1975). A inibição da enzima citocromo oxidase C inibe o processo de respiração mitocondrial, induzindo hipóxia da célula, mesmo com PO_2 sanguínea normal. Isso é o maior causador da acidose metabólica, pois causará diferença aniônica elevada devido ao metabolismo celular direcionado a lactato (CHIANG, 1992). A hipóxia ocorrerá, pois, mesmo tendo O_2 a citocromo oxidase não consegue usá-lo como receptor final de elétrons. Não havendo o transporte final de elétrons acumulará íons H^+ . Em conseqüência disso, para a célula manter o aporte de energia, o metabolismo será direcionado no sentido de lactato. O acúmulo de H^+ e lactato aumentará a diferença cátion aniônica (JONES, 2010).

Os teores no sangue de formaldeído, formato, pH, gases e bicarbonato sanguíneo em macacos recebendo metanol com deficiência ou não de folato foi avaliado por McMartin et al. (1978). Não foi detectado acúmulo de formaldeído em animais com ou sem deficiência de folato, enfatizando a rapidez no seu metabolismo a formato pelo fígado, com meia vida aproximada de 1,5 min. Os teores de formato no sangue foram duas vezes maiores nos animais deficientes em folato que nos não deficientes. O teor de bicarbonato arterial 12 horas após a administração de metanol foram de 8,8 e 8,4 mEq/L para macacos com deficiência e macacos sem deficiência de folato, respectivamente. O teor de formato na urina foi dez vezes mais alto que o teor do sangue. Black et al. (1985) avaliou os teores de vários derivados de folato e de enzimas folato dependentes no fígado de macaco e de ratos. O teor de H_4 folato no fígado de

macacos foi 60% do teor nos ratos. A taxa máxima de oxidação de formato em macacos foi 50% da taxa de ratos (MCMARTIN et al., 1978). A diferença na suscetibilidade à intoxicação por metanol entre espécies pode ser pelo menos em parte explicado pela diferença no teor de H₄ folato no fígado.

A dose letal mínima (DL₅₀) do metanol varia de 7000 a 13000 mg/kg de peso vivo no rato, coelho e cão e entre 2000 a 7000 mg/kg em primatas (EVIROMENTAL HEALTH CRITERIA 196 - EHC 196, 2010). Os primatas são considerados os animais mais sensíveis à intoxicação ao metanol e, portanto, muito utilizados como modelo para estudar a toxidez a este composto (CLAY; MURPHY; EATKINS, 1975). O potencial de intoxicação do metanol entre espécies se dá em função da sua capacidade de metabolizar o formato. Como o formato é o metabólito tóxico, responsável pela acidose metabólica e degeneração neuronal, a metabolização do formato determina a toxicidade ao álcool. Primatas acumulam grandes quantidades de formato após a ingestão de metanol, enquanto que isto não ocorre em roedores e cães (BLACK et al., 1985). A oxidação do metanol, envolvendo a enzima álcool desidrogenase, pode ser inibida por concentração equimolar de etanol, devido a maior especificidade desta enzima ao etanol (ZATMAN, 1946). Por isto, a administração de etanol é uma forma de tratamento de humanos com intoxicação aguda por metanol.

Não existem relatos descrevendo a intoxicação ou a capacidade de metabolização do metanol a ácido fórmico ou a CO₂ em ruminantes. No entanto, a produção de metanol no rúmen a partir de pectina já foi descrita há mais de 50 anos (SMART et al., 1964). A formação de metanol no rúmen, a partir da pectina, é resultante da rápida hidrólise de ésteres metílicos, envolvendo duas enzimas presentes em microrganismos do rúmen (SMART et al., 1964). A pectina esterase catalisa a hidrólise dos grupos metil éster da pectina a metanol e ácido galacturônico e a enzima galacturonase hidrolisa a ligação glicosídica α -1,4 das substâncias pécticas.

Vantcheva, Pradhan e Hemken (1970) demonstraram a produção de metanol por bactérias ruminais *in vivo* e *in vitro* a partir da pectina. A produção de metanol após a incubação *in vitro*, em vários tempos, de metoxil pectina apresentou um pico de produção de metanol após meia hora de incubação. Em experimento com animais canulados, vacas consumindo feno de alfafa produziram mais metanol no rúmen que vacas consumindo feno de alfafa e grãos (28,1 e 22,6µg/ml, $P < 0,02$). Esses autores não descreveram a composição da dieta de grãos, no entanto justificaram o aumento do metanol ao maior teor de pectina na dieta baseada em apenas feno de alfafa.

Alguns autores têm sugerido a formação de metano a partir de metanol no rúmen (PATTERSON; HESPELL, 1979; GENTHNER; DAVIS; BRYANT, 1981; POL; DEMEYER, 1988). A bactéria *Methanosarcina spp*, presente no rúmen, pode utilizar metanol como um substrato metanogênico, (POL; DEMEYER, 1988). Entretanto, Genthner Davis e Bryant (1981) demonstraram que *Eubacterium limosum* lado do rúmen de ovelha converteu metanol principalmente em acetato e butirato.

2.4 Glicerina na alimentação de bovinos leiteiros

Para cada 100 litros de biodiesel são produzidos 10 litros de glicerina bruta (WEN, 2012). O aumento na produção de glicerina, impulsionado pelo aumento da demanda por biodiesel, pode exceder a demanda da indústria de alimentos e produtos de higiene pessoal, podendo se tornar um concentrado energético viável para animais.

O uso do glicerol no tratamento de cetose em vacas leiteiras no período de transição tem sido estudado há mais de 60 anos (JOHNSON, 1954). No entanto, o seu uso na alimentação animal como ingrediente da dieta é mais recente. Concentrações dietéticas de glicerina bruta entre cinco e 10% têm sido

avaliadas para suínos e aves, sem prejuízo ao desempenho animal (SIMON; BERGENER; SCHWABE, 1996; KIJORA et al., 1995; CERRATE et al., 2006). Lammers, Buckmaster e Heinrichs (1996) estimaram em galinhas poedeiras que o conteúdo de energia metabolizável da glicerina bruta, contendo 90% de glicerol, 9% de umidade e 0,028% de metanol foi 14% superior ao do milho em grão moído e metade do conteúdo no óleo de soja.

Donkin et al. (2009) avaliaram a substituição de milho por uma mistura de glicerol puríssimo (99,5% USP/FCC, Kosher grade) e farelo de glúten de milho (6,25:1) na dieta de vacas leiteiras. Sessenta vacas receberam os tratamentos após um período de padronização de duas semanas. Os tratamentos foram: 0,5; 10 ou 15% de glicerol na matéria seca dietética. A produção diária de leite foi ao redor de 37 kg e não foi afetada por tratamento, variando de 36,4 kg no tratamento com 15% de glicerol 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 glicerol ($P < 0,05$ para a interação entre tratamento e semana experimental). Não foi detectado efeito de tratamento sobre o teor de sólidos do leite. Esses dados sugerem que a substituição de milho por glicerol puro, em inclusões dietéticas até 15% da matéria seca, foi adequada.

Carvalho et al. (2011) estudaram o efeito de substituição de 10% de milho por glicerina pura em vacas leiteiras do dia -28 ao dia 56 relativo ao parto. Foi observado que não houve diferença no consumo de MS antes e após o parto (18,2 vs. $18,6 \pm 0,43$, nos tratamentos sem e com glicerol, respectivamente) e nem na produção de leite (35,8 vs. $37,0 \pm 1,45$) e de seus constituintes. O tratamento com glicerina diminuiu a concentração de ácidos graxos não esterificados no plasma (AGNE) e aumentou o teor de β -OH-butilato no sangue antes e após o parto. O aumento na concentração de β -OH-butilato no sangue tem sido observado em vacas de transição alimentadas com glicerol em relação

ao controle (DEFRAIN et al., 2004; CHUNG et al., 2007; OSBORNE et al., 2009). Não houve diferença no pH ruminal mas houve maior proporção molar de propionato, butirato e valerato e menor proporção de acetato. A relação entre acetato e propionato foi menor quando glicerina foi adicionada à dieta (2,76 vs. $1,88 \pm 0,14$).

Zacaroni (2010) avaliou a resposta de vacas leiteiras à substituição total de milho grão moído fino por glicerina bruta de biodiesel (76% de glicerol e 0,88% de metanol). A inclusão dietética de glicerina bruta foi 12,5% da matéria seca. Não houve efeito de tratamento sobre o consumo de MS, no entanto houve queda na produção de leite de 23,4 para 21,3 kg/d na dieta com glicerina ($P=0,02$), resultando em maior eficiência alimentar (Leite/Consumo) na dieta com milho. A substituição de milho por glicerol não reduziu o pH ruminal ($P=0,38$) e tendeu a aumentar a digestibilidade da MS no trato digestivo total ($P=0,10$). O tempo diário de ingestão foi menor na dieta com glicerina ($P=0,04$) e a taxa de ingestão foi maior ($P=0,06$). A substituição total de amido oriundo de milho maduro finamente moído por glicerina bruta não mostrou ser uma estratégia promissora para vacas leiteiras. A inclusão de 12,3% de glicerina bruta à dieta total pode ter sido alta demais, resultando em resposta distinta à observada por Donkin et al. (2009). Possíveis efeitos deletérios do metanol da glicerina bruta podem ter induzido a resposta negativa a este tratamento, sugerindo que estudos podem ser necessários para definir a possibilidade de inclusão máxima deste alimento em dietas para ruminantes.

Shin, Wang e Kim (2012) avaliaram a substituição de ingredientes da dieta por teores de 0,5 ou 10% de glicerina bruta contendo 80,3% e 0,4% de metanol. O alimento foi avaliado em dietas formuladas com 35,6% de silagem de milho e 11,3% feno de alfafa ou 25,1% de caroço de algodão e 10,3% feno de capim bermuda (Fatorial 3x2). Houve efeito quadrático do teor de glicerina na dieta sobre o consumo de MS. Maior consumo ocorreu na dieta com 5% de

glicerina, independentemente da forragem utilizada. Não houve efeito do nível de inclusão de glicerina sobre a produção de leite das vacas (Média de 36,1 kg/d). Houve efeito quadrático da inclusão de glicerina sobre o teor de gordura no leite quando foi incluída à dieta. O maior teor de gordura no leite ocorreu com 5% de glicerina bruta na dieta, ocorrendo queda com 10% de inclusão (3,13 ou 3,26 ou 3,03% de gordura no leite, respectivamente). A secreção diária de gordura teve o mesmo comportamento.

2.5 Glicerina na alimentação de bovinos de corte

O uso de glicerina em dietas de bovinos de corte confinados, como alternativa de substituição de fontes de energia, já foi testado por vários autores. Parsons, Shelor e Drouillard (2009), na tentativa de encontrar um nível adequado de inclusão de glicerina, avaliaram o efeito de níveis crescentes de glicerina na dieta de terminação de 373 novilhas mestiças ($421,6 \pm 28,9$ kg de peso inicial). Os tratamentos foram constituídos de 0, 2, 4, 8, 12 ou 16% de glicerina (bruta com base na MS) em substituição parcial ao milho floculado por 84 dias de confinamento. Houve resposta quadrática em ganhos de peso (1,19; 1,34; 1,25; 1,17 e 1,03 kg/d, respectivamente, $P < 0,05$) com ganho médio diário (GMD) aumentando 12,6; 8,4 e 5,0% para bovinos alimentados com 2, 4 e 8% de glicerina na dieta, respectivamente, mas a inclusão de 12 e 16% de glicerina reduziu o GMD em 1,7 e 13,4%, respectivamente. O CMS diminuiu com a inclusão de glicerina na dieta ($P < 0,05$, efeito linear) com efeito quadrático sobre eficiência alimentar, melhorando 10,8%, 10,0%, 7,2% e 3,1%, quando a glicerina foi incluída em 2, 4, 8 e 12% na dieta, respectivamente, mas a adição de 16% de glicerina reduziu a eficiência em 2,8% comparado ao controle ($P = 0,05$). Sendo assim, esses autores concluíram que o nível máximo de glicerina na dieta para proporcionar melhor desempenho seria de 8% na MS.

Ramos e Kerley (2012) avaliaram o CMS, desempenho e eficiência alimentar de novilhos da raça Holandesa, alimentados com níveis crescentes de glicerina em substituição ao milho da dieta, em três experimentos. No primeiro experimento, 72 novilhos (312 ± 12.7 kg) foram distribuídos em quatro tratamentos com 0, 5, 10 e 20% de glicerina em substituição ao milho grão por 150 dias. No segundo experimento, 100 novilhos ($357 \pm 9,3$ kg) foram distribuídos em cinco tratamentos 0, 5, 10, 12,4 e 15% de glicerina bruta em substituição ao milho. No terceiro experimento, 96 bovinos ($347 \pm 7,0$ kg) foram distribuídos em cinco tratamentos com 0, 5, 10 ou 20% de glicerina na dieta em substituição ao feno por 170 dias. Houve queda linear (8,82; 8,76; 8,37 e 7,63 kg/d, $P=0,03$) no CMS com aumento da glicerina na dieta e resposta quadrática no GMD (1,34; 1,39; 1,43 e 1,20 kg/d, $P=0,04$) eficiência alimentar (0,15; 0,16; 0,17 e 0,16 kg de GMD/kg de CMS $P<0,04$) quando milho foi substituído por glicerina bruta no primeiro experimento. Não houve diferença no CMS, GMD e eficiência alimentar no segundo e terceiro experimentos quando glicerina foi substituído de milho ou feno, respectivamente.

Mach, Bach e Devant (2009) não observaram diferença no CMS, GMD e pesos-vivo final de quarenta e oito bovinos da raça Holandesa, submetidos a dietas de confinamento com níveis crescentes de glicerina bruta (0, 4, 8 ou 12% com base na MS) em substituição a grãos de cevada. Françaço et al. (2013) avaliaram a inclusão de três níveis de inclusão de glicerina (0,5 e 12% com base na MS) na dieta de quarenta e quatro bovinos da raça Nelore ($380 \pm 7,6$ kg) por 84 dias de confinamento. A glicerina continha 81,2% de glicerina, 0,33% de metanol e 12,3% de água, 0,10% PB e 0,30% gordura bruta. Peso corporal final e ganho médio diário foram similares entre os animais que consumiram 5% ($517,9$ kg e $1,43$ kg/d) ou 12% ($515,4$ kg e $1,40$ kg/d) de glicerina e maiores em animais que não consumiram glicerina ($509,6$ kg e $1,33$ kg/d) ($P=0,08$). Apesar de numericamente, o nível de 5% ter proporcionado maior consumo, esses

autores não encontraram diferença no CMS (11,3; 12,2 e 11,1 kg/d, $P=0,22$). O peso de carcaça quente tendeu a aumentar ($P<0,10$) com 5% de inclusão de glicerina na dieta ($285 \pm 6,73\text{kg}$), no entanto diminuiu com inclusão de 12% de glicerina na dieta ($282,1 \pm 6,73\text{kg}$).

Barton et al. (2013) avaliaram o efeito da alimentação de 48 bovinos com dietas contendo níveis crescentes de glicerina bruta em substituição a cevada. Os tratamentos constituíram-se de uma dieta controle com 0% de glicerina e dietas com 4,7% e 9,3% de glicerina, por um período experimental inteiro de 266 dias e outro tratamento com 0% de glicerina por 118 dias, seguido de 9,3% de glicerina dieta por 148 dias para avaliar o efeito do tempo de inclusão de glicerina. Esses autores não observaram diferença no GMD (1,33; 1,36; 1,38 e 1,43 kg/d, respectivamente, $P=0,60$), CMS (7,59; 7,71; 7,75 e 8,02 kd/d, respectivamente, $P=0,43$) e nem na conversão alimentar (5,65; 5,56; 5,58 e 5,53 kg MS/ Kg GMD, respectivamente, $P= 0,96$). Van Cleef et al. (2014) observaram tendência de redução no CMS ($P=10$) de bovinos da raça Nelore quando foram alimentados com mais de 7,5% de glicerina (base na MS). O GMD (1,54; 1,69; 1,75; 1,70 e 1,44 kg/dia, respectivamente, $P= 0,12$ Quadrático) teve efeito quadrático com a inclusão de 0; 7,5; 15; 22,5 ou 30% de glicerina em substituição ao milho.

Farias et al. (2012) avaliaram inclusão de quatro níveis de glicerina bruta (0; 2,8; 6,1 e 9,0% da MS) em substituição ao milho sobre desempenho de novilhas mestiças em pastagem de *Brachiaria brizanta* cultivar Marandú. Esses autores observaram redução linear no peso final e ganho de peso médio diário dos animais, porém não encontraram efeito na digestibilidade da MS no trato total nem no consumo de MS estimado por marcador. Os dados de desempenho de bovinos são contraditórios. No entanto, tem demonstrado que pequenas quantidades de inclusão de glicerina na dieta de bovinos podem ser benéficas ao

seu desempenho, mas concentrações superiores a 8% podem diminuir CMS e consequentemente o GMD.

2.5.1 Metabolismo da glicerina no rúmen

O destino provável do glicerol no rúmen é a passagem com a digesta (13%), fermentação (44%) e absorção direta pela parede (43%) (KREHBIEL, 2008). Os primeiros relatos sobre o metabolismo de glicerol no rúmen sugeriam uma conversão rápida a propionato (JOHNS, 1953; GARTON; LOUGH; VIOQUE, 1961). Wright (1969) relataram um aumento em ácidos acético e propiônico, e Czerkowski e Breckenridge (1972), aumentos de propiônico e butírico quando o glicerol foi fermentado por bactérias ruminais. Estudos *in vitro* sugeriram que espécies de *Selenomonas ssp* seriam os maiores fermentadores do glicerol no rúmen, tendo como principais produtos fermentativos propionato, lactato, succinato e acetato (HOBSON; MANN, 1961). Estudos *in vitro* com glicerol marcado têm demonstrado maior produção de propionato a partir de glicerol (BERGNER et al., 1995). Entretanto, outros produtos da fermentação do glicerol têm sido descritos na literatura. A maioria dos trabalhos *in vitro* e *in vivo* sugere que ocorre pequeno aumento na proporção de propionato e aumento maior na de butirato, quando glicerol é fermentado no rúmen (RÉMOND; SOUDAY; JOUANY, 1993; KREHBIEL, 2008). O aumento na concentração ruminal de butirato tem sido acompanhado por aumento no teor de β -OH-butirato no plasma (DEFRAIN et al., 2004). Assume-se que o glicerol é metabolizado no rúmen pelas bactérias *Megasphaera elsdenii*, *Streptococcus bovis*, e *Selenomonas ruminantium* (STEWART et al. 1997). Aumento de ácido láctico tem sido observado em incubações *in vitro* de glicerina (TRABUE et al., 2007). A bactéria *Selenomonas ruminantium*, capaz de metabolizar glicerina, atua na conversão de succinato a propionato no rúmen (WOLIN et al., 1997) e

Megasphaera elsdenii também produz propionato como produto final da fermentação, podendo ser a explicação do aumento nas proporções de propionato em alguns experimentos.

Linke et al. (2004) observaram que a administração de glicerol na forma de drench ou misturado à dieta aumentou a proporção de butirato no rúmen e a concentração de β -OH-butirato no sangue de vacas. Não existe consenso na literatura quanto ao tipo e direção da resposta em perfil de ácidos graxos voláteis no rúmen ao uso de glicerina na dieta.

O desaparecimento da glicerina do rúmen ocorreu em até 4 horas após o pulso ruminal de 240 g ou 480 g de glicerina em vacas da raça Holandesa (RÉMOND; SOUDAY; JOUANY, 1993) ou 200 g de glicerina em garrotes (KIJORA et al., 1995). A capacidade ruminal em degradar glicerol *in vitro* aumenta com o aumento da quantidade de glicerol administrado e foi ligeiramente superior quando o fluido ruminal veio de vacas que continham amido na dieta, proporcionado por vacas alimentadas com silagem de milho comparado com feno de gramínea (REMOND; SOUDAY; JOUANY, 1993). Além disso, a adaptação microbiana do rúmen para ser imediata, pois Rémond, Souday e Jouany (1993) encontraram taxa máxima de degradação da glicerina no primeiro dia de inclusão. Já, Lee et al. (2011) observaram uma taxa fracional de produção de gás mais lenta e um *lag time* maior quando a glicerina foi fermentada *in vitro* comparado ao milho grão ($P < 0,01$), no entanto a produção máxima de gás foi semelhante ao milho. Esses autores observaram que quando adicionou em torno de 16% de glicerol em fermentadores ruminais contendo feno de alfafa ou milho grão, reduziu o pH do fluido ruminal, a produção de gás e a concentração de amônia ($P < 0,01$).

Schroder e Sudekum (2014) observaram que a inclusão de glicerina em dietas com alto amido aumentaram a energia líquida de lactação de vacas quando comparado com dietas de amido baixo. As digestibilidades da matéria

orgânica do FDN e do amido foram semelhantes (72,1; 65,1 e 98,3%, respectivamente) quando animais consumiram 1,1 kg/d de glicerol e 1,4 kg/d de amido nas dietas que continham glicerol ou 2,1 kg de amido/d nas dietas que não continham. Apesar de alto concentrado na dieta, o pH pós-prandial foi sempre superior a 6,2, no entanto a diminuição foi mais pronunciada em dietas que continham glicerol, sugerindo maior velocidade de degradação do glicerol em relação ao amido. Houve redução na relação acetato propionato ($P<0,05$) quando glicerina foi fornecida aos animais. As concentrações de butirato no líquido ruminal aumentaram significativamente para os tratamentos com glicerina, atingindo um pico com 3 horas após alimentação ($P<0,05$). Esses autores observaram uma ligeira diminuição da concentração de matéria seca bacteriana no rúmen para os animais que consumiram dietas com glicerol, mas por causa da grande variação na dieta as diferenças observadas não foram estatisticamente significativas.

A síntese de proteína microbiana não tem sido afetada com a adição de glicerina na dieta de ruminantes (SHIN; WAG; KIM, 2012; DONKIN et al., 2009; ZACARONI, 2010). No entanto, seu uso tem mostrado manipular o ambiente ruminal através da eficiência na utilização de nitrogênio por microrganismos ruminais e conseqüentemente menor aparecimento de nitrogênio no sangue ou no leite. Donkin et al. (2009) observaram redução de 20% no teor de N-uréico no leite com o uso de glicerol (12,5 mg/dL no tratamento controle e 10,6 nos tratamentos com glicerol $P<0,05$) e Shin, Wang e Kim (2012) redução de 14% do teor de N-uréico no plasma. Apesar disso, esses mesmos autores observaram diminuição na digestibilidade de FDN (efeito linear) com o aumento do teor de glicerina dietética de 0 a 10% da MS e DONKIN et al. (2009), tendência de redução na digestibilidade do FDN no trato digestivo total em vacas lactantes com dietas contendo 5, 10 ou 15% comparada a 0% de glicerina. Esse decréscimo nem sempre é acompanhado com o

decréscimo do pH ruminal. Isso pode ser explicado pela inibição de microrganismos que digerem fibra, pois o crescimento de *Ruminococcus flavefaciens* foi inibido *in vitro* quando a glicerina constituía mais de 1% do meio de cultura (ROGER; FONTY; ANDRE, 1992).

