

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**GLICERINA BRUTA NA ALIMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS**

CÁSSIO ANDRÉ WILBERT  
Médico Veterinário/UFRGS  
Mestre em Zootecnia/UFRGS

Tese apresentada como um dos requisitos à obtenção do Grau de Doutor em  
Zootecnia  
Área de Concentração Produção Animal

Porto Alegre (RS), Brasil  
Junho de 2012

### CIP - Catalogação na Publicação

Wilbert, Cássio André  
GLICERINA BRUTA NA ALIMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS  
/ Cássio André Wilbert. -- 2012.  
161 f.

Orientador: Ênio Rosa Prates.  
Coorientador: Júlio Otávio Jardim Barcellos.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Produção animal. 2. Nutrição ruminantes. 3. Avaliação alimentos. 4. Alimentação de bovinos leiteiros. 5. Subprodutos biodiesel. I. Prates, Ênio Rosa, orient. II. Barcellos, Júlio Otávio Jardim, coorient. III. Título.

CASSIO ANDRÉ WILBERT  
Médico Veterinário e  
Mestre em Zootecnia

## TESE

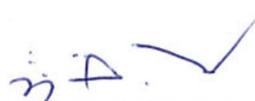
Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de

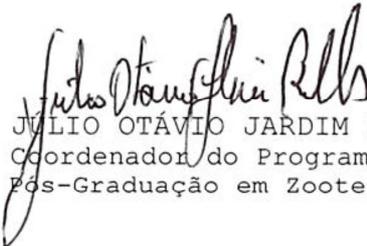
### DOUTOR EM ZOOTECNIA

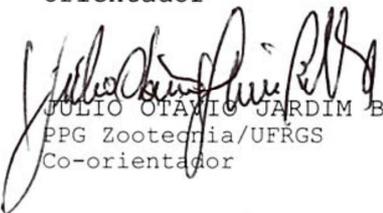
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 20.06.2012  
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 24.08.2012  
Por

  
ÊNIO ROSA PRATES  
PPG Zootecnia/UFRGS  
Orientador

  
JÚLIO OTÁVIO JARDIM BARCELLOS  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia

  
JÚLIO OTÁVIO JARDIM BARCELLOS  
PPG Zootecnia/UFRGS  
Co-orientador

  
VIVIAN FISCHER  
PPG Zootecnia/UFRGS

  
DIMAS ESTRASULAS DE OLIVEIRA  
UDESC

  
JORGE SCHAPHAUSER JR  
EMBRAPA

  
PEDRO ALBERTO SELBACH  
Diretor da Faculdade de Agronomia

## DEDICATÓRIA

À Vivi e Alice.

## AGRADECIMENTOS

À minha esposa Viviane, companheira em todos os momentos.

À minha filha Alice, pela sua simples existência que me enche de alegria.

À meus pais, meu irmão, minha cunhada e minha afilhada que sempre me apoiaram e, mesmo quando distantes, sempre estiveram muito perto.

Ao professor Ênio Prates, exemplo de caráter, competência, dedicação e inteligência, especialmente pela confiança em mim depositada.

Ao professor Júlio Barcellos, que com sua visão sistêmica e integrada dos processos ajudou muito no meu desenvolvimento.

À Embrapa Clima Temperado, especialmente ao Dr. Waldy Stumpf Jr. e ao Dr. Jorge Schafhäuser Jr., por acreditarem em nosso projeto e abrirem as portas da Embrapa.

À toda a equipe do SISPEL (Álcio, Christiano, Edenílson, Fernando, Gílson, Guaraci, Júlio, Rogério e estagiários Paola e Rafael).

Ao pessoal da Fazenda do Araçá (Sr. Paulinho, D. Olinda, Alexandre, Cristiano, Cleiton e estagiária Jéssica) que me acolheu como se fosse da família.

Um agradecimento especial a UFRGS, sem a qual nunca chegaria a semelhante momento.

À Granol S.A. pelo apoio financeiro e ao Alexandre Rotta pela confiança.

Às gurias do Laboratório de Nutrição Animal e da secretaria do PPG em Zootecnia (Andressa, Cláudia, Ione, Maria e Mônica).

Ao CNPq pelo financiamento deste projeto e pela concessão de bolsa de estudos.

Muito obrigado!

## GLICERINA BRUTA NA ALIMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS<sup>1</sup>

**Autor:** Cássio André Wilbert

**Orientador:** Ênio Rosa Prates

**Co-orientador:** Júlio Otávio Jardim Barcellos

**RESUMO** – Foram realizados dois ensaios com o objetivo de avaliar a glicerina bruta (GLB) como alimento energético alternativo e como aditivo precursor da gliconeogênese. No primeiro foram utilizadas oito vacas no terço médio de lactação, em um quadrado latino duplo, com uma inclusão de 0, 4, 8 ou 12% de GLB na dieta. Foram avaliadas a produção e a composição do leite, consumo de alimentos, digestibilidade e indicadores bioquímicos do metabolismo energético. O consumo de GLB não influenciou a produção média diária, produção de leite corrigido para 4% de GB, produção e concentração média diária de GB, lactose ou sólidos totais. A concentração de PB foi maior na inclusão de 12% do que no controle, enquanto a produção média diária de PB foi maior com uma inclusão de 8%. Nenhum dos tratamentos influenciou o consumo, eficiência alimentar, digestibilidade, concentração de AGNE ou uréia. Entretanto, a eficiência energética foi influenciada de maneira cúbica. A glicemia respondeu de uma maneira quadrática, sendo menor com 4 e 8% de GLB. No segundo ensaio foram utilizadas 24 vacas divididas entre três tratamentos (controle - TC, 1 mL de GLB/kg de PV – TG, ou 1mL de propilenoglicol/kg de PV - TP), em um delineamento de blocos completos casualizados. Os tratamentos iniciaram duas semanas pré e terminaram duas semanas pós-parto, as avaliações foram realizadas até a décima semana de lactação. Foram avaliadas a produção e a composição do leite, ECC, intervalo parto-1º cio e indicadores bioquímicos do metabolismo energético. Estudando os resultados médios para cada período de duas semanas, foi observada uma maior produção média diária de leite em todos os períodos no TP do que no TC. Na comparação com o TG, esta diferença existiu até a oitava semana de lactação, com exceção da quarta semana, quando foi observada uma tendência para esta diferença ( $P < 0,10$ ). O TP também apresentou uma maior produção média de leite corrigido para 4% de GB, enquanto a produção das vacas do TC foi superior à observada no TG. O TP e o TG influenciaram negativamente a concentração de GB. A produção média diária de GB foi menor no TG do que nos demais tratamentos. A concentração de lactose foi menor no TP, porém, este foi o tratamento com maior produção média diária deste componente. A concentração de NUL foi menor nas vacas tratadas. Não houve influência dos tratamentos estudados sobre o intervalo parto-1º cio, ECC, glicemia, concentração de AGNE ou de BHBO. A GLB é um bom alimento energético alternativo, em um nível de inclusão de até 12%, substituindo parcialmente o grão de milho moído na alimentação de vacas leiteiras. Entretanto, os resultados observados demonstram que o propilenoglicol é mais efetivo como aditivo precursor da gliconeogênese.

<sup>1</sup>Tese de Doutorado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (161 p.). Junho, 2012.

## CRUDE GLYCERIN IN THE DAIRY COWS FEEDING

**Author:** Cássio André Wilbert

**Advisor:** Ênio Rosa Prates

**Co-advisor:** Júlio Otávio Jardim Barcellos

**ABSTRACT** - There were made two experiments with the aim to evaluate crude glycerin (CG) as an alternative energy feed and as a gluconeogenic additive for dairy cows. In the first experiment were used eight cows in the mid of lactation, in a double latin square design, receiving four CG inclusion levels in the diet (0, 4, 8 or 12%). There were evaluated the milk production and composition, feed intake, digestibility and biochemical indicators from the energy metabolism. The CG intake did not influence the mean milk production, 4% fat-corrected milk, production and concentration of fat milk, lactose or total solids. The CP concentration was greater in the 12% inclusion than in the control, while the mean CP production was greater with the 8% inclusion. No one of the treatments influenced significantly the DMI, the OMI or the feed efficiency. However, the energy efficiency was influenced in a cubic manner. The DMD, OMD, NDFD and the seric concentrations of NEFA and urea were not influenced by the treatments. The blood glucose respond in a quadratic manner, being smaller in the 4 and 8% inclusion. In the second experiment were used 24 cows allocated in three treatments (control – CT, 1 mL of CG/kg of BW - GT, or 1 mL of propylene glycol/kg of BW – PT) in complete randomized blocks. The treatments started two weeks pre and were finished two weeks postpartum, the evaluations were made until the 10<sup>th</sup> week of lactation. It were evaluated the milk production and composition, BCS, partum-1<sup>st</sup> estrus period and biochemical indicators from the energy metabolism. There was observed a greater milk production in all of the five study periods in the PT than CT and in the first eight lactation weeks than GT, with exception of the fourth week, when was observed a tendency to this difference ( $P < 0,10$ ). The PT showed a greater 4% fat-corrected milk production, while the production of the cows in the CT was greater than the GT. The intake of gluconeogenic influenced the fat milk concentration in a negative manner. The daily mean production of fat milk was small in the GT than in other treatments. The lactose concentration was smallest in the PT, but, that was the treatment with the biggest daily mean production of this component. The MUN was decreased in the treated cows. There was not influence of the treatments over the partum-1<sup>st</sup> estrus period, BCS, blood glucose, NEFA or beta-hidroxybutirate. The CG is a good alternative energy feed, in an inclusion up to 12%, replacing partially the corn grain in the dairy cows feeding. However, the observed results demonstrate that the propilene glycol is more effective as a gluconeogenesis precursor.

---

<sup>2</sup> Doctoral Thesis in Animal Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (161 p.). June, 2012.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>11</b>
<b>1.1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>14</b>
1.2.1. O Biodiesel .....	14
1.2.1.1. Biodiesel – história .....	14
1.2.1.2. Biodiesel – processo de produção .....	15
1.2.1.3. Biodiesel - importância .....	15
1.2.2. O glicerol .....	16
1.2.2.1. O resíduo (ou subproduto) glicerina .....	16
1.2.2.2. Utilizações da glicerina .....	17
1.2.2.3. Variação na composição da glicerina.....	18
1.2.3. A gliconeogênese em ruminantes .....	18
1.2.3.1. Importância da gliconeogênese para os ruminantes.....	18
1.2.3.2. Substâncias precursoras da gliconeogênese.....	19
1.2.3.3. Mecanismo da gliconeogênese.....	20
1.2.4. Digestão do glicerol.....	20
1.2.4.1. O processo de fermentação ruminal do glicerol.....	21
1.2.5. A glicerina/glicerol na alimentação animal.....	23
1.2.5.1. Os efeitos da contaminação por metanol.....	23
1.2.5.2. Valor energético da glicerina.....	23
1.2.5.3. Resultados produtivos.....	24
1.2.6. O período de transição .....	25
1.2.6.1. Princípios básicos de manejo.....	25
1.2.6.2. Adaptações fisiológicas.....	26
1.2.6.3. Alterações no período - consumo .....	26
1.2.6.4. Alterações metabólicas .....	27
1.2.6.4.1. Influência das alterações metabólicas sobre a reprodução ...	29
1.2.7. O uso do glicerol durante o período de transição.....	30
1.2.7.1. Formas de administração.....	32
1.2.8. Outros aditivos utilizados durante o período de transição .....	33
1.2.8.1. Propilenoglicol.....	33
1.2.8.2. Propionato.....	34
<b>1.3. HIPÓTESES E OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
<b>2. CAPÍTULO II.....</b>	<b>36</b>
<b>Glicerina bruta como alimento energético alternativo para vacas leiteiras .....</b>	<b>37</b>
2.1. Introdução .....	39
2.2. Material e métodos.....	41
2.2.1. Local.....	41
2.2.2. Instalações .....	41
2.2.3. Animais experimentais .....	42
2.2.4. Tratamentos .....	42
2.2.5. Dietas experimentais .....	43
2.2.6. Delineamento experimental.....	43
2.2.7. Manejo experimental .....	44

2.2.8. Avaliações .....	45
2.2.9. Análise estatística.....	47
2.3. Resultados .....	48
2.4. Discussão .....	49
2.4.1. Produção de leite.....	49
2.4.2. Composição do leite .....	50
2.4.3. Consumo .....	52
2.4.4. Digestibilidade .....	52
2.4.5. Eficiência .....	53
2.4.6. Parâmetros bioquímicos.....	54
2.5. Conclusões .....	56
Referências .....	56
<b>3. CAPÍTULO III.....</b>	<b>68</b>
<b>Glicerina bruta como aditivo precursor da gliconeogênese durante o período de transição em vacas leiteiras.....</b>	<b>69</b>
3.1. Introdução .....	72
3.2. Material e métodos.....	74
3.2.1. Local.....	75
3.2.2. Animais experimentais .....	75
3.2.3. Tratamentos .....	75
3.2.4. Dietas experimentais .....	75
3.2.5. Delineamento experimental.....	76
3.2.6. Manejo experimental .....	76
3.2.7. Avaliações .....	77
3.2.8. Análises estatísticas .....	78
3.3. Resultados .....	79
3.4. Discussão .....	83
3.5. Conclusões .....	91
Referências .....	91
<b>4. CAPÍTULO IV .....</b>	<b>110</b>
<b>Considerações finais.....</b>	<b>111</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>113</b>
<b>6. APÊNDICES .....</b>	<b>126</b>

## RELAÇÃO DE TABELAS

### CAPÍTULO II

Tabela 1. Composição das dietas experimentais (g/kg de MS).....	61
Tabela 2. Produção de leite (L/dia), produção de leite corrigido para 40 g de GB/L (PLCG, L/dia), gordura bruta no leite (GB, g/L), produção de gordura bruta (kg), proteína bruta no leite (PB, g/L), produção de proteína bruta (kg), lactose (g/L) e produção de lactose (kg).....	62
Tabela 3. Consumo de matéria seca (CMS, kg e g/kg de peso corporal), consumo de matéria orgânica (CMO, kg e g/kg de peso corporal), eficiência alimentar (leite prod./CMS; leite prod./CMO; PLCG/CMS; PLCG/CMO), eficiência energética (ELI prod./ELI cons.).....	63
Tabela 4. Coeficientes de digestibilidade da matéria seca (CDMS), matéria orgânica (CDMO) e fibra em detergente neutro (CDFDN).....	65
Tabela 5. Parâmetros sanguíneos: glicose (mg/dL), ácidos graxos não-esterificados (AGNE, mmol/L) e uréia (mg/dL).....	66

### CAPÍTULO III

Tabela 1. Composição das dietas (porção fornecida no cocho; g/kg de MS)...	99
Tabela 2. Composição química dos alimentos (g/kg MS).....	100
Tabela 3. Produção de leite (L/dia), produção de leite corrigido para 40 g de GB/L (PLCG, L/dia), gordura bruta no leite (GB, g/L), produção de gordura bruta (kg/dia), proteína bruta no leite (PB, g/L), produção de proteína bruta (kg/dia), lactose (g/L), produção de lactose (kg/dia), nitrogênio uréico no leite (NUL, mg/dL), intervalo parto- 1º cio (IPC, dias) .....	101
Tabela 4. Escore de condição corporal (ECC), concentração sanguínea de glicose, ácidos graxos não-esterificados (AGNE) e beta-hidroxibutirato (BHBO).....	107

## RELAÇÃO DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

Figura 1. Fluxograma do processo de geração do biodiesel.....15

### CAPÍTULO II

Figura 1. Efeito da inclusão de glicerina bruta (g/kg) sobre a eficiência energética.....64

Figura 2. Efeito da inclusão de glicerina bruta (g/kg) sobre a concentração sanguínea de glicose (mg/dL).....67

### CAPÍTULO III

Figura 1. Produção média diária de leite (A) e produção média diária de leite corrigido para 40 g de gordura bruta/L (B) de vacas do tratamento controle (●), glicerina bruta (■), propilenoglicol (▲).....102

Figura 2. Concentração de proteína bruta no leite (A) e produção média diária de proteína bruta (B) de vacas do tratamento controle (●), glicerina bruta (■), propilenoglicol (▲).....103

