

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINÁRIA

Programa de Pós- Graduação

**GLICERINA EM SUBSTITUIÇÃO AO MILHO NO CONCENTRADO DE
VACAS HOLANDÊS X GIR EM LACTAÇÃO**

Anna Carolynne Alvim Duque

Belo Horizonte

UFMG – Escola de Veterinária

2012

Anna Carolynne Alvim Duque

**GLICERINA EM SUBSTITUIÇÃO AO MILHO NO CONCENTRADO DE
VACAS HOLANDÊS X GIR EM LACTAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Zootecnia.

Área de concentração: Nutrição Animal

Orientador: Prof. Fernando César Ferraz Lopes

Co-orientador: Profa. Ana Luiza da C. C. Borges

Belo Horizonte

UFMG – Escola de Veterinária

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Dissertação defendida e aprovada em 15 de fevereiro de 2012, pela Comissão Examinadora constituída por:

Prof. Fernando César Ferraz Lopes
(Orientador)
Embrapa Gado de Leite

Dr. Jackson Silva e Oliveira
Embrapa Gado de Leite

Prof. Ricardo Reis e Silva
Escola de Veterinária da UFMG

Dedicatória

A Deus, o todo-poderoso que fez e faz em mim maravilhas!
À Maria Rosália, Luiz Fernando e Mariana, meus amores, minha vida.
Aos avôs maternos Francisca e José dos Santos (*in memoriam*) e paternos Manoel
Augusto (*in memoriam*) e Célia, pelos ensinamentos.
A Franklin, meu sinônimo.

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida e por me conduzir sempre pelos caminhos a qual me proponho.

À Maria, minha rainha, mãe do céu, ao qual me inspiro noite e dia.

À minha mãe, meu pai e minha linda irmã, por sempre serem meus inspiradores, minha força e pelas incansáveis orações que me deram força para vencer os obstáculos.

Ao meu tio Mateus e família, pelo amor sem limite e incentivo.

À minha madrinha Marley, Carlos e Larissa, pelo apoio e carinho.

A todos familiares da família Alvim e Duque pelo carinho e compreensão pela minha ausência.

Ao Franklin, meu porto seguro, por abraçar os meus projetos do início ao fim e enfrentar a distância.

Ao Paulo, Laís Mary, Lucas, Fabrícia, Laís e Tia Odete, por toda atenção, ajuda e carinho em meus projetos. E a todos os familiares da família Lopardi e Franco, pelo carinho.

Ao meu orientador, professor Dr. Fernando César, que me segue ao longo de toda a minha vida acadêmica, e o qual sempre foi e será meu exemplo de profissional e de pessoa humana. Obrigada por acreditar em mim!

À minha co-orientadora, Professora Dra. Ana Luiza da Costa Cruz Borges, pelo apoio, incentivo, atenção, proteção e, principalmente, por me receber de coração aberto.

Ao Dr. Jackson Silva e Oliveira, pela confiança na condução do experimento e total atenção nas minhas dúvidas.

À minha segunda família, “Biogás”: Rosemeire (mãe), Marcial (Mengo) e Moreira, o meu muito obrigado por todo carinho, sorriso e apoio nessa minha caminhada, amo vocês demais.

Aos funcionários e estagiários do Laboratório de Análise de Alimentos e do Laboratório de Cromatografia da Embrapa Gado de Leite, nas pessoas de: Ernando, Hernani, Carol, Larissa, Ellen, Nilva, Luiz, Kleber e Mário, pela importante ajuda nas análises bromatológicas e químicas.

A todos os funcionários da Embrapa Gado de Leite, extensivo aos do Campo Experimental José Henrique Bruschi pelo carinho em todos esses anos de trabalho.

Aos estagiários Raul e Diego (RN), pela fundamental ajuda na condução do experimento; a Mário Mourthé (Kiko) pelo companheirismo em todas as fases e conselhos; à Larissa, pela amizade incondicional e apoio.

Ao Prof. Ricardo Reis e Silva, pela confiança e amizade.

Ao grupo de estudos NUTRIRUM, Alexandre, André, Andressa, Carlos Pancoti, Carlos Ricardo, Gabriela, Helena, Juliana, Marcelina, Paolo, Paulo, Pedro, Rafael, Raphael e Thiago, por toda ajuda e incentivo.

Ao Danilo Bastos (UPD), pela amizade e ajuda nas análises estatísticas.

Ao Dr. Mirton Morenz e família, pela amizade, carinho, conselhos e ajuda nas análises estatísticas.

Aos amigos de Belo Horizonte e que guardarei por toda vida.

Aos colegas de pós-graduação, professores e funcionários da Escola de Veterinária-UFMG que fizeram parte desta caminhada, em especial as secretárias do Colegiado, Paula e Heloísa.

À Princesa (*in memoriam*) pela fidelidade; Prewla, pelo jeitinho cativante e a mais nova integrante da família Arya, pela inspiração nos esportes.

À Barranqueira, Alcione, Égua, Coração, Kikinha, Cucuruca, Branquinha, Soneca, Furona, Estrela, Coração, Modelo, Pequena, Orelha, Ladrona, Moleca, Espertinha e Doideira, que me deram total carinho em meu experimento, “minhas vacas”, saudades.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

E a todos aqueles que acreditaram em mim quando eu não mais acreditava em mim mesmo; àqueles que com seu sorriso removeram a sombra do meu rosto e me deram asas e um céu azul para voar; àqueles por quem minha gratidão será sempre pequena nesta vida.

*“O Poderoso fez em mim maravilhas e Santo é o seu nome.
A minha alma engrandece o Senhor, exulta meu espírito em Deus meu Salvador.
Porque olhou para a humildade da sua serva,
Doravante as gerações hão de chamar-me de bendita.
O Poderoso fez em mim maravilhas e Santo é o seu nome
Seu amor para sempre se estende, sobre aqueles que o temem.
Manifesta o poder de Seu braço, dispersa os soberbos.
Derruba os poderosos de seu trono, e eleva os humildes.
Sacia de bens os famintos, despede os ricos sem nada.
Acolhe Israel seu servidor, fiel a seu amor.
Como havia prometido a nossos pais,
Em favor de Abraão e de seus filhos para sempre.
Glória ao PAI, ao FILHO e ao ESPÍRITO SANTO,
Como era no princípio agora e sempre.”
AMÉM.*

SUMÁRIO

1.0-INTRODUÇÃO.....	14
2.0-REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 - Biodiesel e glicerina.....	16
2.2 - Glicerina na alimentação de vacas em lactação.....	18
2.3 - Metabolismo do glicerol.....	23
3.0-MATERIAL e MÉTODOS.....	26
4.0-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.0-CONCLUSÃO.....	45
6.0-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tabela 1 – Proporção dos ingredientes nos suplementos concentrados formulados com inclusão ou não de Glicerina Bruta (GB).....	26
Tabela 2 – Composição química das dietas (% da matéria seca), formuladas utilizando o programa Spartan (Michigan State University).....	27
Tabela 3 – Composição físico-química da glicerina bruta utilizada.....	28
Tabela 4 – Composição química das silagens de milho em função do período experimental.....	33
Tabela 5 – Composição química dos suplementos concentrados oferecidos ao longo do período experimental.....	34
Tabela 6 - Composição química das dietas com ou sem inclusão de glicerina bruta (GB), utilizadas nos três períodos experimentais, na base da matéria seca.....	35
Tabela 7 - Consumos diários de matéria seca (CMS), de matéria orgânica (CMO) e de fibra em detergente neutro (CFDN), expressos em kg/vaca/dia e em porcentagem do peso corpóreo (%PV), e de fibra em detergente ácido (CFDA), de extrato étereo (CEE), de nutrientes digestíveis totais (CDNT), de amido (CAMIDO), de carboidratos totais (CCHOT), e de carboidratos não fibrosos (CCNF), expressos em kg/vaca/dia, de dietas baseadas em silagem de milho suplementada com concentrado contendo ou não glicerina bruta (GB), fornecidas a vacas Holandês x Gir em lactação.....	36
Tabela 8 - Consumo diário de glicerol de dietas baseadas em silagem de milho suplementada com concentrado contendo ou não glicerina bruta (GB), fornecidas a vacas Holandês x Gir em lactação.....	39
Tabela 9 – Digestibilidade aparente (%) da matéria seca (DMS), matéria orgânica (DMO), fibra em detergente neutro (DFDN) e proteína bruta (DPB) de dietas baseadas em silagem de milho suplementada com concentrado contendo ou não glicerina bruta (GB), fornecidas a vacas Holandês x Gir em lactação.....	39
Tabela 10 - Produção e composição do leite de vacas Holandês x Gir alimentadas com dietas baseadas em silagem de milho suplementada com concentrado contendo ou não glicerina bruta (GB).....	40
Tabela 11 – Concentrações (mg/dL) de glicose e ureia no plasma de vacas Holandês x Gir alimentadas com dietas baseadas em silagem de milho suplementada com concentrado contendo ou não glicerina bruta (GB).....	43

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Reação de transesterificação para a produção de biodiesel.....	17
Figura 2. Via de <i>Emden-Meyerhof-Parnas</i>	25

ABREVIACOES

AGV: Ácidos Graxos Voláteis
CAMIDO: Consumo de Amido
CCNF: Consumo de Carboidratos não Fibrosos
CDIVMS: Consumo de Matéria Seca Digestível
CDNT: Consumo de Nutrientes Digestíveis Totais
CEE: Consumo de Extrato Etéreo
CFDA: Consumo de Fibra Insolúvel em Detergente Ácido
CFDN: Consumo de Fibra Insolúvel em Detergente Neutro
CGLICEROL: Consumo de Glicerol
CHOT: Consumo de Carboidratos Totais
CMO: Consumo de Matéria Orgânica
CMS: Consumo de Matéria Seca
CNDT: Consumo de Nutrientes Digestíveis Totais
CNF: Carboidratos Não Fibrosos
CPB: Consumo de Proteína Bruta
DA: Digestibilidade Aparente
EE: Extrato Etéreo
FDA: Fibra em Detergente Ácido
FDN: Fibra em Detergente Neutro
FDNcp: Fibra em Detergente Neutro corrigida para Cinzas e Proteína
FDNi: Fibra em Detergente Neutro Indigestível
FDNp: Fibra em Detergente Neutro corrigida para Proteína
GB: Glicerina Bruta
LIG: Lignina
MM: Cinzas
MO: Matéria Orgânica
MS: Matéria Seca
NDT: Nutrientes Digestíveis Totais
NIDA: Nitrogênio Insolúvel em Detergente Ácido
NIDN: Nitrogênio insolúvel em Detergente Neutro
NUL: Nitrogênio Ureico no Leite
PB: Proteína Bruta
PDR: Proteína Degradável no Rúmen
PF: Produção Fecal

RESUMO

Avaliou-se o consumo e a digestibilidade dos nutrientes, a produção e composição do leite e a concentração de metabólitos no plasma de vacas Holandês x Gir alimentadas com dietas baseadas em silagem de milho suplementada com concentrados contendo ou não glicerina bruta (GB). Os tratamentos basearam-se na substituição parcial do fubá de milho do suplemento concentrado pelo glicerol da GB, em cerca de 7% da MS na dieta. O experimento foi realizado em delineamento de blocos ao acaso, com nove vacas por tratamento, e três medidas repetidas no tempo, tendo as vacas sido distribuídas nos blocos com base na produção de leite e peso corpóreo observados em período pré-experimental, na ordem de parição e no grau de sangue. Os consumos individuais foram determinados por diferença entre as quantidades oferecidas das dietas e respectivas sobras. A produção individual diária de leite foi registrada em cada período de avaliação, sendo realizadas amostragens para análise da composição do leite nitrogênio ureico no leite (NUL), gordura, proteína, lactose, extrato seco total e desengordurado. Foram também coletadas amostras de sangue, para determinação das concentrações plasmáticas de glicose e ureia. A determinação da digestibilidade aparente foi avaliada somente no segundo período de coletas utilizando-se óxido crômico (Cr_2O_3), como indicador da excreção fecal. Não houve diferença ($P>0,05$) entre tratamentos para consumos de matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, fibra em detergente neutro e nutrientes digestíveis totais. Para os consumos de amido e extrato etéreo houve diferença entre os tratamentos ($P<0,05$), sendo observado que o tratamento com GB obteve os menores valores, decorrente da composição da dieta. Já o consumo de glicerol também foi significativo ($P<0,05$), obtendo-se maiores valores no tratamento com GB, pelo mesmo fator dos anteriores. Não houve diferença ($P>0,05$) entre tratamentos para produção e composição do leite, exceto para a produção de leite corrigida para 4% de gordura e NUL ($P<0,05$). Para as concentrações plasmáticas, bem como a digestibilidade aparente também não foram encontrado diferença ($P>0,05$) entre tratamentos. Em dietas de vacas Holandês x Gir a suplementação da silagem de milho com níveis próximos de 7% de GB apresenta potencial para produção de 20 kg/dia de leite com elevado teor de sólidos.