Abo El-Nor et al. (2010) testaram o efeito da inclusão de quatro níveis de glicerina (0; 3,6; 7,2 e 10,8%) em substituição ao milho sobre a fermentação *in vitro* de bactérias que degradam fibra (*Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus albus*), amido e açúcares (*Selenomonas ruminantium*, *Succinivibrio dextrinosolvens*) e proteína (*Clostridium proteoclasticum*) no rúmen. A concentração de DNA de *B. fibrisolvens* foi reduzida com dietas contendo 7,2 e 10,8% de glicerina, indicando que os níveis elevados de glicerol afetam o seu crescimento. A redução na concentração de DNA para *B. fibrisolvens* com 7,2 e 10,8% de glicerina nas dietas correspondeu com a redução de digestibilidade no FDN. As concentrações de DNA de *R. albus* não foram afetadas pela substituição de glicerol, indicando que *R. albus* é menos sensível do que o *B. fibrisolvens* para o efeito inibidor de glicerol nos níveis testados. A concentração de DNA de *S. ruminantium* foi menor com 7,2 e 10,8% de glicerina nas dietas relativamente às dietas com 0 e 3,6%. A sensibilidade dos microrganismos do rúmen ao glicerol dependem do nível de inclusão. Paggi, Fay e Faverin (2004) observaram que a atividade de bactérias celulolíticas, extraídas do rúmen, foi reduzida com concentrações de glicerol aumentadas de 50 a 300mM *in vitro*.

2.5.2 Gliconeogênese e metabolismo hepático de glicerina

O glicerol pode ser convertido em glicose no fígado entrando na via gliconeogênica ao nível de diidroxiacetona e 3-fosfogliceraldeído, mas isso só acontece quando o glicerol chega ao fígado como tal. Quando ele é fermentado

no rúmen se transforma em propionato que é absorvido e metabolizado à glicose. Quando o glicerol é absorvido através do epitélio ruminal, o seu destino provável seria a conversão à glicose no fígado. Porém, após absorvido, o glicerol pode ser metabolizado à glicose ou à piruvato (NELSON; COX, 2005).

O metabolismo do glicerol à glicose acontece da seguinte forma: o glicerol através da enzima glicerol quinase é metabolizado a glicerol-3-fosfato com gasto de um ATP, em seguida esse produto metabólico é desidrogenado pela enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase formando a diidroxiacetona fosfato que é em seguida metabolizado a gliceraldeído fosfato pela enzima triose fosfato isomerase (NELSON; COX, 2005). O gliceraldeído pode se ligar a uma diidroxiacetona, produto do metabolismo de outro glicerol e formar frutose 1,6-bifosfato ou simplesmente caminhar no sentido de formação do piruvato (NELSON; COX, 2005).

Para sintetizar uma molécula de glicose a partir de glicerol precisa-se de duas moléculas de glicerol e dois ATP. Isso formará uma molécula de glicose e dois NADH. A oxidação dessa glicose formará 36 ATP. No entanto, são gastos dois ATP para transformar glicerol em glicerol 3-fosfato (um ATP de cada molécula de glicerol), mas são produzidos dois NADH que produzirão quatro ATP na cadeia transportadora de elétrons. Sendo assim o saldo de ATP seria de 38, ou seja, 19 ATP por molécula de glicerol. Caso o glicerol seja metabolizado a piruvato, ele entrará na via glicolítica no nível de diidroxiacetona fosfato e cada glicerol produzirá os mesmos 19 ATP (NELSON; COX, 2005). A eficiência energética é a mesma se o glicerol formar glicose ou se for metabolizado diretamente. O cérebro sozinho requer cerca de 120 g de glicose a cada dia, mais do que a metade de toda a glicose armazenada como glicogênio no músculo e no fígado (NELSON; COX, 2005). Sendo assim o fígado precisa sintetizar glicose através de precursores não carboidratos para atender a demanda do cérebro.

O efeito da glicerina na concentração de glicose no sangue tem sido inconsistente. Alguns autores não encontraram diferença nos teores de glicose plasmática, quando ingredientes da dieta, principalmente milho, foram substituídos por glicerina (SHIN; WANG; KIM, 2012; OSBORNE et al., 2009), outros observaram aumento nos níveis de glicose (DONKIN et al., 2009). No entanto há trabalhos que encontraram redução nos níveis de glicose plasmática (CARVALHO et al., 2011; ZACARONI, 2010) quando vacas em lactação consumiram glicerina em níveis de 5 a 11% na MS. Pensar em níveis de contaminantes do glicerol como principal causador da redução de glicose no sangue parece não ser a alternativa mais plausível. Zacaroni (2010) avaliou glicerina bruta com 76,2% de glicerol e 0,88% de metanol e Carvalho et al. (2011) avaliaram glicerina puríssima com mais de 99% de glicerol, sendo que ambos os trabalhos apresentaram redução no teor de glicose sanguínea em vacas em lactação que receberam níveis crescentes de glicerina em substituição ao milho.

A concentração de glicose no sangue se dá em função da taxa de absorção de glicose, produção e uso da glicose, sendo difícil determinar o mecanismo de ação do glicerol sem mensurações fisiológicas adicionais. A ausência de diferença na produção de leite, mudança no peso vivo e escore corporal, não suportam diferenças na utilização de glicose no trabalho realizado por Carvalho et al. (2011), quando ingredientes energéticos da dieta foram substituídos por níveis crescentes de glicerina.

O β -OH-butirato parece ser um inibidor de gliconeogênese. A infusão intravenosa de β -OH-butirato diminuiu a concentração plasmática de glicose em cães (MADISON et al., 1964), suínos (MÜLLER; PASCHEN; SEITZ, 1984) e ovelhas (SCHLUMBOHM; HARMEYER, 2003, 2004). Aiello e Armentano (1987) observaram inibição da gliconeogênese a partir do propionato na presença de butirato *in vitro*. Zarrin et al. (2013) avaliaram o efeito do β -OH-

butirato sobre a concentração plasmática de glicose, insulina, ácido graxo não esterificado, ureia, glucagon, IGF-1, triglicerídeos e cortisol. A infusão de BHBA diminuiu a concentração de glicose e glucagon sanguíneo. As razões da diminuição de concentração de glicose no plasma, devido ao aumento na concentração de β -OH-butilato, ainda é obscuro. Zarrin et al. (2013) não encontraram efeito do β -OH-butilato na quantidade hepática de RNAm das enzimas glicose-6-fosfatase, piruvato carboxilase, fosfoenolpiruvato carboxiquinase, lactato desidrogenase, fosfofrutoquinase e glicogênio sintetase. O glucagon aumenta a concentração de glicose no plasma através da estimulação da gliconeogênese e glicogenólise (ARONOFF et al., 2004; TABORSKY JUNIOR, 2010).

Alguns trabalhos têm demonstrado que animais se alimentando com glicerina aumentaram a proporção molar de butirato no rúmen (DEFRAIN et al., 2004; KREHBIEL, 2008). Cerca de 90% de butirato absorvido no rúmen é metabolizado no epitélio do órgão a β -OH-butilato (SHESTED et al., 1999) elevando os níveis de β -OH-butilato sanguíneo (DEFRAIN et al., 2004, LINKE et al., 2004) podendo estar relacionado com a diminuição de glicose sanguínea observado em alguns trabalhos que utilizaram glicerina na dieta (CARVALHO et al., 2011)

A forma como o glicerol é administrado pode também interferir na taxa de absorção e conseqüentemente determinar a gliconeogênese de glicerol em animais ruminantes. A forma de drench aponta ser mais efetivo na estimulação de glicose no sangue que na forma de dieta completa (GOFF; HORST, 2001; LINKE et al, 2004). O aparecimento portal de glicerol representa apenas 10% e a remoção pelo fígado apenas 8% da dose intrarruminal total. A concentração arterial de glicerol aumenta, mas nem sempre a concentração de glicose é afetada. Estudos de expressão gênica de enzimas da gliconeogênese precisam ser

avaliados para se conhecer onde ocorre a inibição da gliconeogênese em animais alimentados com glicerina.

2.6 Equilíbrio Acidobásico Venoso

O sangue de um animal é um ambiente ligeiramente alcalino com pH que varia de 7,35 a 7,45 com média 7,4 (CUNNINGHAM, 2004). Animais com pH abaixo ou acima disto estão em quadro de acidose ou alcalose, respectivamente. A faixa de pH sanguíneo compatível com a vida vai de 6,85 a 7,8, mas raramente esses extremos são obtidos (CUNNINGHAM, 2004). Para o ótimo funcionamento das células e enzimas que constituem o corpo, precisa-se de uma constância relativa do pH corpóreo. Assim, três sistemas são envolvidos para manter a homeostase acidobásica; tampões intra e extracelulares, sistema respiratório e rins (DAVENPORT, 1974).

Os tampões são combinações de sais e ácidos fracos que impedem alterações significativas do pH, pois se ligam com H^+ impedindo seu acúmulo nos líquidos corpóreos e alterações drásticas no pH (CUNNINGHAM, 2004). Os principais tampões sanguíneos são hemoglobina, sistema HPO_4^{2-}/HPO_4^- sistema HCO_3^-/H_2CO_3 (DAVENPORT, 1974). A hemoglobina é um importante tampão devido à sua abundância e aos resíduos imidazólicos da globina histidina ter pka próximo ao pH sanguíneo. Esse pka se altera com o grau de oxigenação da globulina. A desoxihemoglobina tem pka 7,93, mais próximo ao pH do sangue e a oxihemoglobina tem pka 6,68. Sendo assim a desoxihemoglobina tem maior capacidade de tamponante (DAVENPORT, 1974). O sistema HPO_4^{2-}/HPO_4^- é um tampão sanguíneo ideal, pois possui pka 6,8. No entanto, a concentração baixa de fosfato no sangue torna esse tampão menos importante do ponto de vista quantitativo. Ele é mais importante nos túbulos renais, pois a concentração de fosfato é maior (GUYTON; HALL, 2006). Já o sistema HCO_3^-

H_2CO_3 apesar de ter um pK_a de 6,1, ele é muito importante como tamponante, por dois motivos básicos: há grande quantidade de HCO_3^- (24 mEq/L em condições normais) no sangue, tornando-o rapidamente disponível para o tamponamento, e os rins podem regular a concentração de H_2CO_3 (CUNNINGHAM, 2004).

A concentração de H_2CO_3 em solução é diretamente proporcional à tensão de dióxido de carbono (PCO_2). Uma molécula de H_2CO_3 está em equilíbrio com 340 moléculas de CO_2 (GUYTON; HALL, 2006). Portanto, a concentração de H_2CO_3 é calculada como $0,03 \times \text{PCO}_2$. Em condições normais o pH do sangue é em média 7,4, a concentração de HCO_3^- é de 24 mEq/L e a $\text{pCO}_2 = 40$ mmHg. Sendo assim a equação de Henderson – Hasselbalch para esses valores seria $7,4 = 6,1 + \log[24]/[0,03 \times 40]$, ou seja, o sangue normalmente requer uma razão $[\text{HCO}_3^-]/[0,03\text{PCO}_2]$ de 20:1 (CUNNINGHAM, 2004). Um aumento ou diminuição nesta proporção aumenta ou diminui o pH sanguíneo, respectivamente (DAVENPORT, 1974).

A primeira defesa contra alteração no pH sanguíneo é feita por tampões sanguíneos. No entanto, os pulmões e os rins é que devem por fim corrigir a carga de íon hidrogênio (JONES, 2010). Os pulmões podem alterar a pressão sanguínea de CO_2 e os rins a concentração de HCO_3^- . Alterações na ventilação podem modificar rapidamente a PCO_2 e, portanto alterar o pH. Quando o sangue flui através dos tecidos, o dióxido de carbono difunde-se até o plasma e eritrócitos, onde forma o ácido carbônico. Este se dissocia em íons hidrogênio e íons bicarbonato ($\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$). Como a concentração inicial de HCO_3^- no sangue é maior que a de H_2CO_3 , o aumento relativo de H_2CO_3 é maior que o aumento de HCO_3^- e, portanto a proporção $[\text{HCO}_3^-]/[\text{H}_2\text{CO}_3]$ está reduzida, conseqüentemente o pH diminui. A diminuição do pH que acompanha a acidose metabólica estimula a ventilação. Esse aumento na ventilação alveolar tem efeito compensatório na acidose metabólica por eliminar

CO₂ e diminuição na PCO₂ que restaura a proporção $[\text{HCO}_3^-]/0,03 \cdot \text{PCO}_2$ e o pH a níveis normais (JONES, 2010).

As compensações respiratórias para as anormalidades acidobásicas ocorrem rapidamente, já as compensações renais ocorrem no decorrer de várias horas. Os quimiorreceptores respondem quase imediatamente às alterações no pH sanguíneo, e como as alterações na ventilação modificam rapidamente a PCO₂ (CUNNINGHAM, 2004) é raro observar uma acidose ou alcalose sem uma compensação respiratória.

A resposta dos rins aos distúrbios acidobásicos é menos rápida e alterações na produção de NH₃ e HCO₃⁻ ocorrem no decorrer de aproximadamente 24 horas. Os rins geram e excretam íon amônio, que é intensificado pela acidose (CUNNINGHAM, 2004). Nas células do túbulo proximal, o aminoácido glutamina é metabolizado para produzir NH₄⁺ (CUNNINGHAM, 2004). O NH₄⁺ entra no líquido tubular por transporte ativo secundário pela substituição do H⁺ no trocador Na⁺/H⁺. Além disso, outros produtos do metabolismo da glutamina são metabolizados para produzir novos ânions bicarbonato. Assim, o resultado da produção e excreção de NH₄⁺ é a excreção de ácido e a produção de bicarbonato (CUNNINGHAM, 2004).

O excesso ou déficit de bases, medidos em hemogasometria sanguínea, não é simplesmente a diferença entre a concentração de bicarbonato encontrada em uma amostra de sangue e a concentração normal de bicarbonato em um sangue que não apresente nem excesso nem déficit de base (DAVENPORT, 1974). A razão é que além das modificações da concentração de bicarbonato, ocasionada pelo excesso ou déficit de bases, ela pode ser modificada por ajustes respiratórios. Quando ácidos são adicionados ao sangue, seus íons hidrogênio entram em duas reações, alguns se combinam com tampões do sangue, titulando-os na direção ácida e os restantes combinam com íons bicarbonato para formar ácido carbônico (DAVENPORT, 1974). O ácido carbônico é desidratado

a dióxido de carbono que é expirado. Como alguns íons hidrogênios adicionados ao sangue se combinam com tampões sanguíneos, o número de íons hidrogênio que se combina com os íons bicarbonato é menor que o número total adicionado (CUNNINGHAM, 2004). Portanto, a redução em íons bicarbonato é inferior ao déficit de base. Por essa razão, o valor do déficit de base é avaliado no diagrama pH-bicarbonato pela distância vertical entre a linha de tamponamento normal e a linha de tamponamento após a adição de ácido e não pela diferença entre concentrações de bicarbonato entre o sangue normal e o acidificado (CUNNINGHAM, 2004). Um excesso de base é normalmente presente no sangue, mas uma carga de ácidos tais como a acidose metabólica pode diminuir o excesso de base e, conseqüentemente, pode ultrapassar a capacidade de tamponamento bicarbonato e ocorrer um déficit de base.

Para ajudar a compreender a causa da acidose metabólica, deve-se medir a diferença de cátions e ânions no sangue. A carga líquida dos cátions e ânions deve ser zero no espaço extracelular para manter o equilíbrio eletroquímico. Embora existam outros íons carregados, o sódio é o principal cátion mensurado, e o cloreto e o bicarbonato os principais ânions mensuráveis (JONES, 2010). Ânions não mensuráveis são fosfatos e proteínas e cátions não mensuráveis incluem cálcio, potássio e magnésio. A medição da diferença aniônica requer uma análise simultânea de gases no sangue arterial e determinação de eletrólitos no sangue venoso (JONES, 2010). Os resultados dos gases sanguíneos arteriais são utilizados para determinar se uma acidose metabólica está presente. Uma vez que a acidose metabólica é confirmada, os resultados do ensaio de eletrólito fornecem os valores necessários para calcular a diferença de ânions. Aumento na diferença cátion aniônica é devido a uma diminuição de ânions ou aumento de cátions. O aumento de ácidos na corrente sanguínea por um metabolismo de gordura formando corpos cetônicos, ou mesmo absorção de ácidos em ruminantes, aumenta cátions (H^+) e diminuem os ânions (HCO_3^-) (JONES,

2010). Em caso de acidose metabólica causada por ingestão de metanol, o acúmulo de ácido não é adequadamente tamponado pela base (JONES, 2010).

Estudos de hemogasometria para avaliar o perfil ácido básico em ruminantes ainda é novo e há poucos trabalhos na literatura. Esses estudos estão relacionados ao estresse calórico e à acidose ruminal, influenciando o equilíbrio ácido básico.

Vacas de alta produção são comumente alimentadas com dietas contendo altas proporções de carboidratos altamente fermentáveis no rúmen (APPER-BOSSARD et al., 2010). Essa prática muitas vezes causa acidose ruminal subaguda (ARSA), definida como pH ruminal abaixo de 5,8 por mais de três horas por dia (PLAIZER et al., 2009). A ARSA pode gerar alguns efeitos no equilíbrio ácido básico. Goad, Goad e Nagaraja (1998) e Brown et al. (2000) observaram uma diminuição do pH sanguíneo, concentração de HCO_3^- e excesso de base em novilhos com desafio de grãos, mostrando que a carga de ácido no rúmen pode diminuir o HCO_3^- no sangue. Faverdin, Bareille e Vérité (1999) encontraram correlação negativa entre HCO_3^- do sangue e ácidos graxos voláteis no rúmen de vacas. Gianesella et al. (2010) avaliaram a influência da acidose ruminal sobre a gasometria sanguínea em 2016 vacas holandesas recebendo a mesma dieta. As vacas foram divididas em três grupos de acordo com o pH ruminal ($\text{pH} > 5,8$; $\text{pH} \leq 5,8 > 5,5$ e $\text{pH} \leq 5,5$). Esses autores observaram diminuição no pH e quantidade de O_2 sanguíneo em vacas com pH ruminal menor que 5,5 comparado com vacas com pH ruminal $\geq 5,5 < 5,8$ e vacas com pH ruminal $> 5,8$ (pH sanguíneo de 7,42; 7,43; 7,44 e quantidade de O_2 de 34,03; 37,06; 38,03 mg/dL, respectivamente). A PCO_2 tendeu a aumentar quando o pH ruminal diminuiu, passando de 44,10 em pH ruminal maior que 5,8 para 45,60 mmHg em pH ruminal abaixo de 5,5.

A diferença cátion – aniônica dietética (DCAD), definida como a diferença em miliequivalente de sódio mais potássio e cloreto mais enxofre por

kg de matéria seca, pode ajudar na prevenção de acidose metabólica (APPER-BOSSARD et al., 2010). Sódio e potássio são absorvidos a partir do trato gastrointestinal em troca da secreção de próton, enquanto cloro e enxofre são muitas vezes absorvidos na troca por secreção de íons bicarbonato (CUNNIGHAM, 2004). Aumento do DCAD aumenta o pH sanguíneo, a concentração de HCO_3^- no sangue e o pH urinário (HU; MURPHY, 2004; PEYRAUD; APPER-BOSSARD, 2006) sugerindo efeito na homeostase acidobásica.

A acidose metabólica está associada a menores níveis de HCO_3^- sanguíneo. Marchesini et al. (2013) observaram menores níveis de bicarbonato no sangue em animais com acidose metabólica, em consequência da acidose ruminal. Apper Bossard et al. (2010), apesar de observar diminuição no pH ruminal, não observaram efeito no pH sanguíneo, concentração de HCO_3^- e excesso de base do sangue quando vacas em lactação tiveram a relação concentrado volumoso aumentada de 21:79 para 41:59, porém, houve tendência de maior PCO_2 para as vacas que receberam baixo concentrado. O aumento no DCAD aumentou linearmente o pH sanguíneo e esse aumento foi maior quando as vacas foram alimentadas com alta proporção de concentrado na dieta.

A quantidade de bicarbonato diminuiu 20% após a intoxicação de metanol em macacos (4g/kg), aumentou as concentrações molares de lactato α -hidroxibutirato, β -hidroxibutirato, α -cetobutirato e acetoacetato relativos ao controle (CLAY; MURPHY; WATKINS, 1975). O aumento de formato com consequente diminuição do bicarbonato foi observado em sangue de macaco após administração de metanol com período de latência de 18-24 horas em macacos (CLAY; MURPHY; WATKINS, 1975).

REFERÊNCIAS

ABO EL-NOR, S.; ABUGHAZALEH, A. A.; POTU, R. B.; HASTINGS, D.; KHATTAB, M. S. A. Effects of differing levels of glycerol on rumen fermentation and bacteria. **Animal Feed Science and Technology**, v. 162, p. 99–105, 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Biodiesel. Brasília, 2011.

AIELO, R. J.; ARMENTANO, L. E. Effects of volatile fatty acids on propionate metabolism and gluconeogenesis in caprine hepatocytes. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 2504-2510, 1987.

ANDRADE, M. A. F. **Desempenho de novilhas Holandesas alimentadas com cana-de-açúcar como forrageira única**. 1999. 56 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

APPER-BOSSARD, E.; FAVERDIN, P.; MESCHY, F.; PEYRAUD, J. L. Effects dietary cation-anion difference on ruminal metabolism and blood acid-base regulation in dairy cows receiving 2 contrasting levels of concentrate in diets. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 4196-4210, 2010.

ARONOFF, S. L.; BERKOWITZ, K.; SHREINER, B.; WANT, L. Glucose metabolism and regulation: Beyond insulin and glucagon. **Diabetes Spectrum**, v. 17, p. 183–190, 2004.

ÁVILA, C. L. S.; PINTO, J. C.; FIGUEIREDO, H. C. P.; SCHWAN, R. F. Effects of na indigenos and a comercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugarcane silage. **Grass and Forage Science**, v. 64, p. 384-394, 2009.

ÁVILA, C. L. S.; CARVALHO, B. F.; PINTO, J. C.; SCHWAN, R. F. The use of *Lactobacillus* species as starter cultures for enhancing the quality of sugar cane silage. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 940-951, 2014.

BALIEIRO NETO, G.; FERRARI JUNIOR, E.; NOGUEIRA, J. R.; POSSENTI, R.; PAULINO, V. T.; BUENO, M. S. Perdas fermentativas, composição química, estabilidade aeróbica e digestibilidade aparente de silagem de cana-de-açúcar com aditivos químicos e microbiano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 621-630, 2009.

BARTON, L.; BURES, D.; HOMOLKA, P.; JANCIK, F.; MAROUNEK, M.; REHAK, D. Effects of long-term feeding of crude glycerine on performance, carcass traits, meat quality, and blood and rumen metabolites of finishing bulls. **Livestock Science**, v. 155, p. 53-59, 2013.

BAUMBACH, G.; CANCELLA, P.; MARTIN-AMAT, G.; TEPHLY, T. R.; MCMARTIN, K. E.; MAKAR, A. B.; HAYREH, M. S.; HAYREH, S. S. Methanol poisoning: IV, Alterations of the ocular morphology in the methanol-poisoned rhesus monkey. **Archives of Ophthalmology**, v. 95, p. 1859-1865, 1977.

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

BLACK, K. A.; EELLS, J. T.; NOKER, P. E.; HAWTREY, C. A.; TEPHLY, T. R. Role of hepatic tetrahydrofolate in the species difference in methanol toxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, p. 3854-3858, 1985.

BROCKMAN, R. P.; LAARVELD, B. Hormonal regulation of metabolism in ruminants: a review. **Livestock Production Science**, v. 14, p. 313-334, 1986.

BROWN, M. S.; KREHBIEL, C. R.; GALYEAN, M. L.; REMMENA, M. D.; PETERS, J. P.; HIBBARD, B.; ROBINSON, J.; MOSELEY, W. M. Evaluation of models of acute and subacute acidosis on dry matter intake, ruminal fermentation, blood chemistry, and endocrine profiles of beef steers. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 3155-3168, 2000.