Figura 3. Efeito da interação entre tratamento e tempo pós-parto sobre a concentração de gordura bruta do leite (A) e produção média diária de gordura bruta (B) de vacas do tratamento controle (●, ----), glicerina bruta (■, - - - -), propilenoglicol (▲, ———).....104

Figura 4. Concentração de lactose no leite (A) e produção média diária de lactose (B) de vacas do tratamento controle (●), glicerina bruta (■), propilenoglicol (▲).....105

Figura 5. Nitrogênio uréico no leite (NUL, mg/dL) de vacas do tratamento controle (●), glicerina bruta (■), propilenoglicol (▲).....106

Figura 6. Nitrogênio uréico no leite (NUL, mg/dL) de vacas do tratamento controle (●), glicerina bruta (■), propilenoglicol (▲).....108

Figura 7. Concentração sanguínea de glicose (A), ácidos graxos não-esterificados (B) e de beta-hidroxibutirato (C) de vacas do tratamento controle (●), glicerina bruta (■), propilenoglicol (▲).....109

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP: adenosina difosfato  
AGNE: ácidos graxos não-esterificados  
AGVs: ácidos graxos voláteis  
ATP: adenosina trifosfato  
BHBO: beta-hidroxibutirato  
CMO: consumo de matéria orgânica  
CMS: consumo de matéria seca  
ECC: escore de condição corporal  
EE: extrato etéreo  
DFDN: digestibilidade da fibra em detergente neutro  
DMO: digestibilidade da matéria orgânica  
DIVMS: digestibilidade *in vitro* da matéria seca  
ELI: energia líquida de lactação  
EM: energia metabolizável  
FSH: hormônio folículo-estimulante  
GBP: glicerina bruta purificada  
GLB: glicerina bruta  
GMD: ganho médio diário  
GnRH: hormônio liberador de gonadotrofina  
IGF-I: fator de crescimento semelhante à insulina tipo I  
LH: hormônio luteinizante  
MO: matéria orgânica  
MS: matéria seca  
NUL: nitrogênio uréico no leite  
VLDL: *very low density lipoprotein* (lipoproteína de muito baixa densidade)

## **CAPÍTULO I**

## 1.1. INTRODUÇÃO

Mesmo antes de haver um consenso sobre o conceito de biodiesel, este passou a ser um importante combustível renovável, não somente no Brasil, mas em todo o mundo, e a perspectiva é de crescimento na sua produção. Apesar da menor emissão de gases do efeito estufa ser a vantagem mais citada pelos especialistas, não se pode desprezar que a utilização de combustíveis renováveis diminui bastante a dependência por combustíveis fósseis, melhorando a balança comercial de países que ainda não alcançaram a autossuficiência em combustíveis, como é o caso do Brasil.

O principal (até então) resíduo da produção do biodiesel é a glicerina bruta, que após vários processos de purificação alcança os padrões exigidos pelas indústrias farmacêuticas, de cosméticos e de produtos de limpeza, suas principais consumidoras, sendo considerado um subproduto. Porém, estes mercados não apresentam o mesmo crescimento que a indústria produtora de biodiesel nos últimos anos. Sendo assim, o aumento do excedente desse resíduo passou a ser considerado um grande problema. Qual o correto destino dessa glicerina bruta, já que o processo de purificação é muito oneroso e uma grande oferta do produto baixaria muito os preços recebidos, tornando inviável esse processo? As indústrias serão obrigadas a desembolsar mais dinheiro para que esse resíduo tenha um destino adequado? Em que grau isso impactará os preços do biodiesel? Em função disso, a pergunta que moveu este trabalho foi a seguinte: por que não encarar este problema como oportunidade e tratar este “resíduo” como subproduto, utilizando-o na alimentação animal?

O maior componente da glicerina bruta é o glicerol, importante precursor da gliconeogênese. Sabendo da importância da gliconeogênese para os ruminantes, especialmente para as vacas leiteiras, animais de alta exigência nutricional, por que não utilizar a glicerina bruta como alimento energético alternativo?

A fase mais crítica no ciclo produtivo das vacas de alta produção é o período compreendido entre as três últimas semanas de gestação e as três primeiras semanas de lactação (período de transição), principalmente devido ao grande déficit energético vivido nesse período, então, por que não utilizar a glicerina bruta como precursor da gliconeogênese?

Esses questionamentos moveram o trabalho realizado, que iniciou com uma extensa revisão sobre os temas até aqui citados (Capítulo I). A partir desta, ficou constatado que vários questionamentos ainda não haviam sido respondidos, mesmo com mais de 50 anos de pesquisas sobre a utilização da glicerina bruta na alimentação animal.

No Capítulo II é apresentado o artigo que trata da inclusão de diferentes níveis de glicerina bruta na dieta de vacas leiteiras no terço médio de lactação, em que foi avaliada a sua influência sobre a produção e a composição do leite, consumo de alimentos, digestibilidade e indicadores bioquímicos do metabolismo energético.

No Capítulo III é apresentado o artigo que trata da utilização de glicerina bruta como precursor da gliconeogênese durante o período de transição, comparando-a com o mais comum aditivo alimentar utilizado para

este fim (propilenoglicol). Foram avaliadas a produção e a composição do leite, bem como indicadores metabólicos do metabolismo energético.

Por fim, no Capítulo IV são apresentadas as considerações finais baseadas nos capítulos acima descritos.

Ao final deste trabalho, o leitor ficará com a certeza de que vários questionamentos não foram respondidos. Porém, sem sombra de dúvidas novos questionamentos também serão formulados pelo leitor. Se isto ocorrer, pode-se afirmar que o presente trabalho cumpriu com seu compromisso com a ciência, afinal, o que é ciência a não ser um questionamento após o outro?

## 1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.2.1. O Biodiesel

O conceito de biodiesel ainda está em discussão e não encontra um consenso. Entretanto, a definição adotada pelo Programa Brasileiro de Biodiesel é: “combustível obtido de misturas, em diferentes proporções, de diesel fóssil e álquil ésteres de óleos vegetais ou gorduras animais”. Tecnicamente, segundo Pinto et al. (2005), biodiesel é o álquil éster de ácidos graxos, obtido pela transesterificação de óleos ou gorduras, de plantas ou animais, com álcoois de cadeias curtas tais como o metanol e o etanol.

#### 1.2.1.1. Biodiesel – história

A seguir é apresentado um breve histórico sobre o biodiesel (Câmara, 2006; Goes et al., 2010):

- 23 de fevereiro de 1892: o engenheiro alemão Rudolph Christian Karl Diesel (1858-1913) obtém a patente para o seu motor de auto-ignição.
- 10 de agosto de 1897: Rudolph Diesel coloca em funcionamento o primeiro modelo do motor a diesel. Em 1898 este motor é apresentado na Feira Mundial de Paris, utilizando como combustível o óleo de amendoim.
- 1911: Rudolf Diesel faz a seguinte afirmação: *“O motor a diesel pode ser alimentado por óleos vegetais, e ajudará no desenvolvimento agrário dos países que vierem a utilizá-lo. O uso de óleos vegetais como combustível pode parecer insignificante hoje em dia, mas com o tempo, irá se tornar tão importantes quanto o petróleo e o carvão são atualmente.”*
- Década de 20: No Brasil, o Instituto Nacional de Tecnologia (INT), estuda e testa combustíveis alternativos e renováveis a partir da palma, algodão e amendoim.
- Década de 70: A Universidade Federal do Ceará (UFC) desenvolve pesquisas sobre fontes alternativas de energia que culminaram com a descoberta de um novo combustível: o biodiesel.
- Década de 80: Registro da primeira patente mundial do biodiesel obtida pelo Prof. Expedito Parente, da UFC – Patente “PI-8007959”.
- 2004: É lançado, em 06 de dezembro, o Programa Brasileiro de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB). Foram se sucedendo edições de Leis, Atos Normativos e Regulamentos que formam todo o arcabouço legal que norteia as iniciativas do biodiesel no Brasil.
- 2005: Em janeiro, é publicada a Lei nº 11.097 que dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira. A partir dessa publicação a Agência Nacional do Petróleo (ANP) assumiu a atribuição de regular e fiscalizar as atividades relativas ao biodiesel. Realização do 1º leilão. Adição facultativa de 2% do biodiesel no diesel.
- 2008/2009: Início da obrigatoriedade da mistura de 2% de biodiesel no diesel. Em junho de 2008 é autorizado o aumento para 3% (Resolução nº 2 do Conselho Nacional de Política Energética- CNPE). Em julho de 2009 entrou em vigor a adição de 4% de biodiesel.
- 2010: A partir de primeiro de janeiro de 2010, a resolução CNPE nº 6/2009 publicada no Diário Oficial de 18 de fevereiro de 2009 permite a adição de 5% biodiesel no diesel combustível fóssil.

### 1.2.1.2. Biodiesel – processo de produção

O processo de produção de biodiesel (Figura 1) é composto das seguintes etapas: preparação da matéria-prima, reação de transesterificação, separação de fases, recuperação e desidratação do álcool, destilação da glicerina e purificação do biodiesel.

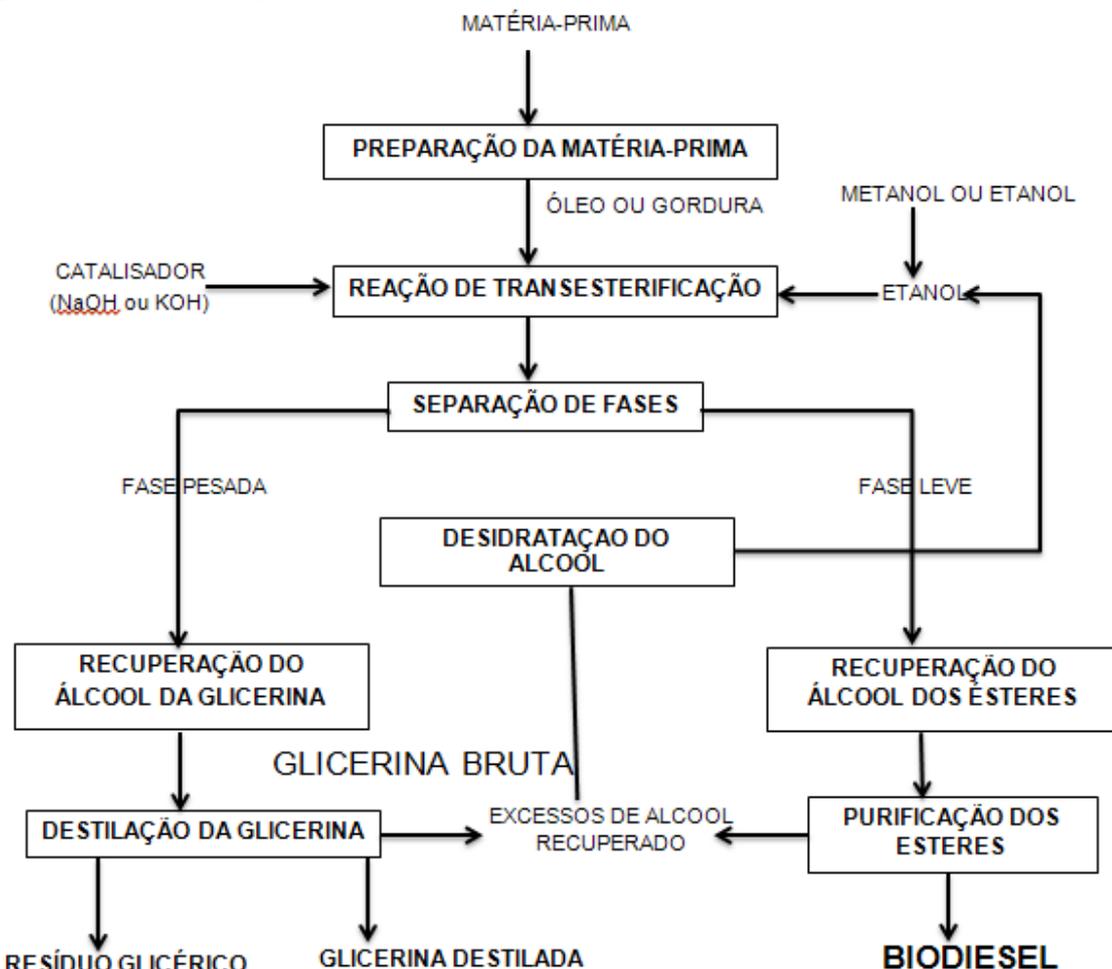


Figura 1. Fluxograma do processo de geração do biodiesel (adaptado de: Holanda, 2004)

A transesterificação é a reação de um lipídio com um álcool simples (etanol ou metanol, sendo o metanol o mais comumente utilizado) para formar ésteres, gerando um subproduto, a glicerina bruta. Como essa reação é reversível, faz-se necessário um excesso de álcool para forçar o equilíbrio para o lado do produto desejado. A estequiometria para a reação é de 3:1 (álcool:lipídio). Um catalisador ácido, básico ou enzimático é normalmente usado para acelerar a reação (o hidróxido de sódio é o catalisador mais usado) (Holanda, 2004).

### 1.2.1.3. Biodiesel - importância

Embora ainda não possa substituir inteiramente o diesel fóssil, o biodiesel merece atenção por algumas características (Van Gerpen, 2005):

1. Mercado para óleos vegetais e gorduras animais em excesso;

2. Diminuição na dependência de petróleo importado (em 2008, por exemplo, a economia de petróleo estimada com o uso de biodiesel, foi de US\$ 992 milhões; Goes et al., 2010);

3. É um combustível renovável,

4. É menos poluente;

5. Pode melhorar as propriedades do diesel fóssil.

De março a dezembro de 2005, a produção brasileira de biodiesel foi de 736,1 mil litros. Em 2011, a produção foi de 2,64 bilhões de litros (ANP, 2012).

Esse grande aumento na produção de biodiesel é um fenômeno que não ocorre somente no Brasil. A produção mundial de biodiesel projetada para 2019 é de cerca de 41 bilhões de litros (OECD-FAO, 2010). Nos EUA, a produção de biodiesel em 2008 já havia superado os 2,5 bilhões de litros (National Biodiesel Board, 2010).

Além disso, a glicerina, principal resíduo da produção do biodiesel, depois de purificada, é um subproduto valioso da reação, cuja venda aumenta a receita econômica total do processo.

### **1.2.2. O glicerol**

Glicerol é o nome comum do composto orgânico 1,2,3-propanotriol, descoberto por Carl W. Scheele em 1779 durante a separação de uma mistura aquecida de PbO preparada com óleo de oliva (The Soap and Detergent Association, 1990). Os seus sinônimos são glicerina, trihidroxipropano, glicil álcool, gliceril e 1,2,3-trihidroxipropano (OECD-SIDS, 2002). É um álcool trihidratado, viscoso, incolor, inodoro, de sabor adocicado, higroscópico, solúvel em água e álcool em todas as proporções e pouco solúvel em éter, acetato de etila e dioxano e insolúvel em hidrocarbonetos. Sua fórmula química é  $\text{OH-CH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-OH}$  (Pachauri & He, 2006).

Na natureza, o glicerol existe em vegetais (soja, mamona, babaçu, girassol, palma, algodão, coco, dendê, pinhão manso) e animais na forma combinada com ácidos graxos (triglicerídeos). Também é um composto considerado fundamental dentro do sistema metabólico de microrganismos, atuando como precursor de numerosos compostos e como regulador de vários mecanismos bioquímicos intracelulares (Lages et al., 1999). Além disso, é um importante precursor da gliconeogênese, quando mobilizado através da lipólise.

Normalmente, a indústria trata como glicerina o resíduo da produção do biodiesel, mesmo que este não seja seu único componente. Para não gerar confundimento, no presente trabalho, glicerina bruta (GLB) será chamada o resíduo (e potencial subproduto) da produção de biodiesel com pureza inferior a 85%, glicerina bruta purificada (GBP) o composto com 85 a 99,5% de glicerol, enquanto glicerol será chamada a substância com, no mínimo, 99,5% de pureza.

#### **1.2.2.1. O resíduo (ou subproduto) glicerina**

Por muito tempo, a produção de glicerina aconteceu por síntese química a partir do propileno, encarecendo muito seus custos (Cavalheiro et al., 2011). Porém, atualmente a realidade é outra.