Palavras-chave: energia, fubá de milho, glicerol, silagem de milho.

ABSTRACT

Evaluated the intake and digestibility of nutrients, production and milk composition and concentration of metabolites in plasma of Holstein x Gir cows fed diets based on corn silage supplemented with concentrates containing crude glycerin or not (GB). The treatments were based on the partial substitution of corn meal in the concentrate supplement by GB of glycerol, about 7% of diet DM. The experiment was conducted in randomized block design, with nine cows per treatment, and three repeated measures, and the cows were distributed in blocks based on milk production and body weight observed in pre-trial period in order and the degree of farrowing blood. The individual consumption were determined by difference between the amounts of diets offered and their leftovers. The individual daily milk production was recorded at each evaluation period, and samples taken for analysis of milk composition in milk urea nitrogen (MUN), fat, protein, lactose, total solids and fat. We also collected blood samples for determination of plasma concentrations of glucose and urea. The determination of apparent digestibility was assessed only in the second collection period using chromic oxide (Cr_2O_3) as an indicator of fecal excretion. There was no difference ($P > 0.05$) between treatments for dry matter intake, organic matter, crude protein, neutral detergent fiber and total digestible nutrients. For the consumption of starch and ether extract was no difference between treatments ($P < 0.05$), observed that treatment with the lowest values obtained GB, due to diet composition. The consumption of glycerol was also significant ($P < 0.05$), resulting in higher values for treatment with GB, by the same factor of the foregoing. There was no difference ($P > 0.05$) among treatments for milk production and composition, except for milk yield corrected for 4% fat and MUN ($P < 0.05$). For plasma concentrations and apparent digestibility were not found differences ($P > 0.05$) between treatments. In diets of Holstein x Gir supplementation of corn silage with levels of 7% of GB has potential for production of 20 kg / day of milk with high solids content.

Key- words: soybean meal, corn meal, glycerol, corn silage.

1.0 - INTRODUÇÃO

Na busca por fontes renováveis de energia, o biodiesel, considerado combustível ecológico e biodegradável, destaca-se por permitir redução das emissões de hidrocarbonetos e monóxidos de carbono no ambiente. Paralelamente, surgem discussões sobre uma matriz vegetal adequada à fabricação dos biocombustíveis que cause menor concorrência com a alimentação humana e com os ingredientes utilizados na alimentação animal.

O biodiesel pode ser produzido a partir de caroço de algodão, polpa de dendê, grãos de soja, milho, baba de mamona, canola, palma, semente de girassol, amendoim e pinhão-manso (SEBRAE, 2007). E, segundo Freitas & Penteado (2006), também a partir de sementes de colza e de maracujá, polpa de abacate, caroço de oiticica, semente de linhaça, semente de tomate, amêndoa de coco da praia, etc. Outra fonte a se destacar são as gorduras animais, que por sua vez também podem ser transformadas em biodiesel: sebo bovino, suíno, de aves e óleo de peixe (Freitas & Penteado, 2006). Da mesma forma, que óleos e gorduras residuais provenientes da indústria alimentícia e de cozinhas domésticas.

Uma importante preocupação para a cadeia produtiva do biodiesel diz respeito ao excedente de glicerina bruta (GB), principal co-produto originado, já que para cada 100 L de biodiesel produzidos são gerados, aproximadamente, 10 L de GB. Segundo a ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Bicomustível), a produção de biodiesel puro no Brasil foi de, aproximadamente, 52 milhões de litros em 2007. O Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel do Brasil prevê a obrigatoriedade de incluir 11% de biodiesel no diesel de petróleo a partir de 2013 e, em decorrência disto, haverá aumento substancial da produção de GB.

Com este patamar de produção de GB bastante superior à quantidade empregada atualmente nas principais aplicações comerciais (indústria química, farmacêutica, alimentícia e de cosméticos), haverá forte demanda por criação de novas aplicações para este co-produto. Sem isso, o excesso de glicerina poderá se tornar um problema, principalmente, no que se refere ao ambiente, já que o programa de produção do biodiesel não define de forma clara e segura o destino que deve ser dado aos subprodutos.

Neste sentido, o uso da GB como ingrediente energético na dieta de ruminantes desponta como promissora alternativa. O glicerol, principal componente da glicerina é altamente energético e quando incluído na dieta de vacas pode suprir a demanda energética, já que esta apresenta valor de energia líquida para lactação entre 8,0 e 9,7 MJ/kg (Schöeder & Südekum, 1999), enquanto que o fubá de milho possui de 8,4 MJ/kg (NRC, 2001). Por esta razão, a inclusão da glicerina em dietas de vacas leiteiras como substituto do milho no suplemento concentrado já vem sendo alvo de estudos.

Contudo, vale alertar que nos trabalhos versando sobre a inclusão de glicerina na dieta de ruminantes realizados em outros países foram utilizadas glicerinias altamente purificadas (Donklin, 2008), cenário diferente do encontrado no Brasil, onde o custo deste material o torna proibitivo para inclusão na dieta de ruminantes. A proposta assim, da utilização da glicerina semi-purificada ganha destaque por apresentar preço reduzido, o que a coloca em competição clara com o milho.

Além disto, convém ressaltar que a oferta do milho para a produção animal poderá tornar-se menos viável economicamente em consequência do seu direcionamento para a agroindústria de etanol em alguns países.

No Brasil foi autorizado o uso da GB pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, em outubro de 2010. A glicerina, para ser utilizada na alimentação animal deve ter a seguinte especificação: mínimo de 80% de glicerol, além de máximo de 13% de umidade e máximo de 150 ppm de metanol (Sindirações, 2010).

Contudo, fazem-se necessários estudos, visando adequada recomendação de inclusão da GB na alimentação de vacas em lactação.

Foi objetivo deste trabalho, avaliar o consumo e a digestibilidade dos nutrientes, a produção e composição do leite e a concentração de metabólitos no plasma de vacas Holandês x Gir alimentadas com dietas baseadas em silagem de milho suplementada com concentrados contendo ou não glicerina bruta.

2.0 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Biodiesel e glicerina

A história do biodiesel no mundo nasce junto com a criação dos motores a diesel no final do século XIX por Rudolf Diesel, que desenvolveu um motor à combustão interna, construído para operar com diversas variedades de óleos vegetais. Nos 30 anos seguintes, houve descontinuidade do uso de óleos vegetais como combustível, provocado, principalmente, pelo baixo custo do óleo diesel de fonte mineral (SEBRAE, 2007). Nos anos 90, com a busca de fontes energéticas menos poluentes, o biodiesel realmente renasce e se estabelece ganhando força, principalmente, por se tratar de fonte renovável de energia, resultando em menor agressão ao meio ambiente.

O Brasil acompanhando o movimento mundial e apoiado em suas experiências anteriores lança o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel, em 2005, objetivando maior geração de empregos e renda na agricultura familiar, contribuindo para economia nacional e melhoria nas condições ambientais (Brasil, 2005).

Definido pela Lei 11.097, de 13 de janeiro de 2005, o biodiesel é um combustível derivado das biomassas renováveis para o uso em motores à combustão interna ou, conforme regulamento, para outro tipo de geração de energia, que possa substituir parcial ou totalmente os combustíveis de origem fóssil (Brasil, 2005).

Um dos processos para produção do biodiesel é baseado em reação química de transesterificação (Figura 1), que é, sinteticamente, a reação de um óleo vegetal com um álcool simples, em geral, metanol ou etanol. A reação é catalisada por um ácido ou uma base. Nessa reação, as moléculas principais dos óleos e gorduras, os chamados triacilgliceróis, são separados em ácidos graxos e glicerina. Os ácidos graxos são reagrupados e formam uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos (biodiesel), dependendo do álcool utilizado (Plá, 2002). Sob o ponto de vista técnico-econômico, a reação via metanol é muito mais vantajosa que a via etanol (Freitas & Penteado, 2006).

Como coproduto do biodiesel é gerada a GB, caracterizada como sendo esta um líquido viscoso de sabor adocicado, inodoro, incolor (IUPAC, 1993), higroscópico e com alta solubilidade em água. O glicerol, principal componente da glicerina, é um composto

orgânico pertencente à função química álcool, sendo líquido à temperatura ambiente (25°C), e apresenta temperatura de fusão de 17,8°C (Pachauri & He, 2006).

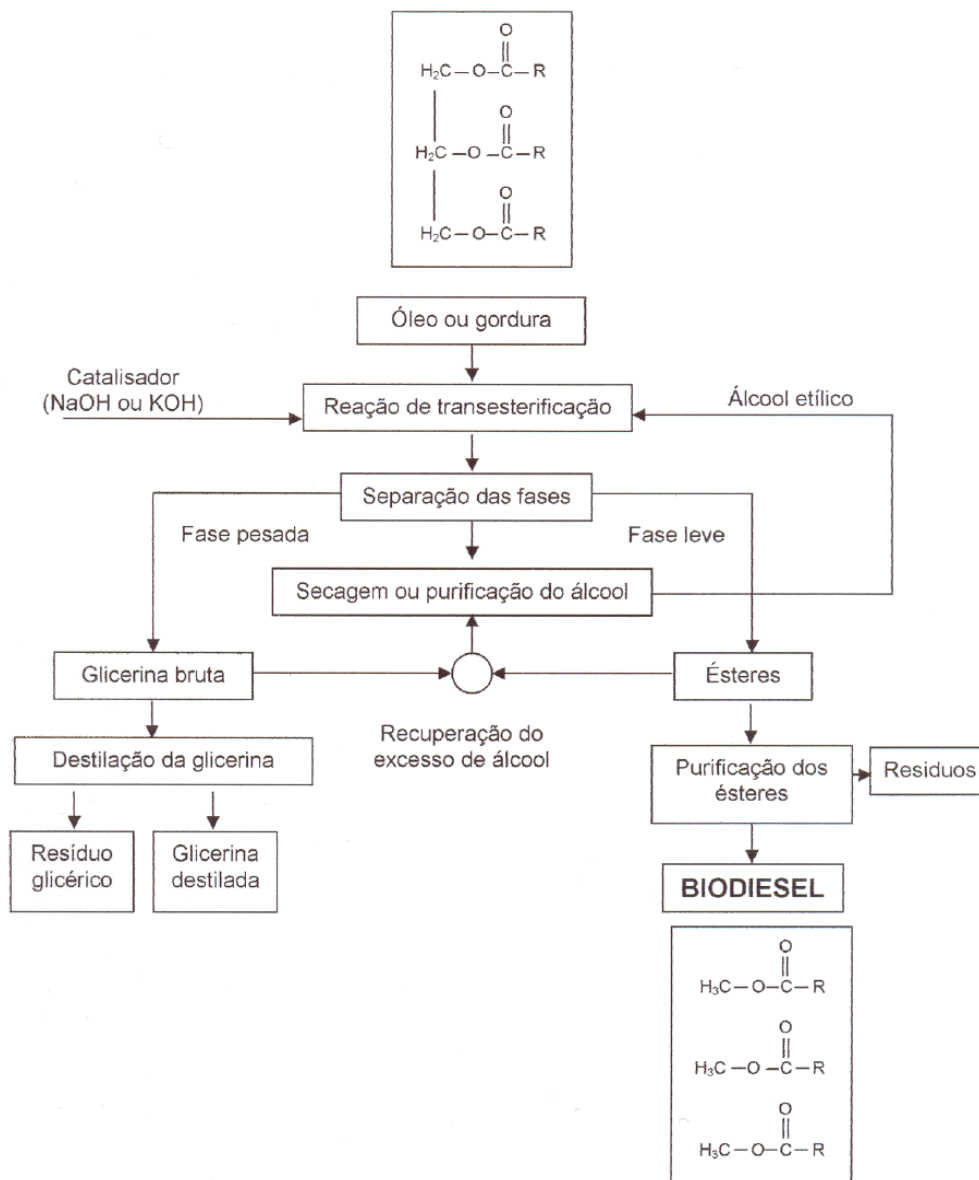


Figura 1. Reação de transesterificação para a produção de biodiesel. Fonte: Brasil (2005)

O termo glicerina é muito utilizado na literatura como sinônimo de glicerol, apesar desta ser composta por proporções variáveis de glicerol e outros compostos. Assim, quanto maior o conteúdo de glicerol, mais pura é a glicerina.