CARVALHO, E. R.; SCHMELZ-ROBERTS, N. S.; WHITE, H. M.; DOANE, P. H.; DONKIN, S. S. Replacing corn with glycerol in diets for transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 908-916, 2011.

CARVALHO, B. F.; ÁVILA, C. L. S.; PINTO, J. C.; PEREIRA, J. C.; SCHWAN, R. F. Effects of propionic acid and *Lactobacillus buchneri* (UFLA SIL 72) addition on fermentative and microbiological characteristics of sugar cane silage treated with and without calcium oxide. **Grass and Forage Science**, v. 67, p. 1-10, 2012.

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

CHIANG, W. K. **Alcohols**: Emergency Medicine. 3rd edition, p. 572-578, 1992.

CHUNG, Y. H.; RICO, D. E.; MARTINEZ, C. M.; CASSIDY, T. W.; NOIROT, V.; AMES, A.; VARGA, G. A. Effect of feeding dry glycerin to early postpartum Holstein dairy cows on milk production and metabolic profiles. **Journal Dairy Science**, v. 90, p. 5682-5691, 2007.

CLAY, K. L.; MURPHY, R. C.; WATKINS, W. D. Experimental methanol toxicity in the primate: analysis of metabolic acidosis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 34, p. 49-61, 1975.

CORREA, C. E. S.; PEREIRA, M. N.; OLIVEIRA, S. G.; RAMOS, M. H. Performance of holstein cows fed sugarcane or corn silage of different grain textures. **Scientia Agricola**, v. 60, p. 621-629, 2003.

CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro RJ, 3 ed., 579 p. 2004.

CZERKAWSKI, J. W.; BRECKENRIDGE, G. Fermentation of various glycolytic intermediates and other compounds by rumen microorganisms, with particular reference to methane production. **British Journal of Nutrition**, v. 27, p. 131-146, 1972.

DAVENPORT, H. W. **The ABC of Acid-Base Chemistry**. 6 ed. Chicago: University of Chicago Press, 1974.

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. 51, 721 p. 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, 2009.

ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 196 – EHC 196. **International program on chemical safety**. Virginia, 1997. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc196.htm>>. Acesso em: 10 de fevereiro 2010.

FARIAS, M. S.; PRADO, I. N.; VALERO, M. V.; ZAWADZKI, F.; SILVA, R. R.; EIRAS, C. E.; RIVAROLI, D. C.; LIMA, B. S. Níveis de glicerina para novilhas suplementadas em pastagens: desempenho, ingestão, eficiência alimentar e digestibilidade. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, p. 1177-1188, 2012.

FAVERDIN, P.; BAREILLE, N; VÉRITÉ, R. Effects of rumen energy supply timing on feed intake control in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2443–2454, 1999.

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

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA. 2006. **Code of Federal Regulations, 21 CFR 582.1320**, Title 21, V. 6, 21CFR582.1320. Disponível em: <http://edocket.access.gpo.gov/cfr_2002/aprqr/21cfr582.1320.htm>. Acesso em: 20 de Janeiro 2012.

FRANCOZO, M. C.; PRADO, I. N.; CECATO, U.; VALERO, M. V.; ZAWADZKII, F.; RIBEIRO, O. L.; PRADO, R. M.; VISENTAINER, J. V. Growth performance, carcass characteristics and meat quality of finishing bulls fed crude glycerin-supplemented diets. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, p. 327-336, 2013

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

GALLO, P. C. S. **Desempenho de novilhas Holandesas alimentadas com teores dietéticos crescentes de cana-de-açúcar**. 2001. 40 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2001.

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

GENTHNER, B. R. S.; DAVIS, C. L.; BRYANT, M. P. Features of rumen and sewage sludge strains of *Eubacterium limosum*, a methanol- and H₂-CO₂-utilizing species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, p. 12-19, 1981.

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**, v. 30, p. 1369-1373, 2007.

GIANELLA, M. G; MORGANTE, M.; CANNIZZO, C.; STEFANI, A.; DALVIT, P.; MESSINA, V.; GIUDICE, E. Subacute ruminal acidosis and evaluation of blood gas analysis in dairy cow. **Veterinary Medicine International**, v. 1, p. 1-4, 2010.

GOAD, D.W.; GOAD, C. L.; NAGARAJA, T. G. Ruminant microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 234-241, 1998.

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

GUYTON, A. C; HALL, J. E. Regulation of acid-base balance. In: **Textbook of Medical Physiology**. 11^a ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, p. 383-401, 2006.

HALL, M. B.; HEREJK, C. Differences in yields of microbial crude protein from in vitro fermentation of carbohydrates. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 2486-2493, 2001.

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

HU, W.; MURPHY, M. R. Dietary cation-anion difference effects on performance and acid-base status of lactating dairy cows: A meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 2222-2229, 2004.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY - IUPAC. Nomenclature of organic chemistry: recommendations. Washington, 1993. Disponível em: <<http://www.iupac.org/Publications>>. Acesso em: 20 de fevereiro 2012.

JACOBSEN, D.; MCMARTIN, K. E. Methanol and ethylene glycol poisonings. Mechanisms of toxicity, clinical course, diagnosis and treatment. **Journal of Medical Toxicology**, v. 1, p. 309-334, 1986.

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

JOHNSON, R. B. The treatment of ketosis with glycerol and propylene glycol. **The Cornell Veterinarian**, v. 44, p. 6-21, 1954.

JONES, M. B. Basic interpretation of metabolic acidosis. **Critical Care Nurse**, v. 30, p. 63-69, 2010.

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

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

LAMMERS, B. P.; BUCKMASTER, D. R.; HEINRICH, A. J. A simple method for the analysis of particle sizes of forage and total mixed rations. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 922-928, 1996.

LEE, S. Y.; LEE, A. M.; CHO, Y. B.; KAM, D. K.; LEE, S. C.; KIM, C. H.; SEO, S. Glycerol as a feed supplement for ruminants: In vitro fermentation characteristics and methane production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 166-167, p. 269-274, 2011.

LEE, S. L.; SHIH, H. T.; CHI, Y. C.; LI, Y. P.; YIN, S. J. Oxidation of methanol, ethylene glycol, and isopropanol with human alcohol dehydrogenases and the inhibition by ethanol and 4-methylpyrazole. **Chemico Biological Interactions**, v. 191, p. 26-31, 2011.

LINKE, P. L.; DEFRAIN, J. M.; HIPPEL, A. R.; JARDON, P. W. Ruminal and plasma responses in dairy cows to drenching or feeding glycerol. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 343, 2004.

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

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

MADISON, L. L.; MEBANE, D.; UNGER, H. R.; LOCHNER, A.
The hypoglycemic action of ketones. II. Evidence for a stimulatory feedback of ketones on the pancreatic beta cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 43, p. 408–415, 1964.

MAKAR, A. B.; TEPHLY, T. R. Methanol poisoning VI, Role of folic acid in the production of methanol poisoning in rat. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 2, p. 1201–1209, 1977.

MARCHESINI, G.; DE NARDI, R.; GIANESELLA, M.; STEFANI, A. L.; MORGANTE, M.; BARBEIRO, A.; ANDRIGHETTO, I.; SEGATO, S. Effect of induced ruminal acidosis on blood variables in heifers. **BMC Veterinary Research**, v. 9, 98 p. 2013.

MARTIN-AMAT, G.; TEPHLY, T. R.; MCMARTIN, K. E.; MAKAR, A. B.; HAYREH, M. S.; HAYREH, S. S.; BAUMBACH, G.; CANCELLA, P.
Methanol poisoning: II, Development of a model for ocular toxicity in methanol poisoning using the rhesus monkey. **Archives of ophthalmology**, v. 95, p. 1847-1850, 1977.

MARTIN-AMAT, G.; MCMARTIN, K. E.; HAYREH, S. S.; HAYREH, M. S.; TEPHLY, T. R. Methanol poisoning: ocular toxicity produced by formate. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 45, p. 201-108, 1978.

MCDONALD, I. A revised model for the estimation of protein degradability in the rumen. **Journal of Agricultural Science**, v. 96, p. 251–252, 1981.

MCMARTIN, K. E.; MAKAR, A. B.; MARTIN-AMAT G.; PALESE, M.; TEPHLY, T. R. Methanol Poisoning 1 The role of formic acid in the development of metabolic acidosis in Monkey and the reversal by 4-methylpyrazole. **Biochemical Medicine**, v. 13, p. 319-333, 1975.

MCMARTIN, K. E.; MARTIN-AMAT, G.; MAKAR, A. B.; TEPHLY, T. R.
Methanol poisoning: V, Role of formate metabolism in the monkey. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 201, p. 564-572, 1977.

MCMARTIN, K. E.; MARTIN-AMAT, G.; NOKER, P. E.; TEPHLY, T. R.
Lack of a role for formaldehyde in methanol poisoning in the monkey. **Biochemical Pharmacology**, v. 28, p. 645-649, 1978.

MILLEN, D. D.; PACHECO, R. D. L.; ARRIGONI, M. D. B.; GALYEAN, M. F.; VASCONCELOS, J. T. A snapshot of management practices and nutritional recommendations used by feedlot nutritionists in Brazil. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 3427-3439, 2009.

MIRANDA, D. C. L.; DIAS JUNIOR, G. S.; LOPES, F.; PEREIRA, R. A. N.; PEREIRA, M. N. Composição e pH de silagem de cana-de-açúcar com aditivos químicos e microbiológicos. **Revista de Ciências Agrárias**, Belém, v. 54, p. 122-130, 2011.

MÜLLER, M. J.; PASCHEN, U.; SEITZ, H. J. Effect of ketone bodies on glucose production and utilization in the miniature pig. **Journal of Clinical Investigation**, v.74, p. 249–261, 1984.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**, 3^a Ed., 1009 p. 2005.

NICHOLLS, P. Formate as an inhibitor of cytochrome c oxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 67, p. 610-616, 1975.

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.

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 of periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 698–707, 2009.

PAGGI, R. A.; FAY, J. P.; FAVERIN, C. In vitro ruminal digestibility of oat hay and cellulolytic activity in the presence of increasing concentrations of short-chain acids and glycerol. **Journal of Agricultural Science**, v. 142, p. 89–96, 2004.

PALESE, M.; TEPHLY, T. R. Metabolism of formate in the rat. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 1, p. 13-24, 1975.

PARSONS, G. L.; SHELOR, M. K.; DROUILLARD, J. S. Performance and carcass traits of finishing heifers fed crude glycerin. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 653-657, 2009.

PATTERSON, J. A.; HESPELL, R. B. Trimethylamine and methylamine as growth substrates for rumen bacteria and *Methanosarcina barkeri*. **Current Microbiology**, v. 3, p. 79-83, 1979.

PEREIRA, M. N. Novos conceitos em cana-de-açúcar fresca e ensilada. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL EM FORMULAÇÕES DE DIETAS PARA GADO LEITEIRO, 2., 2012, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2012. p. 67-94.

PEYRAUD, J. L.; APPER-BOSSARD, E. L'acidose latente chez la vache laitière. **Inra Productions Animales**, v. 19, p. 79-92, 2006.

PLAIZIER, J. C.; KRAUSE, D. O.; GOZHOM G. N.; MCBRIDE, B. W. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences. **The Veterinary Journal**, v. 176, p. 21-31, 2009.

POLL, A.; DEMEYER, D. I. Fermentation of Methanol in the Sheep Rumen. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 54, p. 832-834, 1988.

RAMOS, M. H.; KERLEY, M. S. Effect of dietary crude glycerol level on ruminal fermentation in continuous culture and growth performance of beef calves. **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 892-899, 2012.

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

RÖE, O. The metabolism and toxicity of methanol. **Pharmacological Reviews**, v. 7, p. 399-412, 1955.

ROGER, V.; FONTY, G.; ANDRE, C. Effects of glycerol on the growth, adhesion, and cellulolytic activity of rumen cellulolytic bacteria and anaerobic fungi. **Current Microbiology**, v. 25, p. 197-201, 1992.

SCHLUMBOHM, C.; HARMEYER, J. Hypocalcemia reduces endogenous glucose production in hyperketonemic sheep. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1953-1962, 2003.

SCHLUMBOHM, C.; HARMEYER, J. Hyperketonemia impairs glucose metabolism in pregnant and nonpregnant ewes. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 350-358.

SCHRODER, A.; SUDEKUM, K. H. Glycerol as a by-product of biodiesel production in diets for ruminants. In: 10th International Rapeseed Congress, 10., 1999, Canberra. **Anais eletrônicos...**The Regional Institute Ltd. Canberra, 1999. Disponível em:<<http://www.regional.org.au/au/gcirc/1/>>. Acesso em: 26 Ago. 2014.

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.

SEHESTED, J.; DIERNAES, L.; MOLLER, P. D.; SKADHAUGE, E. Ruminal transport and metabolism of short-chain fatty acids (SCFA) in vitro: Effect of SCFA chain length and pH. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 123, p. 359–368, 1999.

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

SHIN, J. H.; WANG, D.; KIM, S. C. Effects of feeding crude glycerin on performance and ruminal kinetics of lactating Holstein cows fed silage or cottonseed hull-based, low-fiber diets. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 4006-4016, 2012.

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

SMART, W. W. G.; BELL JUNIOR, T. A.; MOCHRIE, R. D.; STANLEY, N. W. Pectic enzymes of rumen fluid. **Journal of Dairy Science**, v. 47, p. 1220-1225, 1964.

STEWART, C. S.; FLINT, H. J.; BRYANT, M. P. The Rumen Bacteria. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. **The Rumen Microbial Ecosystem**. 2^a ed., ed. Blackie Academic & Professional. London, UK, p. 10–72, 1997.

TABORSKY JUNIOR, G. J. The physiology of glucagon. **Journal of Diabetes Science and Technology**, v. 4, p. 1338–1344, 2010.

THOMPSON, J. C.; HE, B. B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Applied Engineering in Agriculture**, v. 22, 261 p. 2006.

TRABUE, S.; SCOGGIN, K.; TJANDRAKUSUMA, S.; RASMUSSEN, M. A.; REILLY, P. J. Ruminant fermentation of propylene glycol and glycerol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 7043–7051, 2007.

TRIGO, I. L. A.; MARTINI, A. M.; FRANCISCO, F.; HUSAMMI, 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 de maio 2008.

VAN CLEEF, E. H. C. B.; EZEQUIEL, J. M. B.; D'AUREA, A. P.; FÁVARO, V. R.; SANCANARI, J. B. D. Crude glycerol in diets for feedlot Nelore cattle, **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 43, p. 86-91, 2014.

VANTCHEVA, Z. M.; PRADHAN, K.; HEMKEN, R.W. Rumen methanol in vivo and in vitro. **Journal of Dairy Science**, v. 53, p. 1511-1514, 1970.

WEN, Z. **New uses for crude glycerol from biodiesel production**. Disponível em: <<http://www.extension.org/pages/29264/new-uses-for-crude-glycerol-from-biodiesel-production>>. Acesso em: 2 de Abril de 2012.

WILLIAMS, G. F.; HATCH, F. J. Methanol poisoning: a review and case study of four patients from Central Australia. **Australian Critical Care**, v. 10, p. 113-8, 1997.

WOLIN, M. J.; MILLER, T. L.; STEWART, C. S. Microbe-microbe interactions.. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. **The Rumen Microbial Ecosystem**. 2nd ed., ed. Blackie Academic & Professional, London, UK. p. 467– 491, 1997.

WRIGHT, D. E. Fermentation of glycerol by rumen microorganisms. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 12, p. 281-286, 1969.

ZACARONI, O. F. **Resposta de vacas leiteiras à substituição de milho por glicerina bruta**. 2010. 43 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

ZARRIN, M.; DE MATTEIS, L.; VERNAY, M. C. M. B.; WELLNITZ, O.; VAN DORLAND, H. A.; BRUCKMAIER, R. M. Long-term elevation of β -hydroxybutyrate in dairy cows through infusion: Effects on feed intake, milk production, and metabolism. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 2960-2972, 2013.

ZATMAN, L. J. The effect of ethanol on the metabolism of methanol in man. **Biochemical Journal**, v. 40, p. 16-21, 1946.

ZOPOLLATTO, M.; DANIEL, J. L. P.; NUSSIO, L. G. Aditivos microbiológicos em silagens no Brasil: revisão dos aspectos da ensilagem e do desempenho de animais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, p. 170-189, 2009 (supl. especial).

CAPÍTULO 2 Substituição de milho por glicerina bruta na dieta de novilhas alimentadas com silagem de cana-de-açúcar

RESUMO

O glicerol na glicerina de biodiesel pode ser um substituto do amido de milho como alimento energético para ruminantes. Avaliou-se a glicerina bruta, rica em metanol (7,3% de metanol e 70,2% de MS na MN), na alimentação de bovinos. No Experimento 1, 36 novilhas mestiças Holandês-Zebu (177 ± 56 kg) foram alimentadas com dietas contendo 0% (T0), 5,6% (T6) ou 11,9% (T12) de glicerina bruta e 15,2%, 7,8% e 0% de milho finamente moído na MS, respectivamente. A composição das dietas (% da MS) foi $69,6 \pm 1,3$ de silagem de cana de açúcar, $14,2 \pm 0,3$ de farelo de soja, 1% de ureia, $12,6 \pm 0,4$ de PB e $49,0 \pm 0,7$ de FDN. Os animais foram blocados pelo peso vivo e receberam os tratamentos por 91 dias, após um período de padronização de 14 dias. Dados foram obtidos ao longo do tempo e o valor da mesma variável no final do período de padronização foram usados como covariável no modelo estatístico. Contrastes linear (T0 vs. T12) e quadrático (T6 vs. T0+T12) compararam tratamentos. Maior teor de glicerina na dieta induziu queda linear no consumo de MS (CMS) nos dois primeiros dias do período experimental ($P < 0,05$), e tendência de queda quadrática no CMS ($P = 0,13$) e no consumo de MO digestível ($P = 0,10$) ao longo do experimento. A glicerina reduziu o peso vivo ajustado para o peso no final do período de padronização de forma quadrática ($P = 0,03$), mas não foi detectado efeito significativo sobre o ganho de peso ($P > 0,38$): 306 g/d no T0, 343 g/d no T6 e 254 g/d no T12. O perímetro torácico ($P = 0,09$) e o escore de condição corporal ($P = 0,02$) também foram reduzidos de forma quadrática. Houve tendência de variação quadrática ($0,10 < P < 0,15$) nas digestibilidades aparentes da MS, MO e FDN, cujos valores foram máximos no T6 e mínimos no T0. O pH ruminal aumentou ($P < 0,01$) e o teor de protozoários no fluido foi reduzido ($P = 0,07$) pela maior inclusão de glicerina, ambos de forma linear. Não houve efeito de tratamento sobre a relação entre alantóina e creatinina na urina ($P > 0,49$). O menor teor de N-uréico no plasma foi no T6 e o maior foi no T0 ($P = 0,05$ para contraste quadrático). A glicerina reduziu o teor de glicose no plasma sanguíneo de forma linear ($P = 0,02$) e aumentou os teores de metanol ($P = 0,02$) e formato ($P < 0,01$). Houve tendência de queda linear na enzima aspartatoaminotransferase com maior inclusão de glicerina ($P = 0,13$), sem afetar a gama-glutamyltransferase ($P > 0,26$). Os maiores tempos diários de ruminação e de mastigação foram observados no T6 e os menores no T0 ($P < 0,05$ para contraste quadrático), mas a atividade mastigatória por unidade de CMS não diferiu entre tratamentos ($P > 0,35$). Houve variação linear em parâmetros descrevendo o balanço ácido-básico do sangue venoso,

sugerindo que maior inclusão de glicerina induziu acidose metabólica. Não foram detectados sintomas clínicos de intoxicação por metanol ao longo do experimento.

Palavras-chave: biodiesel, bovino, glicose, glicerol, metanol.

ABSTRACT

Glycerol in glycerin from biodiesel can substitute corn starch as energy substrate for ruminants. We evaluated methanol rich, crude glycerin (7.3% methanol and 70.2% DM, as fed basis) as bovine feed. Thirty-six Holstein-Zebu crossbred heifers (177 ± 56 kg) were fed 0% (T0), 5.6% (T6), or 11.9% (T12) of crude glycerin in diet DM, and 15.2%, 7.8% or 0% of finely ground corn, respectively. Diets composition were (% of DM): 69.6 ± 1.3 of sugarcane silage, 14.2 ± 0.3 of soybean meal, 1.0 of urea, 12.6 ± 0.4 of CP, and 49.0 ± 0.7 of NDF. Heifers were blocked by body weight and received a treatment for 91 d, after a 14-d standardization period. Data were obtained over time and the value of the same variable at the end of the standardization period was used as covariate in the statistical model. Linear (T0 vs. T12) and quadratic (T6 vs. T0 + T12) contrasts compared treatments. Increasing dietary glycerin content induced a linear decrease in DM intake (DMI) in the first two days of the experimental period ($P < 0.05$), and a quadratic trend for decline in DMI ($P = 0.13$) and digestible OM intake ($P = 0.10$) throughout the experiment. Glycerin quadratically reduced body weight adjusted for the weight at the end of the standardization period ($P = 0.03$), girth circumference ($P = 0.09$), and body condition score ($P = 0.02$), but had no detectable effect on weight gain ($P > 0.38$): 306 g/d on T0, 343 g/d on T6, and 254 g/d on T12. There were trends for quadratic variation ($0.10 < P < 0.15$) in total tract apparent digestibility of DM, OM, and NDF, highest on T6 and lowest on T0. Ruminal pH increased ($P < 0.01$) and the content of protozoa in the fluid was reduced ($P = 0.07$) by glycerin, both linearly. There was no effect of treatment on the ratio between the content of allantoin and creatinine in urine ($P > 0.49$). The lowest content of plasma urea-N was observed on T6 and the highest was on T0 ($P = 0.05$ for quadratic contrast). Glycerin linearly reduced the content of blood plasma glucose ($P = 0.02$) and increased the contents of methanol ($P = 0.02$) and formate ($P < 0.01$). There was a trend for a linear decrease in the plasma content of the enzyme aspartate aminotransferase with increased content of glycerin in the diet ($P = 0.13$), with no effect on gamma glutamyltransferase ($P > 0.26$). Rumination and chewing time per day were highest on T6 and lowest on T0 ($P < 0.05$ for quadratic contrast), but chewing activity per unit of DMI did not differ among treatments ($P > 0.35$). There were linear variations in parameters describing the acid-base balance in venous blood, suggesting that glycerin induced metabolic acidosis. Clinical symptoms of methanol toxicity were not observed when heifers were fed crude glycerin for 91 days.

Keywords: biodiesel, bovine, glucose, glycerol, methanol.

1 INTRODUÇÃO

A rápida expansão da indústria de biodiesel tem levado a um aumento da produção de glicerina em bruto, um coproduto líquido resultante da transesterificação de óleos vegetais (MACH; BACH; DEVANT, 2009). Para cada 100 litros de biodiesel são produzidos 10 litros de glicerina bruta (WEN, 2012). A glicerina bruta é rica em glicerol, um composto de alto conteúdo energético e eventual substituto do milho na alimentação animal (DEFRAIN et al., 2004), e quantidades variáveis de metanol. Essa quantidade de metanol pode variar de quantidades irrisórias a 26,7% da quantidade total de glicerina (SCHRODER; SUDEKUM, 1999)

Animais consumindo glicerina como substituto de milho na dieta têm apresentado resultados variados. Carvalho et al. (2011) não observou diferença no ganho médio diário (GMD) de bovinos Red Norte em confinamento (GMD de 1,83 kg/d) recebendo níveis crescentes de glicerina bruta na dieta (0, 6, 12, 18%), no entanto, os animais apresentaram maior rendimento de carcaça. Parsons, Shelor e Drouillard (2009) avaliando o efeito de vários níveis de inclusão de glicerina em substituição ao milho floculado na dieta de novilhas mestiças em confinamento, observaram que níveis de até 8% de glicerina na dieta proporcionaram melhores GMD em relação ao controle, porém níveis acima disso reduziram o GMD. Farias et al. (2012) observaram redução linear no desempenho de animais a pasto suplementado com dietas contendo níveis crescentes de glicerina (0; 2,8; 6,1 e 9,0% de glicerina na MS).