Com o grande incremento na produção de biodiesel surgiu a preocupação de se encontrar novos usos para a glicerina derivada deste processo, pois para cada litro de biodiesel produzido, são gerados cerca de

100 mL de GLB (Dasari et al., 2005). Sendo assim, somente no ano de 2011, estima-se que tenham sido geradas 264.000 toneladas de GLB no Brasil (ANP, 2012). Nos Estados Unidos, estima-se que tenham sido produzidos cerca de 30 milhões de toneladas de GLB, em 2008 (Parsons, 2010).

A GLB apresenta-se na forma de líquido viscoso pardo escuro, que contém quantidades variáveis de sabão, álcool (metanol ou etanol), monoacilglicerol, diacilglicerol, oligômeros de glicerol, polímeros e água (Ooi et al., 2004). A porcentagem de glicerol é bastante variável, porém normalmente varia entre 65 a 70%. Este resíduo é submetido ao processo de acidulação com ácido concentrado (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ou H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) para a separação de glicerol e ácidos graxos do sabão. No entanto, a maior parte dos processos de tratamento de glicerol é conduzida utilizando HCl ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, sendo o H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> restrito pelo alto custo. Durante a acidulação, forma-se certa quantidade de sal (reação do ácido inorgânico com íon do sabão) que se deposita na fase inferior de um líquido de três fases, estando a fase superior constituída pelos ácidos graxos livres, e a fase intermédia composta principalmente por glicerol e álcool (Rivaldi et al, 2008).

O produto recuperado alcança concentrações de glicerol superiores a 80%, com quantidades variáveis de água, corantes e álcool. Posteriormente, a glicerina bruta com excesso de ácido é neutralizado com solução de NaOH e submetido a tratamento térmico (70°C) para eliminar os componentes voláteis (recuperação de álcool) (Ooi et al., 2004).

#### **1.2.2.2. Utilizações da glicerina**

Até 1866, ano da invenção da dinamite, a glicerina não tinha significância econômica ou industrial. Atualmente, possui mais de 1500 usos industriais (USSEC, 2007).

As aplicações principais da glicerina são: síntese de resinas, ésteres 18%; aplicações farmacêuticas 7% (principalmente na composição de cápsulas e como emoliente); uso em cosméticos 40% (emoliente e umectante); uso alimentício 24% (umectante e conservante); outros 11% (usado para aumentar a resistência das fibras do fumo; amaciar e aumentar a flexibilidade das fibras têxteis; lubrificante de máquinas, etc.) (Valor Econômico, 2007).

Com um grande excedente nos últimos anos, já que é o principal (ainda) resíduo da produção de biodiesel, a glicerina necessita de um destino que não seja a queima ou o descarte em rios e terrenos (destinos bastante comuns) para não afetar o ambiente. Se descartada nos rios, causa consumo excessivo de oxigênio, causando um desequilíbrio na população aquática. Se queimada, libera cloreína na atmosfera, considerada cancerígena (Batista, 2007). No entanto, são necessários processos complexos e de alto custo para que essa matéria-prima alcance as exigências em grau de pureza necessárias para as utilizações tradicionais (Diniz, 2005), visto que a GLB apresenta impurezas como água, catalisador (alcalino ou ácido), impurezas provindas dos reagentes, ácidos graxos, ésteres, etanol ou metanol, propanodíóis, monoésteres e oligômeros de glicerina (Menten et al., 2008). Dessa forma, sua utilização na alimentação animal passa a ser uma alternativa muito interessante, principalmente devido à diminuição no seu preço resultante dessa grande produção.

Desde 1959, o glicerol é reconhecido como substância atóxica, permitido como aditivo em alimentos, e também considerado como substância “GRAS” (*Generally Regraded as Safe*) pelo *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos (Donkin & Doane, 2007). No Brasil, seu uso em produtos alimentícios é assegurado pela Resolução de nº 386, de 5 de Agosto de 1999 (Anvisa, 1999).

No Brasil, sua utilização na nutrição animal foi aprovada pela Instrução Normativa N° 42 do MAPA, de 16 de dezembro de 2010. Os parâmetros mínimos para uso são um teor mínimo de 80% de glicerol, menos de 150 ppm de metanol e um máximo de 12% de umidade (MAPA, 2010).

### **1.2.2.3. Variação na composição da glicerina**

A variação na composição da GLB encontrada atualmente também merece especial atenção quando da sua utilização na alimentação animal pois esse fato resultará em grandes diferenças produtivas. Schröder & Südekum (1999) observaram teores de glicerol variando de 66,3 até 99,8%, na Alemanha, e Gott (2009) observou que o teor de matéria mineral variou de 1,28 até 8,98%, em amostras dos EUA.

Em trabalho com cordeiros, Lage et al. (2010) utilizaram uma amostra de GLB contendo apenas 36,20% de glicerol, 8,66% de metanol e 46,48% de ácidos graxos, quando normalmente são observado teores de ácidos graxos inferiores a 1%. Concentrações elevadas de ácidos graxos na GLB podem ser explicadas por falhas no processo de separação entre biodiesel e glicerol, fato observado principalmente em agroindústrias de biodiesel de pequeno porte.

### **1.2.3. A gliconeogênese em ruminantes**

Pelo glicerol se tratar de uma importante substância precursora da gliconeogênese, nesta revisão serão abordados alguns aspectos fundamentais deste processo, passo essencial para entender o posterior desenvolvimento do presente trabalho.

#### **1.2.3.1. Importância da gliconeogênese para os ruminantes**

A gliconeogênese é um processo contínuo de suma importância em ruminantes, já que quase todos os carboidratos dietéticos são fermentados a ácidos graxos voláteis (AGVs) no rúmen, sendo o propionato o transformado em glicose, provendo cerca de 90% da glicose total absorvida. Ou seja, praticamente não há absorção direta de glicose, como ocorre em outras espécies (Young, 1977).

De maneira geral, o processo de gliconeogênese pode ser sintetizado da seguinte forma: os polissacarídeos são hidrolisados no rúmen até suas unidades básicas (monossacarídeos), já que os microorganismos ruminais são capazes de romper tanto as ligações glicídicas  $\beta$  quanto  $\alpha$ . Nessa etapa, o principal monossacarídeo é a glicose, que posteriormente é convertida em AGVs (González & Silva, 2006).

Embora a gliconeogênese seja importante em todos os períodos, sua importância é ainda maior após o consumo de alimentos, quando há grande fluxo de nutrientes. Enquanto a gliconeogênese e a lipogênese são estimuladas em ruminantes em períodos de consumo abundante de alimentos, nos não-ruminantes apenas a taxa de lipogênese está elevada. Nestes animais, a gliconeogênese é elevada somente em períodos de deficiência no

consumo (Young, 1977). Além disso, outras adaptações dos ruminantes são que há um limitado uso da glicose para oxidação e a utilização de acetato ao invés de glicose para a síntese de ácidos graxos (Danfaer et al., 1995).

Em ruminantes lactantes, a demanda por glicose é extremamente alta devido à secreção de leite, rico em lactose. Como a concentração de lactose sofre uma variação muito pequena, o leite produzido é altamente dependente da síntese e secreção de lactose (Danfaer et al., 1995). Sendo assim, a disponibilidade de glicose, através de uma alta taxa de gliconeogênese, é requisito básico para uma alta produção leiteira.

Para vacas lactantes, as exigências por glicose, somente da glândula mamária, costumam ser calculadas através de equação proposta por Elliot (1976). Segundo o autor, a lactose contida no leite corresponde a 69,4% de toda glicose captada pela glândula mamária. Assim, a glândula mamária de uma vaca produzindo 60 kg de leite por dia, com um teor de lactose de 4,8%, necessita de cerca de 4 kg de glicose por dia (Reynolds, 2005).

A proporção de glicose necessária para a produção leiteira também varia de acordo com a produção. Dados de Annison et al. (1974) demonstraram que conforme a produção leiteira aumenta, aumenta também a proporção da glicose necessária para o tecido mamário: de 20% com uma produção de 6 kg de leite/dia para 90% com uma produção de 25 kg de leite/dia.

#### **1.2.3.2. Substâncias precursoras da gliconeogênese**

Como na natureza nada se cria, tudo se transforma, para que haja a síntese de nova glicose, outras substâncias devem servir como precursores.

Os principais precursores para a síntese de glicose são o propionato, aminoácidos, lactato e o glicerol (Leng, 1970), sendo que o propionato, de origem exclusivamente dietética, responde por até 76% da síntese hepática de glicose (Reynolds et al., 1994). A quantidade disponível de propionato é ditada pelo consumo de alimentos, e este AGV por si só, é um importante regulador do consumo (Anil & Forbes, 1988).

A contribuição dos aminoácidos, de origem exógena ou endógena, é maior nos primeiros dias de lactação, mas por volta do 11º dia, sua contribuição é mínima. A contribuição do glicerol, de origem exclusivamente endógena, a partir da lipólise das reservas de TG é muito pequena, a não ser em períodos de severo balanço energético negativo, e a contribuição do lactato, de origem exógena ou endógena, varia de 10 a 20% (Danfaer et al., 1995).

De modo geral, um aumento no consumo de alimentos, incrementará a disponibilidade do principal substrato para a geração da glicose, o ácido propiônico, o qual estimulará um aumento na taxa de gliconeogênese (Reynolds et al., 1988). Em períodos de baixo consumo de alimentos, a contribuição do propionato decresce, sendo necessário mobilizar reservas corporais capazes de proverem outros precursores.

Deve-se lembrar, entretanto, que tanto o glicerol quanto o lactato, em última instância, são derivados da própria glicose, dessa forma, sua contribuição para a gliconeogênese não representa uma síntese líquida de glicose.

### 1.2.3.3. Mecanismo da gliconeogênese

A gliconeogênese acontece nos rins e no fígado, sendo que de 80 a 90% se dá no fígado (Bergman, 1975).

A gliconeogênese a partir de propionato ocorre da seguinte forma: o propionato, AGV produzido pela fermentação microbiana dos carboidratos, é absorvido pelo epitélio ruminal, chegando até o fígado. No fígado, entra no ciclo de Krebs até gerar oxalacetato para que seja, finalmente, convertido em glicose. Esta entrada no ciclo de Krebs ocorre após sua conversão em succinil-CoA (González & Silva, 2006).

O lactato, produzido no eritrócito e no músculo esquelético, é o produto final da glicólise anaeróbia. Sendo convertido em piruvato pela ação da enzima lactato desidrogenase. O piruvato entra na mitocôndria, onde é convertido em oxalacetato. Este é transformado em fosfoenolpiruvato, já no citosol, ingressando, definitivamente na rota gliconeogênica.

Os aminoácidos ditos gliconeogênicos têm cinco possíveis rotas para a geração de glicose: 1 – via piruvato (alanina, serina, cistina, glicina); 2 – via  $\alpha$ -cetoglutarato (glutamina, prolina, arginina, histidina); 3 – via succinil-CoA (valina, treonina, metionina, isoleucina); 4 – via fumarato (fenilalanina, tirosina); 5 – via oxalacetato (aspartato).

O glicerol, ingerido oralmente (desde que escape intacto pela fermentação ruminal) ou produzido a partir da lipólise dos triglicerídeos no tecido adiposo, ingressa na via gliconeogênica, no fígado, através da di-hidroxiacetona-fosfato. Numa primeira etapa, é fosforilado pela enzima glicerol-quinase. Após, o glicerol-3-fosfato é oxidado pela enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase, gerando di-hidroxiacetona-fosfato, composto intermediário da via gliconeogênica (González & Silva, 2006).

Brockman (1990) observou que a infusão contínua de insulina em ovelhas resultou em uma diminuição na taxa de produção de glicose hepática e de disponibilidade de vários substratos gliconeogênicos (aminoácidos, lactato e glicerol). Isto aconteceu porque a insulina é o principal hormônio lipogênico.

Porém, a taxa de gliconeogênese a partir de ácido propiônico parece não ser influenciada pelo glucagon ou insulina, mas sim pela sua disponibilidade dietética (Brockman & Greer, 1980).

Ou seja, o mais importante para uma adequada disponibilidade de glicose é haver um adequado fornecimento de substratos via dieta.

### 1.2.4. Digestão do glicerol

Três rotas têm sido descritas para o glicerol ingerido oralmente: passagem (13%), fermentação (44%) e absorção (43%). Embora os primeiros trabalhos *in vitro* tenham observado uma fermentação quase que completa do glicerol, gerando propionato, lactato, succinato e acetato, a partir de resultados de trabalhos *in vivo*, ficou demonstrado que os principais compostos gerados a partir da fermentação são o propionato e o butirato, principalmente este último. A absorção do glicerol, em sua forma intacta, pelo epitélio ruminal está mais relacionada à conversão em glicose no fígado. A glicerolquinase converte o glicerol e o ATP em glicerol-3-fosfato e ADP ao nível da fosfato triose, direcionando o glicerol para a gliconeogênese (Krehbiel, 2008).

Quando a demanda por glicose é muito alta, como ocorre com vacas de alta produção no início da lactação, as vias seguidas pelo glicerol ou pelo

propionato são praticamente idênticas, sempre visando a geração de glicose (Donkin & Doane, 2007).

#### **1.2.4.1. O processo de fermentação ruminal do glicerol**

As principais bactérias fermentadoras do glicerol são anaeróbias estritas como a *Selenomonas ruminantium* var. *lactilytica* (Hobson et al., 1961). Bactérias anaeróbias facultativas parecem desempenhar um papel muito pequeno na fermentação do glicerol. Segundo Kijora et al. (1998), a microbiota ruminal adapta-se ao glicerol fornecido via oral em menos de sete dias. Rémond et al. (1993), observaram uma máxima degradação do glicerol logo no primeiro dia, indicando que esta adaptação dos microorganismos a este substrato é quase que imediata.

Após este período de adaptação dos microorganismos ruminais, o desaparecimento do glicerol é bastante rápido. Bergner et al. (1995) observaram um desaparecimento de mais de 90% em meio *in vitro* em 2 horas de incubação (5% de inclusão), 4 horas (10% de inclusão) e 6 horas (15-25% de inclusão).

Alguns trabalhos demonstravam que o glicerol que era fermentado no rúmen gerava propionato (Johns, 1953; Garton et al., 1961). Porém trabalhos posteriores demonstraram que uma parte também gera ácido butírico (Czerkawski & Breckenridge, 1972). Este butirato é convertido em  $\beta$ -hidroxibutirato (BHBO) no rúmen, o qual pode ser utilizado como fonte de energia por alguns tecidos, porém pode agravar eventuais casos de cetose. Por este motivo, considera-se que o glicerol que é absorvido em sua forma intacta será mais eficaz no tratamento de um caso de cetose.

Ao testar os efeitos de diferentes quantidades de GLB (80,2% de glicerol) durante o período de transição, DeFrain et al. (2004) observaram que tanto com 430 quanto com 860 g, houve uma maior produção de AGVs, principalmente de propionato e butirato.

Bergner et al. (1995) trabalharam com glicerol com carbono marcado, e observaram que a maior parte foi transformado em propionato, porém cerca de 11% deste carbono foi detectado no CO<sub>2</sub>, ou seja, foi perdido. Rémond et al. (1993) observaram que a proporção de glicerol transformado em propionato variou de 35 a 69%.

Carvalho et al. (2011) não detectaram um aumento na produção de AGVs em decorrência da inclusão de cerca de 11% de glicerol na dieta de vacas leiteiras durante o período de transição. Entretanto, houve um aumento na proporção de propionato e de butirato (22,7% (controle) vs. 28,6% (glicerol) de propionato; 11,5% (controle) vs. 15,3% (glicerol) de butirato) à custa de acetato (61,4% (controle) vs. 51,5% (glicerol)).

Outro parâmetro bastante estudado é a variação no pH ruminal em decorrência do consumo de glicerol, fato que tem grande influência sobre a população microbiana ruminal e, conseqüentemente, sobre o aproveitamento dos alimentos.

Em experimento *in situ*, Wang et al. (2009) forneceu 0, 100, 200 ou 300 g de glicerol/dia para animais fistulados ruminalmente. O pH ruminal diminuiu linearmente (de 6,58 até 6,23; P<0,05) enquanto a concentração de AGVs aumentou de maneira quadrática (de 93,4 até 99,61 mmol; P<0,04). A relação acetato:propionato respondeu de maneira quadrática (P<0,03) devido a

um aumento na proporção de propionato e não a uma diminuição no acetato. A digestibilidade da fibra em detergente neutro (DFDN) aumentou linearmente, contrariando os resultados apresentados por Roger et al. (1992).