A glicerina tem uma gama de aplicações, sendo esta utilizada na indústria farmacêutica, na composição de cápsulas, anestésicos, xaropes e antissépticos, e na indústria alimentícia, como umectante e para conservar bebidas e alimentos (Larsen, 2009).

Entretanto, a glicerina obtida no processo de produção de biodiesel vem misturada à água, ácidos graxos, sabões ésteres, etanol ou metanol, monoésteres e oligômeros de glicerina (Diniz, 2005), precisando assim ser purificada para atender às especificações das indústrias que a utilizam. Mas a tecnologia exigida para extração das impurezas tem custo elevado, sendo dominada por apenas algumas empresas brasileiras (Larsen, 2009). Os custos de implantação e operação de uma fábrica para purificação de GB são maiores que os necessários para a própria planta destinada à produção de biodiesel (Brasil, 2005).

Diante do exposto, justifica-se a busca por alternativas de aproveitamento da GB para que essa não se torne um problema ambiental na cadeia de produção do biodiesel, e, concomitantemente, auxiliando na redução da competição por alimentos entre animais e humanos.

2.2 - Glicerina na alimentação de vacas em lactação

Os primeiros trabalhos relacionados ao uso de glicerina para bovinos foi na prevenção de cetose, principalmente, para vacas de alta produção de leite, por aumentar o suprimento de precursores da glicose (Johnson, 1954).

Do ponto de vista nutricional, a glicerina tem surgido como fonte alimentar energética alternativa e promissora na produção animal, particularmente para ruminantes, pois, assemelha-se ao propilenoglicol (substância gliconeogênica), utilizado com grande eficiência na alimentação de vacas leiteiras de alta produção. De acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA - EUA), a glicerina tem seu uso seguro e reconhecido na alimentação animal. No entanto, o teor de metanol presente na glicerina deverá ser levado em consideração, não devendo ultrapassar 150 ppm, conforme também determina a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil, por meio da resolução 386/1999.

A intoxicação por metanol em animais é identificada pela excreção de ácido fórmico na urina. O metanol ingerido é oxidado no fígado a formaldeído e este a ácido fórmico. Lammers et al. (2007) indicaram que, quando em quantidades elevadas, o ácido fórmico pode causar cegueira pela destruição do nervo óptico, sendo relatadas também a ocorrência de depressão do sistema nervoso central, vômito, acidose metabólica e alteração motora.

Ademais, a inclusão de glicerina na dieta de vacas leiteiras tem sido utilizada na prevenção de distúrbios metabólicos associados ao período de transição, sendo a recomendação para esta fase de 5 a 8% na matéria seca da dieta (Donkin, 2008). De acordo com o mesmo autor, a glicerina advinda do biodiesel poderá ser considerada o “novo milho” para a alimentação de ruminantes, podendo-se incluir até 15% na matéria seca da dieta, sem interferir na ingestão de alimentos nem na produção animal.

Ogborn (2006) verificou que a produção e composição do leite não foram alteradas quando suplementou dietas de vacas com glicerina como fonte energética no pré-parto. A utilização de glicerina como fonte energética é viável no pré-parto (DeFrain et al., 2004), bem como no início (Fisher et al., 1971) e no meio da lactação (Khalili et al., 1997). De acordo com Donkin (2008), há necessidade de se estudar a inclusão de glicerina na dieta de vacas em lactação após o período de transição e em concentrações mais elevadas (maior que 15% na matéria seca da dieta).

DeFrain et al. (2004) avaliaram a suplementação de glicerina parcialmente purificada nos 21 dias anteriores à data prevista do parto até 21 dias pós-parto. Trinta vacas receberam os tratamentos: Controle (0,86 kg/dia de amido de milho), baixa glicerina (0,43 kg/dia de glicerina bruta e 0,43 kg/dia de amido de milho) ou alta glicerina (0,86 kg/dia de glicerina bruta). As dietas fornecidas como misturas completas foram oferecidas três vezes ao dia e os tratamentos foram alocados uma vez ao dia sobre o alimento oferecido. A glicerina continha 80,2% de glicerol, 11,5% de sais, 6,6% de água e 1,3% de metanol. A suplementação com GB reduziu o consumo de MS no pré-parto ($P=0,01$), sendo que as vacas alimentadas com os tratamentos com baixa e alta inclusão de glicerina consumiram 17% menos que aquelas recebendo a dieta controle. No pós-parto houve interação entre tratamento e dia ($P = 0,11$) para a variável peso corporal. Aos 21 dias de lactação, vacas alimentadas com dietas contendo baixa inclusão de glicerina ganharam mais peso do que aquelas recebendo nível mais elevado de glicerina. A

produção de leite não diferiu entre tratamentos, apesar das menores concentrações de energia ($P = 0,09$) e de gordura ($P = 0,13$) e menor produção diária de gordura ($P = 0,13$) nos tratamentos com glicerina. Foi observado menor teor de nitrogênio ureico no leite nos tratamentos contendo glicerina ($P = 0,08$). Houve interação entre tratamento e dia pós-parto para a concentração plasmática de glicose ($P = 0,01$). A concentração plasmática de glicose foi reduzida pela baixa inclusão de glicerina até sete dias de lactação, e foi mais baixa entre os dias 14 e 21 na dieta com alta inclusão de glicerina, que também apresentou menor teor de amônia no fluido ruminal antes do parto ($P = 0,12$). Os tratamentos com glicerina aumentaram a relação entre acetato e propionato no rúmen ($P < 0,01$) e tenderam a aumentar tanto a concentração de butirato quanto a de ácidos graxos voláteis (AGV) sete dias após o parto ($P = 0,06$). Baseado nestes dados, a glicerina foi depressora de consumo, induziu menor teor de glicose plasmática e aumentou a concentração ruminal de butirato comparativamente ao amido de milho.

San Vito (2010) avaliou o efeito da substituição do milho grão pela GB (84% de glicerol), nas proporções de 0%; 33,3%; 66,6% e 100%, na base da matéria seca (MS), que corresponderam a 0, 7, 14 e 21% de inclusão de GB na MS da dieta. Este autor avaliou o consumo, a digestibilidade, o desempenho produtivo e o metabolismo de compostos nitrogenados em 12 vacas da raça Holandês, com produção média de 30 kg/dia de leite, distribuídas em três quadrados latinos 4 x 4. Os animais receberam dietas baseadas em silagem de milho na proporção de 50:50 (volumoso:concentrado), com base da MS. Os consumos de MS, MO, PB, FDN, FDNcp e FDAi foram reduzidos ($P < 0,05$) a partir de 33,3% de substituição do milho grão por GB (7% de GB na dieta). O consumo de EE aumentou ($P < 0,05$) a partir do nível de 66% de substituição. No entanto, não houve efeito significativo ($P > 0,05$) para o consumo de CNF. Apesar da digestibilidade da MS, MO, PB, CNF e do teor de NDT (% da MS) terem aumentado ($P < 0,05$) a partir de 66,6% de substituição do milho grão pela GB, os consumos de MS, MO e de NDT não foram influenciados ($P > 0,05$) pela substituição nas dietas. A produção de leite e a produção de leite corrigida para 3,5% de gordura apresentaram redução ($P < 0,05$) a partir do nível de 66,6% de substituição do milho grão pela GB, enquanto que não houve efeito ($P > 0,05$) do aumento dos níveis de GB nas dietas sobre a composição do leite, relação entre o teor de proteína e gordura do leite e eficiência alimentar dos animais. O autor concluiu que a GB pode

substituir até 33,3% ao milho grão na dieta de vacas leiteiras com produção média de 30 kg/dia de leite sem que haja redução significativa da produção de leite.

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

Shin et al. (2009) avaliaram a substituição de milho moído por glicerina em dietas baseadas em diferentes volumosos. Estes autores utilizaram 24 vacas com 116 ± 13 dias em lactação, alocadas em arranjo fatorial 2 x 3 (dieta basal x nível de inclusão de glicerina). As dietas basais foram formuladas com 37% de silagem de milho e 10% de feno de alfafa ou com 25% de casca de algodão e 10% de feno de tifton. Os níveis de inclusão de glicerina (90% de glicerol) foram 0; 5 e 10% na MS da dieta. Ao mesmo tempo, quatro vacas canuladas no rúmen foram alocadas em Quadrado Latino 4 x 4 com períodos de 20 dias, cujos tratamentos foram silagem de milho ou casca de algodão em arranjo fatorial com 0 ou 10% de glicerina. A eficiência entre a produção de leite e o consumo de MS foi menor nas dietas com 5% de glicerina. Aumento no teor dietético de glicerina reduziu linearmente a concentração de nitrogênio ureico no plasma (16,1, 15,5 e 13,8 mg/dL, nos tratamentos com inclusão de 0, 5 e 10% de glicerina, respectivamente). Não foi observado efeito da suplementação com glicerina sobre a glicose plasmática e pH ruminal. Houve tendência de aumento na produção diária de leite de 34,4 para 35,6

kg/vaca quando a glicerina substituiu o milho na dieta. No entanto, houve tendência de queda de 37,7 para 36,4 kg leite/dia quando glicerina foi adicionada à dieta com casca de algodão. Os autores concluíram que teores dietéticos de até 10% de glicerina podem ser usados para vacas em lactação.

Echeverria et. al. (2010) avaliaram a inclusão de diferentes níveis de glicerol ao concentrado de vacas Holandês para estudar a resposta de produção de leite. Estes autores constataram que as vacas alimentadas com 0,72 e 1,44 kg/dia de glicerol produziram 2,15 litros de leite a mais, quando comparadas àquelas recebendo a dieta controle.

Zacaroni (2010) avaliou a resposta de vacas leiteiras à substituição total do fubá de milho finamente moído por GB, usando 18 vacas Holandês em Quadrados Latinos 3×3 , com períodos de 28 dias. Os tratamentos foram: dieta basal com milho maduro finamente moído (Tratamento Controle), e dieta onde o milho foi totalmente substituído por uma mistura isoproteica de glicerina (com 12,3% de MS na dieta) e farelo de soja (Tratamento com Glicerina), acrescidas do produto em teste. A GB continha 6,3% de umidade, 76,2% de glicerol e 8.800 ppm de metanol na matéria natural. A substituição do amido de milho por GB deprimiu a produção diária de leite de 23,4 para 21,3 kg/vaca ($P = 0,02$), sem afetar o consumo, com média de 16,7 kg/dia, resultando em queda na eficiência alimentar ($P = 0,01$). A secreção diária de lactose foi menor para o tratamento com glicerina ($P = 0,01$), havendo tendência de queda na secreção láctea de proteína ($P = 0,13$). A concentração plasmática de glicose foi menor no tratamento com glicerina, sendo de 51,6 mg/dL contra 58,3 mg/dL para a dieta Controle ($P = 0,03$). O consumo de matéria orgânica digestível (CMOD) não diferiu ($P = 0,29$), apesar da digestibilidade aparente da matéria orgânica no trato digestivo total ter sido maior no tratamento com glicerina ($P = 0,02$). Não houve evidência de mudança na síntese de proteína microbiana estimada pela excreção diária de alantoína na urina ($P = 0,87$) ou na eficiência de síntese microbiana estimada pela relação entre a alantoína excretada e o CMOD ($P = 0,64$). A substituição total do milho por GB reduziu a produção de leite e a eficiência alimentar, o que segundo o autor, pode indicar menor disponibilidade de glicose para síntese mamária de lactose.

Drackley et al. (1992) adicionaram até 10% de glicerina na matéria seca da dieta em substituição aos grãos, e concluíram que a glicerina é um ingrediente com potencial para ser utilizado na alimentação de vacas em lactação (principalmente, no pico da

lactação), pois contém praticamente o mesmo teor de energia na matéria seca que o milho. Estes autores relataram que a substituição do milho por glicerina não causou impactos sobre a produção e qualidade do leite. No entanto, a pureza da glicerina foi um limitante, devendo ser sempre considerada, haja vista a GB apresentar concentrações variáveis de água, metanol, fósforo e potássio em sua composição (Chung et al., 2007).

As diferenças encontradas nos trabalhos apresentados parecem estar relacionadas às características inerentes a cada experimento, necessitando-se, portanto, de maiores pesquisas para elucidação do potencial gliconeogênico em vacas em função da produção e composição do leite produzido.