Apesar de as bactérias do rúmen produzirem metanol a partir da pectina (VANTCHEVA; PRADHAN; HEMKEN, 1970) e converterem metanol em metano (PATTERSON; HESPELL, 1979; GENTHNER; DAVIS; BRYANT, 1981; POLL; DEMEYER, 1988), o efeito tóxico do metanol em ruminantes é pouco conhecido. Sabe-se que em primatas o metanol é metabolizado a formato

pelo fígado, sendo capaz de causar acidose metabólica e inibir a cadeia transportadora de elétrons, causando lesão no nervo óptico e deficiência ocular (MARTIN-AMAT et al., 1978; NIE et al., 2007).

A utilização da cana-de-açúcar fresca na recria de novilhas leiteiras não penaliza o desempenho animal relativamente a dietas baseadas em silagem de milho (ANDRADE, 1999). Entretanto, na ensilagem da cana ocorre alta perda de teor energético na forma de açúcares, o que aumenta o teor de fibra do alimento (MIRANDA et al., 2011). Em dietas baseadas em cana-de-açúcar, aumento no teor energético da dieta pode ser obtido por aporte nutricional de carboidratos amiláceos, oriundos dos alimentos concentrados. A substituição de milho por glicerina bruta pode aumentar a eficiência zootécnica e financeira da atividade leiteira. Dietas baseadas em cana-de-açúcar propiciam que a substituição de amido de milho por glicerol seja avaliada de forma clara.

Com este trabalho objetivou-se avaliar o desempenho e o equilíbrio acidobásico venoso, de novilhas alimentadas com silagem de cana e teores dietéticos crescentes de glicerina bruta, em substituição ao milho finamente moído.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Trinta e seis novilhas mestiças Holandês-Zebu, com peso inicial de 177 ± 56 kg, foram alimentadas individualmente em confinamento total com camas de areia. Os ingredientes dietéticos foram misturados e oferecidos na forma de Dieta Completa às 7 horas, em quantidade suficiente para prover no mínimo 10% do oferecido como sobra diária. Os animais receberam a mesma dieta durante um período pré-experimental de padronização de duas semanas (Tabela 1). As variáveis mensuradas no final da padronização foram utilizadas como covariável no modelo de análise estatística. Os animais formaram doze blocos de três animais com base no peso vivo e foram aleatoriamente alocados a um de três tratamentos, por 91 dias do período de comparação em delineamento, em blocos ao acaso, ajustados para covariável e com estrutura de medidas repetidas no tempo. O desempenho animal foi avaliado até o dia 84, enquanto que na semana 13 foram avaliados parâmetros de digestão, fermentação ruminal e parâmetros sanguíneos.

Os animais foram alimentados com silagem de cana-de-açúcar. A cana foi colhida manualmente sem sofrer despalha e foi triturada em picadeira ensiladora (Modelo PP47, Pinheiro Máquinas Agrícolas, Itapira, SP) acoplada a trator e ajustada para tamanho de corte de 4,5 mm. A silagem foi aditivada com $3,6 \times 10^{11}$ UFC/ton de matéria seca (MS) de cepa bacteriana isolada de silagem de cana e identificada bioquimicamente como *Lactobacillus buchneri* (ÁVILA et al., 2009). A silagem ficou armazenada por 30 dias até o início do fornecimento aos animais.

Os tratamentos variaram na proporção de substituição de milho maduro finamente moído por glicerina bruta (Tabela 1) oriunda de sebo bovino (Tecno-Oil Indústria e Comércio Ltda, Mombuca, SP). A composição da glicerina bruta foi: 29,8% de umidade e 7,3% de metanol na matéria seca (MS), 0,92% de

proteína bruta (PB), 7,1% de extrato etéreo (EE), 7,9% de cinzas, 0,52% de sódio, 0,25% de enxofre, 0,06% de potássio, 0,05% de fósforo, 0,03% de cálcio e 0,01% de magnésio na MS.

Amostras dos ingredientes e das sobras alimentares de cada animal foram coletadas diariamente e congeladas. Quantidades idênticas de MN das amostras diárias formaram compostos semanais. As amostras compostas semanais foram pré-secas em estufa ventilada por 72 horas a 55° C, triturados em peneira com crivo de 1mm em moinho do tipo Thomas-Willey e subamostras foram desidratadas a 105° C por 24 horas para determinação do teor de MS. O consumo de MS (CMS) foi mensurado nos dias 10 a 13 da padronização e diariamente ao longo da comparação.

Tabela 1 Composição das dietas oferecidas em ingredientes e das dietas consumidas em nutrientes durante o período de padronização (P) e nos tratamentos com zero (T0), seis (T6) e 12% (T12) de glicerina bruta

Componentes	P	T0	T6	T12
	% da matéria seca			
Silagem de milho	93,2			
Silagem de cana		68,3	69,6	71,0
Ureia	1,0	1,0	1,0	1,0
Farelo de soja (49% de PB)	4,2	13,9	14,2	14,5
Milho moído fino		15,2	7,8	
Glicerina bruta			5,8	11,9
Calcário calcítico	0,2	0,2	0,2	0,2
Minerais e vitaminas ¹	1,4	1,4	1,4	1,4
Proteína bruta	11,6	12,9	12,7	12,1
Fibra em detergente neutro (FDN)	51,8	48,2	49,5	49,3
FDN oriundo de forragem	45,6	46,7	47,4	48,6
Cinzas	4,0	3,9	4,3	5,3
Extrato etéreo	3,1	2,8	2,6	2,3
CNF ²	29,5	32,2	31,9	31,0
		% da matéria natural		
Matéria seca	30,3	32,9	32,3	31,8

¹Minerais e vitaminas: 18,5% de Ca; 15,0% de P; 3,0% de Mg; 3,0% de S; 240ppm de Co; 3.000ppm de Cu; 8.000ppm de Mn; 12000 ppm de Zn; 90ppm de Se; 180ppm de I; 8.000.000UI/kg de Vit. A; 2.000.000UI/kg de Vit. D; 50.000UI/kg de Vit. E. ² Carboidratos não fibrosos = 100 - (PB + FDN + EE + cinzas)

Amostras compostas da silagem de cana e dos concentrados foram formadas por união dos compostos semanais pré-secos, em quantidade proporcional ao consumido de MS em cada semana da comparação. Um composto das sobras por animal foi formado unindo-se quantidades idênticas de matéria pré-seca dos compostos semanais. A PB foi analisada por um destilador a vapor do tipo Mikrokjeldhal (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS - AOAC, 1975), o EE segundo o AOAC (1990), e as cinzas por incineração da amostra a 550°C por 8 horas. O teor de FDN foi analisado por um determinador de fibra TE-149 (Tecnal Equipamentos para Laboratórios, Piracicaba, SP), utilizando sulfito de sódio e amilase.

O peso vivo, o escore de condição corporal (ECC), o perímetro torácico e as alturas na cernelha e na garupa foram determinados nos dias 13 e 14 da padronização e a cada sete dias da comparação, iniciando no dia 6. As novilhas foram pesadas a partir de uma hora do fornecimento da dieta, em ordem ao acaso dentro de blocos. As alturas foram determinadas com bengala graduada do tipo Lydtin na extremidade dorsal do processo espinhoso da terceira vértebra torácica (na região da cernelha) e no ponto mais alto do osso sacro. O perímetro torácico foi determinado caudalmente aos membros torácicos. O ECC foi avaliado visualmente em escala de 1 a 5, sendo 1 representativo de magra e 5 de gorda (WILDMAN et al., 1982), por três avaliadores independentes, para obtenção da média por animal. O ganho diário de peso foi calculado para cada uma das 12 semanas da comparação, pela diferença entre os pares de determinações intervaladas de sete dias.

O equilíbrio acidobásico venoso foi avaliado em amostras do sangue da veia jugular obtidas no dia 13 da padronização e a cada 14 dias da comparação. Os tempos de amostragem foram zero, 6 e 12 horas após a alimentação. O sangue foi coletado em tubos heparinizados e analisados no máximo 1 hora após

a coleta em avaliador de pH e gases sanguíneos AGS22 (Drake, São José do Rio Preto, SP).

No dia 13 da padronização e a cada 14 dias da comparação, 12 horas após a alimentação, foram obtidas amostras do sangue da veia jugular para análise de glicose e das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamil transferase (GGT). Para a análise de glicose foram utilizados tubos contendo 100 µl de fluoreto de potássio e para AST e GGT tubos contendo heparina sódica. As amostras foram centrifugadas a 1118xg por 10min e o plasma foi congelado a -20°C até análise laboratorial. As análises de glicose foram feitas através do Kit Glicose enzimática líquida, AST através do kit AST/TGO e GGT através do kit γ -glutamilttransferase (ambos da Doles Reagentes para Laboratório Ltda, Goiânia, GO).

No dia 40 a atividade mastigatória foi mensurada por observação visual da atividade bucal de cada animal, a cada 5min por 24 horas. 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 e de ruminação. A atividade mastigatória por unidade de MS ingerida foi calculada considerando o CMS no dia da avaliação.

No dia 56 da comparação, 12 horas após a alimentação, foram coletadas amostras de sangue da veia jugular, em tubos com ativador de coágulo para obtenção do soro. Amostras do soro foram congeladas a -20°C para determinação dos teores de ácido fórmico e metanol. As amostras foram descongeladas e desproteinizadas com solução de ácido tricloracético. O sobrenadante foi analisado em cromatógrafo a gás (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com coluna capilar (Stabilwax, Restek, Bellefonte, USA; 60 m, 0.25 mm i.d., 0.25 µm crossbond carbowax polyethylene glycol). Foi utilizado hélio como gás de arraste, hidrogênio como gás de combustão, ar sintético como gás

comburente e nitrogênio como gás de ajuste. A temperatura do injetor foi de 200° C e do detector de 220° C com taxa split de 1:20 e controle de fluxo com velocidade linear de 30 cm/s. A rampa de temperatura foi regulada para 40° C por um minuto e elevação de 40° C a 200° C com taxa de aquecimento de 10° C/min., permanecendo a 200° C por dois minutos.

No dia 73 foram iniciados os procedimentos para estimativa da produção fecal e mensuração da digestibilidade aparente de nutrientes no trato digestivo total. Cápsulas de celulose contendo 5g de óxido crômico foram administradas uma vez ao dia por 10 dias. No sétimo dia de administração do marcador (79º dia da comparação), foi iniciada a coleta das fezes diretamente do reto, de 6 em 6 horas, por 72 horas, começando com 3 horas de atraso a cada novo dia. Um grama de fezes pré-seca a 55°C por 72 horas foi incinerada a 550°C por 8 horas, submetida à digestão com solução de 1.000 mL de ácido fosfórico (85%), 30 ml de sulfato de manganês (10%) e 4 mL de bromato de potássio (4,5%), em banho de areia, até a mudança para cor violeta. O material foi então transferido para um balão volumétrico de 100 mL, adicionado de 25 mL de cloreto de cálcio (4.000ppm) e o volume foi completado para 100 mL com água destilada. Posteriormente, a solução foi filtrada em papel de filtro (Whatman nº 40), para análise da solução por espectrofotometria de absorção atômica (SpectrAA-100 Varian. Varian Australia Pty Ltda, Victoria, Austrália). O teor de MS, FDN e cinzas das fezes foi mensurado como previamente descrito.

No dia 83 da comparação foram obtidas amostras de urina para determinação dos teores de alantoína e creatinina. A relação entre a alantoína e a creatinina na urina estimou a síntese relativa de proteína microbiana no rúmen. Uma amostra de urina foi diluída em solução de ácido sulfúrico a 4% (4:1, ácido: urina) e foi congelada a -20°C. Para a análise de alantoína o procedimento adotado foi o de Chen e Gomes (1992). Para a análise de creatinina foi utilizado

kit laboratorial (Creatinina. Doles Reagentes para Laboratório Ltda, Goiânia, GO). No mesmo dia foram também coletadas amostras do sangue da veia jugular para dosagem do teor de nitrogênio uréico no plasma (NUP). As amostras foram coletadas imediatamente antes da alimentação e a cada 3 horas do dia por 24 horas. O plasma foi obtido por centrifugação a 2118xg por 10min e foi armazenado a -20° C. O teor de NUP foi mensurado por método colorimétrico-enzimático (Ureia 500. Doles Reagente para Laboratórios Ltda, Goiânia, GO).

No dia 85 foram obtidas amostras de fluído ruminal, através de sonda flexível oro-gástrica com auxílio de uma bomba de sucção a vácuo acoplada a um Kitassato. As amostras foram obtidas 12±02 horas após a alimentação, ao acaso dentro de blocos. O pH ruminal foi mensurado imediatamente. Uma amostra foi homogeneizada, fixada e conservada, empregando-se a diluição 1:2 entre fluído ruminal e formaldeído, para posterior contagem de protozoários (DEHORITY, 1984). A contagem dos protozoários foi realizada em microscópio óptico, utilizando amostras de 1 mL do fluído formalizado alocado em câmara de Neubauer com 0,1mm de profundidade (WARNER, 1962).

2.1 Análises estatísticas

As variáveis mensuradas ao longo do tempo foram analisadas como medidas repetidas pelo procedimento MIXED do SAS (LITTEL; MILLKEN; STROUP, 1996). A estrutura de covariância utilizada foi definida pelo critério de informação de Akaike, dentre auto regressiva de ordem 1, simetria composta e não estruturada. O efeito de bloco e animal dentro de tratamento foi considerado aleatório. O modelo estatístico foi: $Y_{jk} = \mu + CV + Tr_j + T_k + TrT_{jk} + e_{ijk}$. Onde: μ =média geral; CV=covariável (medição da mesma variável no final da padronização); Tr_j =efeito de tratamento ($j=T_0, T_6, T_{12}$); T_k =efeito

de tempo (k =semanas 1 a 12); $TrTjk$ =interação entre tratamento e tempo; $eijk$ =erro residual. Dois contrastes pré-planejados foram testados: 1) Efeito linear de inclusão de glicerina (T0 vs. T12); 2) Efeito quadrático de inclusão de glicerina (T6 vs. T0+T12). O quadrado médio para o efeito de animal aninhado em tratamento foi utilizado como medida de erro para testar o efeito de tratamento. O ganho de peso por semana experimental e o teor de NUP foram analisados pelo mesmo modelo, mas sem o termo covariável. As variáveis mensuradas uma vez, durante o período experimental, foram analisadas por modelo sem os efeitos de covariável, tempo e sua interação com tratamento. Valores de probabilidade abaixo de 0,05 foram considerados como significativos, abaixo de 0,10 como tendência e abaixo de 0,15 como tendência fraca.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição da silagem de cana foi 25,4% de MS na MN e 2,9% de PB, 68,5% de FDN, 1,4% de EE e 3,8% de cinzas na MS. A inoculação da silagem com bactérias epifíticas isoladas de silagem de cana resultou em silagem com teor de FDN acima da cana *in natura*, relatadas na literatura (TEIXEIRA et al., 2014; SIÉCOLA JÚNIOR et al., 2014), sugerindo que o aditivo não reduziu significativamente a perda de açúcares durante a ensilagem. A proporção de partículas da silagem nas peneiras do separador de partículas da Penn State (LAMMERS; BUCKMASTER; HEINRICHS, 1996) foi: 6,3% da MN acima dos orifícios com diâmetro de 19mm; 39,6% entre 8 e 19mm e 54,1% abaixo de 8mm. A distribuição com base na MS foi: 15,5% acima de 19 mm; 41,0% entre 8 e 19 mm e 43,5% abaixo de 8mm. A proporção da FDN nas peneiras foi: 16,9% acima de 19 mm; 40,6% entre 8 e 19 mm e 42,5% abaixo de 8mm. Como o teor dietético de FDN oriundo de forragem foi em média 46,6% da MS (Tabela 1), o teor de FDN maior que 8 mm foi em média 26,8% da MS.

O efeito depressor do consumo das dietas com silagem de cana foi evidenciado pela diferença acentuada entre o CMS na dieta de padronização, baseada em silagem de milho e as dietas com cana ensilada (Figura 1). O CMS em ruminantes pode ser alterado com o teor e digestibilidade da fibra das dietas (ALLEN, 2000). Apesar do teor de fibra da dieta de cana-de-açúcar no período experimental e de silagem de milho no período de padronização ser semelhantes (Tabela 1), a redução do consumo pode estar relacionada à menor digestibilidade do FDN da cana. Corrêa et al. (2003) observaram redução na digestibilidade do FDN da cana de aproximadamente 50%, quando vacas em lactação foram alimentadas com dietas à base de cana-de-açúcar em comparação a dietas à base de silagem de milho. O baixo CMS, ao redor de 1,9% do peso vivo, aparentemente explica o baixo ganho de peso diário em todos os tratamentos

(Tabela 2). Quando novilhas Holandesas foram alimentadas com dieta contendo em torno de 78% de cana fresca acrescida de farelo de soja e ureia, o CMS foi ao redor de 2,6% do peso vivo e o ganho de peso foi próximo a 1,13kg/d (SIÉCOLA JÚNIRO et al., 2014). Entretanto, naquele experimento com cana fresca, o teor dietético de FDN oriundo da cana foi 41% da MS, cerca de 6,6 unidades percentuais abaixo do FDN das dietas deste experimento (Tabela 1). A ensilagem da cana e o conseqüente aumento no teor de fibra e/ou produtos da fermentação alcoólica, pode deprimir o CMS em dietas contendo esta forrageira, com baixa inclusão de alimentos concentrados. Isso sugere que, apesar das possíveis vantagens operacionais da ensilagem da cana (PEREIRA, 2012), o uso preferencial desta forragem, quando a obtenção de alto desempenho animal for priorizado, parece ser na forma fresca.

Tabela 2 Consumo de matéria seca (CMS), morfometria e eficiência alimentar de novilhas nos tratamentos com 0%(T0), 6%(T6) ou 12% (T12) de glicerina bruta.

	T0	T6	T12	EPM ¹	T ²	S	T*S	L	Q
CMS, kg/d	3,6	3,7	3,4	0,11	0,12	<0,01	0,10	0,16	0,13
CMS, % PV	1,91	1,91	1,88	0,082	0,93	<0,01	0,69	0,75	0,86
CMOD, kg/d ⁹	2,1	2,3	2,0	0,13	0,23	<0,01	0,15	0,68	0,10
Peso, kg ³	192	194	188	2,0	0,04	<0,01	0,62	0,11	0,03
GMD, g/d ³	306	343	259	55,7	0,58	<0,01	0,76	0,56	0,38
Tórax, cm ⁴	135	135	134	0,5	0,06	<0,01	0,53	0,08	0,09
Garupa, cm ⁵	112	113	113	0,10	0,66	<0,01	0,16	0,40	0,75
Cernelha, cm ⁶	107	108	109	0,93	0,16	<0,01	0,21	0,06	0,77
ECC, 1 a 5 ⁷	3,60	3,71	3,60	0,041	0,07	0,05	0,43	0,92	0,02
Eficiência, g/kg ⁸	79	89	71	15,8	0,74	<0,01	0,62	0,73	0,49

¹Erro padrão das médias. ²Valor de probabilidade para os efeitos de tratamento (T), semana experimental (S), interação entre T e S e contrastes linear (T0 vs. T12) e quadrático (T6 vs. T0+T12) de inclusão de glicerina. ³Peso vivo final e ganho médio diário de peso calculado semanalmente (GMD). ⁴Perímetro torácico. ⁵Altura na garupa. ⁶Altura na cernelha. ⁷Escore de condição corporal. ⁸Eficiência = GMD/CMS semanal. ⁹Consumo de matéria orgânica digestível.

A queda no CMS, quando ocorreu a mudança abrupta de dieta, foi diretamente proporcional à inclusão de glicerina bruta (Figura 1) nos dois primeiros dias ($P < 0,05$, efeito linear), quando o consumo das dietas foi avaliado nos primeiros sete dias. No entanto, houve uma tendência de efeito quadrático ($P = 0,13$) para CMS (Tabela 2) ao longo do experimento. Os animais tenderam a consumir mais quando houve substituição parcial de amido por glicerol, proporcionado pelo tratamento com inclusão de 6% de glicerina em substituição ao milho (T6). Parsons, Shelor e Drouillard (2009) também observaram efeito quadrático no CMS. Esses autores observaram redução no CMS, quando animais foram alimentados com mais de 8% da matéria seca da dieta, em substituição parcial ao milho floculado. Já Pyatt, Doane e Cecava (2007) observaram redução no consumo de novilhos quando a glicerina foi incluída na dieta em mais de 10% em substituição ao milho. Ambos os autores, mesmo em seus níveis máximos de substituição de milho por glicerina, o milho não era totalmente substituído, ao contrário desse experimento que houve uma substituição parcial (T6) ou total do milho por glicerina bruta (T12) com inclusão de 6% ou 12% de glicerina nas dietas, respectivamente. Sendo assim, parece que a limitação de desempenho em dietas com substituição do glicerol por milho está mais relacionada à dose de inclusão que pelo substrato a ser substituído. Quando combinou amido de milho com glicerina (T6) nesse experimento houve indícios de melhores respostas que dietas com apenas milho (T0) ou apenas glicerina (T12). A resposta aguda negativa em CMS à substituição de milho por glicerina pode estar vinculada ao teor de contaminantes (SCHÖDER; SUDEKUN, 1999; CHUNG et al., 2007), a presença de metanol ou sódio, ou mesmo devido ao baixo pH da glicerina desse experimento (pH=1,8).

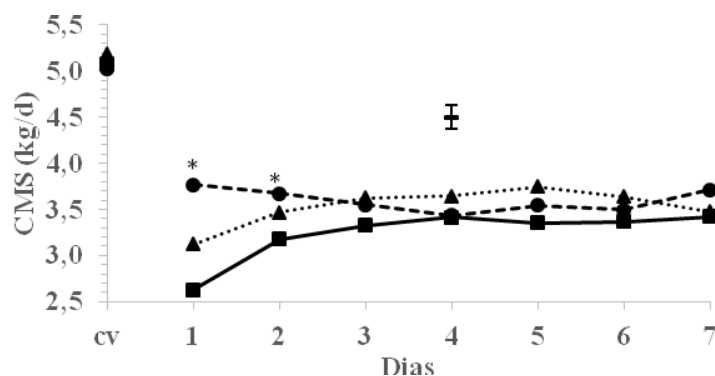


Figura 1 Consumo de matéria seca (CMS) de novilhas nos sete primeiros dias de oferta dos tratamentos com 0% (- -●- -), 6% (···▲···) ou 12% (—■—) de glicerina bruta. cv=Consumo no final do período de padronização (covariável), ($P < 0,01$ para o efeito de tratamento, $P = 0,05$ para o efeito de dia, $P = 0,22$ para a interação entre tratamento e dia, $*P < 0,05$ para o contraste linear de inclusão de glicerina).