Schröder & Südekum (1999) não observaram uma diminuição no pH abaixo de 6,2 utilizando uma inclusão de GLB de até 15%. Os autores também observaram uma redução na relação acetato:propionato, bem como um aumento na concentração de butirato, principalmente cerca de 3 horas após o consumo de glicerol.

Enquanto Mach et al. (2009) relataram uma diminuição no pH em experimento *in vivo*, Parsons (2010) observou um aumento linear trabalhando com 0, 2 ou 4% de glicerina em um meio *in vitro*.

Paggi et al. (1999) observaram uma redução de cerca de 20% na atividade proteolítica de um fluido ruminal em que a concentração de glicerol aumentou de 50 para 300 mmol. Além disso, esses autores observaram uma diminuição na digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) de 8 a 15% com a adição de 100, 200 ou 300 mmol de glicerol na dieta.

Outros autores também utilizaram técnicas *in vitro* para estudar os efeitos do glicerol sobre a fermentação ruminal e a digestibilidade. Ferraro et al. (2009) testaram os efeitos da incubação de glicerol (320 ou 640 mL) ou de propilenoglicol (320 ou 640 mL) através da técnica de produção de gás *in vitro*. A maior produção de gás ocorreu no maior nível de incubação de glicerol, tratamento que também apresentou o maior *lag-time*, comportamento igual ao observado por Trabue et al. (2007).

Em mais um ensaio *in vitro*, Abo El-Nor et al. (2010) em trabalho *in vitro*, incubaram 0, 36, 72 ou 108 g de glicerol/kg de matéria seca (MS). A DFDN diminuiu mais de cinco pontos percentuais nos dois tratamentos com maior utilização de glicerol em relação ao grupo controle. Trabalho de AbuGhazaleh et al. (2011) auxiliou no entendimento destes resultados. Os autores substituíram 0, 15, 30 ou 45% do grão de milho da dieta por glicerol, e observaram uma redução na concentração de *Butyrivibrio fibrisolvens* (bactéria fibrolítica) e de *Selenomonas ruminantium* (bactéria amilolítica).

Trabalho de Pereira et al. (2008) demonstrou que a cinética de fermentação varia de acordo com a dieta basal à qual o glicerol é incluído, pois em uma dieta a base de feno de Braquiária Marandu o *lag-time* aumentou em cerca de 1,5 hora com 3% de GLB, sem que este efeito fosse observado em uma dieta a base de concentrado comercial ou a associação deste com o feno. Porém, deve-se considerar que nestas dietas com maior concentração de carboidratos rapidamente fermentáveis, o propionato tipicamente está em maiores concentrações, havendo, nestes casos uma menor oportunidade para o glicerol expressar seu potencial como alimento energético (Drouillard, 2008).

Ávila et al. (2011) utilizaram 0, 7, 14 ou 21% de glicerina em substituição ao grão de cevada sob a hipótese de que haveria uma redução na emissão de gás metano, já que a maior parte que escapa intacta à fermentação ruminal transforma-se em propionato. Entretanto, apesar de haver um incremento na concentração de propionato e uma diminuição na de acetato, esta hipótese não se confirmou neste trabalho, diferentemente do que ocorreu em trabalho de Lee et al. (2011).

### **1.2.5. A glicerina/glicerol na alimentação animal**

Principalmente devido às suas características como substrato para a gliconeogênese hepática, muitos estudos têm avaliado os efeitos da glicerina como uma fonte de energia para aves (Simon et al., 1996; Cerrate et al., 2006), suínos (Kijora et al., 1995; Lammers et al., 2008), ovinos (Gunn et al., 2010), e bovinos (DeFrain et al., 2004; Mach et al., 2009).

A glicerina geralmente é reconhecida como segura para o uso na alimentação animal (FDA, 21 C.F.R. 582.1320). Entretanto, especial atenção deve ser dada ao seu teor de metanol, substância utilizada no processo de produção de biodiesel. A concentração de metanol no composto deve ser inferior a 0,5% da dieta total (Donkin & Doane, 2007). Segundo o FDA, os níveis de metanol devem ser inferiores a 150 ppm para que a GLB obtida a partir da produção de biodiesel seja considerada segura para a alimentação animal. O governo alemão tem estabelecido como seguro níveis de até 5.000 ppm (Sellers, 2008) enquanto no Canadá são aceitos níveis de até 1.000 ppm (Gordon, 2009).

#### **1.2.5.1. Os efeitos da contaminação por metanol**

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 (Carvalho et al., 2011).

Lammers et al. (2008) 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. Além disso, a via da gliconeogênese é inibida pelo metanol resultando em hipoglicemia.

Um aspecto que deve ser salientado é que o potencial efeito prejudicial do metanol incorporado às rações pode ser desprezado quando a ração for peletizada, uma vez que a temperatura atingida na peletização (82°C) é mais alta que a temperatura de vaporização do metanol (65°C) (Menten et al., 2008).

Entretanto, o alto risco à saúde associado ao consumo do metanol (considerando níveis possivelmente detectados em GLB) não é esperado em animais ruminantes. Isso ocorre porque o metanol naturalmente é produzido no rúmen como resultado da hidrólise de metil ésteres da pectina. Pol & Demeyer (1988) demonstraram que a infusão de metanol (19 mL/h) no rúmen de ovinos apresenta efeitos semelhantes à administração de pectina em termos de taxa de metanogênese. Além disso, *Methanosarcina spp.*, que pode usar metanol como substrato foi isolada de amostras de conteúdo ruminal (Rowe et al., 1979). A bactéria *Eubacterium limosum* também é capaz de converter metanol em acetato e butirato (Genthner et al., 1981).

#### **1.2.5.2. Valor energético da glicerina**

Parte da indefinição quanto ao valor energético da glicerina deve-se à diferença entre os níveis estudados e interações ainda desconhecidas com outros componentes da dieta. De modo geral, considerar o valor energético da glicerina como aproximadamente igual à energia contida no amido de milho é um bom começo para a formulação das dietas (Donkin & Doane, 2007).

Segundo Schröder & Südekum (1999), em dietas com alta inclusão de concentrados (60%), o valor energético da GLB foi de aproximadamente

85% de seu valor em dietas com 100% de forragem: nas dietas com baixa inclusão de amido, não houve diferença no teor energético da GLB independente do seu nível de inclusão (10, 15 ou 20%) e o valor médio foi de 2,32 Mcal de ELI/kg de GLB. Nas dietas com alta inclusão de amido, este valor foi de 1,91 a 2,03 Mcal/kg. Valores bastante próximos ao observado por DeFrain et al. (2004): 1,91 Mcal de ELI/kg no início da lactação. Já Linke et al. (2004) estimaram uma ELI de 2,33 Mcal/kg (cerca de 20% superior a do grão de milho).

Mach et al. (2009) estimaram, para touros jovens da raça Holandês, um conteúdo energético (EM) da GLB (86% de glicerol) de 3,47 Mcal/kg. Este valor foi obtido através dos seguintes cálculos: 1 mol de glicerol pode ser fermentado a 0,5 mol de propionato, assim, provendo 0,367 Mcal de EM/mol (Baldwin, 1968). Os outros 50% restantes do glicerol foram assumidos como escapando da fermentação ruminal e atingindo o intestino com uma EM de 4,3 Mcal/kg (NRC, 2001). Assim, assumindo uma digestibilidade de 95% e uma metabolizabilidade de 100%, esse glicerol que escapa a fermentação ruminal fornece cerca de 0,376 Mcal de EM por mol (1 kg de glicerol = 10,87 moles). Dessa forma, uma amostra com 86% de glicerol, forneceria 3,47 Mcal de EM/kg.

#### **1.2.5.3. Resultados produtivos**

Em um trabalho com 60 vacas da raça Holandês em lactação, por 56 dias, Donkin & Doane (2007) testaram quatro níveis de inclusão de glicerol (0, 5, 10 e 15%). Não houve efeito dos tratamentos sobre a produção. O consumo foi ligeiramente menor no tratamento com maior inclusão de glicerol nos primeiros sete dias de experimento. A adição de glicerol na dieta resultou em uma diminuição no nitrogênio uréico no leite (NUL) (de 12,5 para 10,2 mg/dL), sugerindo uma melhora na eficiência de utilização do nitrogênio, embora Kijora et al. (1998) tenham relatado uma diminuição no conteúdo de N bacteriano no fluido ruminal. Apesar do escore de condição corporal (ECC) não ser diferente entre os tratamentos, com a inclusão de 10 e 15% de glicerol o ganho de peso foi maior. A digestibilidade da MS (quadraticamente) e da matéria orgânica (MO) (linearmente) melhoraram com a adição de glicerina. A DFDN foi reduzida com 5% de glicerina em comparação com o tratamento controle, porém a eficiência de utilização dos alimentos não diferiu entre os tratamentos.

Schröder & Südekum (1999), não observaram diferenças na DFDN, digestibilidade da MO (DMO) e digestibilidade do amido com a inclusão de até 15% de GLB em uma ração peletizada. Resultados diferentes foram apresentados por Lage et al. (2010), trabalhando com uma amostra de GLB de baixa qualidade (36,20% de glicerol, 8,66% de metanol, 46,48% de ácidos graxos), que observaram efeito linear decrescente da inclusão de 0, 3, 6, 9 e 12% de GLB na dieta de cordeiros em terminação sobre o consumo de MS (CMS) e ganho médio diário (GMD), e efeito quadrático sobre a DFDN ( $P < 0,05$ ). Entretanto é necessário destacar que, devido a alta concentração de ácidos graxos, tratavam-se de dietas com alto teor de EE nas inclusões de 9 e 12% de GLB (6,95 e 8,25%). Segundo Palmquist & Jenkins (1980), o consumo de alimentos pelos ruminantes usualmente diminui em níveis de extrato etéreo (EE) superiores a 6%, principalmente devido a diminuição da DFDN.

Segundo Schröder & Südekum (1999), a GLB pode ser incluída na dieta de animais em lactação em até 10% da MS sem qualquer efeito prejudicial sobre o consumo de alimentos e água, degradação ruminal, digestibilidade ou produção de biomassa microbiana, mesmo em que esta apresente diferentes graus de pureza (63, 85 ou 100%).

Como a gliconeogênese acontece, sobretudo, no tecido hepático, mas também no tecido renal, existia a hipótese de que a utilização de GLB pudesse provocar uma sobrecarga desses tecidos. Para testá-la, Cavalheiro et al. (2011) estudaram os efeitos da utilização de GLB (83% de glicerol) na dieta de novilhas de corte por 112 dia e não observaram influência da inclusão de 10 ou 20% de glicerina na MS da dieta sobre o peso e área celular do fígado e rins dos animais.

Alguns estudos foram realizados para avaliar a influência da ingestão de GLB sobre o consumo de alimentos e ganho de peso. Parsons et al. (2009) testaram a inclusão de 0, 2, 4, 8, 12 ou 16% de GLB na dieta de 373 novilhos de corte e observaram uma diminuição linear no CMS ( $P < 0,001$ ). O GMD e a eficiência alimentar variaram de maneira quadrática sendo que o maior foi observado no nível de 2%. Entretanto, Mach et al. (2009) não observaram diferenças no CMS ou eficiência de utilização dos alimentos incluindo 0, 4, 8 ou 12% de GLB na dieta de touros Holandês terminados em confinamento. Diferente destes dois trabalhos, Gunn et al. (2010) observaram um incremento linear no CMS de cordeiros Suffolk incluindo 0, 5, 10, 15 ou 20% de GLB (86% de glicerol) em sua dieta, demonstrando haver uma grande inconsistência nos resultados.

Linke et al. (2004) trabalharam com três níveis de utilização de glicerina na dieta de vacas em lactação: 0; 0,5 kg; ou 1 kg. O CMS e a produção de leite não foram influenciados pelos tratamentos. A eficiência alimentar também melhorou com o consumo de glicerol. A composição do leite não diferiu entre os tratamentos, com exceção do NUL, que diminuiu com o fornecimento de glicerina.

#### **1.2.6. O período de transição**

O período de transição em vacas leiteiras é definido como as três últimas semanas de gestação e as três primeiras de lactação (Drackley, 1999; Grummer, 1995). Este período apresenta duas fases distintas: 21 dias pré até o parto, caracterizado por uma redução de até 30% no CMS; e do parto até os 21 dias de lactação, durante o qual há um incremento gradual no consumo de alimentos (Grant & Albright, 1995).

A maioria dos problemas metabólicos surge ou tem origem nesse período (hipocalcemia, cetose, retenção de placenta, deslocamento de abomaso, laminite) em decorrência das diversas modificações pelas quais o animal passa durante essa fase. Até mesmo a incidência de mastite é maior durante esse período devido à diminuição da resposta imune (Goff & Horst, 1997).

##### **1.2.6.1. Princípios básicos de manejo**

O principal objetivo de qualquer programa de manejo para o período de transição é prevenir excessos ou deficiências energéticas que podem ocasionar problemas de saúde no início da lactação (Beede et al., 1996; Dyk & Emery, 1996). Desta forma, três funções básicas devem ser mantidas:

adaptação do rúmen às dietas do início da lactação, com um maior teor energético e uma maior inclusão de grãos; manutenção da normocalcemia; manutenção do sistema imunitário em bom funcionamento (Goff & Horst, 1997).

#### **1.2.6.2. Adaptações fisiológicas**

Nos últimos dois meses de gestação, o consumo de nutrientes pelo feto e seus acessórios praticamente dobra (Bauman & Currie, 1980). Porém, o desencadeamento da lactação é responsável por alterações ainda mais profundas. Uma série de adaptações fisiológicas ocorre nas vacas leiteiras no início da lactação, objetivando sempre a produção de leite em detrimento a outras atividades metabólicas como a manutenção, o crescimento e a atividade reprodutiva (Santos et al., 2002). Essas características estão relacionadas com as mudanças nas concentrações séricas hormonais favorecendo o suprimento de nutrientes para a glândula mamária em detrimento a outros tecidos (Mattos, 1995).

As exigências por nutrientes, que já estão elevadas no final da gestação, aumentam muito após o parto. Goff & Horst (1997) exemplificaram muito bem estas alterações citando que, no final da gestação, o feto necessita de cerca de 0,82 Mcal de energia, 117 g de proteína, 10,3 g de cálcio, 5,4 g de fósforo e 0,2 g de Mg, diariamente. Porém, para a produção de somente 10 kg de colostro são necessários 11 Mcal de energia, 140 g de proteína, 23 g de cálcio, 9 g de fósforo e 1 g de Mg.

Com toda esta demanda por nutrientes, especialmente por energia, as exigências por ELI e proteína metabolizável 4 dias pós-parto, excedem em cerca de 25% a ingestão destes nutrientes. Outro fator importante é que a glândula mamária, nessa fase, demanda 97% da ELI e 83% da proteína metabolizável total ingerida, restando muito pouco para as outras funções vitais (Drackley, 1999).

Segundo Bell (1995), de um útero aos 250 dias de gestação para uma glândula mamária aos quatro dias de lactação, as demandas por glicose triplicam e as de aminoácidos dobram. E Overton (1998) demonstrou que a demanda estimada de glicose de uma vaca da raça Holandês é de 1000 a 1100 g/d durante os últimos dias de gestação, mas aumenta rapidamente após o parto para aproximadamente 2500 g/d aos 21 dias pós-parto.

#### **1.2.6.3. Alterações no período - consumo**

No final da gestação, há um grande aumento no crescimento fetal, elevando a pressão interna nos órgãos digestivos, diminuindo desta forma o espaço ocupado pelos alimentos (o rúmen fica com cerca de 1/3 de seu tamanho normal) (Goff & Horst, 1997), este fato, associado com a grande variação hormonal no período pré-parto (aumento nas concentrações sanguíneas de estrógeno e corticóides e uma diminuição na concentração de progesterona) (Chew et al., 1979), reduz o CMS em até 30%, predispondo o animal a um balanço energético negativo (consumo de energia é menor do que as exigências do animal), com isso aumenta o catabolismo de gordura elevando as concentrações de ácidos graxos não-esterificados (AGNE) em 2 ou 3 vezes na circulação (Grum et al., 1996; Van Saun, 2000). Estes, por sua vez, serão posteriormente acumulados no fígado podendo causar problemas metabólicos e diminuindo a posterior produção leiteira.