2.3 - Metabolismo do glicerol

O glicerol é um componente do metabolismo normal dos animais, sendo encontrado na circulação e nas células. Ele é derivado de lipólise no tecido adiposo, hidrólise dos triglicerídeos e das lipoproteínas do sangue e da gordura dietética (Lin, 1977). Quando o organismo utiliza a reserva corporal de gordura como fonte de energia, ácidos graxos e glicerol são liberados no fluxo sanguíneo, podendo ser este convertido em glicose pelo fígado e rins para prover energia para o metabolismo celular. Entretanto, existem poucas informações sobre as implicações metabólicas da suplementação exógena de glicerol na dieta, especialmente quando esta atinge grandes proporções como ingrediente energético das dietas.

Quando absorvido, o glicerol pode ser convertido em glicose via gliconeogênese, ou oxidado para a produção de energia, via glicólise e ciclo de Krebs (Robergs & Griffin, 1998), sendo que o metabolismo do glicerol predominantemente ocorrerá no fígado e nos rins. Em ruminantes, o glicerol pode seguir duas rotas metabólicas: 1) absorção direta pelo epitélio da parede ruminal (Rémond et al., 1993); ou 2) transformação em AGV pelas bactérias ruminais (Johns, 1953), principalmente, em ácido propiônico (Bergner et al., 1995) em detrimento ao acetato. Após chegar ao fígado, pela corrente sanguínea, tanto o glicerol como o propionato serão transformados em glicose por gluconeogênese. Isto fornece fonte de energia prontamente disponível

para os animais, o que poderia ser especialmente benéfico para aqueles que estão em balanço energético negativo.

O metabolismo ruminal do glicerol baseia-se no transporte desse substrato através da membrana celular da microbiota ruminal, sendo este realizado via difusão facilitada (em função do gradiente de concentração) pelos microrganismos do rúmen de forma a saturar a enzima glicerol quinase. Garton et al. (1961) mostraram que o transporte ocorre rapidamente, tendo evidenciado, em experimentação *in vitro*, o desaparecimento de 50% do glicerol após 4 h de incubação em conteúdo ruminal.

A enzima glicerol quinase fosforila o glicerol resultando em uma molécula de glicerol-3-fosfato, que é oxidada em di-hidroxiacetona fosfato, sendo essa reação reversível catalisada pela enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase. A di-hidroxiacetona-3-fosfato é então convertida em gliceraldeído-3-fosfato pela enzima triose fosfato isomerase que interconverte cetoses em aldoses. Estas duas últimas moléculas participam da via glicolítica de *Embden-Meyerhof-Parnas* (Figura 2) comumente encontrada no metabolismo das hexoses em organismos superiores e microrganismos aeróbicos ou anaeróbicos (Russel & Wallace, 1997), sendo, portanto, passíveis de participarem da gliconeogênese, glicogênese ou, ainda, produção de piruvato.

Em experimentos com inclusão de glicerol é frequente o relato de aumento da produção total de AGVs, sendo justificado pela maior produção de propionato. Krehbiel (2008) relatou que, aproximadamente, 13% do glicerol que chega ao rúmen desaparece por passagem com a digesta, 44% por fermentação e 43% por absorção pela parede ruminal. Baseado em observações *in vitro*, a bactéria ruminal que mais metabolizou o glicerol foi a *Selenomonas* e os produtos finais foram propionato, lactato, succinato e acetato (Hobson & Mann, 1961, *apud* Zacaroni, 2010). Garton et al. (1961) e DeFrain et al. (2004) encontraram que a metabolização ruminal do glicerol resultou em pequeno incremento na proporção molar de propionato e aumento na concentração de butirato, diferenciando dos estudos clássicos que só relataram aumento na concentração de propionato.

O NADH excedente da entrada do glicerol na via de *Embden-Meyerhof-Parnas*, pode ser aproveitado pelos microrganismos ruminais, aumentando a eficiência de absorção e incorporação da amônia ruminal à proteína bacteriana. Esse processo pode

justificar a diminuição de amônia livre no rúmen e nitrogênio ureico no leite observados por Wang et al. (2008) e Donkin (2008).

Conforme exposto, o glicerol pode entrar na via glicolítica e ser convertido em piruvato. O piruvato, por sua vez, pode gerar propionato por duas rotas diferentes: a do succinato ou a do acrilato (Kozloski, 2002), justificando a evidência experimental de aumento na produção de propionato em trabalhos que adicionaram glicerol à dieta de ruminantes.

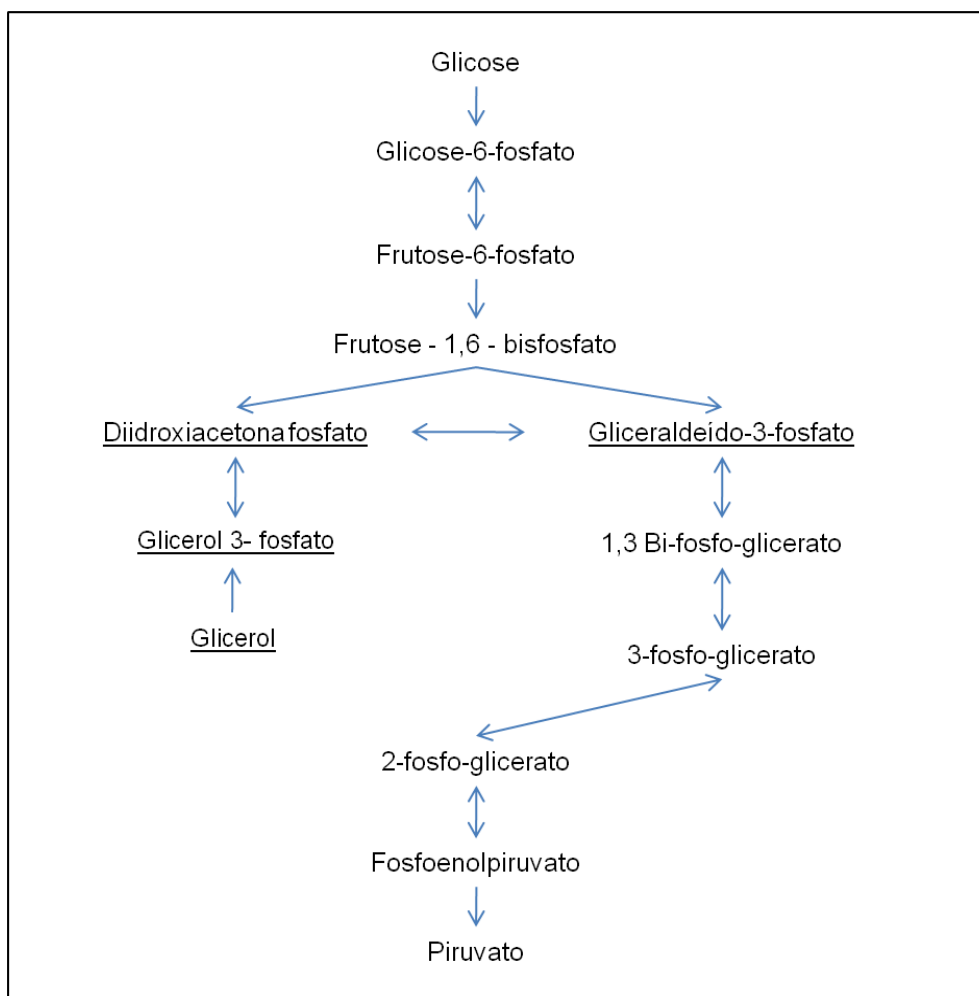


Figura 2. Via de *Embden-Meyerhof-Parnas* (Lehninger, 2002)

3.0 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Local e animais utilizados

O trabalho foi realizado no período de julho a novembro de 2010, no Campo Experimental José Henrique Bruschi, de propriedade da Embrapa Gado de Leite, e localizado no município de Coronel Pacheco-MG. Foram utilizadas 18 vacas Holandês x Gir, multíparas, no terço inicial de lactação (48 ± 18 dias), com produção média de leite de $19,8 \pm 4,9$ kg/dia, e peso corporal médio de 554 ± 48 kg.

3.2 – Delineamento e período experimental

Foi utilizado delineamento de blocos ao acaso, com nove vacas por tratamento, e três medidas repetidas no tempo. As vacas foram distribuídas nos blocos com base na produção de leite e peso corpóreo observados em período pré-experimental, na ordem de parição e no grau de sangue, que variou de $\frac{1}{2}$ a $\frac{7}{8}$ H x G. O período experimental total foi de 94 dias, sendo os três períodos de coletas, com duração de 105 dias, realizados do 26^o ao 35^o dia, do 61^o ao 70^o dia e do 96^o ao 105^o dia.

3.3 – Dietas experimentais e fornecimento

Foram avaliadas duas dietas que consistiram nos tratamentos experimentais. As dietas foram baseadas em silagem de milho suplementada com concentrado contendo ou não GB.

Tabela 1 – Proporção dos ingredientes nos suplementos concentrados formulados com inclusão ou não de Glicerina Bruta (GB)

<i>Ingredientes</i>	Concentrado	
	Sem GB	Com GB
	<i>% da matéria seca</i>	
Farelo de soja	44,9	49,9
Fubá de milho	35,1	8,3
Glicerina bruta	0,0	22,1
Farelo de trigo	14,0	13,9
Top Milk Núcleo [®] , ¹	4,1	4,0
Calcário	0,7	0,7
Sal branco	1,1	1,1

¹ Cálcio 255 g, Fósforo 76 g, Enxofre 20 g, Magnésio 30 g, Cobalto 60 mg, Cobre 850 mg, Iodo 65 mg, Manganês 2.000 mg, Selênio 20 mg, Zinco 6.000 mg, Ferro 1.000 mg, Flúor 760 mg, Vitamina A 20.000 UI/kg e E 500 UI/kg.

Os tratamentos basearam-se na substituição parcial do fubá de milho do suplemento concentrado pelo glicerol da GB. Os suplementos concentrados foram preparados a cada 10 dias, sendo formulados com fubá de milho, farelo de soja, farelo de trigo, e mistura mineral-vitamínica, além da GB (Tabela 1).

As dietas experimentais (Tabela 2) foram formuladas para serem isoenergéticas e isoproteicas, por meio do *software* Spartan (Michigan State University, EUA) com objetivo de atender às exigências estabelecidas pelo NRC (2001) para vaca de 550 kg de peso corpóreo, com 100 dias em lactação, produzindo 20 kg/dia de leite com 3,5% de gordura, sem alteração do peso corporal.

Tabela 2 – Composição química das dietas (% da matéria seca), formuladas utilizando o programa Spartan (Michigan State University)

	Dieta	
	Sem GB ¹	Com GB
Matéria Seca (%)	42,0	42,1
Proteína bruta	15,2	15,2
Fibra em detergente neutro	39,1	38,3
Fibra em detergente ácido	24,1	23,9
Glicerina bruta	0,0	8,9
Glicerol	0,0	7,2
Cálcio	0,7	0,7
Fósforo	0,5	0,5

¹Glicerina bruta

As vacas permaneceram em curral do tipo *free-stall*, onde havia disponibilidade de água e mistura mineral. As dietas foram fornecidas *ad libitum* (10% de sobras), uma vez ao dia, logo após a ordenha da manhã, e preparadas na forma de mistura completa em vagão misturador semi-automatizado e computadorizado (DATARANGER[®], American Calan Inc., Northwood, NH), sendo o consumo individual determinado diariamente em cochos com portões eletrônicos do tipo *calan-gates* (American Calan Inc., Northwood, NH, EUA).

3.4. – Determinação da Matéria Seca da Silagem de Milho

Durante todo o período experimental, no início de cada semana, amostras da silagem de milho a ser fornecida foram coletadas e seu teor de matéria seca (MS) determinado com auxílio de forno micro-ondas (Modelo MM7809, Panasonic, Belo

Horizonte, MG), visando ajustar a relação volumoso:concentrado das duas dietas para 60:40 (com base na MS).

3.5 – Glicerina Bruta

A GB utilizada (Tabela 3) foi fornecida pela fábrica de biodiesel da ADM (Archer Daniels Midland Company) Ltda. (Rondonópolis, MT), e obtida a partir do óleo de soja.

Tabela 3 – Composição físico-química da glicerina bruta utilizada¹

Elementos	Composição
Na % (m/m)	2,20
Densidade a 20°C g/mL	1,25
Cloro % (m/m)	3,40
NaCl % (m/m)	5,60
Óleo (%)	0,3
Umidade % (m/m)	13,13
Cinzas % (m/m)	6,4
pH	6,5
Glicerol % (m/m)	80,19
Metanol % (m/m)	0,020

¹Informado pela ADM Company Ltda (Rondonópolis, MT).