Houve resposta quadrática ($P = 0,03$) no peso vivo final e escore de condição corporal dos animais e, apesar das unidades experimentais não suportarem diferença estatística, houve maior ganho de peso diário e eficiência alimentar para T6 (Tabela 2). Essas respostas e tendências quadráticas são coerentes com a tendência quadrática de maior consumo de energia, representado pelo consumo de matéria orgânica digestível (CMOD). A tendência quadrática de maior CMOD se deu em consequência à tendência quadrática de maior CMS (Tabela 1) e tendência quadrática de maior digestibilidade da MS ($P = 0,12$) da matéria orgânica ($P = 0,15$) e do FDN ($P = 0,12$) (Tabela 3). Similarmente ao observado por Zacaroni (2010), o aumento na digestibilidade da dieta induzido pela substituição de milho por glicerina foi associado à tendência de aumento na digestibilidade da FDN, plausivelmente ditado pelo aumento no pH ruminal (Tabela 3).

A inclusão de glicerina em substituição ao milho proporcionou aumento linear no pH do fluido ruminal ($P < 0,01$). O maior pH nas dietas com glicerina

12 horas após a alimentação pode ter decorrido do desaparecimento ruminal de glicerol, por absorção pela parede ou passagem com a digesta (KIJORA et al., 1998; KREHBIEL, 2008), resultando em maior proporção da MO dietética escapando da fermentação ruminal em comparação com dietas com amido (RÉMOND; SOUDAY; JOUANY, 1993). Outra hipótese para o aumento do pH ruminal, seria sua mensuração 12 horas após a alimentação não ter sido adequada para avaliar o pico de fermentação da glicerina, citado por alguns autores ser de 2–6 horas após a alimentação (RÉMOND; SOUDAY; JOUANY, 1993; BERGNER et al 1995), uma vez que não houve diferença na digestibilidade da matéria orgânica não FDN (DMOnFDN) que explicaria maior digestibilidade do glicerol em relação ao amido (TABELA3).

Parte significativa do CMOD pode ter sido composto por glicerol absorvido intacto (FROGER et al., 2001) e metabolizado por rota não gliconeogênica, o que explica a queda linear no teor de glicose plasmática com aumento no teor de glicerina da dieta (Tabela 4). O menor teor de glicose no plasma nas dietas com glicerina foi consistente ao longo do período experimental, e foi observado duas semanas após o início de aplicação dos tratamentos (Figura 2). Tem sido demonstrado que a infusão intrarruminal de glicerol é capaz de aumentar a concentração arterial do mesmo sem aumentar a glicose plasmática (KREHBIEL, 2008). Outra explicação plausível para a queda na glicose plasmática seria a maior proporção molar de ácido butírico que poderia estar sendo produzida no rúmen, induzida pela alimentação com glicerina (CARVALHO et al., 2011; ZACARONI, 2010), capaz de inibir a gliconeogênese hepática a partir de propionato (AIELO; ARMENTANO, 1987) ou mesmo devido ao aumento das concentrações de β -OH-butirato inibindo a gliconeogênese hepática (ZARRIN et al., 2013).

Tabela 3 Digestibilidade aparente de nutrientes no trato digestivo total, relação entre alantoína e creatinina na urina, protozoários e pH do fluido ruminal de novilhas nos tratamentos com 0%(T0), 6%(T6) ou 12% (T12) de glicerina bruta

	T0	T6	T12	EPM ¹	T ²	L	Q
CMS, kg/d ³	3,3	3,4	3,3	0,19	0,81	0,91	0,52
DMS, % do ingerido ⁴	54,4	60,2	58,5	1,90	0,10	0,14	0,12
DMO, % do ingerido ⁴	60,6	64,8	62,8	1,69	0,23	0,36	0,15
DFDN, % do ingerido ⁴	38,9	44,1	42,0	1,96	0,17	0,25	0,12
DMOnFDN, % do ingerido ⁴	91,2	91,1	89,5	0,96	0,37	0,20	0,54
Alantoína/Creatinina	0,80	0,80	0,75	0,060	0,74	0,49	0,76
A:C/CMOD ⁵	0,26	0,25	0,24	0,025	0,74	0,44	0,95
Protozoários, x10 ⁴ /mL	31,0	22,7	21,7	3,90	0,14	0,07	0,40
pH ruminal	6,51	6,77	6,88	0,080	0,01	<0,01	0,47

¹Erro padrão das médias. ²Valor de probabilidade para os efeitos de tratamento (T) e contrastes linear (T0 vs. T12) e quadrático (T6 vs. T0+T12) de inclusão de glicerina. ³Consumo de matéria seca nos dias da determinação da digestibilidade. ⁴Digestibilidades da matéria seca (DMS), da matéria orgânica (DMO), da fibra em detergente neutro (DFDN) e da matéria orgânica não-FDN. ⁵Relação alantoína creatinina consumo de matéria orgânica digestível.

Houve tendência fraca ($P=0,13$) de queda linear na AST com aumento no teor dietético de glicerina bruta, sem ocorrer efeito sobre a GGT (Tabela 4). Similarmente, Silva et al. (2010) observaram queda linear nos teores de AST quando garrotes Nelore foram alimentados com dietas contendo 0; 7,5; 15; 22,5 ou 30% de glicerina bruta, sem efeito sobre a GGT. Valores plasmáticos normais dessas enzimas em bovinos são de 27 a 44 U/L para AST e menor que 140 U/L para GGT (BARROS FILHO, 1995), sugerindo que não ocorreu dano hepático pelo uso de glicerina bruta neste experimento. Entretanto, há similaridade na resposta em AST neste trabalho e no de Silva et al. (2010), sugere que há algum efeito da glicerina bruta sobre a função hepática de bovinos.

Tabela 4 Nitrogênio uréico (NUP), glicose, gamaglutamiltransferase (GGT), aspartato aminotransferase (AST), metanol e formato no plasma de novilhas nos tratamentos com 0%(T0), 6%(T6) ou 12% (T12) de glicerina bruta

	T0	T6	T12	EPM ¹	T ²	Te	T*Te	L	Q
NUP, mg/dL	16,6	14,0	14,8	0,94	0,03	<0,01	0,76	0,06	0,05
Glicose, mg/dL	90,2	83,0	80,1	2,33	0,05	<0,01	0,93	0,02	0,54
GGT, U/L	22,0	19,1	20,7	1,66	0,46			0,59	0,26
AST, U/L	32,8	30,3	29,2	1,57	0,28			0,13	0,70
Metanol, mg/L	0,77	4,06	5,10	1,198	0,05			0,02	0,45
Formato, mg/L	0,07	0,12	0,34	0,038	<0,01			<0,01	0,08

¹Erro padrão das médias. ²Valor de probabilidade para os efeitos de tratamento (T), Tempo (Te) (semana experimental para glicose e tempo após alimentação para NUP), interação entre T e S e contrastes linear (T0 vs. T12) e quadrático (T6 vs. T0+T12) de inclusão de glicerina.

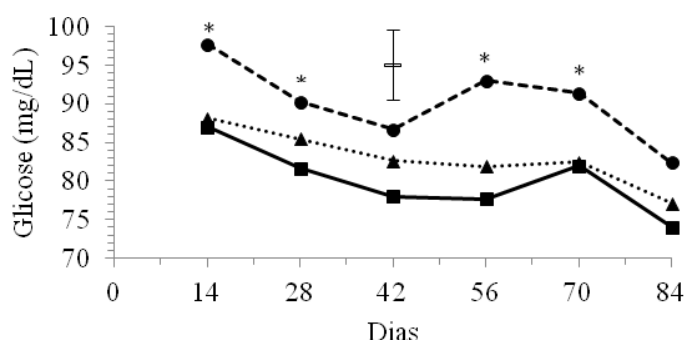


Figura 2 Teor de glicose plasmática de novilhas submetidas a tratamentos com 0% (-●-), 6% (●▲●) ou 12% (—■—) de glicerina bruta ($P<0,03$ para o efeito de tratamento, $P=0,05$ para o efeito de dia, $P=0,65$ para a interação entre dia e tratamento, $*P<0,05$ para efeito de contraste linear de inclusão de glicerina)

A glicerina induziu tendência linear de queda no número de protozoários do rúmen ($P=0,07$), no entanto não houve diferença na síntese relativa de

proteína microbiana no rúmen, estimada pela relação entre a alantoína a creatinina na urina e nem na eficiência de síntese microbiana, estimada pela relação alantoína creatinina consumo de matéria orgânica digestível (A/C/CMOD) (Tabela 3). Como a absorção de glicerol intacto pode ter sido uma proporção representativa do CMOD no T6 e T12, a massa microbiana produzida por unidade de matéria orgânica fermentada no rúmen pode ter sido maior nesses tratamentos. No entanto, o menor teor de NUP em T6 ($P=0,05$ efeito quadrático, Tabela 4) indica que a glicerina combinada com milho melhorou ao uso de N no rúmen principalmente nas primeiras horas do dia (Figura 4). 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 novilhos suplementados com glicerina. Shin, Wang e Kim (2012) observaram queda no NUP em resposta à suplementação com glicerina, semelhante ao observado neste trabalho (Tabela 4, Figura 3). O NUP respondeu quadraticamente à substituição de milho por glicerina ($P=0,05$). O menor valor de NUP nos tratamentos com glicerina também pode ser em consequência da defaunação (VEIRA, 1986) induzida por este alimento (Tabela 3). A menor concentração sanguínea de NUP no T6, reafirma o possível efeito benéfico da combinação de glicerol e amido no rúmen, com menor perda ruminal de amônia, o que pode ter determinado, mesmo que sutilmente, a tendência fraca de melhor desempenho animal neste tratamento (Tabela 2). O amido combinado com o glicerol pode ter proporcionado sincronismo na utilização de N, visto que pico de degradação do glicerol ((REMOND; SOUDAY; JOUANY, 1993) ocorre em torno de seis horas antes ao pico de degradação do amido (HALL; HEREJK, 2001).

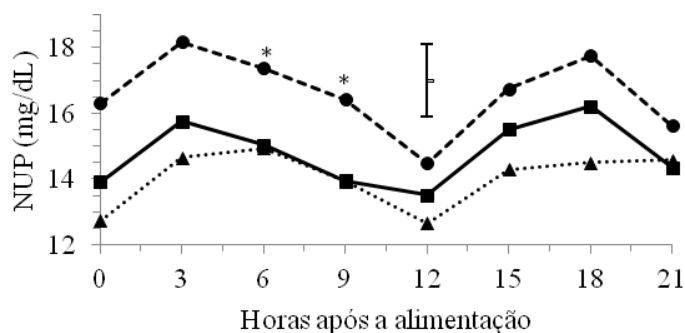


Figura 4 Nitrogênio ureico no plasma (NUP) de novilhas submetidas a tratamentos com 0% (-●-), 6% (▲) ou 12% (■) de glicerina bruta, ($P < 0,05$ para o efeito de tratamento, $P < 0,01$ para o efeito de dia, $P = 0,76$ para a interação entre dia e tratamento, $*P < 0,05$ para efeito de contraste quadrático de inclusão de glicerina).

A inclusão de glicerina à dieta aumentou de forma quadrática ($P < 0,05$) o tempo de ruminação e mastigação total (ruminação mais ingestão) em minutos por dia, sem afetar a atividade mastigatória por unidade de CMS (Tabela 5). O aumento na ruminação e mastigação no T6 foi acompanhado por um aumento CMS ($P = 0,05$, efeito quadrático) um dia antes da avaliação do comportamento com consequente aumento numérico no tempo de ingestão. O maior tempo de ingestão, quando 6% de glicerina foram incluídos na dieta, pode estar relacionado ao maior consumo de FDN, proporcionado pelo maior consumo no dia antes da avaliação da atividade mastigatória (YANG; BEAUCHEMIN, 2009).

A maioria dos trabalhos indica que existe um limite ótimo de inclusão máxima de glicerina para bovinos em crescimento. Mach, Bach e Devant (2009) não encontraram diferença no CMS e obtiveram maior ganho de peso com inclusão de até 10% de glicerina à dieta, Parsons, Shelor e Drouillard (2009) encontraram limites de 8% de inclusão de glicerina sem prejuízos ao desempenho animal. Em concordância com esses trabalhos, a substituição

parcial de amido oriundo de milho finamente moído por glicerina não deprimiu o desempenho animal neste experimento, mas a substituição total pode não ter sido benéfica. A manutenção de algum amido dietético parece ser requerida em dietas baseadas em cana ensilada.

Tabela 5 Atividade mastigatória em minutos por dia e por consumo de matéria seca (CMS) de novilhas nos tratamentos com 0%(T0), 6%(T6) ou 12% (T12) de glicerina bruta

	T0	T6	T12	EPM ¹	T ²	L	Q
CMS ³ , Kg/dia	3,4	3,6	3,0	0,25	0,05	0,10	0,05
Ingestão, min/d	291	316	305	16,7	0,44	0,49	0,28
Ruminação, min/d	479	535	515	16,0	0,05	0,11	0,05
Mastigação, min/d ⁴	770	851	820	17,9	0,01	0,06	0,02
Ingestão, min/kg CMS.	97	95	95	10,0	0,99	0,88	0,96
Ruminação, min/kg CMS	150	162	158	8,7	0,45	0,40	0,35
Mastigação, min/kg CMS	247	257	253	16,6	0,82	0,71	0,62

¹Erro padrão das médias. ²Valor de probabilidade para os efeitos de tratamento (T) e contrastes linear (T0 vs. T12) e quadrático (T6 vs. T0+T12) de inclusão de glicerina.

³CMS=consumo de matéria seca um dia antes da mensuração do comportamento.

⁴Mastigação=Ingestão+Ruminação

A glicerina bruta utilizada neste experimento continha 7,3% de metanol na MS, bem acima do teor de 0,5% permitido na Alemanha e 0,015% nos EUA (SELLERS, 2008). Considerando que o teor de MS na glicerina bruta foi 70,2% da MN, o teor dietético de metanol no T6 foi 0,60% da MS e 1,24% no T12, calculado com base nos teores de 5,8% e 11,9% de glicerina na MS das dietas, respectivamente (Tabela 1). O consumo calculado de metanol foi 22,3g/d no T6 e 42,1g/d no T12, equivalentes a consumos diários por kg de peso vivo de 114mg e 224mg, respectivamente (Tabela 2). A DL₅₀ do metanol foi definida como 7.000 e 13.000mg/kg para ratos, coelhos e cães, e 2.000 e 7.000mg/kg para primatas (EHC 196, 2010). Apesar da quantidade consumida de metanol ter sido aparentemente baixa, a suscetibilidade de bovinos à intoxicação por metanol é desconhecida (BLACK et al., 1985). Sintomas clínicos característicos

da intoxicação por metanol não foram observados neste estudo (MCMARTIN et al. 1975; BAUMBACH et al., 1977).

Tabela 6 Equilíbrio acidobásico do sangue jugular imediatamente antes da alimentação de novilhas nos tratamentos com zero (T0), seis (T6) ou 12% (T12) de glicerina bruta

	T0	T6	T12	EPM ¹	T ²	S	T*S	L	Q
pH	7,32	7,33	7,30	0,015	0,22	<0,01	0,90	0,18	0,26
PCO ₂ , mm Hg	31,7	30,7	30,6	0,45	0,18	<0,01	0,89	0,09	0,40
PO ₂ , mm Hg	34,8	35,7	36,5	0,99	0,47	<0,01	0,15	0,23	0,95
HCO ₃ ⁻ , mEq/L	17,1	16,5	15,4	0,42	0,01	<0,01	0,50	<0,01	0,67
TCO ₂ , mEq/L	18,1	17,5	16,4	0,40	<0,01	<0,01	0,63	<0,01	0,56
Excesso de bases	-7,7	-7,8	-8,5	1,15	0,75	<0,01	0,45	0,51	0,75
SatO ₂ , % ³	60,2	62,1	62,3	2,45	0,60	<0,01	0,63	0,34	0,80
O ₂ ct, vol% ³	13,6	13,9	14,1	0,57	0,73	<0,01	0,41	0,45	0,91

¹Erro padrão das médias. ²Valor de probabilidade para os efeitos de tratamento (T), semana experimental (S), interação entre T e S e contrastes linear (T0 vs. T12) e quadrático (T6 vs. T0+T12) de inclusão de glicerina. ³SatO₂= % de hemácias saturadas, ³O₂ct=% de oxigênio no volume total.

Apesar da ausência de sintomatologia clínica indicativa de intoxicação por metanol houve aumento na concentração de metanol e formato no sangue (Tabela 4). Além disso, os menores valores de pH sanguíneo, concentração de dióxido de carbono (TCO₂) e de íons bicarbonato (HCO₃⁻) no sangue jugular sugerem que houve acidose metabólica nos animais alimentados com glicerina bruta (Tabelas 6 a 8). O metanol ingerido é metabolizado a formaldeído pelo fígado, sendo este transformado em ácido fórmico (RÖE, 1955), capaz de induzir acidose metabólica. Clay, Murphy e Watkins (1975) ao administrarem 4g de metanol por kg de peso vivo por via endovenosa a macacos obtiveram variação em parâmetros sanguíneos similares aos observados neste experimento. Doze horas após a alimentação houve resposta quadrática significativa em

saturação de hemácias por O₂ e na PO₂, plausivelmente correlacionado às tendências também quadráticas de maior CMOD e ganho de peso no T6 (LOPES et al., 2010).

Tabela 7 Equilíbrio acidobásico do sangue jugular seis horas após a alimentação de novilhas nos tratamentos com zero (T0), seis (T6) ou 12% (T12) de glicerina bruta

	T0	T6	T12	EPM ¹	T ²	S	T*S	L	Q
pH	7,34	7,35	7,32	0,009	0,10	<0,01	0,71	0,21	0,07
PCO ₂ , mm Hg	27,6	24,9	25,8	0,63	<0,01	<0,01	0,63	0,03	0,01
PO ₂ , mm Hg	35,2	38,5	35,3	1,31	0,17	<0,01	0,56	0,94	0,06
HCO ₃ ⁻ , mEq/L	14,8	13,8	13,6	0,79	0,02	<0,01	0,72	<0,01	0,26
TCO ₂ , mEq/L	15,7	14,7	14,4	0,31	0,02	<0,01	0,85	<0,01	0,41
Excesso de bases	-8,9	-9,0	-	0,52	0,12	<0,01	0,83	0,07	0,31
SatO ₂ , % ³	63,5	66,2	62,1	1,56	0,16	<0,01	0,32	0,51	0,08
O ₂ ct, vol. % ³	14,2	14,8	13,9	0,37	0,17	<0,01	0,32	0,51	0,08

¹Erro padrão das médias, ²Valor de probabilidade para os efeitos de tratamento (T), semana experimental (S), interação entre T e S e contrastes linear (T0 vs, T12) e quadrático (T6 vs, T0+T12) de inclusão de glicerina. ³SatO₂= % de hemácias saturada, ³O₂ct=% de oxigênio no volume total.

A toxicidade do metanol está relacionada à inibição da fosforilação oxidativa pela inibição da atividade da citocromo oxidase C (MARTIN-AMAT et al., 1977; NICHOLLS, 1975). O ácido fórmico pode se ligar na posição livre do ferro heme da citocromo oxidase C, inibindo sua ligação com O₂ e conseqüentemente o transporte de elétrons (NICHOLLS, 1975). As concentrações de ácido fórmico que foram inibitórias à citocromo oxidase de macacos foram de 5 a 30 mM de formato no sangue (NICHOLLS, 1975), que corresponde a 230 a 1380 mg/L. A concentração de formato máxima nesse experimento foi de 0,34 mg/L de sangue no tratamento com 12% de inclusão de glicerina, aparentemente não é alto o suficiente para causar sinais de toxidez.

Tabela 8 Equilíbrio acidobásico do sangue jugular doze horas após a alimentação de novilhas nos tratamentos com zero (T0), seis (T6) ou 12% (T12) de glicerina bruta

	T0	T6	T12	EPM¹	T²	S	T*S	L	Q
pH	7,30	7,29	7,27	0,02	0,25	<0,01	0,55	0,10	0,98
PCO ₂ , mm Hg	34,3	34,0	33,9	0,83	0,90	<0,01	0,58	0,66	0,92
PO ₂ , mm Hg	34,9	36,7	34,7	0,76	0,12	<0,01	0,15	0,86	0,04
HCO ₃ ⁻ , mEq/L	17,1	16,3	15,8	0,34	0,03	<0,01	0,65	<0,01	0,72
TCO ₂ , mEq/L	18,1	17,3	16,5	0,42	0,05	<0,01	0,29	0,02	0,94
Excesso de bases	-8,3	-9,2	-8,5	1,05	0,77	<0,01	0,79	0,86	0,49
SatO ₂ , % ³	60,2	62,1	57,1	1,45	0,05	<0,01	0,18	0,17	0,04
O ₂ ct, vol. % ³	13,6	14,0	12,9	0,46	0,15	<0,01	0,17	0,24	0,12

¹Erro padrão das médias, ²Valor de probabilidade para os efeitos de tratamento (T), semana experimental (S), interação entre T e S e contrastes linear (T0 vs, T12) e quadrático (T6 vs, T0+T12) de inclusão de glicerina. ³SatO₂= % de hemácias saturada, ³O₂ct=% de oxigênio no volume total.

4 CONCLUSÕES

A inclusão de até 6% de glicerina mostrou ser uma alternativa viável para o desenvolvimento de novilhas em crescimento. No entanto, a substituição total de milho por glicerina não foi satisfatório.

O consumo de até 224mg/kg de peso vivo de metanol oriundo de glicerina bruta de biodiesel não induziu sintomas clínicos de intoxicação por ácido fórmico em bovinos alimentados por 91 dias, mas induziu acidose metabólica.

O efeito negativo sobre o teor de glicose no plasma da substituição de milho por glicerina bruta precisa ser melhor compreendido.

REFERÊNCIAS

AIELO, R. J.; ARMENTANO, L. E. Effects of volatile fatty acids on propionate metabolism and gluconeogenesis in caprine hepatocytes. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 2504-2510, 1987.

ALLEN, M. S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1598-1624, 2000.

ANDRADE, M. A. F. **Desempenho de novilhas Holandesas alimentadas com cana-de-açúcar como forrageira única**. 1999. 56 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**, Washington, D.C., 12^a ed, v. 1, 1094 p. 1975.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**, Virgínia, Arlington, 15^a ed., v.1, 1117 p. 1990.

ÁVILA, C. L. S.; PINTO, J. C.; FIGUEIREDO, H. C. P.; SCHWAN, R. F. Effects of a indigenuos and a comercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugarcane silage. **Grass Forage Science**, v. 64, p. 384-394, 2009.

BARROS FILHO, I. R. **Contribuição ao estudo da bioquímica clínica em zebuínos da raça Nelore (Bos Indicus, Linnaeus 1758) criados no Estado de São Paulo**. 1995. 132 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, São Paulo, 1995.

BAUMBACH, G.; CANCELLA, P.; MARTIN-AMAT, G.; TEPHLY, T. R.; MCMARTIN, K. E.; MAKAR, A. B.; HAYREH, M. S.; HAYREH, S. S. Methanol poisoning: IV, Alterations of the ocular morphology in the methanol-poisoned rhesus monkey. **Archives of Ophthalmology**, v. 95, p. 1859-1865, 1977.

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

BLACK, K. A.; EELLS, J. T.; NOKER, P. E.; HAWTREY, C. A.; TEPHLY, T. Role of hepatic tetrahydrofolate in the species difference in methanol toxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, p. 3854, 1985.

CARVALHO, E. R.; SCHMELZ-ROBERTS, N. S.; WHITE, H. M.; DOANE, P. H.; DONKIN, S. S. Replacing corn with glycerol in diets for transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 908-916, 2011.

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.** International Feed Resources Unit. Rowett Research Institute, Bucksburn, Aberdeen, UK. 1992. 20 p.