A diminuição no CMS coincide com o período em que ocorrem mudanças no *status* reprodutivo, reservas de tecido adiposo e alterações no metabolismo para dar o devido suporte à lactação, sendo assim, não se pode ser tão simplista a ponto de afirmar que a diminuição no consumo de alimentos deva-se somente a motivos físicos. Alguns sinais metabólicos, derivados e/ou causadores das alterações descritas desempenham papel fundamental como nutrientes, metabólitos, hormônios reprodutivos, hormônios do estresse, leptina, insulina, peptídeos intestinais, citocinas e neuropeptídeos como o neuropeptídeo Y, galanina e fator de liberação da corticotropina (Ingvarsten & Andersen, 2000).

Segundo Ingvarsten & Andersen (2000), o menor CMS ocorre no dia do parto, entretanto, múltiparas consomem mais alimentos do que as primíparas (a capacidade de consumo das vacas primíparas, com cerca de dois anos, é de cerca de 80% de uma vaca múltipara, durante a primeira parte da lactação).

Logo após o parto a ingestão de MS aumenta gradualmente (1,5 a 2,5 kg/semana) (Grant & Albright, 1995) até chegar ao ponto máximo por volta da 10<sup>a</sup> a 14<sup>a</sup> semana de lactação, enquanto o pico de produção de leite ocorre por volta de 4 a 8 semanas pós-parto (NRC, 2001). Esta diferença na curva de produção de leite e ingestão de MS faz com que o animal experimente, durante um período de  $\pm$  60 dias, um desequilíbrio nutricional negativo (Santos et al., 1993).

Villa-Godoy et al. (1988), observaram que no início da lactação a variação no balanço energético negativo médio esteve mais intimamente correlacionada com o CMS do que com a produção de leite ( $r = 0,73$  e  $r = -0,25$ , respectivamente). Entretanto, deve-se considerar que a produção de leite é uma função da disponibilidade de alimentos para o animal e nutrientes para a glândula mamária.

#### **1.2.6.4. Alterações metabólicas**

Várias são as mudanças metabólicas pelas quais as fêmeas bovinas leiteiras passam durante o período de transição: a concentração de progesterona, alta durante a gestação, diminui rapidamente ao parto. As concentrações de insulina plasmática diminuem no período final da gestação e no início da lactação em vacas leiteiras, com picos agudos no dia do parto (Kunz et al., 1985), além disso, há uma maior resistência à insulina durante o final da gestação (Petterson et al, 1993; Petterson et al. 1994). Assim, a mobilização de gordura durante o final da gestação é facilitada em parte pela diminuição da habilidade da insulina em promover a lipogênese e de se opor a lipólise (Bell, 1995).

As concentrações plasmáticas do hormônio do crescimento aumentam durante o final da gestação, apresentam um pico durante a parição, e se mantêm moderadamente elevadas durante o início da lactação (Tucker, 1985). A somatotropina diminui as taxas de lipogênese e a atividade de enzimas lipogênicas importantes no tecido adiposo aparentemente por se opor a resposta dos tecidos à insulina (Bauman & Vernon, 1993) e estimula a gliconeogênese através de um incremento no metabolismo do propionato em glicose (Danfaer et al., 1995) e na partição de nutrientes, privilegiando a glândula mamária para a síntese de leite (Bauman, 1992).

A primeira adaptação pela qual passa uma vaca no início da lactação é o aumento na gliconeogênese hepática e uma diminuição na oxidação da glicose pelos tecidos periféricos (Reynolds et al., 2003; Bennink et al., 1972) para redirecionar glicose para a glândula mamária.

No início da lactação ocorre quase total supressão da lipogênese, devido aos baixos níveis de insulina plasmática e a diminuição da utilização de glicose ou acetato em razão da baixa resposta do tecido adiposo a insulina (Vernon & Taylor, 1988). O aumento das concentrações de glicose ao parto provavelmente ocorra devido ao aumento das concentrações de glucagon e glicocorticóides, como o cortisol, que promovem a depleção do glicogênio hepático (Grummer, 1995). Além disso, os glicocorticóides estimulam a lipólise e a mobilização de aminoácidos de tecidos extra-hepáticos, que podem servir de substrato para a gliconeogênese (Ogborn, 2006). Durante o período de transição, a contribuição do propionato para a geração de glicose é de 50 a 60%, a de lactato de 15 a 20% e a do glicerol de 2 a 4% (Reynolds et al., 2003).

Como resultado do intenso déficit energético sofrido no início da lactação, a vaca passa a mobilizar seu tecido adiposo como uma fonte de energia. Essas reservas, que entram na circulação na forma de AGNE podem seguir três rotas no fígado: 1) completa oxidação a dióxido de carbono para fornecimento de energia; 2) oxidação parcial para produção de corpos cetônicos que são liberados no sangue e servem com fontes de energia para outros tecidos ou; 3) serem reconvertidos a triglicerídeos (Goff & Horst, 1997).

Obviamente, a primeira rota a ser seguida é a da oxidação completa, entretanto, há um limite para que o fígado consiga realizar esta tarefa fazendo com que os AGNE entrem no ciclo de Krebs. O passo seguinte seria exportar estes ácidos graxos como lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), porém os ruminantes possuem baixa capacidade para síntese e secreção de VLDL para exportação de triglicerídeos do fígado (Kleppe et al., 1988; Pullen et al., 1989), no entanto, apresentam capacidade semelhante a outros mamíferos em recuperar AGNE em triglicerídeos (Kleppe et al., 1988). Se junta a isto o fato destes animais terem sua capacidade do tecido hepático em esterificar AGNE em triglicerídeos aumentada com a aproximação do parto (Grum et al. 1996; Litherland et al., 2003). Assim, estes triglicerídeos acumulam-se nos hepatócitos, e o acetilCoA que não entra no ciclo de Krebs é convertido em acetato e BHBO. A gliconeogênese é inibida, inclusive aquela que usa o propionato como substrato, e o resultado é um estado de hipoglicemia. O consumo diminui, bem como a produção de leite. O estrogênio parece ter efeito fundamental neste processo, estimulando a deposição dos ácidos graxos no tecido hepático (Goff & Horst, 1997).

Por isto, torna-se vital um adequado controle da condição corporal dos animais. Para se ter uma estimativa aproximada do total de leite que uma vaca deixa de produzir em função da má condição corporal ao parto (abaixo do escore 3, em uma escala de 1 a 5), multiplica-se o valor da produção de leite obtida no pico da lactação pelo índice 230 para vacas e 250 para novilhas da raça Holandês (Soberanes, 1989).

Recomenda-se que na primeira fase de lactação a perda de peso vivo seja inferior a 1 kg/dia; ou o equivalente a uma unidade no escore de

condição corporal (escala de 1 a 5) aproximadamente 57 kg do peso corporal (para vacas da raça Holandês) nos primeiros 60 dias pós-parto (Chase, 1992).

Broster & Broster (1998) observaram um aumento de 2-4 kg de leite/dia em vacas que pariram com condição corporal (CC) de 3,25 comparado com aquelas que estavam em uma CC menor ou igual a 2.

Porém, um acúmulo excessivo de reservas corporais também não é uma medida eficiente. Waltner et al. (1993) observaram uma relação quadrática entre a CC e a produção de leite, sendo que quando a CC passa de 2 para 3, há um acréscimo de 322 Kg de leite em três meses, entretanto quando a condição corporal passa de 3 para 4, este acréscimo é de somente 33 kg. Segundo Santos et al. (2002), o ideal é que a vaca se apresente ao parto com um ECC de 3,5 a 3,75.

Rukkwamsuk et al. (1999) observaram que vacas superalimentadas tiveram um aumento de 446% na concentração de AGNE, 3 dias pós-parto comparado com o período pré-parto e um aumento de 514% na concentração de triglicerídeos no fígado neste período. Enquanto este incremento foi de 123% e 97% nas vacas consumindo uma dieta bem balanceada, para AGNE e triglicerídeos no fígado, respectivamente.

Os AGNE mobilizados no início da lactação são responsáveis por cerca de 40% da gordura do leite nesta fase (Bell, 1995) e também podem ser utilizados como fonte de energia por tecidos periféricos. Para Drackley (1999), os níveis de AGNE em animais com balanço energético positivo devem estar em torno de 200  $\mu\text{eq/L}$ , durante o período próximo do parto este valor se situa em torno de 200 a 300 e atingem os valores de 800 a 1200  $\mu\text{eq/L}$  dois dias antes do parto até 3 dias após parto.

Soberanes (1989) cita que a quantidade máxima de leite que pode ser sintetizada a partir das reservas corporais pode ser considerada como até 30% durante o primeiro mês, 20% no segundo e 10% no terceiro mês de lactação.

#### **1.2.6.4.1. Influência das alterações metabólicas sobre a reprodução**

No final da gestação a hipófise anterior possui pequenas quantidades de LH e FSH devido ao forte *feedback* negativo das altas concentrações de estrógeno e progesterona, o qual diminui a produção de GnRH (Nett, 1987). No entanto, 7 a 10 dias após o parto a concentração de FSH aumenta lentamente, estimulando o desenvolvimento de uma onda folicular (Yavas & Walton, 2000), e o declínio do mesmo, a seleção de um folículo dominante (Roche et al., 2000). Todavia, para este folículo ovular é necessário o estabelecimento de uma secreção pulsátil de LH, responsável pela produção de estrógenos, crescimento final e ovulação do folículo dominante (Roche et al., 1992). Sabe-se que a produção de LH é regulada fisiologicamente pelo GnRH produzido pelo hipotálamo (Roche et al., 2000) e a retomada dos pulsos de GnRH pós-parto é altamente dependente da intensidade do balanço energético negativo (Thatcher et al., 1996). De acordo com Santos & Amstalden (1998) quando as vacas estão em balanço energético negativo, as concentrações de ácidos graxos não esterificados aumentam, e ao mesmo tempo, os níveis séricos de IGF-I, glicose e insulina diminuem,

reduzindo os pulsos de GnRH, produção de estrógeno, LH e posterior ovulação.

Staples et al. (1990) observaram que vacas em anestro nas primeiras nove semanas de lactação eram aquelas que consumiam menos alimentos (2,5 a 3,6 kg de MS a menos), produziam menos leite e se encontravam em um maior déficit energético. Estas vacas também obtinham uma maior quantidade de energia através de reservas corporais do que aquelas que ciclavam até 40 dias pós-parto.

Butler et al. (1981) monitoraram a concentração de progesterona sérica e o balanço energético de vacas de alta produção. Foi observado que o balanço energético durante os primeiros 20 dias de lactação foi inversamente correlacionado com o intervalo parto-1ª ovulação ( $r = -0,60$ ) e com a produção de leite ( $r = -0,80$ ). Entretanto, não houve uma correlação forte entre intervalo parto-1ª ovulação e produção de leite ( $r = 0,30$ ). De modo geral, a ovulação ocorreu 10 dias após o balanço energético negativo chegar ao seu ponto máximo e iniciar seu retorno a zero.

### **1.2.6. O uso do glicerol durante o período de transição**

A utilização do glicerol durante o período de transição, com o objetivo de amenizar o déficit energético e tratar/prevenir a cetose tem sido estudada há bastante tempo. Johnson (1954) já citava o glicerol como mais efetivo do que o propilenoglicol como substrato para a geração de glicose, porém o autor concluía que este produto era de pouca utilidade para os produtores rurais devido ao seu alto preço. Conclusão semelhante foi feita por Fischer et al. (1973). Atualmente, há uma grande mudança no mercado do glicerol, tornando o uso desta substância na alimentação animal bastante atrativa.

Conforme citado na seção 1.2.4., uma grande parcela do glicerol escapa intacta da fermentação ruminal. Isto acaba se constituindo em uma importante vantagem, pois entra na rota da gliconeogênese ao nível da triose fosfato, não sendo afetado por duas enzimas limitantes (piruvato carboxilase e fosfoenolpiruvato carboxiquinase). Porém, nem todo glicerol será absorvido em sua forma intacta. Segundo Rémond et al. (1993), o sucesso da utilização do glicerol depende da via que este tomará para ser metabolizado: em uma dieta totalmente misturada, por exemplo, o glicerol provavelmente será absorvido muito rapidamente em sua forma intacta (cerca de 52%) e o restante será transformado em AGVs (principalmente propionato, mas também butirato, e em pequena extensão, acetato). Esta segunda via é bastante perigosa, já que o butirato é o principal precursor do BHBO.

Entretanto, segundo Grummer (1993), o propionato gerado a partir da fermentação do glicerol pode ser considerado um ótimo anticetogênico, pois: 1) sua conversão em oxalacetato facilita a oxidação de acetil-coA em CO<sub>2</sub>; 2) a conversão do propionato em propionil-CoA causa a inibição do 3-hidroxi-metilglutaril-CoA sintetase; 3) a conversão do propionato em propionil-CoA inibe a acil-CoA desidrogenase; 4) a conversão do propionato em metil malonil-CoA inibe a carnitina-palmitoiltransferase (CPT-1); 5) há a conversão do propionato em succinil-CoA e inibição do 3-hidroxi-metilglutaril-CoA sintetase; 6) o propionato compete com outros ácidos graxos por CoA intramitocondrial; 7) a conversão do propionato em glicerídeo-glicerol aumenta

a esterificação de ácidos graxos e diminui o substrato para oxidação. O quarto mecanismo parece ser a hipótese mais atraente por representar um mecanismo que discrimina os efeitos de diferentes precursores da gliconeogênese sobre a oxidação de ácidos graxos. Por exemplo, o lactato é um precursor que não é metabolizado via malonil-CoA. Assim, durante a privação de alimentos, quando a demanda por glicose é alta e a disponibilidade de propionato é baixa, o lactato pode ser um substrato para a geração de glicose, porém sem reduzir a cetogênese (Grummer, 1993).

Aiello et al. (1984) reafirmaram as propriedades anticetogênicas do propionato, pois, com a adição de 10 mmol de propionato em um meio *in vitro*, houve uma diminuição na produção de corpos cetônicos e CO<sub>2</sub> a partir de palmitato. Os autores atribuíram o efeito anticetogênico do propionato à diminuição de ácidos graxos disponíveis ao fígado, pois, como o propionato é um estimulador da secreção de insulina pelos ruminantes, um aumento na sua concentração reduz a mobilização de reservas corporais.

Com o objetivo de avaliar a eficácia do glicerol como tratamento para a cetose, Goff & Horst (2001) administraram 1, 2 ou 3 litros de glicerol via sonda esofágica. Trinta minutos depois, a concentração de glicose aumentou 16, 20 e 25% para cada um dos respectivos tratamentos. Em outro experimento, duas vacas com cetose clínica, receberam 1 litro de glicerol. Ambos os animais apresentaram um incremento na glicemia, uma menor excreção urinária de corpos cetônicos e um aumento na produção de leite.

Osman et al. (2008) observaram um discreto aumento na glicose plasmática, uma diminuição na concentração de AGNE no plasma e nenhuma alteração nos níveis de insulina com o fornecimento de 400 mL de glicerol puro nas primeiras duas semanas pós-parto. Sendo assim, a diminuição nos níveis de AGNE pode ser devido a um aumento na esterificação destes em triglicerídeos no fígado, já que glicerol pode ser absorvido através da parede ruminal e fosforilado no fígado pela glicerolquinase em  $\alpha$ -glicerolfosfato, e este pode ser utilizada pelo fígado para esterificar AGNE em triglicerídeos antes de exportá-lo para tecidos extra-hepáticos.

Outros compostos podem ser utilizados como precursores da gliconeogênese e torna-se importante comparar o glicerol com essas outras opções. Assim, DeFrain et al. (2004) testaram a utilização da GLB (80,2% de glicerol) ou do amido de milho como precursor gliconeogênico durante o período de transição em vacas leiteiras. Foram fornecidos 860 g de amido de milho (controle), 430 g de amido de milho + 430 g de GLB, ou 860 g de GLB, mesclados ao alimento. O consumo de MS no pré-parto foi superior no grupo controle (13,3 kg para o grupo controle versus 11 kg, em média, para os grupos tratados), entretanto, o consumo de MS no pós-parto não foi afetado. No pós-parto, a concentração de glicose plasmática foi maior no grupo controle (66 mg/dL versus 60,8 mg/dL para a média dos dois grupos consumindo GLB). A concentração plasmática de AGNE e a de triglicerídeos hepático foi similar nos primeiros 21 de lactação.