3.6 – Parâmetros avaliados

3.6.1 – Consumo de nutrientes e análises químicas

Durante nove dias de cada um dos três períodos de coletas, os consumos individuais foram determinados por diferença entre as quantidades oferecidas das dietas e respectivas sobras. Amostras da silagem de milho, dos suplementos concentrados e das respectivas sobras individuais foram armazenadas a -10°C e, posteriormente, descongeladas, pré-secadas em estufa de ventilação forçada de ar (55°C, 72 h), e moídas em moinho de facas do tipo *Willey* dotado de peneira com perfurações de 5 mm. Após esse procedimento, as amostras foram compostas (com base na MS) por vaca x período de coletas, novamente moídas (1 mm) e analisadas quanto aos teores de MS a 105°C, matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), lignina (LIG), nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN), e nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA), conforme métodos descritos por Silva &

Queiroz (2002). Nestas amostras foram analisados também os teores de glicerol (Moreira et al., 2011) e de amido, bem como determinada a digestibilidade *in vitro* de MS (DIVMS), segundo Tilley & Terry (1963). O teor de amido foi determinado, multiplicando-se por 0,9 a concentração de glicose, determinada pelo método enzimático da glicose oxidase (*kit* PAP - ref. 84, LabTest[®], Diagnóstico SA, Lagoa Santa, MG), após hidrólise ácida das amostras (Passos, 1996).

Foram realizadas análises para o fracionamento de carboidratos dos alimentos fornecidos aos animais, utilizando a metodologia descrita por Sniffen et al. (1992). As frações que compõem os carboidratos totais (CHOT) foram obtidas pela seguinte equação: $CHOT = 100 - (PB + EE + MM)$, em que PB corresponde à proteína bruta da amostra, EE ao extrato etéreo e MM às cinzas. A fração C, representada pelas proteínas associadas à lignina, consideradas indigeríveis, foi estimada pela equação: Fração C = $FDN * 0,01 * LIG * 2,4$. A fração B2 composta pela fração fibrosa potencialmente degradável foi estimada pela equação: Fração B2 = $FDN_p - \text{Fração C}$, em que FDN_p corresponde à fibra em detergente neutro corrigida para proteína. A fração A+B1 (carboidratos não fibrosos - CNF) composta por açúcares solúveis, amido e pectina foram estimados pela seguinte equação: $A+B1 = CHOT - (\text{Fração B2} + \text{Fração C})$.

Os teores de nutrientes digestíveis totais (NDT) dos alimentos e da dieta foram estimados, conforme equação descrita por Weiss et al. (1992).

$$NDT = 0,98 * (100 - FDN_n - PB - MM - EE) + EXP(-0,012 * NIDA) * PB + 2,25 * (EE - 1) + 0,75 * (FDN_n - LIG) * [1 - (LIG / FDN)^{0,667}] - 7$$

Onde:

FDN_n = Fibra em detergente neutro livre de nitrogênio

PB = Proteína bruta

MM = Cinzas

NIDA = Nitrogênio insolúvel em detergente ácido

EE = Extrato etéreo

LIG = Lignina

FDN = Fibra em detergente neutro

Os resultados das análises laboratoriais e os valores dos pesos diários das dietas fornecidas e das respectivas sobras individuais, durante cada um dos três períodos de

coleta foram utilizados para os cálculos dos consumos de matéria seca (CMS), de matéria orgânica (CMO), e de fibra insolúvel em detergente neutro (CFDN), expressos em kg/vaca/dia e em porcentagem do peso corpóreo (%PV); e de proteína bruta (CPB), de fibra insolúvel em detergente ácido (CFDA), de MS digestível (CDIVMS), de amido (CAMIDO) e de glicerol (CGLICEROL), expressos em kg/vaca/dia.

3.6.2 – Digestibilidade aparente

No segundo período de coletas, a digestibilidade aparente foi determinada, segundo as equações descritas por Berchielli et al. (2011): $DMS (\%) = ((MS \text{ ingerida} - MS \text{ excretada}) / (MS \text{ ingerida})) * 100$. Para os demais nutrientes MO, PB e FDN, foi utilizado a equação: $DN (\%) = (((MS \text{ ingerida} \times \% \text{ nutrientes}) - (MS \text{ excretada} \times \% \text{ nutrientes})) / (MS \text{ ingerida} \times \% \text{ nutriente})) * 100$.

A PF foi calculada conforme relatado por Lopes (2007), utilizando óxido crômico (Cr_2O_3) embalado em “papel-toalha”, administrado às vacas por via oral durante 12 dias, sempre após as ordenhas, na quantidade de 10 g/vaca/dia, divididos em duas partes iguais. Nos seis últimos dias de administração do indicador externo foram realizadas coletas de fezes diretamente na ampola retal das vacas. As amostras de fezes foram amostradas a intervalos de 26 h a partir das 8:00 h do primeiro dia de coletas, sendo armazenadas ($-10^\circ C$) e, posteriormente, descongeladas, pré-secadas em estufa de ventilação forçada de ar ($55^\circ C$, 72 h), compostas (com base na MS) por vaca, moídas (1 mm), e analisadas quanto ao teor de cromo por espectrofotometria de absorção atômica (Williams et al., 1962), após digestão nitroperclórica (Kimura & Miller, 1957).

3.6.3 – Produção e composição do leite

Durante cada período, sempre nos últimos nove dias, foram realizados registros das produções individuais diárias e homogeneização do leite ordenhado de cada vaca, e por meio de dispositivo acoplado à ordenhadeira, foram coletadas em frascos contendo bronopol[®] como conservante, amostras representativas da produção individual diária de leite (alíquotas de 2/3 e 1/3, respectivamente nas ordenhas da manhã e da tarde) de cada vaca. Estas amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora, MG), sendo

analisadas em equipamento Bentley[®] 2000 (Bentley Instruments Inc., Chaska, Minnesota, EUA) quanto aos teores de gordura, lactose, proteína, extrato seco total e desengordurado, segundo procedimentos da Official... (1990).

Uma segunda amostragem individual de leite foi realizada conforme descrito anteriormente, porém em frascos sem conservante, destinada à análise do teor de ureia, empregando-se o método enzimático-colorimétrico - urease, e utilizando o *kit* UREIA CE (LabTest[®] Diagnóstico SA, Lagoa Santa, MG), sendo os resultados convertidos em teores de nitrogênio ureico no leite (NUL), por meio da multiplicação pelo fator 0,4667.

A produção de leite corrigida para 4,0% de gordura (PLCG 4,0%) foi calculada conforme a equação (NRC, 2001): $PLCG\ 4,0\% = (0,4 * \text{produção de leite}) + 15 * (\text{teor de gordura do leite} / 100) * \text{produção de leite}$.

3.6.4 – Parâmetros sanguíneos

Pela manhã do último dia de cada período de coletas, antes do fornecimento das dietas foram realizadas coletas individuais de sangue na veia ou artéria coccígea de cada vaca, utilizando *vacuntainers* de capacidade de 5 mL com heparina (Thompson & Christie, 1991). As amostras foram imediatamente centrifugadas a 3.000 x g por 15 minutos, sendo então retiradas alíquotas de plasma, que foram acondicionadas em tubos plásticos de 2,0 mL com tampa (tipo Microtubes MCT-200C - Axygen Scientific, Union City, CA, EUA) e armazenadas a -10°C, para posteriores análises de glicose, realizada pelo método enzimático da glicose oxidase (*kit* Glicose PAP ref. 84 da LabTest[®] Diagnóstico SA, Lagoa Santa, MG) e de ureia pelo método enzimático-colorimétrico - urease (*kit* Ureia CE ref. 27 da LabTest[®] Diagnóstico SA, Lagoa Santa, MG).

3.6.5 – Pesagem e Eficiência Alimentar

As vacas foram pesadas no início e final de cada período de coletas, sempre após a ordenha da manhã, e antes do fornecimento do trato diário. Já a Eficiência Alimentar foi calculada da seguinte forma: kg de MS consumida por dia/kg de leite produzido por dia (corrigido ou não para 4% de gordura).

3.7 – Análises Estatísticas

A análise de variância dos dados de digestibilidade aparente da MS, MO, FDN e PB foi realizada, utilizando o procedimento GLM do SAS (2002), considerando os efeitos de bloco e tratamento. Para comparação das médias ($\alpha = 0,05$) utilizou-se o teste de Tukey.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade
Total	17
Tratamento	1
	16

As variáveis referentes ao consumo de nutrientes, parâmetros sanguíneos, eficiência e conversão alimentar, produção e composição de leite foram analisadas como medidas repetidas no tempo, utilizando-se o procedimento MIXED do SAS (2002). A escolha da matriz de covariância foi realizada com base no Critério de Informação de Akaike-AIC (Wolfinger, 1993), adotando-se as seguintes fontes de variação: nível de glicerina, período de coleta e a interação destes fatores. Os níveis de glicerina e os períodos de coleta, bem como a interação entre eles, foram considerados efeitos fixos, e os blocos e suas interações considerados efeitos aleatórios. As médias foram estudadas utilizando-se os testes F e de Tukey para os fatores nível de glicerina e período de coleta, respectivamente ($\alpha = 0,05$).

Fonte de Variação	Graus de Liberdade
Total	17
Tratamento	1
Blocos	2
	14

4.0 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Composições das dietas experimentais

A composição química da silagem de milho oferecida variou ao longo dos períodos experimentais (Tabela 4). Ressalte-se que somente no primeiro período, o teor de MS foi semelhante ao preconizado na formulação das dietas apresentadas na Tabela 2, bem como ao valor médio encontrado na literatura, de 31,59% (Valadares Filho e al., 2010). Isto pode ser parcialmente atribuído ao fato de que a silagem de milho fornecida às vacas foi obtida de um silo aéreo, de elevada capacidade de armazenamento de massa ensilada, que era também utilizado para a alimentação de grande número de animais do Campo Experimental. Isto pode ter sido a principal causa da grande variação observada não só no teor de matéria seca, mas na composição bromatológica da silagem de milho utilizada nos três períodos experimentais.

Tabela 4 – Composição química das silagens de milho em função do período experimental

<i>Composição química (% da MS)</i>	Período		
	1	2	3
MS (%)	33,46	23,84	22,44
Matéria orgânica	95,33	93,78	92,13
Proteína bruta	6,14	9,49	9,42
Fibra em detergente neutro	41,26	53,30	53,69
Fibra em detergente ácido	24,17	34,49	32,26
Cinzas	4,67	6,22	7,87
Lignina	2,28	1,87	2,74
Amido	32,67	19,09	17,84
Digestibilidade <i>in vitro</i> da MS (%)	64,96	63,33	64,01
Glicerol	1,99	0,90	0,79
Extrato Étereo	4,64	4,27	3,33
Carboidratos não fibrosos	44,54	28,85	27,82
Carboidratos totais	84,55	80,02	79,38
Nutrientes digestíveis totais	69,02	61,61	57,07

Como reflexo dessa variação no teor de MS da silagem de milho, a relação volumoso:concentrado (V:C), preconizada na formulação das dietas (Tabela 2) em 60:40 (base MS) foi, em média, de 63:37 e 64:36, respectivamente, para os tratamentos sem e com inclusão de GB na dieta. Costa et al. (2005) sugeriram que a V:C pode influenciar a produção e o teor de gordura do leite, em função do consumo voluntário bem como.

Ademais, durante todo o período experimental, no início de cada semana, houve a preocupação em retirar amostras da silagem de milho a ser fornecida para as vacas, visando ajustar a relação V:C. No entanto, esta periodicidade parece não ter sido suficiente, para o ajuste da relação V:C, conforme preconizada na formulação das dietas. Conforme apresentado na Tabela 5, ao longo do período experimental, foram observados menores teores de MS no suplemento concentrado com inclusão de GB quando comparado àquele utilizado na dieta controle. A redução encontrada pode ser parcialmente atribuída à característica higroscópica da glicerina, já que a mesma apresentava teor de MS semelhante ao do fubá de milho, ingrediente este que foi substituído por ela. Apesar da preocupação com o preparo dos suplementos concentrados a cada 10 dias, precavendo alguma eventual alteração na sua composição química como resultado dos efeitos de tempo e fatores ambientais, não foi prevista esta característica umectante da GB. Este aspecto, provavelmente, também influenciou na diferença observada entre o valor preconizado e aquele efetivamente obtido para a relação V:C.