CHUNG, Y. H.; RICO, D. E.; MARTINEZ, C. M.; CASSIDY, T. W.; NOIROT, V.; AMES, A.; VARGA, G. A. Effect of feeding dry glycerin to early postpartum Holstein dairy cows on milk production and metabolic profiles. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 5682-5691, 2007.

CLAY, K. L.; MURPHY, R. C.; WATKINS, W. D. Experimental methanol toxicity in the primate: analysis of metabolic acidosis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 34, p. 49-61, 1975.

CORREA, C. E. S.; PEREIRA, M. N.; OLIVEIRA, S. G.; RAMOS, M. H. Performance of holstein cows fed sugarcane or corn silage of different grain textures. **Scientia Agricola**, v. 60 p. 621-629, 2003.

DEFRAIN, J. M.; HIPPEN, A. R.; KALSCHEURK, F.; JARDON, P. W. Feeding glycerol to transition dairy cows: effects on blood metabolites and lactation performance. **Journal of Dairy Science**, v. 51, p.721, 2004.

DEHORITY, B. Evaluating of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, p. 182-185, 1984.

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**, v. 92, p. 5111-5119, 2009.

ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 196 – EHC 196. **International programme on chemical safety.** Virginia, 1997. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc196.htm>>. Acesso em: 10 de fevereiro 2010.

FARIAS, M. S.; PRADO, I. N.; VALERO, M. V.; ZAWADZKI, F.; SILVA, R. R.; EIRAS, C. E.; RIVAROLI, D. C.; LIMA, B. S. Níveis de glicerina para novilhas suplementadas em pastagens: desempenho, ingestão, eficiência

alimentar e digestibilidade. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, p. 1177-1188, 2012.

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**, v. 147, n. 5, p. 1129-1135, 2001.

GENTHNER, B. R. S.; DAVIS, C. L.; BRYANT, M. P. Features of rumen and sewage sludge strains of *Eubacterium limosum*, a methanol- and H_2 - CO_2 -utilizing species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, p. 12-19, 1981.

HALL, M. B.; HEREJK, C. Differences in yields of microbial crude protein from in vitro fermentation of carbohydrates. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 2486-2493, 2001.

JOHNSON, R.B. The treatment of ketosis with glycerol and propylene glycol. **The Cornell Veterinarian**, v. 44, p. 6-21, 1954.

KIJORA, C.; BERGNER, H.; KUPSCH, R. D.; HAGEMANN, L. Glycerol as feed component in diets of fattening pigs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 47, p. 345-360, 1998.

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

LAMMERS, B. P.; BUCKMASTER, D. R.; HEINRICHS, A. J. A simple method for the analysis of particle sizes of forage and total mixed rations. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 922-928, 1996.

LITTELL, R. C.; MILLKEN, G. A.; STROUP, W. W. SAS[®] system for mixed models. **SAS Institute Inc**, Cary, NC, 1996. 633 p.

LOPES, N. M.; NERI, J.; SILVEIRA, V. A.; PESSOA JUNIOR, G.; VIEIRA JUNIOR, I. C.; SALVATI, G. G. S.; OLIVEIRA, R. C.; PEREIRA, R. A. N.; PEREIRA, M. N. Suplementação de vacas leiteiras com farinha de algas. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 4., 2010, São Pedro, **Anais...** São Pedro: CBNA/AMENA, 2010. p. 221-222.

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

MARTIN-AMAT, G.; MCMARTIN, K. E.; HAYREHA, S. S.; HAYREH, M. S.; TEPHLY, T. R. Methanol poisoning: ocular toxicity produced by formate. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 45, p. 201-208, 1978.

MARTIN-AMAT, G.; TEPHLY, T. R.; MACMARTIN, K. E.; MAKAR, A. B.; HAYREH, M. S.; HAYREH, S. S.; BAUMBACH, G.; CANCELLA, P. Methanol poisoning: II Development of model for ocular toxicity in methanol poisoning using the rhesus monkey. **Archives of ophthalmology**, v. 95, p. 1847-1850, 1977.

MCMARTIN, K. E.; MAKAR, A. B.; MARTIN G.; PALESE, M.; TEPHLY, T. R. Methanol Poisoning 1 The role of formic acid in the development of metabolic acidosis in Monkey and the reversal by 4-methylpyrazole. **Biochemical Medicine**, v. 13, p. 319-333, 1975.

MIRANDA, D. C. L.; DIAS JUNIOR, G. S.; LOPES, F.; PEREIRA, R. A. N.; PEREIRA, M. N. Composição e pH de silagem de cana-de-açúcar com aditivos químicos e microbiológicos. **Revista de Ciências Agrárias**, Belém, v. 54, p. 122-130, 2011.

NICHOLLS, P. Formate as an inhibitor of cytochrome c oxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 67, p. 610-616, 1975.

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, 2007.

PARSONS, G. L.; SHELOR, M. K.; DROUILLARD, J. S. Performance and carcass traits of finishing heifers fed crude glycerin. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 653-657, 2009.

PATTERSON, J. A.; HESPELL, R. B. Trimethylamine and methylamine as growth substrates for rumen bacteria and *Methanosarcina barkeri*. **Current Microbiology**, v. 3, p.79-83, 1979.

PEREIRA, M. N. Novos conceitos em cana-de-açúcar fresca e ensilada. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL EM FORMULAÇÃO DE DIETAS PARA GADO LEITEIRO, 2., 2012, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2012. p. 67-94.

POLL, A.; DEMEYER, D. I. Fermentation of Methanol in the Sheep Rumen. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 54, p. 832-834, 1988.

PYATT, A.; DOANE, P. H.; CECAVA, M. J. Effect of crude glycerin in finishing cattle diets. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 412, 2007 (Suppl. 1).

RÉMOND, B.; SOUDAY, E.; JOUANY, J. P. In vitro and in vivo fermentation of glycerol by rumen microbes. **Animal feed science Technology**, v. 41, p. 121-132, 1993.

RÖE, O. The metabolism and toxicity of methanol. **Pharmacological Reviews**, v. 7, p. 399-412, 1955.

SAN VITO, E.; **Glicerina bruta na alimentação de vacas leiteiras**. 2010. 40 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

SCHRODER, A.; SUDEKUM, K. H. Glycerol as a by-product of biodiesel production in diets for ruminants. In: NEW HORIZONS FOR AN OLD CROP, RAPESEED CONGRESS, **Proceedings...** 10. 1999, Canberra, Austrália. 1999. 241 p.

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

SHIN, J. H.; WANG, D.; KIM, S. C. Effects of feeding crude glycerin on performance and ruminal kinetics of lactating Holstein cows fed silage or cottonseed hull-based, low-fiber diets. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 4006-4016, 2012.

SIÉCOLA JÚNIOR, S.; BITENCOURT, L. L.; MELO, L. Q.; SILVEIRA, V. A.; LOPES, N. M.; SILVA, J. R. M.; PEREIRA, R. A. N. Despalha da cana-de-açúcar e desempenho de novilhas e vacas leiteiras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, p. 219-228, 2014.

SILVA, D. A. V.; EZEQUIEL, J. M. B.; VAN CLEEF, E. H. C. B.; D'AUREA, A. P.; FÁVARO, V. R. Bioquímica sérica de bovinos de corte confinados recebendo dietas contendo glicerina bruta. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 47, 2010, Salvador, **Anais...** 47ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Salvador, 2010.

TEIXEIRA, C. B.; RAMOS, M. H.; SANTOS, J. F.; CHAVES, M. L.; BITENCOURT, L. L.; PEREIRA, R. A. N.; RAMALHO, M. A. P.; PEREIRA, M. N. Variáveis agrônômicas e químicas e degradabilidade ruminal da cana-de-açúcar. **Arquivo brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, p. 870-878, 2014.

VANTCHEVA, Z. M.; PRADHAN, K.; HEMKEN, R. W. Rumen metanol in vivo and in vitro. **Journal of Dairy Science**, v. 53, p. 1511-1514, 1970.

VEIRA, D. M. The role of ciliate protozoa in nutrition of the ruminant. **Journal Animal Science**, v. 63, p. 1547-1560, 1986.

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

WARNER, A. C. I. Enumeration of rumen microorganisms. **Journal of General Microbiology**, v. 28, p. 119, 1962.

WEN, Z. **New uses for crude glycerin from biodiesel production**. Disponível em: <<http://www.extension.org/pages/29264/new-uses-for-crude-glycerin-from-biodiesel-production>>. Acesso em: 2 de Abril de 2012.

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**, v. 65, p. 495-501, 1982.

YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A. Increasing physically effective fiber content of dairy cow diets through forage proportion versus forage chop length: Chewing and ruminal pH. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 1603-1615, 2009.

ZACARONI, O. F. **Resposta de vacas leiteiras à substituição de milho por glicerina bruta**. 2010. 43 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

ZARRIN, M.; DE MATTEIS, L.; VERNAY, M. C. M. B.; WELLNITZ, O.; VAN DORLAND, H. A.; BRUCKMAIER, R. M. Long-term elevation of β -hydroxybutyrate in dairy cows through infusion: Effects on feed intake, milk production, and metabolism. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 2960-2972, 2013.

**CAPÍTULO 3 Parâmetros ruminais e sanguíneos de vacas submetidas à
acidose ruminal com glicerina ou milho grão**

RESUMO

A glicerina oriunda da indústria de biodiesel pode ser utilizada na dieta de bovinos como fonte de energia em substituição ao milho, porém essa glicerina é rica em contaminantes, principalmente metanol. Não se sabe de forma eficiente qual o efeito do metanol sobre o metabolismo de ruminantes. Objetivou-se avaliar parâmetros ruminais e sanguíneos ao longo de 24 h de vacas não lactantes após a infusão matinal pela cânula ruminal (0,5% do peso vivo) de milho finamente moído (M), milho reidratado e ensilado (MR), glicerina pura (G) ou glicerina acrescida de 7,2% de metanol (GM). Glúten de milho foi acrescido aos tratamentos G e GM para torná-los isoprotéicos relativamente a M e MR. Quatro vacas mestiças Holandês-Zebu (576 ± 35 kg) receberam os tratamentos em Quadrados Latinos 4×4 com períodos de 5 d. Amostras do sangue jugular e do fluido ruminal foram obtidas simultaneamente a cada 2 h por 24 h. Contrastes avaliaram tratamentos: C1 = M+MR vs. G+GM, C2 = G vs. GM, C3 = M vs. MR. O CMS foi 17,6 kg/d no M, 17,0 kg/d no MR, 15,2 kg/d no G e 15,2 kg/d no GM ($P=0,03$ para C1). A degradação ruminal *in situ* da MS de alfafa, silagem de milho, silagem de cana e tifton em 6, 12 e 24 horas de incubação foi inibida pela glicerina ($P<0,01$ para C1). O pH médio ($P=0,12$ para C1) e máximo ($P=0,04$ para C1) do fluido ruminal ao longo do dia foi menor nos animais recebendo milho. O teor de N-amoniaco no rúmen nos tempos 6 e 8 h após a infusão e o teor de N-uréico no plasma nos tempos 8, 12, 14, 16 e 20 h foram maiores na glicerina do que no milho, mas o teor ruminal de amônia 2 h após a infusão foi menor na glicerina ($P<0,01$ para C1). O teor de glicose no plasma foi maior nos animais recebendo glicerina, devido ao maior teor nos tempos 2, 4 e 6 h após a infusão ($P<0,01$ para C1). Não houve efeito de tratamento sobre parâmetros sanguíneos descrevendo o balanço ácido-básico do sangue venoso ($P>0,25$). A infusão de glicerina no rúmen de vacas fistuladas aumentou o teor de glicose plasmática. Não foram observados sintomas clínicos de intoxicação por metanol quando vacas receberam infusões de glicerina no rúmen com proporções de 207 mg de metanol/kg de peso vivo.

Palavras-chave: biodiesel, bovino, glicose, glicerol, metanol.

ABSTRACT

The glycerin from the biodiesel industry can be used in the cattle diet as energy source in substitution to the corn, although this glycerin is rich in contaminants, mainly methanol. The methanol effect on the ruminant metabolism is not efficiently known. This paper aimed to evaluate ruminal and blood parameters of non-lactating cows after the morning infusion through rumen cannula (0.5% of body weight) of finely ground corn (C), rehydrated and ensiled ground corn (MR), pure glycerol (G), or glycerol with 7.2% methanol (GM). Corn gluten meal was added to treatments G and GM to achieve similar N content to M and MR. Four crossbred Holstein-Zebu cows (576 ± 35 kg) received a sequence of the treatments in a 4 x 4 Latin Square with 5-d periods. Samples of jugular blood and rumen fluid were obtained simultaneously at 2-h intervals for 24 h after infusions. Contrasts evaluated treatments: C1 = M + MR vs. GM + G, C2 = G vs. GM, and C3 = M vs. MR. The DMI was 17.6 kg/d on M, 17.0 kg/d on MR, 15.2 kg/d on G, and 15.2 kg/d on GM ($P=0.03$ for C1). Ruminant *in situ* degradation of DM from alfalfa, corn silage, sugarcane silage, and Tifton at 6, 12, and 24 h of incubation was inhibited by glycerol ($P<0.01$ for C1). Mean ($P=0.12$ for C1) and maximum ($P=0.04$ for C1) ruminal pH on corn were lower than on glycerol. Glycerol increased the contents of ruminal ammonia 6 and 8 h post-infusions and plasma urea-N 8, 12, 14, 16, and 20 h, but glycerol reduced ruminal ammonia 2 h post-infusion ($P<0.01$ for C1). Plasma glucose content was increased by glycerol, due to the increased concentrations 2, 4, and 6 h after infusions ($P<0.01$ for C1). There were no treatment effects on blood parameters describing the acid-base balance in venous blood ($P>0.25$). The infusion of glycerol in the rumen of cows increased plasma glucose. Clinical symptoms of methanol toxicity were not observed when cows received glycerol infusions in the rumen with proportion of 207 mg of methanol/kg of body weight.

Keywords: biodiesel, bovine, glucose, glycerol, methanol.

1 INTRODUÇÃO

A expansão da indústria de biodiesel tem proporcionado perspectivas para o uso de glicerol como aditivo em alimentos para animais. A fim de aumentar o suprimento de glicose e melhorar o status metabólico, vários estudos foram conduzidos nos últimos anos. Atuando como um substrato gliconeogênico, o glicerol puro tem sido utilizado como aditivo na alimentação de bovinos (SEAL; REYNOLDS, 1993; LENG, 1970). O glicerol é um substrato fermentável no rúmen (RÉMOND; SOUDAY; JOUANY, 1993; BERGNER et al., 1995) e precursor do gliconeogênico via metabolismo hepático (LIN, 1977). No entanto, apesar de ser um precursor gliconeogênico, os resultados de pesquisa sobre o efeito da glicerina na concentração plasmática de glicose tem sido inconsistente. Alguns autores não encontraram diferença nos teores de glicose sanguínea quando ingredientes da dieta, principalmente milho, foram substituídos por glicerina (OSBORNE et al., 2009; SHIN; WANG; KIM, 2012), outros autores observaram aumento nos teores de glicose plasmática (DONKIN et al., 2009) ou mesmo redução (ZACARONI, 2010, CARVALHO et al., 2011). O metanol, principal contaminante da glicerina bruta, pode estar afetando a gliconeogênese de alguma forma. O metanol é metabolizado a ácido fórmico no fígado que causa acidose metabólica (MARTIN-AMAT et al., 1977) e também liga a posição heme da citocromo oxidase, inibindo sua ligação com O₂ e conseqüentemente o transporte final de elétrons para formar água (NICHOLLS, 1975).

A forma de fornecimento da glicerina ao animal pode influenciar a taxa de absorção ou metabolização. Linke et al. (2004) comparando a forma de fornecimento de glicerol em vacas leiteiras observaram que na forma de drench, em *pulse* dose, o teor de glicose e insulina plasmática foi maior do que em vacas que receberam glicerina misturada na dieta, apresentando pico máximo com três

horas após o fornecimento. Esses autores também observaram aumento nas proporções de propionato e butirato com diminuição de acetato ruminal em animais que receberam glicerina, porém não observaram diferença entre as formas de seu fornecimento.

Alguns autores tem relatado que a digestibilidade ruminal da glicerina é mais rápida que o amido. Essa digestibilidade foi relatada por alguns autores como sendo 90% após 2 horas de incubação (Bergner et al., 1995) e 100% de desaparecimento após 4 horas (REMOND; SOUDAY; JOUANY, 1993). No entanto outros autores observaram digestibilidade ruminal mais lenta com *lag time* maior comparado ao milho (FERRANO et al., 2009; LEE et al., 2011) em experimentos *in vitro* de produção de gás. Além disso, glicerina pode influenciar a digestibilidade da dieta. Wang et al. (2009) observaram que bois alimentados com 200 g de glicerol por dia obtiveram maior digestibilidade da MS e do FDN em suas dietas. Südekum (2008) em sua revisão sobre adição de glicerina como suplemento em dietas de ruminantes, não observou efeito na digestibilidade da matéria orgânica do FDN e do amido das dietas. Em contraste, Shin, Wang e Kim (2012) observaram redução de 30% na digestibilidade do FDN no trato digestivo total quando a glicerina bruta (80,3% de pureza) substituiu 10% de ingredientes energéticos da dieta de vacas em lactação. Donkin et al. (2009) também, relataram menor digestibilidade total da FDN em vacas leiteiras ao substituir grãos de milho por glicerol puro a 5, 10 ou 15% de MS.

O objetivo deste experimento foi avaliar parâmetros ruminais e sanguíneos de vacas que receberam pulsos ruminais de glicerina pura, glicerina acrescida de 7,2% de metanol, milho grão moído fino e milho grão reidratado e ensilado.

2 METODOLOGIA

Quatro vacas mestiças Holandês-Zebu não lactantes, pesando 576 ± 35 kg, com cânulas implantadas cirurgicamente no saco dorsal do rúmen receberam uma sequência de quatro tratamentos em quatro períodos de cinco dias cada, delineando um experimento em Quadrado Latinos 4x4. As vacas foram alimentadas individualmente em confinamento total alojadas em *tie stall* com camas de areia. Foi feita uma dieta única para todos os animais, denominada dieta basal. A composição com base na matéria em ingredientes dessa dieta foi 62,5% de silagem de milho, 32,1% de concentrado comercial (SAAG Comercial Exportadora Ltda, Santana da Vargem, MG) e 5,4% de glicerina bruta oriunda de sebo bovino (Tecno-Oil Indústria e Comércio Ltda, Mombuca, SP), e composição da dieta em nutrientes de 11,6% de proteína bruta (PB), 51,1% de FDN, 5,2% de estrato etéreo (EE) e 6,3% de matéria mineral (MM). A glicerina continha 29,8% de umidade, 7,3% de metanol, 7,1% de EE e 7,9% de MM. A dieta foi oferecida para todos os animais em todos os tratamentos na forma de dieta completa duas vezes ao dia (7h e 13h).

Os animais foram submetidos a um período pré-experimental de doze dias, alimentados *ad libitum* para se adaptarem à inclusão de glicerina na dieta. Nesse período, o consumo de MS foi mensurado entre os dias 7 e 12. Após esse período, seguiram-se quatro períodos experimentais de cinco dias cada. Nos dias 3 e 4 de cada período experimental os animais foram alimentados em quantidade fixa, equivalente a 90% do consumo diário mensurado no período pré-experimental, visando manter enchimento de rúmen constante.

Os tratamentos se constituíram de milho grão moído fino (M), milho grão reidratado e ensilado (MR), glicerina pura (G) ou glicerina acrescida de 7,2% de metanol (GM), infundidos no rúmen em pulse dose no dia 5 do período experimental, numa proporção 0,5% do peso vivo de cada animal. Nos

tratamentos com glicerina utilizou-se glúten de milho para que os tratamentos ficassem com o mesmo teor de proteína dos tratamentos com milho. A glicerina pura (Glicerina Bidestilada U.S.P., Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP) continha 99,9% de glicerol. A administração de metanol foi feita para simular a glicerina bruta.

A infusão dos tratamentos, com base na matéria seca, foi de $2,86 \pm 0,16$ kg (média \pm desvio padrão), variando de 2,64 a 3,09 kg de M, MR, G ou GR. Essa variação ocorreu devido ao peso das vacas serem diferentes. No dia da infusão dos tratamentos a dieta basal foi oferecida *ad libitum*. O consumo de MS no dia da infusão dos tratamentos foi mensurado, pesando a dieta oferecida e as sobras diárias para cada vaca. Amostras do concentrado, da silagem de milho e da sobra de cada vaca foram coletadas diariamente para posterior análise. A silagem de milho e as sobras foram secas a 55° C durante 48 horas, em uma estufa de ventilação forçada e em seguida foram moídas em peneira com crivo de 1 mm em moinho do tipo Thomas - Willey. As amostras foram analisadas para MS (105° C durante 12h), FDN (GOERING; VAN SOEST, 1970) usando α -amilase termoestável, PB por destilador a vapor do tipo Mikrokjeldhal (AOAC, 1975).

Amostras de sangue jugular e fluido ruminal foram coletadas a cada 2 horas por 24 horas, iniciando-se antes do fornecimento da dieta e infusão dos tratamentos (tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 22 relativos à infusão dos tratamentos). Nas amostras de sangue foram analisados teor de glicose, nitrogênio uréico no plasma (NUP) e equilíbrio acidobásico venoso. Para análise de glicose e NUP, as amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo 6 mg de fluoreto de potássio e 12 mg de EDTA, centrifugadas a $1118 \times g$ por 10min e o plasma congelado a -20° C até análise laboratorial. O teor de NUP e glicose foram mensurados por métodos colorimétricos enzimáticos (Ureia 500 e Glicose Enzimática Líquida. Ambos da Doles Reagente para Laboratórios Ltda, Goiânia,

GO). Para o perfil acidobásico venoso o sangue foi coletado em tubos heparinizados e analisado imediatamente após a coleta em avaliador de pH e gases sanguíneos AGS22 (Drake, São José do Rio Preto, SP).

O fluido ruminal foi coletado no saco ventral do rúmen, com auxílio de um tubo de polietileno, para mensuração do pH e concentração de amônia ruminal ao longo do dia. O pH ruminal foi mensurado imediatamente após a coleta, por meio de pHmetro Digimed DM20 (Datamed Instrumentos Científicos e Médicos LTDA, Belo Horizonte, MG). Para concentração de amônia 25 mL de fluido ruminal foram rapidamente congelados em recipiente de plástico contendo 0,5 mL de ácido sulfúrico a 50%. A análise de amônia foi realizada de acordo com a metodologia de Vieira (1980).

Amostras de tifton, silagem de cana-de-açúcar, silagem de milho e alfafa foram incubadas *in situ* por 6, 12 e 24 horas após a infusão de cada tratamento para avaliar o efeito dos tratamentos sobre a degradabilidade da MS de diferentes forragens. Em saquinhos com dimensões de 15 x 10 cm, de tecido *failet* foram colocados 5 g de tifton, silagem de cana-de-açúcar, silagem de milho ou alfafa, triturado em moinho do tipo Thomas-Willey, com peneira de crivo de 2 mm, pesados e lacrados. As forragens, antes de serem pesadas e acondicionadas nos saquinhos de degradabilidade, foram mantidas em estufa de 55° C por 72 horas. Para a incubação no rúmen, esses saquinhos foram colocados em um saco maior de nylon, com dimensões de 30 x 35 cm, contendo peso de 500 g, o que o manteve abaixo do *mat* ruminal. Os saquinhos foram retirados do rúmen em cada horário e congelados, para posterior lavagem juntamente aos demais do mesmo período. Depois de lavados em água corrente, foram colocados em estufa ventilada por 72 horas, a 55° C, e pesados para determinar a degradação ao longo do tempo do material incubado. A composição da forragem incubada pode ser vista na Tabela 1.