Em uma comparação semelhante, Carvalho et al. (2011) forneceram glicerol ou grão de milho úmido para vacas multíparas da raça Holandês de 28 dias pré-parto até 56 dias pós-parto. Porém, neste caso, o nível de inclusão de glicerol foi de cerca de 10%. O CMS, pré ou pós-parto não foi influenciado pelo

tratamento. O mesmo ocorreu com a produção de leite e sua composição. Os autores também observaram uma diminuição na glicemia (59,1 vs. 53,4 mg/dL) e um aumento na concentração de BHBO (0,58 vs. 0,82 mmol/L) com o fornecimento de glicerol, no pré-parto. Não foram observados efeitos sobre os metabólitos sanguíneos no pós-parto.

Bodarski et al. (2005) observaram um maior CMS com o fornecimento de glicerina (300 ou 500 mL) para vacas leiteiras de três semanas pré-parto até 70 dias pós-parto (19,86 kg/dia, no grupo controle; 21,51 kg/dia no grupo recebendo 300 mL de glicerina e; 21,78 kg/dia no grupo consumindo 500 mL de glicerina), especialmente entre a 4ª e a 9ª semana de lactação. Entretanto, Osborne et al. (2009), fornecendo 0 ou 20 g de glicerina/L de água de bebida, observaram uma diminuição de 16% no consumo de MS de vacas Holandês. No mesmo trabalho citado anteriormente, Bodarski et al. (2005) também observaram que a produção de leite foi 14,6 e 12,5% superior para os grupos tratados com 300 e 500 mL, respectivamente, com um decréscimo no teor de proteína bruta no leite. Com o maior nível de glicerol, a concentração de BHBO foi maior e a de glicose menor na terceira semana de lactação. A concentração de AGNE foi menor nos grupos tratados, na terceira semana, sendo que no grupo de maior inclusão de glicerol, esta diminuição foi percebida também na primeira semana. Os tratamentos também influenciaram positivamente o ECC (média de 3,35 versus 3,18 do grupo controle).

Com o objetivo de avaliar a influência do consumo de GLB sobre indicadores bioquímicos, Ogborn (2006) forneceu GLB (80,6% de glicerol) durante o pré-parto (5% da MS) sem que fossem detectadas alterações sobre a concentração de glicose, AGNE ou BHBO. Também não houve efeito do tratamento sobre a concentração de triglicerídeos ou glicogênio no fígado.

Chung et al. (2007) forneceram 0 ou 250 g/d de GLB (65% de glicerol) para 39 vacas Holandês, múltiparas, do parto até a terceira semana de lactação. As vacas tratadas apresentaram melhor status energético (maior concentração plasmática de glicose, menor de BHBO plasmático e de corpos cetônicos na urina) durante a segunda semana de lactação, apenas. Não houve alteração no consumo de alimentos ou produção de leite. Embora, não tenha havido influência do tratamento sobre a produção de gordura no leite, observou-se uma diminuição na sua concentração no grupo tratado (4,0 vs 4,37%,  $P < 0,07$ ). Nas vacas do grupo controle, somente 27% da variação no percentual de gordura pode ser explicado pelos níveis de AGNE (gordura do leite % =  $3,34 + 0,003 \times \text{AGNE plasmático}$ ;  $r^2 = 0,27$ ;  $P < 0,01$ ), para as vacas tratadas, esta relação pode explicar somente 6% desta variação (GB % =  $3,55 + 0,001 \times \text{AGNE plasmático}$ ;  $r^2 = 0,06$ ;  $P < 0,05$ ).

#### **1.2.7.1. Formas de administração**

Apesar de ser bastante estressante para o animal, o fornecimento de glicerina através de ingestão forçada parece ser mais efetivo do que o seu fornecimento mesclado aos alimentos (DeFrain et al., 2004; Ogborn, 2006; Goff & Horst, 2001; Linke et al., 2004).

Linke et al. (2004) avaliaram os efeitos do fornecimento de glicerol de diferentes maneiras (adicionado ao milho, *drench*, ou sonda esofágica), por uma semana, para vacas no terço médio da lactação e submetidas a um manejo que as levasse a um balanço energético negativo. A concentração de

acetato diminuiu em todos os tratamentos estudados. Em contrapartida, o propionato e o butirato tiveram sua concentração aumentada 4 horas após o consumo de glicerol independente da maneira com que este foi fornecido. O uso de *drench* ou da sonda resultou em um aumento na glicemia. A concentração de insulina também foi aumentada nestes tratamentos. O BHBO aumentou em todos os tratamentos estudados. Dessa forma, os autores concluíram que o glicerol deveria ser fornecido junto com a água para se associar com a fração líquida do rúmen ou escapar da fermentação ruminal e ser absorvido em sua forma intacta, sendo convertido em glicose no fígado. Caso contrário, o glicerol fermentado gerará propionato e butirato, o qual será metabolizado em BHBO pelo epitélio ruminal.

Ogborn (2006) observou uma diminuição no consumo de alimentos nos cinco primeiros dias do pós-parto com o fornecimento de GLB na forma de *drench*. Este achado pode ser fruto do grande estresse pelo qual o animal passa, diariamente, quando submetido a este tipo de procedimento.

### **1.2.8. Outros aditivos utilizados durante o período de transição**

Os aditivos precursores da gliconeogênese são substâncias administradas aos animais com subsequente absorção e conversão em glicose pelo fígado, com o propósito de aumentar a disponibilidade de glicose para o animal (Ogborn, 2006).

#### **1.2.8.1. Propilenoglicol**

O propilenoglicol (ou 1,2-propanodiol) é um álcool de aparência cristalina e oleosa. É o mais conhecido aditivo gliconeogênico, utilizado para tratar cetose pós-parto, pois quando administrado por via oral, uma grande quantidade escapa intacta da fermentação ruminal, é absorvido no intestino e transformado em glicose no fígado, primeiramente pela rota do lactoaldeído com subsequente oxidação a lactato (Studer et al., 1993). Outra porção do propilenoglicol é fermentada em propionato (Nielsen & Ingvarsten, 2004).

De acordo com Emery et al. (1964), o propilenoglicol apresenta uma digestibilidade quase que completa (menos de 0,1% é encontrado nas fezes) e a excreção no leite é de menos de 1%. Além disso, a sua digestibilidade é bastante rápida: cerca de metade do propilenoglicol desaparece no rúmen em 1 a 2 horas, e de 80 a 90% desaparecem em até 3 horas, sendo que em 10 minutos já é detectada sua presença na circulação sanguínea (Emery et al., 1964; Clapperton & Czerkawski, 1972).

Trabue et al. (2007) compararam a fermentação *in vitro* do propilenoglicol com a do glicerol e observaram que após 24 horas de incubação todo o propilenoglicol havia sido fermentado, enquanto 20% do glicerol ainda não o haviam. Ao contrário do que ocorre com o glicerol, os autores citaram uma diminuição na produção de butirato com a fermentação do propilenoglicol.

Em experimento *in vivo*, Grummer et al. (1994) forneceram 0, 296, 592 ou 887 mL de propilenoglicol para novilhas por quatro dias e observaram uma diminuição na relação acetato:propionato indicando que há uma conversão ruminal de propilenoglicol em propionato.

Nielsen & Ingvarsten (2004), revisando o assunto, citaram que o propilenoglicol incrementa a concentração de insulina em até 400% cerca de 30 minutos após seu fornecimento, indicando uma absorção muito rápida. A

literatura apresenta aumentos muito discretos, ou mesmo nenhum aumento, na glicemia, provavelmente devido ao grande aumento na insulina circulante frequentemente observado.

Pickett et al. (2003) observaram que a administração de 500 mL de propilenoglicol nos três primeiros dias pós-parto diminuiu a concentração de AGNE no plasma nos primeiros 21 dias de lactação. Também houve um aumento na glicemia e na concentração de glicogênio hepático.

Studer et al. (1993) forneceram 1 L de propilenoglicol nos 10 últimos dias de gestação para 30 vacas multíparas. A concentração plasmática de AGNE foi menor do que no grupo controle na última semana pré-parto (403 vs 234 pM), enquanto a de insulina foi maior (0,354 vs 0,679 ng/mL). O acúmulo de triglicerídeos no fígado nas três primeiras semanas pós-parto foi menor no grupo tratado (32 vs 42%). Houve uma grande correlação entre glicose, AGNE, BHBO e insulina pré-parto com os triglicerídeos hepáticos ( $r = -0,49; 0,45; 0,36; -0,49$ ).

Essa melhora no *status* energético, pode impactar o desempenho reprodutivo de maneira positiva. Fonseca et al. (2003) observaram uma diminuição de 10 dias no intervalo parto-1º cio com o fornecimento de 300 mL de propilenoglicol no período peri-parto.

O fornecimento de um precursor de glicose de rápida fermentação pode influenciar também o metabolismo do nitrogênio dietético. Formigoni et al. (1996) observaram uma redução no NUL (<25 mg/L), principalmente durante as primeiras 9 semanas pós-parto com o fornecimento de propilenoglicol (300 g/d nos 10 últimos dias de gestação e diluído, nesta mesma quantidade, em 1 L de água nos dias 3, 6, 9 e 12 pós-parto).

Entretanto, alguns efeitos colaterais têm sido observados quando o propilenoglicol é consumido em altas quantidades. Johnson (1954) observou que o fornecimento de mais de 800 g de propilenoglicol por dia pode causar incoordenação por várias horas, e, segundo Pehrson (1972), o propilenoglicol também parece ser tóxico para algumas bactérias ruminais. Além disso, Maplesden (1954) relatou uma rejeição no consumo de alimentos quando o propilenoglicol é mesclado a este, sendo necessário administrar o produto através do método de ingestão forçada, na maioria das vezes, o que torna sua utilização bastante inconveniente, sendo, por isso, muito mais utilizado como curativo do que como preventivo.

#### **1.2.8.2. Propionato**

O propionato é o principal AGV precursor da gliconeogênese, com uma eficiência, aproximada, de 95% (Bergman, 1990). Seu mecanismo já foi bastante discutido na seção 1.2.3.3. Como aditivo, normalmente é complexado ao Ca ou microminerais.

Trabalhos têm demonstrado que o propionato como aditivo alimentar aumenta a concentração de glicose (Baird et al., 1980; Shultz, 1958; Schmidt & Shultz, 1958) e diminui a de BHBO (Goff et al., 1996; Schultz, 1958; Schmidt & Schultz, 1958) e de AGNE (Armentano et al., 1991; Jesse et al., 1986; Lomax et al., 1983). Entretanto, altas dosagens de propionato de sódio (>0,5 kg/dia) podem causar diarreia e aumentar o consumo de água (Oba & Allen, 2003).

### 1.3. HIPÓTESES E OBJETIVOS

Com os ensaios realizados e apresentados no presente trabalho, buscou-se testar as seguintes hipóteses:

- A glicerina bruta, resíduo (e potencialmente subproduto) da indústria do biodiesel, é um bom alimento energético alternativo para ruminantes;
- A glicerina bruta pode substituir o grão de milho, pelo menos parcialmente (inclusão de cerca de 10% da matéria seca total consumida), como fonte de alimento concentrado energético para vacas leiteiras sem qualquer alteração na produção, consumo de alimentos, eficiência produtiva ou indicadores bioquímicos do metabolismo energético;
- O consumo de glicerina bruta durante o período de transição de vaca seca para vaca lactante é benéfico para a produção e para o metabolismo energético, influenciando positivamente, inclusive, o retorno à ciclicidade de vacas leiteiras;
- A glicerina bruta apresenta eficácia e eficiência semelhantes ao propilenoglicol como aditivo precursor da gliconeogênese, utilizado durante o período de transição de vacas leiteiras, seja em relação à parâmetros produtivos, bioquímicos, retorno à ciclicidade ou incidência de cetose;
- Tanto a glicerina bruta quanto o propilenoglicol influenciam negativamente a concentração de gordura bruta no leite quando utilizados como aditivo durante o período de transição de vacas leiteiras.

O objetivo geral do trabalho foi:

- Avaliar a viabilidade de utilização da glicerina bruta como alimento alternativo para ruminantes (assim, passando à categoria de subproduto).

Os objetivos específicos foram:

- Detectar o nível máximo de inclusão de glicerina bruta na dieta de vacas leiteiras no terço médio de lactação sem que fosse observado qualquer prejuízo à produção, composição do leite ou metabolismo energético, consumo de alimentos e eficiência de utilização dos alimentos;
- Avaliar a glicerina bruta como precursor da gliconeogênese durante o período de transição em vacas leiteiras através de resultados produtivos, composição do leite, metabolismo energético, retorno à ciclicidade reprodutiva e incidência de distúrbios metabólicos;
- Comparar a eficácia e a eficiência da glicerina bruta como precursor da gliconeogênese durante o período de transição de vacas leiteiras contra o propilenoglicol, principal aditivo utilizado para este fim.

## **2. CAPÍTULO II<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Artigo elaborado conforme as Normas da Revista Animal Feed Science and Technology (Apêndice 1).

## **Glicerina bruta como alimento energético alternativo para vacas leiteiras**

### **Resumo**

Neste trabalho será demonstrado que a glicerina bruta, proveniente de uma usina produtora de biodiesel, é um bom alimento energético alternativo para vacas leiteiras. Foram utilizadas 8 vacas multíparas da raça Jersey, com  $85 \pm 20$  dias em lactação. Os tratamentos estudados foram: 0, 40, 80 e 120 g de glicerina bruta (contendo 814,4 g de glicerol/kg)/kg de matéria seca. As dietas experimentais eram isoprotéicas e isoenergéticas. O delineamento experimental utilizado foi o quadrado latino duplo. O consumo de glicerina bruta não influenciou a produção média diária de leite, produção de leite corrigido para 40 g de gordura bruta/L, produção e concentração média diária de gordura bruta, lactose ou sólidos totais no leite ( $P > 0,05$ ). A concentração de proteína bruta no leite foi maior com a inclusão de 120 g de glicerina bruta do que no grupo controle (37,2 vs 36,1 g/L, respectivamente,  $P < 0,05$ ). O consumo de glicerina bruta também influenciou positivamente a produção média diária de proteína bruta no nível de inclusão de 80 g/kg (0,77 vs 0,71 kg do grupo controle,  $P < 0,05$ ). Nenhum dos tratamentos estudados influenciou significativamente o consumo de matéria seca ou de matéria orgânica ou a eficiência alimentar ( $P > 0,05$ ). Entretanto, a eficiência energética foi influenciada de maneira cúbica pelos tratamentos ( $P < 0,05$ ). A digestibilidade da matéria seca, matéria orgânica ou da fibra em detergente neutro não sofreram influência do consumo de glicerina bruta ( $P > 0,05$ ). As concentrações séricas de ácidos graxos não-esterificados e de uréia não foram influenciadas pelo consumo de glicerina bruta ( $P > 0,05$ ). A glicemia respondeu de uma maneira quadrática ao consumo de glicerina bruta ( $P < 0,05$ ), sendo menor nos níveis intermediários de inclusão (40 e 80 g/kg). A

glicerina bruta é um bom alimento energético alternativo, em um nível de inclusão de até 120 g/kg de matéria seca, substituindo parcialmente o grão de milho moído na alimentação de vacas leiteiras podendo, inclusive, melhorar a concentração protéica do leite.

**Palavras-chave:** ácidos graxos não-esterificados, composição leite, consumo, digestibilidade, glicemia, produção leite

### **Crude glycerin as an alternative energy feed to dairy cows**

#### **Abstract**

In this work will be demonstrated that the crude glycerin, from a biodiesel plant, is a good alternative energy feed for dairy cows. There were used 8 Jersey multiparous cows, with  $85 \pm 20$  days in milk. The treatments were: 0, 40, 80 and 120 g of crude glycerin (containing 814.4 g of glycerol/kg)/kg of dry matter. The experimental diets were isonitrogenous and isoenergetics. The experimental design was a double latin square. The crude glycerin intake did not influenced the milk yield, 40 g/L fat-corrected milk yield, concentration and production of fat, lactose or total solids in milk ( $P > 0.05$ ). The crude protein concentration was greater with the inclusion of 120 g of crude glycerin than in the control group (37.2 vs 36.1 g/L, respectively,  $P < 0.05$ ). The crude glycerin intake also influenced, in a positive manner, the milk crude protein yield with the inclusion of 80 g/kg of dry matter (0.77 vs 0.71 kg/day from the control,  $P < 0.05$ ). No one of the treatments significantly changed the dry matter or the organic matter intake or the feed efficiency ( $P > 0.05$ ). However, the energy efficiency was influenced,

in a cubic manner, by the treatments ( $P < 0.05$ ). The dry matter, the organic matter and the neutral detergent fiber digestibility were not influenced by the crude glycerin intake ( $P > 0.05$ ). The blood concentrations of non-esterified fatty acids and urea were not altered by the crude glycerin intake ( $P > 0.05$ ). The glucose concentration respond in a quadratic manner to the crude glycerin intake ( $P < 0.05$ ) being small in the intermediary levels of inclusion (40 and 80 g/kg). The crude glycerin is a good alternative energy feed for dairy cows, in an inclusion up to 120 g/kg of dry matter, partially replacing the corn grain to fed dairy cows and can, additionally, improve the digestibility of the fibrous portion of the feeds and the protein milk concentration.