Tabela 5 – Composição química dos suplementos concentrados oferecidos ao longo do período experimental

Composição química (% da MS)	Concentrado/Período					
	Sem GB ¹			Com GB		
	1	2	3	1	2	3
MS (%)	81,43	80,64	79,27	75,83	68,60	68,88
Matéria orgânica	89,70	88,46	90,33	88,14	88,46	89,12
Proteína bruta	31,05	21,37	27,11	28,58	29,04	32,16
Fibra em detergente neutro	18,40	18,75	21,25	15,70	19,79	21,25
Fibra em detergente ácido	6,39	6,84	7,85	5,85	7,42	7,64
Cinzas	10,30	11,54	9,67	11,86	11,54	10,88
Lignina	2,09	1,24	2,38	0,78	2,17	2,24
Amido	31,80	32,60	28,40	14,10	12,70	14,20
Digestibilidade <i>in vitro</i> da MS (%)	85,31	84,66	83,92	86,69	86,26	87,64
Glicerol	0,52	0,58	0,49	17,13	15,11	15,37
Extrato Étereo	2,86	3,32	2,23	1,74	1,80	0,87
Carboidratos não fibrosos	39,39	47,77	42,24	44,62	45,33	41,03
Carboidratos totais	55,79	63,77	60,99	57,82	57,62	56,09
Nutrientes digestíveis totais	41,98	51,53	44,10	43,98	37,68	34,33

¹Glicerina bruta

Conforme observado na Tabela 6, os teores de glicerol nas dietas com inclusão de glicerina variaram de 5,7 a 7,7% da MS, com valor médio de 6,5% da MS, inferior aos

7,2% da MS preconizados na formulação da dieta com inclusão de glicerina (Tabela 2). Novamente, isto pode ser parcialmente atribuído à variação nos teores de MS do suplemento concentrado contendo GB, principalmente, nos períodos 2 e 3 (Tabela 5).

Tabela 6. Composição química das dietas com ou sem inclusão de glicerina bruta (GB), utilizadas nos três períodos experimentais, na base da matéria seca.

Composição química (% da MS)	Dietas/Período					
	Sem GB			Com GB		
	1	2	3	1	2	3
MS (%)	42,78	31,94	30,54	42,48	30,64	29,63
Matéria orgânica	93,25	91,86	91,46	93,25	91,97	91,05
Proteína bruta	15,36	13,77	15,97	14,67	16,14	17,61
Fibra em detergente neutro	32,80	40,86	41,69	31,55	41,91	42,01
Fibra em detergente ácido	17,59	24,54	23,23	17,21	25,29	23,40
Cinzas	6,75	8,14	8,54	6,75	8,03	8,95
Lignina	2,21	1,64	2,61	1,71	1,97	2,56
Amido	32,35	23,96	21,75	25,61	16,92	16,53
Digestibilidade <i>in vitro</i> da MS (%)	72,49	71,01	71,38	73,22	71,13	72,52
Glicerol	1,45	0,78	0,68	7,74	5,73	6,04
Extrato Étereo	3,98	3,93	2,92	3,54	3,43	2,44
Carboidratos não fibrosos	42,63	35,66	33,15	45,22	34,45	32,57
Carboidratos totais	73,91	74,17	72,58	75,04	72,40	71,00
Nutrientes digestíveis totais	59,64	58,89	53,05	61,06	55,64	50,87

4.2 - Consumo

Os consumos de MS, MO e FDN, expressos em kg/vaca/dia e em %PV; e os de PB, FDN, FDA, NDT, CHOT e CNF, expressos em kg/vaca/dia, não foram influenciados ($P>0,05$) pela inclusão de GB na dieta (Tabela 7). Para nenhuma destas variáveis houve efeito da interação tratamento x período ($P>0,05$).

San Vito (2010) avaliou dietas baseadas em silagem de milho (relação V:C de 50:50, base MS) com inclusão (7% da MS) ou não de GB em substituição ao milho grão fornecidas a vacas Holandês com 600 kg de peso corporal e produzindo, em média 30 kg/dia de leite. Os consumos de MS e FDN apresentados por este autor foram, de modo geral, superiores aos observados no presente estudo (Tabela 7), sendo, respectivamente, de 3,66 e 3,48%PV, e de 1,40 e 1,26%PV, para os tratamentos sem ou com inclusão de 7% de GB na MS da dieta. Leite et al (2006) trabalhando com vacas Holandês, com peso corporal de 550 kg e produção média de 25 kg/dia de leite, recebendo dieta a base de

silagem de milho e concentrado (relação V:C de 56:44, base MS), encontraram valores para CMS, CMO, CPB, CFDN, CFDA, CEE e CNDT, respectivamente, de 21,62; 20,28; 3,54; 9,92; 5,62; 0,64 e 14,74 kg/vaca/dia, ou seja, também superiores aos observados no presente estudo. Da mesma forma, Pereira et al. (2005) avaliando dieta com 15% de PB, baseada em silagem de milho (60% da MS) e concentrado, fornecida a vacas Holandês e H x Z, com peso corporal de 550 kg e produção de leite de 28 kg/dia, encontraram valores superiores aos dos presente estudo para CMS, CMO, CPB, CFDN, CEE e CNDT, respectivamente, de 19,11; 17,97; 3,01; 7,20; 0,63 e 12,99 kg/vaca/dia.

Tabela 7 - Consumos diários de matéria seca (CMS), de matéria orgânica (CMO) e de fibra em detergente neutro (CFDN), expressos em kg/vaca/dia e em porcentagem do peso corpóreo (%PV), e de fibra em detergente ácido (CFDA), de extrato étereo (CEE), de nutrientes digestíveis totais (CDNT), de amido (CAMIDO), de carboidratos totais (CCHOT), e de carboidratos não fibrosos (CCNF), expressos em kg/vaca/dia, de dietas baseadas em silagem de milho suplementada com concentrado contendo ou não glicerina bruta (GB), fornecidas a vacas Holandês x Gir em lactação

Consumo	Dieta		Erro padrão da média
	Sem GB	Com GB	
	<i>kg/vaca/dia</i>		
CMS	16,76	17,17	0,6067
CMO	15,45	15,79	0,5592
CPB	2,53	2,77	0,0936
CFDN	6,19	6,36	0,2470
CFDA	3,59	3,72	0,1392
CAMIDO	4,48 a	3,45 b	0,1633
CEE	0,65 a	0,58 b	0,0193
CNDT	11,27	11,47	0,4022
CCHOT	12,28	12,44	0,4472
CCNF	6,40	6,59	0,2175
	<i>% do peso corporal</i>		
CMS	3,05	2,92	0,1292
CMO	2,81	2,68	0,1188
CFDN	1,13	1,08	0,0507

Médias seguidas por letras diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

Os baixos consumos de MS das duas dietas, quando comparados, por exemplo, aos observados por San Vito (2010) e associados às respectivas baixas concentrações de NDT explicam, parcialmente, os menores consumos de NDT observados no presente estudo. Estas baixas concentrações de NDT nas dietas podem também ser atribuídas aos teores de amido nas silagens de milho (Tabela 4), principalmente, naquelas utilizadas na segunda e terceira fases do experimento, já que na primeira fase o teor médio foi de 32,7% da MS.

Nas silagens das duas últimas fases, os teores de amido variaram de 17,8 a 19,1% da MS, valores estes inferiores ao compilado por Valadares Filho et al. (2010), de 24,01% da MS.

Todavia, o baixo consumo de MS encontrado nesse experimento pode ser ainda parcialmente atribuído à resposta metabólica decorrente do aumento da produção e absorção de propionato produzido durante a fermentação do amido e/ou do glicerol (Rémond et al., 1993; Bergner et al., 1995). Estudos indicam que o aumento da produção e absorção de propionato no rúmen, podem estar relacionados à redução da ingestão de MS nos ruminantes (Allen & Bradford, 2009). Todavia, esse baixo consumo não foi verificado por Khalili et al. (1997) e Donkin & Doane (2007), quando o glicerol foi incluído em substituição ao milho grão em dietas de vacas em lactação nos níveis de 3,6% e 15% da MS.

Diferenças na ingestão de MS relatadas na literatura podem ser causadas pela composição da glicerina, que varia de acordo com o método de obtenção, e também por fatores intrínsecos ao glicerol no metabolismo do animal (Fávaro, 2010). Ademais, variações nas concentrações de água, metanol, fósforo e potássio, podem ser limitantes para o uso da glicerina na alimentação animal, além de também poder influenciar na palatabilidade da glicerina obtida, bem como na sua aceitabilidade (Chung et al., 2007).

O teor de cinzas encontrado na glicerina bruta utilizada está bem acima dos encontrados na literatura (Paige, 2009; San Vito, 2010; Zacaroni, 2010). Da mesma forma, o teor de metanol foi superior (Tabela 3) ao considerado seguro para o uso na alimentação animal. A amostra continha 200 ppm de metanol (0,02% na matéria natural), enquanto limites máximos de segurança são de 150 ppm para o Brasil e os EUA, respectivamente, enquanto que na Alemanha é de 5.000 ppm (Seller, 2008). Sintomas da intoxicação por metanol são neurológicos e associados a distúrbios da visão, estes últimos dependentes do acúmulo de ácido fórmico no organismo.

As doses letais de metanol variam de 700 a 13.000 mg/kg para ratos, coelhos e cães, e de 2.000 a 7.000 mg/kg para primatas (Eells et al. 1996, *apud* Zacaroni 2010). Apesar do teor de metanol na GB utilizada no presente estudo estar abaixo destes níveis, não deve ser descartado pequeno efeito sobre o consumo, já que a susceptibilidade de bovinos à intoxicação por metanol é desconhecida (Black et al., 1985, *apud* Zacaroni

2010). No entanto, vale lembrar que não houve efeito ($P>0,05$) da inclusão da GB na dieta sobre o CMS (Tabela 7).

Aparentemente, a inclusão de GB no concentrado não resultou em alterações de comportamento ingestivo das vacas, já que não observou-se qualquer rejeição à dieta com GB, dificuldade de adaptação ou outro tipo de problema clínico digestivo anormal durante o experimento.

Estudos para avaliar o potencial de intoxicação de vacas leiteiras por metanol em dietas suplementadas com GB são pertinentes, em função da pouca informação disponível sobre o tema.

Os valores observados para o CPB (Tabela 7) foram semelhantes entre os dois tratamentos experimentais ($P>0,05$). Isto pode ser considerado reflexo de que as dietas oferecidas foram isoproteicas, conforme se previa inicialmente (Tabela 2). Todavia, o teor de PB observado para o concentrado sem inclusão de GB no segundo período de avaliação foi bem abaixo dos demais. Tal análise foi repetida e os resultados confirmados. Sendo assim, isto pode ser parcialmente atribuído a algum problema de amostragem. Na Tabela 7, pode-se observar que os valores observados nas duas dietas para consumo de PB (2,53 a 2,77 kg/dia) estão abaixo do previsto pelo NRC (2001), de 2,79 kg/dia, para vacas de 550 kg de peso corporal e produção de 20 kg/dia de leite. Entretanto, mesmo assim, as vacas do presente experimento produziram acima de 20 kg/dia, conforme será discutido posteriormente.

Para o consumo de EE foi observada diferença ($P<0,5$) entre tratamentos, com o menor valor associado à dieta com inclusão de GB. Isto é coerente com a composição das duas dietas, haja vista a substituição de uma fonte contendo 4,01% de EE (fubá de milho) por outra contendo apenas 0,3% (glicerina) (Tabela 3). Da mesma forma, a substituição do fubá de milho na dieta controle por GB provocou diferença significativa ($P<0,05$) tanto no consumo de amido (Tabela 7) quanto de glicerol (Tabela 8). Novamente, isto foi decorrente das composições destas substâncias no fubá de milho e na GB. Ressalte-se, que no caso do consumo de glicerol, foi observada interação significativa ($P<0,05$) entre os fatores tratamento x período. Isto pode ser parcialmente atribuído às diferenças observadas nos teores de MS da silagem de milho e do suplemento concentrado com GB, que dificultou o alcance da relação V:C planejada.

Tabela 8 - Consumo diário de glicerol de dietas baseadas em silagem de milho suplementada com concentrado contendo ou não glicerina bruta (GB), fornecidas a vacas Holandês x Gir em lactação

Período	Dieta		Erro padrão da media
	Sem GB	Com GB	
1	268,14 Ab	1.454,63 Aa	40,0268
2	131,04 Bb	984,28 Ba	20,7154
3	95,27 Bb	901,14 Ca	25,3617

Médias seguidas por letras diferentes maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

4.3 – Digestibilidade aparente

Não houve efeito ($P > 0,05$) da inclusão de GB na dieta sobre os coeficientes de digestibilidade aparente da MS, MO, FDN, e PB (Tabela 11). Pires et al. (2008) utilizando vacas Holandês com 526 kg de peso corporal, 85 dias de lactação, e produzindo 16 kg/dia de leite, numa dieta com silagem de milho e concentrado na proporção 50:50, encontraram CMS de 14,86 kg/dia, e coeficientes de DMS (66,6%), DMO (67,0%), DFDN (47,4%) e DPB (74,2%), acima dos obtidos no presente trabalho. Da mesma forma, Costa et al. (2005), trabalhando com vacas Holandês recebendo dieta à base de silagem de milho na relação 60:40, com produção média de 22 kg/dia de leite e CMS de 19,32 kg/dia, encontraram valores de 66,9%; 68,3%; 53,3% e 69,3%, para DMS, DMO, DFDN e DPB, respectivamente.