Tabela 1 Composição química das forragens que foram incubadas no rúmen, em % da matéria seca.

Forragem	PB	EE	MM	FDN	CNF¹
Alfafa	17,9	1,6	7,5	51,4	21,6
Silagem de Milho	6,5	2,0	4,2	66,4	20,9
Silagem de Cana	3,0	1,0	3,3	68,1	24,6
Tifton	11,4	1,0	5,9	72,7	9,0

¹CNF = 100 – (PB + EE + MM + FDN)

2.1 Análises estatísticas

As variáveis mensuradas ao longo do tempo foram analisadas pelo procedimento MIXED do SAS (LITTELL; MILLKEN; STROUP, 1996). O modelo estatístico abordou efeito fixo de período, tratamento, tempo, interação de tempo mais tratamento e efeito de erro. Animal e interação de animal, período e tratamento foi considerado com efeito aleatório. As estruturas de covariância utilizadas foram definidas pelo critério de Akaike dentre autorregressiva de ordem 1, simetria composta e não estruturada. As variáveis mensuradas uma vez durante o período experimental, o modelo estatístico continha efeito fixo de período e tratamento, sendo o animal considerado como efeito aleatório. Três contrastes pré-planejados foram testados: 1) adição de glicerina pura e glicerina acrescida de 7,2% de metanol *versus* adição de milho grão moído fino e milho grão reidratado e ensilado (C1=M+MR vs. G+GM); 2) adição de glicerina pura *versus* glicerina acrescida de 7,2% de metanol (C2=G vs. GM); 3) adição de milho grão moído fino *versus* milho grão reidratado e ensilado (C3=M vs. MR).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O consumo de matéria seca (CMS), mensurado no dia da infusão ruminal dos tratamentos, não diferiu quando o metanol foi acrescido em 7,2% da MS ou não no rúmen das vacas (TABELA 2). No entanto, as vacas que receberam G ou GM apresentaram redução de 12,1% de consumo de MS no dia da infusão comparado com as vacas que receberam M ou MR ($P=0,03$). Esse menor consumo foi acompanhado de redução de 13,8% na degradabilidade da MS de forragens infundidas no rúmen por 24 horas ($P=0,03$). A menor degradabilidade das forragens, observada desde as primeiras 6 horas de incubação ($P=0,01$), pode explicar o menor CMS quando G ou GM foi infundido no rúmen ao invés de M ou MR. O comportamento da degradabilidade da forragem da dieta à base de silagem de milho pode ter sido semelhante ao da silagem de milho incubada, proporcionando uma menor ingestão por limitação física de consumo (ALLEN; BRADFORD; OBA, 2009). Van Cleef et al. (2014) observou uma tendência de redução no CMS de bovinos da raça Nelore quando foram alimentados com mais de 7,5% de glicerina (base na MS), o que está em consonância com este experimento que correspondeu a mais de 18% de glicerina, se for considerado que a infusão média dos tratamentos foi de 2,68 kg e que os animais consumiram 15,2 kg de MS médio nos tratamentos com glicerina no dia da infusão. Apesar de alguns autores terem observado redução apenas na digestibilidade da MS e MO, a maioria dos trabalhos tem mostrado redução na digestibilidade do FDN. Parsons e Drouillard (2010) observaram redução de 20% de digestibilidade aparente no trato digestivo total do FDN da dieta, quando glicerina foi incluída em 4% na MS da dieta total de bovinos em confinamento. Schneider (2010), ao comparar dietas de novilhas mestiças, alimentandas com 0, 4 ou 8% de glicerina bruta em substituição ao milho, observou diminuição linear na digestibilidade da MS, MO

e FDN e Lage et al. (2010) observaram efeito quadrático sobre a digestibilidade do FDN, obtendo melhor digestibilidade, quando 7,3% de glicerina foi incluído na dieta de ovinos. Apesar de não ter sido analisada a degradabilidade do FDN das forragens neste experimento, parece plausível explicar a menor degradabilidade da MS das forragens pela menor degradabilidade do FDN.

Tabela 2 Consumo de matéria seca e degradabilidade ruminal de tifton, silagem de cana, silagem de milho e alfafa incubados nos tempos 6 (DEG 6), 12 (DEG 12) e 24 (DEG 24) horas em vacas submetidas aos tratamentos milho seco moído (M), milho reidratado (MR), glicerina purificada mais glúten de milho (G), glicerina purificada mais glúten de milho contaminada com 7,2% de metanol (GM)

	M	MR	G	GM	EPM	Trat	For	Int	C1	C2	C3
CMS, kg/d	17,6	17,0	15,2	15,2	1,04	0,11			0,03	0,95	0,60
DEG6, %	25,1	23,8	20,9	21,9	0,91	0,05	<0,01	0,51	0,01	0,44	0,32
DEG12, %	29,8	29,3	25,5	25,2	0,93	<0,01	<0,01	0,59	<0,01	0,78	0,65
DEG24, %	41,1	38,3	33,9	34,5	1,70	0,03	<0,01	0,11	<0,01	0,77	0,24

EPM = Erro padrão das médias. Trat = Probabilidade para o efeito de tratamento. For = Probabilidade para o efeito de forragem. Int = Probabilidade para a interação entre tratamento e forragem. CMS= Consumo de matéria seca no dia da infusão dos tratamentos. Contrastes: C1=M+MR vs. G + GM. C2=G vs. GM. C3=M vs. MR.

A infusão ruminal de G ou GM em comparação ao M e MR reduziu a degradabilidade da matéria seca de amostras de alfafa com 6 e 12 horas de incubação, da silagem de cana com 12 e 24 h de incubação, do tifton com 6, 12 e 24 horas de incubação e da silagem de milho com 24 horas de incubação ruminal ($P<0,05$, Figura 1). Quando MR foi infundido no rúmen houve uma diminuição na degradabilidade do tifton em 24 horas de incubação (Figura 1). A digestibilidade ruminal do amido poderia ter reduzido a digestão da forragem em consequência da menor digestibilidade da fibra (THEURER et al., 1999) em função do menor pH (DILorenzo et al., 2011), sabidamente depressor da atividade fibrolítica (STROBEL; RUSSELL, 1986). Entretanto, não houve diferença do pH ruminal das vacas que receberam infusão ruminal de milho ou glicerina (Tabela 3).

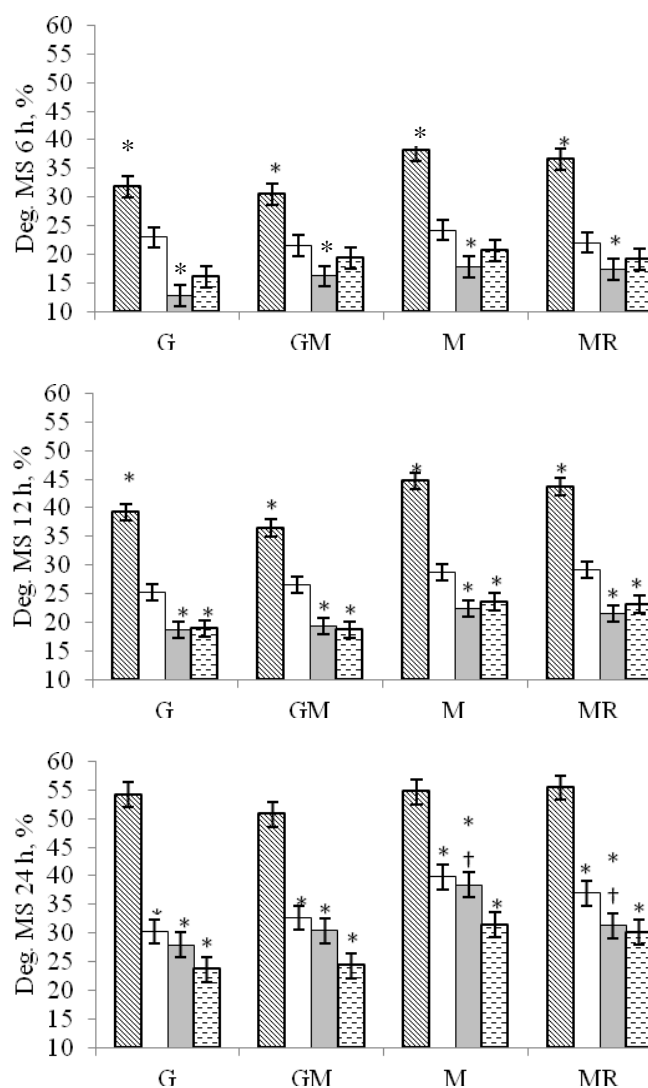


Figura 1 Degradabilidade ruminal da matéria seca (Deg. MS) da alfafa (▨), silagem de milho (□), tifton (■) e silagem de cana (▩) incubados por seis, 12 ou 24 horas após a infusão ruminal de milho grão moído fino (M), milho grão reidratado e ensilado (MR), glicerina pura (G), glicerina acrescida de 7,2% de metanol (GM) ($P < 0,05$ para efeito de tratamento e forragem), * ($P < 0,05$ para efeito de contraste) (G+GM vs M+MR) e † (M vs MR para cada forragem).

Apesar de não ocorrer interação entre forragem e tratamento houve diferença ($P < 0,01$) na degradabilidade nos tempos 6, 12 e 24 horas de incubação entre as forragens (TABELA 2). A degradação ruminal da matéria seca, como porcentagem do incubado nos tempos 6 e 12, foram maior para alfafa seguido da silagem de milho, silagem de cana e tifton (FIGURA 2). Já no tempo 24 a degradabilidade ruminal do tifton foi maior que a silagem de cana. A alfafa apresenta baixa digestibilidade de fibra (CABRAL et al. 2000), no entanto apresenta baixo teor de FDN (TABELA 1). Esse menor teor de FDN permite classificar a alfafa como alimento de alta qualidade. A fibra da alfafa tem maior habilidade que feno de gramíneas e silagem de milho em ligar a cátions, trocando K^+ , Ca^+ e Mg^+ por H^+ quando o pH diminui (MCBURNEY; VAN SOEST; CHASE, 1983). A inibição da degradabilidade com adição de G e GM ocorreu apenas nas primeiras horas, no entanto, o mecanismo que explica isso não é claro. A MS da silagem de cana foi mais degradável no rúmen nas primeiras 6 horas, mas 12 horas não diferiu do tifton, menor que o tifton em 24 horas de incubação (Figura 2). Isso pode ser explicado pela maior quantidade de açúcar da cana, sendo mais rapidamente fermentável e a baixa qualidade da fibra da cana (CORREA et al. 2003) apresentando menor degradabilidade com 24 horas de incubação

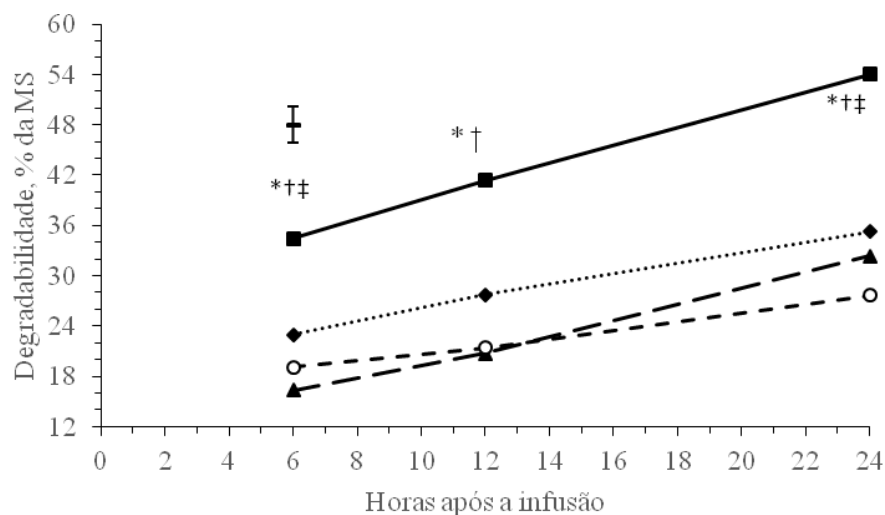


Figura 2 Degradabilidade da matéria seca (MS) de alfafa (—■—), silagem de milho (••◆•••), silagem de cana (- -○- -) e tifton (- -▲- -) após indução de acidose ruminal por glicerol e milho ($P < 0,01$ para efeito de forragem, tempo e interação, tempo forragem), ($P < 0,05$ *para efeito de contraste entre alfafa e silagem de milho), (†para efeito de contraste entre silagem de milho e tifton) e (‡para efeito de contraste entre tifton e silagem de cana em cada tempo).

A glicerina quando infundida no rúmen parece apresentar uma taxa de desaparecimento maior que o amido. Toda glicerina desapareceu do rúmen após 4 horas de dosagem em vacas recebendo 240g (RÉMOND; SOUDAY; JOUANY, 1993) ou bois recebendo 200g (KIJORA et al., 1998) de glicerina em *pulse dose*, por meio de fermentação e absorção no rúmen. A taxa de digestão ruminal do amido de milho varia de acordo com a vitreosidade do milho (CORREA et al., 2003) e método de processamento (BITENCOURT, 2012). A taxa de absorção de glicerina responde de forma linear à sua concentração no rúmen (OMAZIC, 2013). Assim, quando ocorre administração em *pulse dose* de grandes quantidades de glicerina, como ocorreu neste experimento, ela terá uma maior absorção que fornecida na forma de TMR ao longo do dia e, conseqüentemente,

maior disponibilidade para a gliconeogênese (GOFF; HORST, 2001; LINKE et al., 2004). Isso pode ser explicado pelo maior teor de glicose sanguíneo em animais que receberam infusão de G ou GM, comparados aos animais que receberam M ou MR evidenciado nas 6 primeiras horas ($P < 0,05$) e sem efeito nas horas seguintes. (Tabela 3 e Figura 5).

Tabela 3 Avaliação do pH ruminal médio, mínimo, momento que ocorreu o mínimo após alimentação, máximo, tempo de pH<5,8 e tempo de pH<5,5, concentração de NH₃ do rúmen, nitrogênio uréico no plasma (NUP) e glicose no plasma de vacas submetidas aos tratamentos de milho seco moído (M), milho grão reidratado e ensilado (MR), glicerina pura (G) e glicerina acrescida de 7,2% de metanol (GM).

	M	MR	G	GM	EPM ¹	T ²	H	T*H	C1	C2	C3
pH médio	5,58	5,53	5,59	5,68	0,404	0,29	<0,01	0,64	0,12	0,30	0,57
pH mínimo	5,06	5,05	4,86	5,14	0,173	0,67			0,73	0,27	0,95
pH mínimo, hora após alimentação	13,5	15,5	13,5	16,0	2,102	0,72			0,82	0,43	0,63
pH máximo	6,40	6,39	6,61	6,79	0,145	0,15			0,04	0,35	0,94
Tempo pH<5,8, minutos	1045	1017	1150	924	111,8	0,09			0,91	0,02	0,71
Tempo pH<5,5, minutos	721	697	666	619	156,9	0,84			0,46	0,71	0,85
NH ₃ , mg/dL	5,68	5,57	6,00	6,10	0,380	0,78	<0,01	0,01	0,38	0,85	0,83
NUP, mg/dL	9,45	9,34	10,59	10,05	0,440	0,22	<0,01	0,02	0,24	0,24	0,81
Glicose, mg/dL	69,32	70,18	75,31	75,30	4,138	0,02	<0,01	0,14	<0,01	0,99	0,66

¹Erro padrão das médias, ²Valor de probabilidade para efeitos de tratamento (T), horas após a infusão dos tratamentos (H = 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22), interações T e H, contrastes C1=M+MR vs G+GM, C2=M vs GM, C3=M vs MR.

Tabela 4 pH ruminal e sanguíneo, gasometria do sangue jugular, nitrogênio uréico (NUP) e glicose no plasma e N-amoniaco no rúmen de vacas submetidas aos tratamentos de milho seco moído (M), milho reidratado (MR), glicerina purificada mais glúten de milho (G), glicerina purificada mais glúten de milho contaminada com 7,2% de metanol (GM).

	M	MR	G	GM	EPM¹	T²	H	T*H	C1	C2	C3
pH sangue	7,37	7,38	7,37	7,37	0,010	0,88	0,02	1,00	0,66	0,56	0,85
PCO₂, mmHg	29,80	29,88	31,88	31,20	1,325	0,65	0,03	1,00	0,25	0,73	0,97
PO₂, mmHg	34,91	34,74	36,38	36,13	2,22	0,86	0,02	0,85	0,42	0,92	0,94
HCO₃⁻, mEq/L	17,50	17,54	18,69	17,92	0,842	0,78	0,14	1,00	0,45	0,54	0,85
TCO₂, mmHg	18,42	18,66	19,67	18,88	0,880	0,77	0,12	1,00	0,44	0,55	0,86
Excesso de bases	-5,76	-5,51	-4,98	-5,73	0,813	0,90	0,24	1,00	0,74	0,54	0,83
SatO₂, %³	63,81	65,50	66,26	67,08	1,463	0,58	0,04	1,00	0,27	0,78	0,57
O₂ct, vol. %³	14,43	14,56	14,95	15,19	7,82	0,53	0,11	0,99	0,19	0,73	0,86

¹Erro padrão das médias, ²Valor de probabilidade para os efeitos de tratamento (T), horas após a infusão dos tratamentos(H), interações T e H, contrastes C1=M+MR vs. G + GM, C2=G vs. GM, C3=M vs. MR. ³SatO₂= % de hemácias saturadas, O₂ct = % de oxigênio no volume total.

Os dados de pH ruminal estão apresentados na Tabela 4. Houve uma tendência de maior pH ruminal para as vacas que receberam infusão ruminal de G e GM comparada com as vacas que receberam M e MR ($P=0,12$), reforçando a hipótese que a parte da glicerina foi absorvida sem ser metabolizada (LINKE et al., 2004). Essa tendência é acompanhada com o maior pH máximo para as vacas que receberam G e GM ($P=0,04$). O pH ruminal mínimo, tempo de $\text{pH}<5,5$ não foram afetados com a infusão dos tratamentos. No entanto, o tempo de pH ruminal abaixo de 5,8 foi menor quando a glicerina foi acrescida a 7,2 na glicerina pura.

Os animais, independente do tratamento, apresentaram acidose ruminal subaguda (ARSA) (Tabela 3 e Figura 4), definida como pH ruminal abaixo de 5,8 por mais de três horas por dia (PLAIZER et al., 2009). Essa acidose ocorre devido à taxa de produção de ácidos graxos voláteis no rúmen excederem a taxa de remoção através de absorção ou passagem (OWENS et al., 1998), acumulando-se no rúmen. Os animais tiveram pH ruminal abaixo de 5,8 por 15 a 19 horas e abaixo de 5,5 aproximadamente 12 horas, evidenciando a gravidade da ARSA. A quantidade de substrato altamente fermentável no rúmen foi capaz de causar acidose ruminal severa com pH mínimo em torno de 5,03. Os ácidos produzidos no rúmen são absorvidos pela sua mucosa podendo ocorrer acidose metabólica, dependendo do grau de compensação do tampão bicarbonato (OWENS et al., 1998). No entanto, apesar de ter ocorrido ARSA severa, sempre que havia alteração no pH sanguíneo era acompanhado por alteração oposta na PCO_2 , como forma de compensar e não ter grandes alterações no pH (Figura 4) (DAVEMPORT, 1974).

Os dados de pH sanguíneo e equilíbrio acidobásico venoso podem ser vistos na Tabela 4. Não houve diferença entre tratamentos para as variáveis analisadas. Apesar de o pH sanguíneo apresentar, dentro dos padrões considerados normais para acidose ou alcalose metabólica (pH entre 7,35 e 7,45,

JONES, 2010), o baixo valor de PCO_2 (menor que 40 mmHg), bicarbonato (menor que 24 mEq/L de sangue) e o déficit primário de bases (representado pelo excesso de base em média -5,55 mEq/L de sangue) indica que houve acidose metabólica com compensação respiratória nos animais quando submetidos à acidose ruminal, após a infusão dos tratamentos. Goad, Goad e Nagaraja (1998) e Brown et al. (2000) observaram uma diminuição do pH sanguíneo, concentração de HCO_3^- e excesso de base em novilhos com desafio de grãos, mostrando que a carga de ácido no rúmen pode diminuir o HCO_3^- no sangue. Faverdin, Bareille e Vérité (1999) encontraram correlação negativa entre HCO_3^- do sangue e ácidos graxos voláteis no rúmen de vacas. No entanto, Apper-Bossard et al. (2010) não encontraram correlação entre pH sanguíneo e ruminal, quando vacas em lactação receberam dietas com níveis de concentrado diferentes. Isso pode ser explicado por respostas compensatórias no animal com o intuito de evitar a variação pH sanguíneo. Esses mesmos autores observaram uma tendência de redução na PCO_2 quando as vacas foram submetidas à acidose ruminal.

O pH máximo e mínimo do rúmen foi correlacionado através de uma correlação de Pearson, utilizando o PROC CORR do SAS com as variáveis de mesmo tempo mensuradas no sangue, no dia da infusão dos tratamentos (Tabela 5). O pH sanguíneo não teve correlação com o pH ruminal, evidenciando efeito compensatório na tentativa de manter o pH sanguíneo nos níveis fisiológicos (JONES, 2010). Essa compensação é evidenciada com a correlação positiva ($P < 0,01$) entre pH ruminal e PCO_2 , CO_2 total, HCO_3^- e excesso de base. Quando o pH sanguíneo tende a aumentar há uma compensação, os H^+ livres na corrente sanguínea combinam-se com o bicarbonato, formando ácido carbônico que é rapidamente convertido em CO_2 e água através da anidrase carbônica ($H_2O + CO_2 \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow H^+ + HCO_3^-$, DAVENPORT, 1974). Receptores químicos detectam o aumento no CO_2 e conseqüentemente aumentam a frequência

respiratória para eliminar o CO₂ produzido (DAVENPORT, 1974), diminuindo a PCO₂ sanguínea em caso de acidose metabólica com compensação respiratória.

Tabela 5 Correlação de Pearson do pH ruminal e status acidobásico do sangue venoso no tempo zero relativo à indução de acidose e no tempo de pH ruminal mínimo após administração dos tratamentos milho moído fino, milho grão reidratado e ensilado, glicerina pura e glicerina pura acrescida de 7,2% de metanol.

Sangue venoso	Correlação (%)	P
pH	-14,2	0,45
PCO ₂	57,0	<0,01
PO ₂	-7,2	0,70
HCO ₃ ⁻	52,4	<0,01
CO ₂ total	53,0	<0,01
Excesso de Base	42,8	0,02
SatO ₂	-7,6	0,69
O ₂ ct	-7,7	0,69

Tempo médio de pH ruminal mínimo=14h30min ± 3h27min após a infusão dos tratamentos, SatO₂= % de hemácias saturadas, O₂ct = % de oxigênio no volume de sangue total.