**Keywords:** blood glucose concentration, digestibility, intake, milk composition, milk production, non-esterified fatty acids

## 2.1. Introdução

Em 2008 passou a ser obrigatória a inclusão de 20 mL de biodiesel/L de diesel combustível fóssil no Brasil (LEI N° 11.097, de 13 de janeiro de 2005). Em 2010, através da Resolução CNPE, n° 6/2009, foi permitida a inclusão de até 50 mL/L. Dessa forma, em 2011 foram produzidos mais de 2,64 bilhões de litros de biodiesel no Brasil, enquanto em 2005, de março a dezembro foram produzidos somente 736,1 mil litros (ANP, 2012). Este grande aumento na produção de biodiesel é um fenômeno que não ocorre somente no Brasil. A produção mundial de biodiesel projetada para 2019 é de cerca de 41 bilhões de litros (OECD-FAO, 2010).

Com este incremento gigantesco na produção, outros problemas surgem, e junto com estes, novas oportunidades são detectadas. Estima-se que para cada litro de

biodiesel produzido, são gerados cerca de 100 mL de glicerina bruta (GLB) (Dasari et al., 2005), contendo, quantidades muito variáveis de glicerol.

Com um grande excedente nos últimos anos a GLB necessita de um destino que não seja a queima ou o descarte em rios e terrenos (destinos bastante comuns) para não afetar o ambiente. Quando descartada nos rios, causa consumo excessivo de oxigênio, causando um desequilíbrio na população aquática; se queimada, libera cloreína, considerada cancerígena, na atmosfera (Batista, 2007).

Entretanto, são necessários processos complexos e de alto custo para que essa matéria-prima alcance o grau de pureza necessário para as utilizações tradicionais (indústria de cosméticos, medicamentos e produtos de limpeza) (Diniz, 2009), visto que a GLB apresenta impurezas como água, catalisador (alcalino ou ácido), impurezas provindas dos reagentes, ácidos graxos, ésteres, etanol ou metanol, propanodióis, monoéteres e oligômeros de glicerina (Menten et al., 2008).

O glicerol, principal componente da GLB, possui alto teor energético (aproximadamente o mesmo do amido de milho) (Donkin & Doane, 2007) e com grande potencial para utilização na alimentação animal.

A GLB já foi testada como alimento alternativo energético para ruminantes (Schröder & Südekum, 1999; Mach et al., 2009; Wang et al, 2009; Lage et al., 2010), porém, na maioria dos casos, ou foi testada com animais de corte ou foi utilizada como alimento suplementar, incrementando o consumo de energia pelos animais. Nestes trabalhos, a eficiência de utilização dos alimentos e nutrientes também não foi avaliada. Assim, ainda há a necessidade da realização de novos estudos para avaliar a GLB como alimento energético alternativo, substituindo, principalmente, o grão de milho, principal alimento energético utilizado na alimentação de vacas leiteiras.

Com este trabalho objetivou-se demonstrar que a GLB proveniente de uma usina de produção de biodiesel é uma alternativa interessante como alimento energético para vacas leiteiras no terço médio de lactação consumindo dietas isoenergéticas e isoprotéicas, elevando seu *status* de resíduo para importante subproduto. Além disso, como objetivo específico, busca-se detectar seu nível máximo de inclusão na dieta sem que sejam observados efeitos negativos sobre a produção e aproveitamento dos alimentos.

## **2.2. Material e métodos**

### *2.2.1. Local*

O trabalho experimental de campo, desenvolvido de setembro a dezembro de 2009 foi conduzido no Sistema de Pecuária de Leite (SISPEL) na Estação Experimental Terras Baixas (ETB) do Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), localizado no município de Capão do Leão (31° 52' 20" de latitude sul e 52° 21' 24" de longitude oeste, altitude média de sete metros acima do nível do mar), Rio Grande do Sul, Brasil. As análises dos componentes do leite foram realizadas no Laboratório de Qualidade do Leite (LABLEITE), localizado nesta mesma estação experimental. As análises bromatológicas foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal e as análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias, ambos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

### *2.2.2. Instalações*

Em uma construção do tipo “free stall”, os animais experimentais foram mantidos individualmente, separados por meio de cerca eletrificada. Todos os boxes estavam equipados com bebedouro contendo água potável e cama com piso de areia.

### 2.2.3. *Animais experimentais*

Foram utilizadas oito vacas da raça Jersey selecionadas no rebanho do SISPEL, puras de origem, de 2<sup>a</sup> a 8<sup>a</sup> ordem de lactação, com peso corporal médio de  $421 \pm 39$  kg e  $85 \pm 20$  dias de lactação. A produção média diária de leite, antes do início do experimento, era de  $20,5 \pm 2,7$  L.

### 2.2.4. *Tratamentos*

Foram estudados os seguintes tratamentos: TC (controle) – sem inclusão de GLB na dieta; TG4 – 40 g de GLB/kg de MS da dieta; TG8 – 80 g de GLB/kg de MS da dieta; TG12 – 120 g de GLB/kg de MS da dieta. Os níveis de inclusão de GLB são descritos em base seca.

A glicerina bruta (GLB) utilizada continha 814,4 g de glicerol/kg de matéria seca (MS), 860,1 g de MS/kg, 1,1 g de proteína bruta (PB)/kg de MS, 14,29 MJ de EB/kg de MS e menos de 50 ppm de metanol. Para efeitos de cálculo das dietas, o glicerol foi assumido como sendo totalmente digestível. A EM foi estimada através do seguinte cálculo:  $EM = (1,01 \times ED - 0,45)$ . E a ELI foi estimada através do seguinte cálculo:  $ELI = (0,703 \times EM) - 0,19$ . Ambas as fórmulas, segundo o NRC (2001), utilizando calorias/kg como unidade. Dessa forma, a concentração energética, ELI, foi transformada em MJ/kg de MS, sendo estimado um teor de ELI de 8,20 MJ/kg de MS da GLB.

A EM dos demais alimentos, a partir de suas composições bromatológicas foi estimada, também, segundo o NRC (2001): quando estes possuíam menos de 30 g de

gordura bruta (GB)/kg de MS,  $EM = ED * 1,01 - 0,45$ . Possuindo mais do que 30 g de GB/kg de MS,  $EM = ED * 1,01 - 0,45 + 0,0046 * (GB - 3)$ . A mesma fórmula utilizada para estimar a ELI da GLB foi utilizada para estimar a ELI dos demais alimentos com menos de 30 g de GB/kg de MS. Para alimentos com mais de 30 g de GB/kg de MS, foi utilizada a seguinte fórmula (NRC, 2001):  $ELI = (0,703 \times EM) - 0,19 + ((0,097 * EM + 0,19) / 97) * (GB - 3)$ . Para estimativa da ED dos alimentos, foram utilizadas as tabelas do NRC (2001), já que o único objetivo destas análises, no presente experimento, foi prover dietas experimentais com igual densidade energética. A exemplo do que foi citado anteriormente, como os modelos foram construídos utilizando a unidade de calorias/kg, os resultados foram transformados em MJ/kg.

#### 2.2.5. *Dietas experimentais*

As dietas experimentais foram formuladas com o auxílio do programa computacional Spartan® (Michigan State University). As dietas fornecidas aos animais eram isoenergéticas e isoprotéicas e foram formuladas para atender as exigências dos animais já citados, com produção de 20 kg de leite/dia contendo 48 g de GB/kg, segundo o NRC (2001).

A estimativa de ELI a partir da composição bromatológica da GLB utilizada foi bastante semelhante a densidade energética observada no grão de milho moído. Dessa forma, a GLB entrou na composição das dietas, quase que exclusivamente, em substituição ao grão de milho.

Na Tabela 1 é apresentada a composições das dietas experimentais de acordo com cada alimento utilizado bem como a sua composição química.

#### 2.2.6. *Delineamento experimental*

O delineamento experimental utilizado foi em quadrado latino (4 x 4) duplo, com quatro tratamentos e quatro períodos, sendo os animais considerados como unidades experimentais.

#### 2.2.7. *Manejo experimental*

Cerca de 14 dias antes do início do experimento, os animais foram confinados e adaptados à dieta controle experimental, tendo sua produção e consumo medidos.

As dietas experimentais foram formuladas de maneira que houvesse uma oferta mínima de 500 g de volumoso/kg de MS. A oferta foi ajustada para que sempre houvesse uma sobra mínima de 10% garantindo um consumo de alimento *ad libitum*.

Os animais foram alimentados após cada ordenha (8:00 e 17:30 horas), sendo que a mistura concentrada e a GLB eram divididos em três refeições, havendo seu fornecimento também ao meio-dia. Primeiramente era fornecida a mistura concentrada, a qual era mesclada com a GLB já dentro do cocho. Apenas após o consumo total dessa mistura, eram fornecidos os alimentos volumosos, garantindo que a GLB fosse consumida em sua totalidade. Pela manhã, antes da ordenha, eram pesadas as sobras de alimentos e, caso fosse necessário, ajustada a oferta.

Foram utilizados 10 dias de adaptação dos animais aos tratamentos e sete dias de avaliação de consumo máximo e de digestibilidade aparente. Para estimativa da produção fecal, foram fornecidos 10 g de sesquióxido de cromo (Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), em duas vezes ao dia, mesclados a cerca de 100 g de alimentos concentrados, após cada ordenha.

Durante o período de medida do coeficiente de digestibilidade aparente, foram coletadas amostras de fezes diretamente do reto, duas vezes ao dia, logo após a ordenha e antes da alimentação dos animais. Estas amostras foram colocadas em sacos plásticos, identificadas e armazenadas em freezer (-8°C). Ao final de cada período de coleta, as

amostras de fezes foram descongeladas, e foi retirada uma alíquota de cerca de 100 g/turno de coleta, homogeneizadas e formada uma amostra composta, correspondente a cada período, por animal e tratamento.

Logo após a ordenha da manhã, no 12° e 16° dia de cada período experimental, foi realizada a coleta de sangue dos animais experimentais através de venopunção da jugular. As amostras foram armazenadas em tubos, sem anticoagulante, somente durante o tempo de formação de coágulo, e então centrifugadas a 8000 RPM durante 10 minutos para a separação do soro. O soro foi separado e transferido para Eppendorfs que foram armazenados em freezer (-8° C) para posterior determinação de ácidos graxos não-esterificados (AGNE) e uréia. Neste momento também foi analisada a concentração sanguínea de glicose, utilizando o kit comercial Accu-check® (Abbot Laboratories S.A.).

#### 2.2.8. Avaliações

A produção individual de leite foi medida automaticamente nas duas ordenhas do dia (7:00 e 17:00) durante todo o período experimental, sendo que do 11° ao 17° dia de cada período, gerou a produção média de cada período. A produção média diária foi corrigida para 40 g de GB/L (PLCG), conforme a seguinte equação (Gaines & Davidson, 1925):  $PLCG = (0,4 \times L \text{ de leite}) + (15 \times L \text{ de leite} \times \text{concentração de GB no leite})$ .

Amostras de leite de duas ordenhas consecutivas (manhã e tarde) de todos os animais experimentais foram recolhidas no 11°, 14° e 17° dia de cada período. Após a medição da produção, o leite presente nos tubos coletores foi homogeneizado e retirada uma alíquota. As amostras foram conservadas em recipientes adicionados de bronopol (2-bromo,2-nitro-1,3-propanediol), refrigeradas e enviadas ao laboratório em até 24

horas. Os componentes do leite - GB, proteína bruta (PB), lactose e sólidos totais - foram determinados por espectroscopia de infravermelho, segundo a AOAC (1996, método 972.16).

A partir dos dados das três coletas de cada período, foram calculadas as médias para cada componente por período experimental. A concentração de cada componente do leite foi obtida através do seguinte cálculo: Componente (g/L) = (concentração observada na ordenha da manhã x proporção do leite produzido na manhã em relação à produção total) + (concentração observada na ordenha da tarde x proporção do leite produzido na tarde em relação à produção total).

A produção média diária de cada componente foi obtida através do seguinte cálculo: Produção componente (kg) = concentração do componente (g/L) x produção média diária de leite (L).

O coeficiente de digestibilidade foi mensurado através da seguinte equação: Coeficiente de digestibilidade = (fração consumida - fração excretada)/fração consumida. A produção fecal (PF) foi medida da seguinte forma: PF = (g óxido de cromo dosificado/dia) / (g óxido de cromo/g MS fecal).

Também foi avaliada a eficiência produtiva dos animais (L de leite produzido/kg de MS ou de MO consumida) e a eficiência energética (MJ de ELI produzida/MJ de ELI consumida).

A produção diária de energia líquida de lactação do leite foi calculada a partir da seguinte fórmula (NRC, 2001):  $ELI_{prod.} (Mcal) = (0,0929*GB (g/L)+0,0547*PB (g/L)+0,0395*Lactose (g/L))*média\ diária\ de\ leite (L)$ . A seguir os valores foram transformados em MJ/kg.

As análises de AGNE foram realizadas utilizando kits comerciais (Randox<sup>®</sup>) com leitura sendo realizada em um analisador automático Metrolab D-1600<sup>®</sup>. As análises de uréia foram realizadas com o kit comercial Ureia 500<sup>®</sup>, da Doles S.A. e as leituras foram realizadas em um espectrofotômetro.

As análises de FDN foram realizadas segundo Van Soest & Robertson (1985), as de MS segundo Easley et al. (1965), e as de MO, PB e EE segundo a AOAC (1996) (métodos 942.05, 954.05 e 920.39, respectivamente).

### 2.2.9. Análise estatística

Todos os dados foram analisados através da análise de variância com o procedimento GLM do programa estatístico SAS, versão 9.0 (SAS Institute, Inc., Cary, NC). As causas de variação estudadas foram: tratamento, período, quadrado latino, vaca dentro de quadrado latino e quadrado latino\*tratamento. Foi adotado como significativo um  $P < 0,05$  e como tendência  $P > 0,05$  e  $< 0,10$ .

No caso de ter sido detectado efeito significativo para tratamento na ANOVA, foi realizado o teste de regressão (linear, quadrático e cúbico), utilizando, sempre, os níveis de inclusão de GLB como variável contínua. Caso a regressão não tenha apresentado significância estatística, procedeu-se a análise do teste de médias (Tukey 5%).

O modelo utilizado para a ANOVA foi:  $Y_{ijkl} = \mu + T_i + QL_j + V_k(QL_j) + P_l + (QLT)_{ij} + E_{ijkl}$ . Onde:  $Y_{ijkl}$  = valor da média obtida em cada observação;  $\mu$  = média geral da variável no experimento;  $T_i$  = efeito do tratamento  $i$ ;  $QL_j$  = efeito do quadrado latino  $j$ ;  $V_k(QL_j)$  = efeito do animal  $k$  dentro do quadrado latino  $j$ ;  $P_l$  = efeito do período  $l$ ;  $(QLT)_{ij}$  = interação entre quadrado latino  $j$  e tratamento  $i$ ;  $E_{ijkl}$  = Erro experimental.

E para a análise de regressão em cada parâmetro foi utilizado o modelo:  $Y_{ij} = \mu \pm \beta_1 P_j + \beta_2 P_j^2 + \beta_3 P_j^3$ . Onde:  $Y_{ij}$  =  $i$ -ésima observação associada ao  $j$ -ésimo nível de

inclusão de glicerina bruta;  $\mu$  = média geral da variável no experimento;  $\beta_1P_j$  = regressor associado ao efeito linear da inclusão de glicerina bruta;  $\beta_2P_j^2$  = regressor associado ao efeito quadrático da inclusão de glicerina bruta;  $\beta_3P_j^3$  = regressor associado ao efeito cúbico da inclusão de glicerina bruta.