Tabela 9 – Digestibilidade aparente (%) da matéria seca (DMS), matéria orgânica (DMO), fibra em detergente neutro (DFDN) e proteína bruta (DPB) de dietas baseadas em silagem de milho suplementada com concentrado contendo ou não glicerina bruta (GB), fornecidas a vacas Holandês x Gir em lactação.

Digestibilidade aparente (%)	Dieta		Coeficiente de variação (%)
	Sem GB	Com GB	
DMS	60,95	61,59	11,32
DMO	63,45	64,91	10,03
DFDN	38,71	39,58	29,74
DPB	61,65	66,17	9,39

Em contrapartida, Corrêa et al. (2003) trabalhando com silagem de milho de textura dura e macia, não encontraram diferença ($P > 0,05$) entre os híbridos dos milhos testados, quanto à digestibilidade aparente da MS, MO e FDN, para vacas com produção

média de 18 kg/dia de leite, sendo estes valores semelhantes aos valores encontrados no presente trabalho.

San Vito (2010) avaliou dietas baseadas em silagem de milho (relação V:C de 50:50, base MS) com inclusão (7% da MS) ou não de GB em substituição ao milho grão, fornecidas a vacas Holandês com 600 kg de peso corporal e produzindo, em média 30 kg/dia de leite. Os coeficientes de digestibilidade total da MS, MO e PB apresentados por este autor foram, de modo geral, semelhantes aos observados no presente estudo (Tabela 11), sendo, respectivamente, de 61,0%, 62,4% e 65,9%; e de 62,0%, 63,4% e 65,8%, para os tratamentos sem ou com inclusão de 7% de GB na MS da dieta, respectivamente.

4.4 – Produção e composição do leite

Os valores médios de produção e composição do leite estão na Tabela 9. Houve efeito ($P < 0,05$) da inclusão de GB na dieta apenas sobre a produção de leite corrigida para 4,0% de gordura (PLCG) e para o teor de nitrogênio ureico do leite (NUL). Não houve efeito da interação tratamento x período ($P > 0,05$), para nenhuma das variáveis de produção e composição do leite.

Tabela 10 - Produção e composição do leite de vacas Holandês x Gir alimentadas com dietas baseadas em silagem de milho suplementada com concentrado contendo ou não glicerina bruta (GB)

Variável	Dieta		EPM ¹
	Sem GB	Com GB	
Produção de leite (PL, kg/vaca/dia)	22,95	20,11	1,0240
PLC ² 4% de gordura (kg/vaca/dia)	23,16 a	20,39 b	0,9120
Teor de Gordura (%)	4,17	4,08	0,1407
Teor de Proteína (%)	3,35	3,43	0,0707
Teor de Lactose (%)	4,56	4,43	0,0727
Teor de sólidos totais (%)	13,06	12,90	0,1963
Teor de ESD ³ (%)	8,89	8,82	0,0848
Produção de proteína (kg/vaca/dia)	761,2	688,5	30,402
Produção de gordura (kg/vaca/dia)	931,8	822,7	39,774
Produção de lactose (kg/vaca/dia)	1055,5	900,3	54,311
Produção de sólidos totais (kg/vaca/dia)	2.973,2	2.604,6	124,10
Produção de ESD (kg)	2.041,1	1.782,3	92,371
Nitrogênio ureico (mg/dL)	19,38 b	21,47 a	0,5623

Médias seguidas por letras diferentes na linha diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey;

¹Erro Padrão da Média;

²Produção de leite corrigida para 4,0% de gordura: $((0,4 * \text{leite}(\text{kg})) + 15(\% \text{gordura}/100) * \text{leite}(\text{kg}))$, segundo NRC (2001);

³Extrato Seco Desengordurado.

Zacaroni (2010) avaliou a produção e composição do leite de vacas Holandês recebendo dietas baseadas em silagem de milho suplementada ou não com mistura isoproteica de GB (76,2% de glicerol e 8.800 ppm de metanol na matéria natural) e farelo de soja, em substituição ao fubá de milho finamente moído. A substituição de amido de milho por GB deprimiu ($P < 0,05$) a produção diária de leite de 23,4 para 21,3 kg/dia, sem afetar o CMS ($P > 0,05$). O teor de lactose foi menor no leite das vacas que receberam a dieta com inclusão de GB (4,42%), do que no das vacas que receberam a dieta controle (4,46%).

DeFrain et al. (2004) avaliaram a suplementação com GB (80,2% de glicerol e 1,3% de metanol) nos 21 dias anteriores à data prevista do parto até 21 dias pós-parto. Estes autores utilizaram trinta vacas que receberam os seguintes tratamentos: 0,86 kg/dia de amido de milho; 0,43 kg/dia de GB + 0,43 kg/dia de amido de milho; e 0,86 kg/dia de GB. Foi observado que a suplementação com GB reduziu o CMS no pré-parto e que a produção de leite não diferiu entre tratamentos, apesar da tendência de menor conteúdo de energia ($P = 0,09$) e gordura ($P = 0,13$) e menor produção diária de gordura ($P = 0,13$) nos tratamentos com GB.

As respostas encontradas no presente trabalho se assemelham às dos trabalhos citados anteriormente, onde a ausência de efeito da inclusão de GB sobre a produção e composição do leite, pode ser parcialmente explicada pelos consumos semelhantes ($P > 0,05$) de MS, PB, NDT e CNF das dietas.

A falta de energia na dieta como visto, prejudica a sincronização junto à proteína degradável no rúmen (PDR), pois haverá nitrogênio disponível no rúmen e faltará energia fermentável para os microrganismos do rúmen se multiplicarem. O atendimento a essa premissa favorece um aumento no consumo de alimentos pelo animal e desempenhos superiores.

Por outro lado, respostas diferentes para produção de leite foram encontradas em estudos com vacas recebendo dietas onde concentrados energéticos foram substituídos por glicerol (Fisher et al., 1971; Kahalili et al., 1997; De Frain et al., 2004; Bodarski et al., 2005; Ogborn, 2006; Chung et al., 2007; Wang et al., 2008).

As concentrações de NUL foram diferentes entre tratamentos ($P < 0,05$), sendo ambas superiores a 19 mg/dL. Os valores de NUL normalmente variam entre 12 e 16

mg/dL e teores acima de 19 mg/dL podem estar relacionados com efeitos negativos sobre a reprodução das vacas (Butler, 2000), já que o NUL reflete o metabolismo do nitrogênio no ruminante, e seu aumento pode estar associado ao excesso, bem como à qualidade da PB e/ou ao déficit de energia na dieta (Santos et al., 2011). Os CPB entre as duas dietas foram semelhantes ($P>0,05$; Tabela 7). No entanto, o concentrado com inclusão de GB apresentou em sua composição (Tabela 1), maior teor de farelo de soja e menor de fubá de milho, cujas degradabilidades ruminais são, respectivamente, de 75,92% e 92,08% (Valadares Filho et al., 2010). Ou seja, espera-se maior degradabilidade ruminal da PB da dieta com GB. Pela ação dos microrganismos no rúmen, e desde que haja disponibilidade de energia no rúmen, parte da PDR será transformada em proteína microbiana, e juntamente com a PNDR, irá fornecer à glândula mamária os aminoácidos necessários para a síntese da proteína do leite e/ou formação de tecido corporal.

Na ausência de uma fonte de energia com degradabilidade ruminal similar à da PB ingerida, a amônia em excesso produzida no rúmen, será transformada em ureia no fígado, processo este que demanda gasto energético para a vaca, e excretada na urina e no leite.

Não houve efeito da inclusão de GB sobre os consumos de NDT e CNF ($P>0,05$), porém o consumo de amido foi maior na dieta sem GB ($P<0,05$). É possível, que a maior degradabilidade ruminal da PB da dieta com GB, associado ao menor aporte de CNF sob a forma de amido possa ter provocado maior drenagem de amônia do rúmen para o fígado e, por conseguinte, maior ($P<0,05$) concentração de NUL no leite das vacas que consumiram a dieta com GB. Esta maior secreção de NUL no leite das vacas que consumiram GB pode ser ainda relacionada à menor produção de leite corrigida para gordura observada neste tratamento, já que a energia dispensada para o metabolismo da ureia no fígado não foi usada para produção de leite.

4.5 – Parâmetros sanguíneos

Wang et al (2008) e Donkin (2008) relataram que o NADH excedente da entrada do glicerol na via de *Emben-Meyerhof-Parnas* pode ser aproveitado pelos microrganismos ruminais aumentando a eficiência de absorção e incorporação da amônia ruminal à proteína bacteriana, o que segundo eles justificaria diminuição de amônia livre no rúmen e nitrogênio ureico no leite observados. No entanto, segundo Krehbiel (2008),

o glicerol pode tomar três destinos no rúmen, incluindo passagem (13%), fermentação (44%) e absorção (43%), sendo que, mais da metade do glicerol consumido não é fermentado no rúmen. Desta forma haveria redução de substrato para a síntese microbiana nas dietas com glicerina quando comparadas às com inclusão de milho grão.

Não houve efeito da inclusão de GB na dieta sobre o peso corporal das vacas ($P>0,05$), que apresentou valor médio de 576 kg, e nem sobre a conversão e eficiência alimentar corrigida para 4% de gordura ($P>0,05$), cujos valores foram de 1,42 e 1,18, e de 0,75 e 0,88, respectivamente para os tratamentos sem e com inclusão de GB na dieta.

Não houve efeito ($P>0,05$) da inclusão de GB nas dietas nem na interação tratamento x período sobre as concentrações plasmáticas de glicose e ureia (mg/dL) (Tabela 10). Há controvérsia sobre o efeito da suplementação de glicerina no teor plasmático de glicose, apesar da capacidade gliconeogênica do glicerol justificar o uso clássico do mesmo na prevenção e tratamento de cetose (Goff & Horst, 2001). A ausência de resposta para concentração plasmática de glicose decorrente da suplementação com glicerol tem sido observada (Ogborn, 2006; Chung et al., 2007; Rico et al., 2009).

Tabela 11 – Concentrações (mg/dL) de glicose e ureia no plasma de vacas Holandês x Gir alimentadas com dietas baseadas em silagem de milho suplementada com concentrado contendo ou não glicerina bruta (GB)

Metabólitos	Dietas		Erro padrão da média
	Sem GB	Com GB	
Glicose	68,6	69,9	1,62
Ureia	44,5	41,1	1,44

Contudo, com aproximadamente, 43% do glicerol absorvido pelo epitélio ruminal sendo drenado para o fígado (Krehbiel, 2008), esse glicerol se transforma em gliceraldeído-3-fosfato, podendo ser convertido em glicose/glicogênio ou fomentar o ciclo de Krebs (Lin, 1977). No caso de ruminantes, a maior parte do glicerol absorvido ou fermentado no rúmen é convertido em glicose (Donkin, 2008).

Alves et al. (2007) trabalharam com vacas Holandês com produção média de 30 a 35 kg/dia leite, e peso médio corporal de 648 kg, alimentadas com silagem de milho e concentrado. Estes autores encontraram valores abaixo (55,69 mg/dL) daqueles observados no presente trabalho. Imaizumi et al. (2002) avaliaram dietas com teores de 10,05 e 13,70 % de PB na proporção de 60:40, sendo usado silagem de milho como

volumoso e com vacas produzindo 12 kg/dia leite. Estes autores encontraram valores também baixos em relação aos obtidos no presente trabalho, sendo de 54,18 e 52,96 mg/dL.

Não houve efeito ($P>0,05$) da inclusão de GB sobre a concentração de ureia no plasma. Apesar do teor de NUL no leite ter sido maior na dieta com GB ($P<0,05$), isso pode ser parcialmente explicado pelo fato do NUL ser uma medida que reflete o conteúdo médio de ureia nos períodos matutino e vespertino, enquanto que a ureia plasmática indica a concentração no momento em que a amostra de sangue foi coletada. Segundo Gustafsson & Palmquist (1993), as concentrações de ureia plasmática e de $N-NH_3$ no rúmen variam com a frequência e intensidade do consumo de alimentos. Segundo estes autores, os picos diários de concentração de ureia plasmática ocorrem, aproximadamente, 1 a 2 h após a ocorrência do pico de $N-NH_3$ no rúmen ou 2 a 4 h após a alimentação. No presente experimento, as amostras de sangue foram coletadas antes da alimentação diária das vacas, o que pode ser reflexo da resposta encontrada.