Apesar da diferença numérica na concentração de NUP e amônia no rúmen (Tabela 5), o número de unidades experimentais não foi suficiente para provar uma diferença estatística entre tratamentos ($P>0,22$). Entretanto, houve uma interação de tempo e tratamento para concentração de NUP e amônia no rúmen ($P<0,02$). A concentração de amônia no rúmen das vacas que receberam G ou GM foi menor que 2 horas após a infusão dos tratamentos, comparados ao M e MR, no entanto, foi maior, com 6 e 8 horas e não diferiram após 10 horas de infusão dos tratamentos. Já o NUP foi maior no tempo 8 horas e após 12 horas de infusão dos tratamentos. A menor concentração de amônia no rúmen nas primeiras horas e a maior concentração de NUP após 8 horas de infusão dos tratamentos demonstra que a glicerina pode manipular o ambiente ruminal, através da eficiência de utilização do N por microrganismos no rúmen. Hales et

al. (2013) observaram menor concentração de amônia ruminal após 3 horas de suplementação de 5 ou 10%, em comparação com 0 ou 2,5% de glicerina com base na matéria seca em substituição ao milho, na dieta de novilhos em crescimento.

A concentração de amônia no rúmen apresentou picos com duas horas após a infusão dos tratamentos com a primeira alimentação das vacas e duas horas após a segunda alimentação (Figura 3). O primeiro pico de amônia no rúmen foi acompanhado com pico de NUP quatro horas após a infusão dos tratamentos e primeira alimentação dos animais, porém, sem apresentar alguma alteração sanguínea após a segunda alimentação. Esse dado foi semelhante ao de Gomide (2012) quando mediu NUP e amônia ruminal nos mesmos tempos ao longo do dia. Isso pode ser explicado pelo segundo pico ruminal de amônia ser no momento de menor pH ruminal. A forma de absorção no epitélio ruminal é na forma passiva, no entanto ela tem que estar na forma não ionizada (SMITH, 1975). O pH ruminal parece ser o fator mais importante na determinação da absorção da amônia, pois quando abaixa o pH ruminal a amônia fica ionizada, prevalecendo a forma NH_4^+ e diminuindo a absorção que é principalmente na forma de NH_3 (VISEK, 1984). O tratamento com milho reidratado apresentou maior pico de NUP que os demais, 4 horas após a infusão ruminal. (FIGURA 3). Entretanto, esse tratamento teve menor NUP após 8 horas, permanecendo até às 22 horas da infusão ruminal. Esse aumento do NUP nas vacas que receberam MR, nas primeiras horas após a infusão, pode ser explicado pela maior concentração de amônia quando o milho é reidratado e ensilado em consequência da hidrólise das prolaminas do milho (FERRARETO et al., 2014). O aumento do NUP nos tratamentos com glicerina, após seis horas da infusão dos tratamentos, pode ser explicado pela alta taxa de desaparecimento da glicerina nas primeiras horas, explicado por (RÉMOND; SOUDAY E JOUANY, 1993). Apesar de não ter efeito de tratamento ($P=0,80$) (TABELA

12), amônia ruminal apresentou uma interação entre tempo e tratamento ($P<0,05$) com comportamento semelhante ao N do sangue (FIGURA 3). A maioria dos trabalhos que avaliaram a inclusão de glicerina na dieta observou redução de NUP, N-amoniacal no rúmen (SHIN; WANG; KIM, 2012; DEFRAIN et al., 2004) ou N-uréico no leite (DONKIN et al., 2009). Há indícios que o glicerol, combinado com o amido, pode proporcionar sincronismo dos microrganismos ruminais em utilizar N (HALLES et al., 2013).

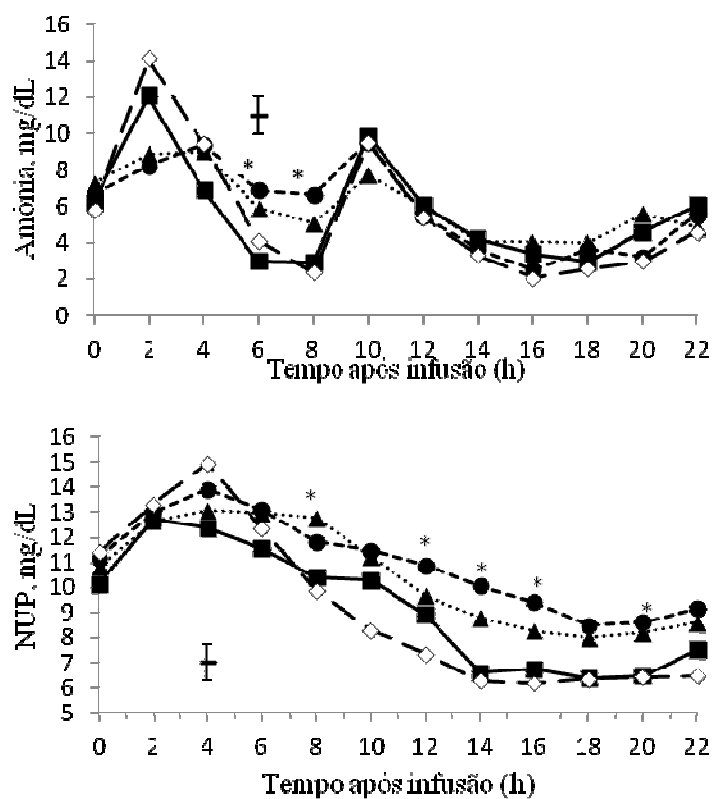


Figura 3 Concentração de amônia no rúmen e nitrogênio uréico no plasma (NUP) e no nitrogênio de vacas ao longo do dia após a administração dos tratamentos milho grão moído fino (M) (—■—), milho grão reidratado e ensilado (MR) (- -◇- -), glicerina pura (G) (- -●- -), glicerina acrescida de 7,2% de metanol (GM) (••▲••) ($P>0,22$ para efeito de tratamento, $P<0,02$ para efeito de tempo e interação

tratamento e tempo. * $P < 0,01$ efeito de contraste entre G+GM vs M+MR).

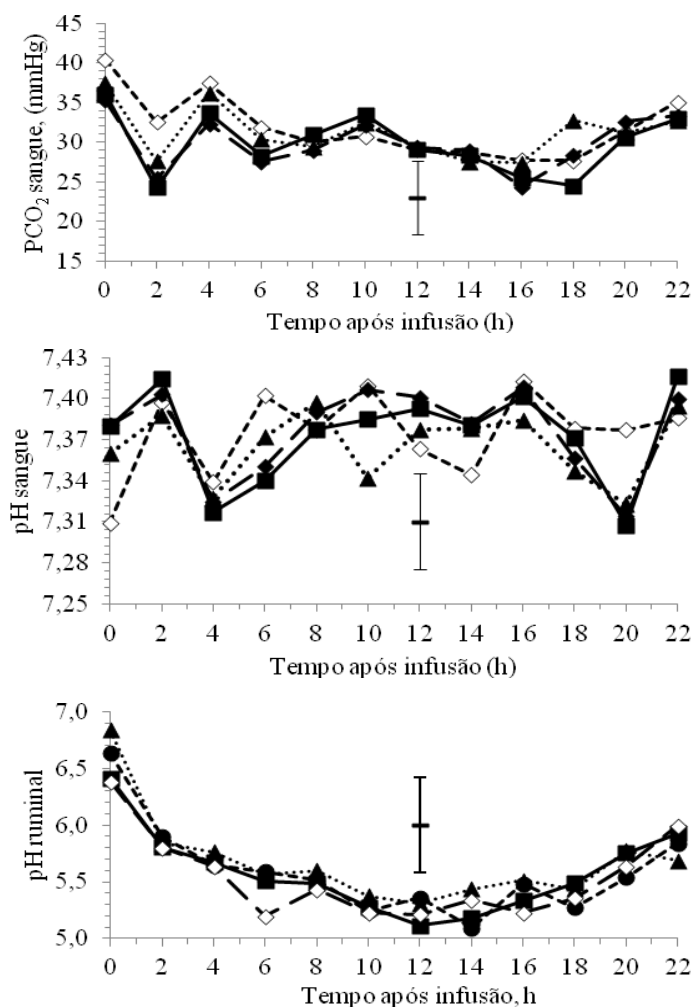


Figura 4 Pressão de CO₂ sanguíneo, pH sanguíneo e pH ruminal de vacas ao longo do dia após a administração do milho grão moído fino (M) (—■—), milho grão reidratado e ensilado (MR) (- -◇- -), glicerina pura (G) (- -●- -), glicerina acrescida de 7,2% de metanol (GM) (••▲••) ($P > 0,29$ para efeito de tratamento, $P < 0,02$ para efeito de tempo, $P > 0,64$ para efeito de interação tratamento e tempo).

A infusão ruminal de G ou GM em vacas aumentou os níveis de glicose plasmática em comparação a vacas que receberam infusão de M ou MR ($P < 0,01$, TABELA 5). Esse aumento ocorreu devido a maior concentração de glicose nas seis primeiras horas após infusão (FIGURA 5). O aumento de glicose plasmática nas vacas tratadas com glicerina, nas primeiras horas após a infusão no rúmen, pode ser explicado pela alta velocidade de absorção quando adicionada em *pulse dose* no rúmen (REMOND; SOUDAY; JOUANY, 1993; KIJORA et al., 1998; OMAZIC, 2013). Esses dados estão de acordo com os observados por Goff e Horst (2001) que adicionaram 1, 2 ou 3 litros de glicerina via sonda esofágica em vacas e observaram aumento de 16, 20 e 25% de glicose, respectivamente, 30 minutos após a infusão, permanecendo mais alto que o controle por 8 horas e voltando a níveis basais em 24 horas. Os dados da literatura sugerem que a forma como a glicerina é fornecida ao animal influenciará no teor de glicose sanguínea. Linke et al. (2004), ao comparar a forma de fornecimento de glicerina observaram que vacas em lactação, recebendo 800 g de glicerol em *pulse dose*, apresentaram maior concentração de glicose plasmática que vacas recebendo glicerina misturada na dieta total. No entanto, os dados na literatura ainda são inconsistentes, pois alguns autores têm observado redução no teor de glicose com a inclusão de glicerina bruta na dieta (DEFRAIN et al., 2004, ZACARONI, 2010) e pura (CARVALHO et al., 2012). Shin, Wang e Kim (2012) não observaram efeito no teor de glicose plasmática quando vacas receberam glicerina bruta em substituição a ingredientes energéticos da dieta.

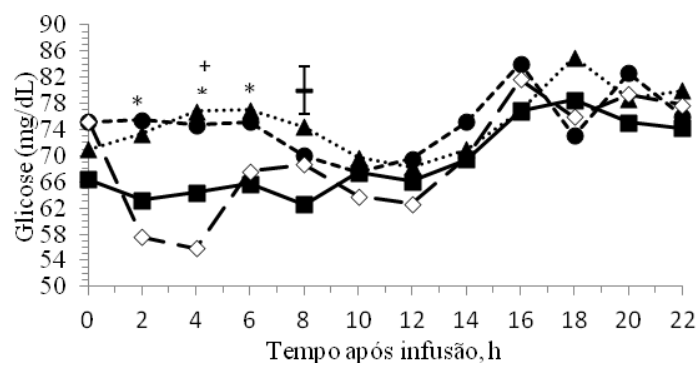


Figura 5 Concentração de glicose no plasma de vacas ao longo do dia após a administração dos tratamentos milho grão moído fino (M) (—■—), milho grão reidratado e ensilado (MR) (—◇—), glicerina pura (G) (-●-), glicerina acrescida de 7,2% de metanol (GM) (●▲●) ($P=0,02$ para efeito de tratamento, $P<0,01$ para efeito de tempo, $P=0,14$ para efeito de interação tratamento e tempo, $*P<0,01$ para efeito de contraste G+GM vs M+MR e $‡P=0,05$ para efeito de contraste M vs MR).

4 CONCLUSÕES

O metanol não alterou os parâmetros ruminais e sanguíneos em vacas que receberam pulse dose de glicerina ou glicerina acrescida com 7,2 de metanol, milho grão moído ou milho grão reidratado e ensilado. Porém, a infusão ruminal de glicerina reduziu a degradabilidade da MS de alfafa, silagem de milho, silagem de cana e tifton em comparação à infusão de milho moído fino ou milho reidratado e ensilado.

A glicerina, em grandes dosagens ruminais, foi tão eficiente quanto o milho em induzir acidose ruminal, no entanto, parece se degradar mais rapidamente, pois foi mais eficiente em curto prazo em reter nitrogênio no rúmen. O teor de glicose sanguíneo foi maior em curto prazo, evidenciando absorção de glicerol e consequente metabolização à glicose.

O pH sanguíneo não altera muito ao longo do dia e não foi correlacionado com o pH sanguíneo, mas a PCO_2 no sangue venoso mostrou ser um bom indicador de acidose ruminal.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, M. S.; BRADFORD, B. J.; OBA, M. Board-invited review: The hepatic oxidation theory of the control of feed intake and its application to ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 3317-3334, 2009.
- ANDRADE, M. A. F. **Desempenho de novilhas Holandesas alimentadas com cana-de-açúcar como forrageira única**. 1999. 56 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**, Washington, D.C., 12^a ed. v. 1, 1094 p. 1975.
- APPER-BOSSARD, E.; FAVERDIN, P.; MESCHY, F.; PEYRAUD, J. L. Effects dietary cation-anion difference on ruminal metabolism and blood acid-base regulation in dairy cows receiving 2 contrasting levels of concentrate in diets. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 4196-4210, 2010.
- BERGNER, U.; KIJORA, C.; CERESNAKOVA, Z.; SKAKACS, J. In vitro studies on glycerol transformation by rumen microorganisms. **Archiv für Tierernahrung**, Berlin, v. 48, n. 3, p. 245-256, 1995.
- BITENCOURT, L. L. **Resposta de vacas leiteiras à substituição de milho moído por milho hidratado e ensilado ou melaço de soja**. 2012. 127 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- BROWN, M. S.; KREHBIEL, C. R.; GALYEAN, M. L.; REMMENGA, M. D.; PETERS, J. P.; HIBBARD, B.; ROBINSON, J.; MOSELY, W. M. Evaluation of models of acute and subacute acidosis on dry matter intake, ruminal fermentation, blood chemistry, and endocrine profiles of beef steers. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 3155–3168, 2000.
- CABRAL, L. S.; VALADARES FILHO, S. C.; MALAFAIA, P. A. M.; LANA, R. P.; SILVA, J. F. C.; VIEIRA, R. A. M.; PEREIRA, E. S. Frações de carboidratos de alimentos volumosos e suas taxas de degradação estimadas pela técnica de produção de gases. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p. 2087-2098, 2000.
- CARVALHO, E. R.; SCHMELZ-ROBERTS, N. S.; WHITE, H. M.; DOANE, P. H.; DONKIN, S. S. Replacing corn with glycerol in diets for transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 908-916, 2011.

CARVALHO, B. F.; ÁVILA, C. L. S.; PINTO, J. C.; PEREIRA, J. C.; SCHWAN, R. F. Effects of propionic acid and *Lactobacillus buchneri* (UFLA SIL 72) addition on fermentative and microbiological characteristics of sugar cane silage treated with and without calcium oxide. **Grass and Forage Science**, v. 67, p. 1-10, 2012.

CORREA, C. E. S.; PEREIRA, M. N.; OLIVEIRA, S. G.; RAMOS, M. H. Performance of holstein cows fed sugarcane or corn silage of different grain textures. **Scientia Agricola**, v. 60, p. 621-629, 2003.

DAVENPORT, H.W: **The ABC of Acid-Base Chemistry**, 6 ed. Chicago: University of Chicago Press, 1974.

DEFRAIN, J. M.; HIPPEN, A. R.; KALSCHEURK. F.; JARDON, P. W. Feeding glycerol to transition dairy cows: effects on blood metabolites and lactation performance. **Journal of Dairy Science**, v. 51, 721 p. 2004.

DILORENZO, N.; SMITH, D. R.; QUINN, M. J.; MAY, M. L.; PONCE, C. H.; STEINBERG, W.; ENGSTROM, M. A.; GALYEAN, M. L. Effects of grain processing and supplementation with exogenous amylase on nutrient digestibility in fedlot diets. **Livestock Science**, v. 137, p. 178-1884, 2011.

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**, Champaing, v. 92, n. 10, p. 5111-5119, 2009.

FAVERDIN, P.; BAREILLE, N.; VÉRITÉ, R. Effects of rumen energy supply timing on feed intake control in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2443–2454, 1999.

FERRARO, S. M.; MENDOZA, G. D.; MIRANDA, L. A.; GUTIÉRREZ, C. G. In vitro gas production and ruminal fermentation of glycerol, propylene glycol and molasses. **Animal Feed Science and Technology**, v. 154, p. 112–118, 2009.

FERRARETO L. F.; TAYSOM, K.; TAYSOM, D. M.; SHAVER, R. D.; HOFFMAN, P. C. Relationships between dry matter content, ensiling, ammonia-nitrogen, and ruminal in vitro starch digestibility in high-moisture corn samples. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 3221–3227, 2014.

GOAD, D. W.; GOAD, C. L.; NAGARAJA, T. G. Ruminant microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 234–241, 1998.

GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. **Forage Fiber Analysis: Apparatus, Reagents, Procedures and Some Applications**. Agriculture Handbook No. 379. ARS- USDA, Washington, DC, 1970.

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

GOMIDE, D. R. Resposta digestiva de bovinos a doses de levedura autolizada. 2012, 58 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, 2012.

HALES, K. E.; KRAICH, K. J.; BONDURANT, R. G.; MEYER, B. E.; LUEBBE, M. K.; BROWN, M. S.; COLE, N. A.; MACDONALD, J. C. Effects of glycerin on receiving performance and health status of beef steers and nutrient digestibility and rumen fermentation characteristics of growing steers. **Journal of Animal Science**, v. 91, p. 4277-4289, 2013.

JONES, M. B. Basic interpretation of metabolic acidosis. **Critical Care Nurse**, v. 30, p. 63-69, 2010.

KIJORA, C.; BERGNER, H.; KUPSCH, R. D.; HAGEMANN, L. Glycerol as feed component in diets of fattening pigs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 47, p. 345-360, 1998.

LAGE, J. F.; PAULINO, P. V. R.; PEREIRA, L. G. R.; VALADARES FILHO, S. C.; OLIVEIRA, A. S.; DETMANN, E.; SOUZA, N. K. P.; LIMA, J. C. M. Glicerina bruta na dieta de cordeiros terminados em confinamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, p. 1012-1020, 2010.

LEE, S. Y.; LEE, A. M.; CHO, Y. B.; KAM, D. K.; LEE, S. C.; KIM, C. H.; SEO, S. Glycerol as a feed supplement for ruminants: In vitro fermentation characteristics and methane production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 166-167, p. 269– 274, 2011.

LENG, R. A. Glucose synthesis in ruminants. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, v. 14, p. 209–260, 1970.

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

LINKE, P. L.; DEFRAIN, J. M.; HIPPEN, A. R.; JARDON, P. W. Ruminant and plasma responses in dairy cows to drenching or feeding glycerol. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 343-343, 2004.

LITTELL, R. C.; MILLKEN, G. A.; STROUP, W. W. **SAS[®] system for mixed models**. SAS Institute Inc, Cary, NC, 1996. 633 p.

MARTIN-AMAT, G.; TEPHLY, T. R.; MACMARTIN, K. E.; MAKAR, A. B.; HAYREH, M. S.; HAYREH, S. S.; BAUMBACH, G.; CANCELLA, P. Methanol poisoning: II Development of model for ocular toxicity in methanol poisoning using the rhesus monkey. **Archives of ophthalmology**, v. 95, p. 1847-1850, 1977.

MCBURNEY, M. I.; VAN SOEST, P. J.; CHASE, L. E. Cation exchange capacity and buffering capacity of neutral-detergent fibres. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 34, p. 910-916, 1983.

NICHOLLS, P. Formate as an inhibitor of cytochrome c oxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 67, p. 610-616, 1975.

OMAZIC, A. W. **Glycerol supplementation in dairy cows and calves**. 2013. 61 p. Doctoral Thesis - Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2013.

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 of periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 698-707, 2009.

OVERTON, T. R. Use of glycerol in dairy rations. CORNELL NUTR. CONF. FEED MANUF. Syracuse, NY. **Proceedings...** p. 73-79, 2007.

OWENS, F. N.; SECRIST, D. S.; HILL, W. J.; GILL, D. R. Acidosis in cattle: a review. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 275-286, 1998.

PARSONS, G. L.; DROUILLARD, J. S. Effects of crude glycerin on ruminal metabolism and diet digestibility in flaked corn finishing diets. p.3 In: **Proceedings of the 43 rd Midwestern Meeting of American Dairy Science Association and American Society of Animal Science**. ASAS, Des Moines, 2010.

PLAIZIER, J. C.; KRAUSE, D. O.; GOZHO, G. N.; MCBRIDE, B. W. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences. **The Veterinary Journal**, v. 176, p. 21–31, 2009.

RÉMOND, B.; SOUDAY, E.; JOUANY, J. P. In vitro and in vivo fermentation of glycerol by rumen microbes. **Animal feed science Technology**, v. 41 p. 121-132, 1993.

ROGER, V.; FONTY, G.; ANDRE, C. Effects of glycerol on the growth, adhesion, and cellulolytic activity of rumen cellulolytic bacteria and anaerobic fungi. **Current Microbiology**, v. 25, p. 197–201, 1992.

SCHNEIDER, C. J. **Crude glycerin in feedlot cattle diets and as a solvent in maillard reaction processes intended for manufacturing value-added protein meals**. Thesis (M.Sc.). Kansas State University, Manhattan, 2010.

SEAL, C. J.; REYNOLDS, C. K. Nutritional implications of gastrointestinal and liver metabolism in ruminants. **Nutrition Research Reviews**, v. 6, p. 185-208, 1993.

SHIN, J. H.; WANG, D.; KIM, S. C. Effects of feeding crude glycerin on performance and ruminal kinetics of lactating Holstein cows fed silage or cottonseed hull-based, low-fiber diets. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 4006-4016, 2012.

SMITH, R. H. Nitrogen metabolism in the rumen and composition and nutritive value of nitrogen compounds entering the duodenum. In: McDONALD, I. W. E.; WARNER, A. C. I. (Ed.) **Digestion and metabolism in the ruminant**, University of New England, Australia, p. 399-415, 1975.

STROBEL, H. J.; RUSSELL, J. B. Effect of pH and energy spilling on bacterial protein synthesis by carbohydrate-limited cultures of mixed rumen bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 69, p. 2941-2947, 1986.

- SÜDEKUM, K. H. **Co-products from biodiesel production**. In: GARNSWORTHY, P. C.; WEISMAN, J. Recent Advances in Animal Nutrition - Nottingham, UK, Nottingham University Press, p. 201-219, 2008.
- THEURER, C. B.; HUBER, J. T.; DELGADO-ELORDUY, A.; WANDERLEY, R. Invited review: summary of steam-flaking corn or sorghum grain for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 1950-1959, 1999.
- VAN CLEEF, E. H. C. B.; EZEQUIEL, J. M. B.; D'AUREA, A. P.; FÁVARO, V. R.; SANCANARI, J. B. D. Crude glycerin in diets for feedlot Nellore cattle, **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 43, p. 86-91, 2014.
- VIEIRA, P. F. **Efeito do formaldeído na proteção de proteínas e lipídeos em rações para ruminantes**. 1980. 98 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1980.
- VISEK, W. J. Ammonia: its effects on biological systems metabolic hormones, and reproduction. **Journal of Dairy Science**, v. 67, p. 481-498, 1984.
- 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**, v. 151, p. 12-20, 2008.
- WANG, C.; LIU, Q.; HUO, W. J.; YANG, W. Z.; DONG, K. H.; HUANG, Y. X.; GUO, G. Effects of glycerol on rumen fermentation, urinary excretion of purine derivatives and feed digestibility in steers. **Livestock Science**, v. 121, p. 15-20, 2009.
- ZACARONI, O. F. **Resposta de vacas leiteiras à substituição de milho por glicerina bruta**. 2010. 43 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.