CONCLUSÃO

Em dietas de vacas Holandês x Gir a suplementação da silagem de milho com níveis próximos de 7% de glicerina bruta em substituição ao fubá de milho, apresenta potencial para produção de 20 kg/dia de leite com elevado teor de sólidos.

No entanto, em dietas com glicerina bruta para vacas em lactação, estudos devem ser realizados para avaliar a inclusão de suplementos proteicos com menor degradabilidade ruminal que o farelo de soja e/ou de suplementos energéticos com características que possibilitem maior sincronismo na fermentação da proteína:carboidrato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, M. S., BRADFORD, B. J. Metabolic regulation of feed intake in cattle : a conceptual model . *Journal of Animal Science*. 87 : 3317-3334, 2009.

ALVES, A.C.N.; MATTOS, W.R.S.; SANTOS, F.A.P.; LIMA, M.L.P.; PAZ, C.C.P.; PEDROSO, A.M. Substituição parcial de silagem de milho por farelo de glúten de milho desidratado na alimentação de vacas holandesas em lactação. *R. Bras. Zootec.*, v.36, n.5, p.1590-1596, 2007.

BERCHIELLI, T.T.; GARCIA, A.V.; OLIVEIRA, S.G. “Principais técnicas de avaliação aplicadas em estudo de nutrição”. In:BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. *Nutrição de ruminantes*. 2ed. Jaboticabal, SP – Funep, 2011.

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

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

BRASIL. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA. *Plano Nacional de Agroenergia*. Brasília, 2005. 120p.

BUTLER, W.R. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Animal Reproduction Science*, v. 60-61, p.449-457, 2000.

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

CORRÊA, C.E.S.; PEREIRA, M.N.; OLIVEIRA, S.G.; RAMOS, M.H. Performance of Holstein cows fed sugarcane or corn silages of different grain textures. *Scientia Agricola*, v.60, n.4, p.621-629, Oct./Dec., 2003.

COSTA, M.G; CAMPOS, J.M.S.; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D.; MENDONÇA, S.S.; SOUZA, D.P.; TEIXEIRA, M.P. Desempenho produtivo de vacas leiteiras alimentadas com diferentes proporções de cana-de-açúcar e concentrado ou silagem de milho na dieta. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.34, n.6, p. 2437-2445, 2005.

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

DINIZ, G. De coadjuvante a protagonista: *Glicerina bruta obtida na produção de biodiesel pode ter muitas aplicações*, 2005. Disponível em: <http://cienciahoje.uol.com.br/noticias/quimica/de-coadjuvanteprotagonista/>. Acesso em: 19 de janeiro de 2012.

DONKIN, S. S.; DOANE, P. *Glycerol as a Feed Ingredient in Dairy Rations*. In: Three-State Dairy Nutrition Conference. The Ohio State University, Michigan State University, Purdue University. Fort Wayne, IN. pp. 97-103. 2007.

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

DONKIN, S. S. Glycerol from biodiesel production: the new corn for dairy cattle. *Brazilian Journal of Animal Science*, v. 37, suppl., p. 280-286, 2008.

DRACKLEY, J. K.; RICHARD, M. J.; BEITZ, D.C, YOUNG J. W. Metabolic Changes in Dairy Cows with Ketonemia in Response to Feed Restriction and Dietary 1,3-Butanediol. *Journal of Dairy Science*. v. 75, p. 1622-1634, 1992

ECHEVERRIA, R; MACKINNON, A; ROTULO, J; CHILIBROSTE, P. Milk production response to incremental levels of crude glycerol on diets of grazing dairy cows. In: ADAS, 2010, Colorado, Denver, EUA. *Journal Animal Science*, v. 88, E-Suppl. 2. Colorado, Denver, EUA : ADAS, 2010. V. 88, p. 713.

FÁVARO, V.R. *Utilização de glicerina, subproduto do biodiesel, na alimentação de bovinos*. Jaboticabal, SP: Universidade Estadual de São Paulo, 2010, 59p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de São Paulo, 2010

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

FREITAS, C.; PENTEADO, M. *Biodiesel energia do futuro*. 1ed. São Paulo: Letras Boreal, 2006. 146p.

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

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

GUSTAFSSON, A.H.; PALMQUIST, D.L. Diurnal variation of rumen ammonia, serum urea, and milk urea in dairy cows at high and low yields. *Journal of Dairy Science*, v.76, p.475-484, 1993.

IUPAC. International Union of Pure and Applied Chemistry. *A guide to iupac nomenclature of organic compounds – recommendations*, Blackwell scientific publications, 1993.

IMAIZUMI, H.; SANTOS, F.A.P.; PIRES, A.V.; NUSSIO, C.M.B.; BARNABÉ, E.C.; JUCHEM, S.O. Avaliação de diferentes fontes e teores de proteína na dieta sobre o desempenho, fermentação ruminal e parâmetros sanguíneos de vacas da raça Holandesa em final de lactação. *Acta Scientiarum*, Maringá, v.24, n.4, p. 1031-1037, 2002.

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

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

KHALILI, H.; VARVIKKO, T.; TOIVONEN, V.; HISSA, K.; SUVITIE, M. The effects of added glycerol or unprotected free fatty acids or a combination of the two on silage intake, milk production, rumen fermentation and diet digestibility in cows grass silage based diets. *Agricultural Food Science Finland*, Jokioinen, v. 6, n. 4, p. 345-360, Jan. 1997.

KIMURA, F.T.; MILLER, V.L. Improved determination of chromic oxid in cal feed and feces. *J. Agric. Food Chem.*, v.5, n. 2, p. 216-223, 1957.

KOZLOSKI, G.V. *Bioquímica dos ruminantes*. 1.ed. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2002. 140p.

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

LARSEN, A.C. *Co-digestão anaeróbica de glicerina bruta e efluentes de fecularia*. Cascavel, PR: Unioeste, 2009. 41f.. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2009.

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

LEHNINGER, A.L. Glicólise. In: *Princípios de Bioquímica*: LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L.; COX, M.M. 3ª EDIÇÃO 2002

LEITE, L.A.; SILVA, B.O.; REIS, R.B.; FARIA, B.N.; GONÇALVES, L.C.; COELHO, S.G.; SATURNINO, H.M. Silagens de girassol e de milho em dietas de vacas leiteiras: consumo e digestibilidade aparente. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.58, n.6, p.1192-1198, 2006.

LIN, E. C. C. Glycerol utilization and its regulation in mammals. *Annual Review of Biochemistry*, Palo Alto, v. 46, p. 765-795, 1977.

LOPES, F. C. F. *Determinação do consumo de forrageiras tropicais por vacas em lactação em condições de pastejo*. Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia, v. 52, p. 1-116, 2007. Belo Horizonte, Minas Gerais.

MOREIRA, E.A.; REIS, L.G.; ALEVATO, C.B.; MOURA, P.P.R.; DUQUE A.C.A.; MOTTA, E.F.; LOPES, F.C.F.; PEREIRA, L.G.R.; AZEVÊDO, J.A.G. Método de extração do glicerol livre por saponificação em alimentos para ruminantes. In: X Congresso Internacional do Leite. Maceió- Alagoas Outubro. *Anais...*:2011

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Nutrient requirements of dairy cattle*. 7. ed. Washinton, D.C.: National Academic Press. 2001. 381 p.

OFFICIAL *Methods of analysis*. 15 Ed., Arlington, VA: AOAC, 1990. 1141p.

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

PACHAURI, N; HE, B. “Value-added Utilization of Crude Glycerol from Biodiesel Production: A Survey of Current Research Activities”, 2006 *ASABE Annual International Meeting*, 9 - 12 July 2006.

PAIGE, G. *Variation in the chemical composition of crude glycerin: the knowledge bank at OSU*,2009.Disponível em: <http://hdl.handle.net/1811/37082>.Acesso em: 18 jan. 2012.

PASSOS,L. P. *Métodos Analíticos Laboratoriais em Fisiologia Vegetal*. Coronel Pacheco: Embrapa Gabo de leite, 1996. 223p.

PEREIRA, M.L.A.; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D.; CAMPOS, J.S.; LEÃO, M.I.; PEREIRA, C.A.R.; PINA, D.S.; MENDONÇA, S.S.Consumo, digestibilidade aparente total, produção e composição do leite em vacas no terço inicial da actação alimentadas com níveis crescentes de proteína bruta no concentrado. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.34, n.3, p.1029-1039, 2005.

PIRES, A.V.; SUSIN, I.; SIMAS, J.M.C.; SANTOS, F.A.P.; MENDES, C.Q.; OLIVEIRA JUNIOR, R.C.; FERNANDES, J.J.R.; ARAÚJO, R.C. Substituição de silagem de milho por cana-de-açúcar e caroço de algodão nos parâmetros ruminais, síntese de proteína microbiana e utilização dos nutrientes em vacas lactantes. *Ciência Animal Brasileira*, v.9, n.1, p.50-58, jan./mar., 2008.

PLÁ, J. A. Perspectivas do biodiesel no Brasil. *Indicadores Econômicos FEE*, Porto Alegre, v. 30, n. 2, p. 179-190, 2002.

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

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

ROBERGS, R.A. & GRIFFIN, S.E. Glycerol: biochemistry, pharmacokinetics and clinical and practical applications. *Sports Medicine* 26:145-167, 1998.

RUSSELL, J. B.; WALLACE, R. J.. Energy-yielding and energy-consuming reactions. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S.. *The rumen microbial ecosystem*. 2. ed. Suffolk: Blackie Academic & Professional, 1997. p. 246-328.

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

SANTOS, F.A.P.; PEDROSO, A.M. "Metabolismo de proteínas". In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. *Nutrição de ruminantes*. 2ed. Jaboticabal, SP – Funep, 2011.

SAS: Statistical analyses systems – SAS: User's guide: Statistics, Version 5.ed. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2002.

SCHRÖEDER, A.; SÜDEKUM, K.-H. *Glycerol as a by-product of biodiesel production in diets for ruminants*. In: N. Watten and P. A. Salisbury, ed. New Horizons for an Old Crop. Proc. 10th Int. Rapeseed Congr., Canberra, Australia, Sept. 26-29, Paper No. 241. 1999.

SEBRAE- SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. *Biodiesel*. 2007. 65p.

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

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

SILVA, D.J.; QUEIROZ, J.S. *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. 2. Ed. Viçosa: Imprensa Universitária, 2002. 235p.

SINDIRAÇÕES. *Ministério da agricultura autoriza novo uso para a glicerina*. Disponível em: http://www.sindiracoes.org.br/index.php?option=com_content&task=view&id=972&Itemid=86&date=2010-11-01 >. Acesso em 21 out, 2010.

SNIFFEN, C.J., O'CONNOR, J.D., VAN SOEST, P.J., FOX, D.J.; RUSSEL, J.B. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein

availability. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 70, n. 11, p. 3562-3577, Nov. 1992.

THOMPSON, G.E.; CHRISTIE, W.W. Extration of plasma triacylglycerols by the mammary gland of the lactating cow. *Journal of Dairy Research*, v.58, p.251-255, 1991.

TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Journal of the British Grassland Society*, v.18, p.104-111, 1963.

VALADARES FILHO, S.C.; MACHADO, P.A.S.; CHIZZOTTI, M.L.; AMARAL, H.F.; MAGALHÃES, K.A.; ROCHA JÚNIOR, V.R.; CAPELLE, E.R. *Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos*. 3ed - Viçosa, MG: UFV/DZO, 2010.

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 Hosltein dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, v. 151, n. 1, p. 12-20, May 2008.

WEISS, W.P.; CONRAD, H.R.; PIERRE, N.R.S. A theoretically-based model for predicting total digestible nutrient values of forages and concentrates. *Animal Feed Science Technology*, v.39, p.95-110, 1992.

WILLIAMS, C. H.; DAVID, D. J.; IISMAA, O. The determination of chromic oxide in faeces samples by atomic absorption spectrophotometry. *J. Agri. Sci.*, v. 59, p. 381-385, 1962.

WOLFINGER, R. D..*Covariance Structive Selection in General Mised Models*. Communication in Statistics, Simulation and Computation, v.22, n. 4, p. 1079-1106, 1993.

ZACARONI, O.F. *Resposta de vacas leiteiras à substituição de milho por glicerina bruta*. Lavras:MG: Universidade Federal de Lavras, 2010. 43p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, 2003.