### 2.3. Resultados

Não foi observada influência da inclusão de glicerina bruta (GLB) sobre a produção de leite (L), produção de leite corrigido para 40 g de gordura bruta (GB)/L de leite (PLCG, L), concentração (g/L) ou produção média diária (kg) de GB, lactose ou sólidos totais (Tabela 2).

A concentração de proteína bruta (PB) no leite (g/L) foi influenciada pelo nível de inclusão de GLB (Tabela 2;  $P < 0,05$ ), havendo uma tendência ( $P = 0,0540$ ) para esta mesma influência sobre a produção média diária de PB (kg). Foi observado um leite com teor de PB 3,05% menor no TC do que no TG12 (Tabela 2;  $P < 0,05$ ).

No TG8 os animais produziram, em média, 8,45% a mais de PB/dia do que no TC (Tabela 2;  $P < 0,05$ ). Esta superioridade se deve ao fato da produção dos animais durante o recebimento deste tratamento ter sido 1,03 L/dia maior do que a produção média diária das vacas enquanto não consumiam GLB (20,90 vs 19,87 L/dia), associada a uma concentração de PB 2,22% maior no TG8 do que no TC, mesmo que não tenham sido identificadas diferenças significativas para estes parâmetros entre estes tratamentos (Tabela 2;  $P > 0,05$ ).

A inclusão de GLB não influenciou o consumo de matéria seca (CMS) ou de MO (CMO), seja em termos absolutos (kg) ou em relação ao peso corporal (g/kg de peso corporal), ou a eficiência alimentar (leite produzido/consumo de MS) (Tabela 3).

A eficiência energética, que relaciona a produção média diária de leite com o consumo médio diário de ELI, respondeu de uma maneira cúbica à inclusão de GLB na dieta, sendo a maior eficiência energética observada no TG8 (Figura 1;  $P < 0,05$ ).

O consumo dos diferentes níveis de GLB estudados não influenciou os coeficientes de digestibilidade da MS (CDMS), da MO (CDMO) ou da FDN (CDFDN) (Tabela 4).

O consumo de GLB influenciou a glicemia das vacas utilizadas no experimento (Tabela 5;  $P < 0,05$ ) de maneira quadrática (Figura 2;  $P < 0,05$ ), havendo uma diminuição inicial na glicemia no TG4, seguida por um incremento em resposta ao aumento no consumo de GLB.

Não foram observadas diferenças na concentração sérica de ácidos graxos não-esterificados (AGNE) ou uréia (Tabela 5).

## **2.4. Discussão**

### *2.4.1. Produção de leite*

Conforme demonstrado na Tabela 1, as dietas ofertadas aos animais eram isoenergéticas e isoprotéicas. Sendo assim, uma eventual diferença na produção leiteira seria mais influenciada por fatores como alteração no consumo de alimentos ou na sua digestibilidade, influenciando no aproveitamento dos nutrientes ingeridos, fatos não observados no presente trabalho (Tabela 3 e 4). Poucos trabalhos foram realizados com o objetivo de avaliar altos níveis de inclusão de glicerol/GLB (mais de 10%) na dieta de vacas no terço médio de lactação, um destes trabalhos é o de Donkin et al. (2009), que testando quatro níveis de inclusão de glicerol (0, 50, 100 e 150 g/kg de MS) não identificaram efeitos sobre a produção média diária de leite.

Assim, sem ter sido detectada qualquer influência dos tratamentos aplicados sobre a produção média diária de leite, ou sobre o teor médio de GB no leite, também não foi observada diferença para a PLCG (Tabela 2).

#### 2.4.2. *Composição do leite*

Para entender os resultados relacionados à composição do leite é fundamental conhecer o processo de fermentação do glicerol. Três rotas têm sido descritas para o glicerol ingerido oralmente: passagem (13%), fermentação (44%) e absorção (43%). Embora os primeiros trabalhos *in vitro* tenham observado uma fermentação quase que completa do glicerol, gerando propionato, lactato, succinato e acetato, a partir de resultados de trabalhos *in vivo*, ficou demonstrado que os principais compostos gerados são o propionato e o butirato, principalmente este último (Krehbiel, 2008). Carvalho et al. (2011) detectaram importantes alterações no padrão fermentativo em decorrência da inclusão de cerca de 110 g de glicerol/ kg de MS na dieta de vacas leiteiras durante o período de transição: aumento na proporção de propionato e de butirato (22,7% (controle) vs. 28,6% (glicerol) de propionato; 11,5% (controle) vs. 15,3% (glicerol) de butirato à custa de acetato (61,4% (controle) vs. 51,5% (glicerol)). Dessa forma, analisando apenas o percentual de cada um dos AGVs, como hipótese inicial poder-se-ia esperar que com uma maior inclusão de GLB haveria uma menor concentração de GB no leite devido a um efeito de diluição, já que, supostamente, exista uma maior disponibilidade de precursor de lactose (propionato), sendo este o principal componente osmótico e, assim, maior responsável pelo volume de leite produzido. Esse efeito de diluição foi observado por Chung et al. (2007).

Para entender o motivo pelo qual o consumo de GLB não influenciou a concentração ou a produção de GB, deve-se considerar que o nível máximo de inclusão

foi de apenas 120 g de GLB/kg de MS total e também considerar as características fermentativas do amido, principal carboidrato rapidamente fermentável do grão de milho. Zeoula et al. (1999) observaram uma concentração de 793,2 g de amido/kg de MS em amostras de milho brasileiro, que possui um coeficiente de digestibilidade superior a 0,90 e que também gera, fundamentalmente, propionato (Van Soest, 1994).

Ao se analisar os teores de PB no leite em cada um dos tratamentos, a hipótese inicial é que o mesmo comportamento seria seguido na produção média diária de PB, persistindo a diferença entre o TC e o TG12, o que não ocorreu. Apesar de não ter sido possível observar efeito de tratamento para produção de leite ( $P>0,05$ ), o TG8 apresentou uma produção média diária de 20,9 L de leite, contra 19,87 L do TC. Assim, associando este parâmetro ao teor médio diário de PB (36,1 g/L no TC e 36,9 g/L no TG8) para o cálculo de produção média diária de PB, é que temos a justificativa para a superioridade no TG8 (0,77 contra 0,71 kg no TC, Tabela 2,  $P<0,05$ ).

Um aumento na concentração de insulina plasmática tem reflexo positivo sobre a síntese de proteína do leite, mesmo que não haja um aporte adicional de aminoácidos, demonstrando a habilidade da glândula mamária em captar aminoácidos de outras fontes que não a dieta (Mackle et al., 2000). Entretanto, não foi observada uma diferença na glicemia dos animais do TC ou do TG12, que provavelmente influenciaria a concentração de insulina, justificando a maior concentração de PB no TG12 do que no TC (Tabela 2). O trabalho de Mackle et al. (2000) também invalida a hipótese de que a maior concentração de PB no TG12 deva-se a maior inclusão de farelo de soja na dieta do TG12 (até porque, no TC há uma maior inclusão de grão de milho, que também fornece aminoácidos, enquanto no TG12, há o maior nível de inclusão de glicerina bruta, que não fornece nenhum aminoácido ao animal). Donkin et al. (2009) sugerem

que com o consumo de glicerol exista uma melhora na eficiência de utilização do N, entretanto, neste caso, provavelmente haveria uma diminuição na concentração sérica de uréia, fato não observado (Tabela 5). O glicerol também influencia positivamente a concentração de PB nos casos em os animais enfrentem uma deficiência energética, mesmo que não haja um incremento na glicemia dos animais (Bodarski et al., 2005). Porém, Bodarski et al. (2005) utilizaram o glicerol com suplemento, enquanto no trabalho que estamos apresentando, foi realizada uma substituição do grão de milho pela GLB, provendo níveis iguais de energia (Tabela 1). Assim, fica evidente a necessidade de novos estudos com o objetivo de esclarecer por quais mecanismos o glicerol influencia positivamente a eficiência de síntese de PB pela glândula mamária.

#### *2.4.3. Consumo*

Donkin et al. (2009) observaram uma diminuição no consumo de alimentos nos primeiros sete dias de fornecimento do glicerol, certamente devido a adaptação dos animais a este novo alimento. Fato não observado no presente ensaio devido ao período de 10 dias de adaptação dos animais às dietas experimentais. Dessa forma, ficou evidenciado que após um período de adaptação a glicerina bruta não influencia o consumo de alimentos. Mach et al. (2009) também não observaram diferenças no CMS ou eficiência de utilização dos alimentos incluindo 0, 40, 80 ou 120 g de GLB/kg de MS na dieta de touros Holandês terminados em confinamento.

#### *2.4.4. Digestibilidade*

A atividade microbiana celulolítica e, conseqüentemente, o CDFDN parecem ser bastante influenciados, de maneira negativa, pelo inclusão de altos níveis de glicerol (Abo El-Nor et al., 2010; AbuGhazaleh et al., 2011; Donkin et al., 2009; Roger et al., 1992). Mas, ao se analisar os resultados do CDFDN aqui apresentados, é importante

considerar que a GLB substituiu, parcialmente, o grão de milho, alimento com grande conteúdo de amido, o qual possui características semelhantes as relatadas à respeito do glicerol no que tange a digestibilidade da porção fibrosa dos alimentos (os ditos efeitos associativos negativos, sendo o principal deles uma diminuição do CDFDN) (Chase & Hibberd, 1987). E neste trabalho, a oferta de grão de milho foi bastante alta. No TC, por exemplo, foi de 13,7 g/kg de peso corporal. Os resultados aqui apresentados, se não provam que a GLB não provoca efeitos associativos negativos sobre o aproveitamento da fibra, pelo menos demonstram que estes não são potencializados por este alimento.

#### 2.4.5. *Eficiência*

Linke et al. (2004) observaram um incremento na eficiência alimentar com o uso de GLB na alimentação de vacas leiteiras ( $P < 0,05$ ): enquanto foi observada uma eficiência de 1,46 kg de leite corrigido para 40 g de GB/L/kg de MS consumido sem o fornecimento do gliconeogênico, com 0,5 kg/dia este valor foi de 1,59, e com 1 kg/dia foi de 1,60. Inclusive, com esses resultados, os autores consideraram o glicerol como tendo uma concentração energética cerca de 20% superior à observada no grão de milho. Entretanto, a resposta cúbica da eficiência energética à inclusão de GLB (diminuição no TG4, seguido por um aumento no TG8 e uma posterior diminuição no TG12, Figura 1) observada no presente trabalho, torna esta uma estimativa bastante temerária em situações práticas.

A eficiência energética pode ser influenciada, de maneira direta, por alguns fatores bastante claros: consumo de ELL, que é o produto do consumo de alimentos e da concentração energética da dieta, e produção de ELL, que é o produto da concentração energética do leite produzido e da sua quantidade. A concentração energética das dietas ofertadas foi a mesma (Tabela 1). Também não foram identificadas diferenças no

consumo de alimentos (Tabela 3). Sendo assim, não houve diferença no consumo de ELI. A digestibilidade dos alimentos também não apresentou diferença entre os tratamentos estudados (Tabela 4). A produção de ELI também variou muito pouco entre os tratamentos (a maior diferença, 8,45%, foi observada entre o TG8 e o TG12, sendo maior no primeiro). Entre o TG4 e o TG8 esta diferença foi de apenas 4,01%, sendo maior no primeiro ( $P>0,05$ ). Porém, da associação de todos estes fatores é que derivou o comportamento cúbico observado ( $P<0,05$ ). Com este comportamento, pode ser observado um melhor aproveitamento da energia disponibilizada quando a GLB é incluída na dieta em níveis intermediários.

Lee et al. (2011), em experimento *in vitro*, observaram uma menor produção de metano no meio contendo glicerol, quando comparado ao meio contendo grão de milho (15,3 versus 29,6 mL/g de MS), demonstrando uma maior eficiência no processo fermentativo e um menor desperdício energético. Estes autores também observaram uma menor produção de metano e maior de propionato associando à alfafa ou ao grão de milho, o glicerol do que durante a incubação somente destes alimentos. Estes resultados podem auxiliar, pelo menos parcialmente, no entendimento dos resultados observados.

#### 2.4.6. Parâmetros bioquímicos

No presente trabalho, não foram detectadas alterações na concentração sérica de AGNE, provavelmente por terem sido utilizados como unidades experimentais animais no terço médio de lactação (65 a 173 dias em lactação, considerando todo o período experimental) período em que, classicamente, o consumo de alimentos atinge o seu pico (NRC, 2001). Assim, dificilmente animais de média produtividade, como os utilizados no experimento, estariam em um estado de déficit energético severo, não havendo a necessidade de haver mobilização das reservas corporais.

A concentração sérica de uréia pode ser considerada um bom indicador do balanço energia:PDR da dieta. Sendo assim, em dietas com igual teor protéico e mesma densidade energética, não há influência da GLB sobre este balanço (Tabela 5).

Conforme citado anteriormente, uma grande parte do glicerol fermentado no rúmen é transformada em ácido propiônico, que, por sua vez, é o principal precursor da gliconeogênese em animais ruminantes. Porém, uma grande parcela também é absorvida em sua forma intacta, entrando, também, na gliconeogênese e de uma maneira ainda mais eficiente (Krehbiel, 2008). No presente trabalho, foi observado um comportamento quadrático da glicemia em resposta ao consumo de GLB (Figura 2,  $P < 0,05$ ), havendo uma diminuição na glicemia nos menores níveis de inclusão (TG4 e TG8) com um incremento posterior (TG12). Provavelmente no TG4 e no TG8 houve uma maior fermentação do glicerol do que no TG12, quando é mais provável que uma maior fração escape à fermentação ruminal, sendo absorvido de maneira intacta.

A diminuição na glicemia no TG4 é um indicativo de que em dietas com baixa inclusão de glicerina em substituição ao grão de milho (quando é menos provável que esta escape à fermentação ruminal), o amido apresenta uma maior eficiência de conversão em glicose a partir da fermentação ruminal e geração de AGVs, provavelmente devido às características da população microbiana ruminal em dietas com alta inclusão de grão de milho (conforme pode ser visualizado na Tabela 1, foi de 291,9 e 249,2 g/kg de MS no TC e no TG4, respectivamente), que tem privilegiadas as espécies fermentadoras de amido, principalmente a *Streptococcus bovis*, *Ruminobacter amylophilus*, *Lactobacillus sp.*, invés das fermentadoras de glicerol, sendo a principal delas a *Selenomonas ruminantium* var. *lactilytica* (Hobson et al., 1961).

## 2.5. Conclusões

A glicerina bruta é um bom alimento energético alternativo, em um nível de inclusão de até 120 g/ kg de MS total consumida, podendo substituir parcialmente o grão de milho moído na alimentação de vacas leiteiras sem que sejam detectados quaisquer prejuízos sobre a produção, *status* energético, composição do leite, consumo de alimentos ou a sobre a sua digestibilidade. Inclusive, o consumo de glicerina bruta pode melhorar a concentração proteica do leite.

Mais estudos *in vivo* são necessários para avaliar todo o potencial da glicerina bruta como alimento para vacas leiteiras em produção, inclusive com o fornecimento de níveis de inclusão superiores aos estudados.

## Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e a empresa Granol S.A. pelo financiamento deste experimento.

## Referências

- Abo El-Nor, S., AbuGhazaleh, A.A., Potua, R.B., Hastings, D., Khattab, M.S.A., 2010. Effects of differing levels of glycerol on rumen fermentation and Bacteria. *Anim. Feed Sci. Technol.* 162, 99-105.
- AbuGhazaleh, A.A., Abo El-Nor, S., Ibrahim, S.A., 2011. The effect of replacing corn with glycerol on ruminal bacteria in continuous culture fermenters. *J. Anim. Physiol. and Anim. Nutr.* 95, 313–319.
- Agência Nacional do Petróleo (ANP). Retrieved March 3, 2012, from: <http://www.anp.gov.br>.

- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1996. Official Methods of Analysis. 16th ed. AOAC, Washington, DC., USA.
- Batista, F., 2007. Brasil não tem destino certo para glicerina gerada por biodiesel. *Gazeta mercantil*. Retrieved April 18, 2009, from: <http://www.biodieselbr.com/noticias/biodiesel/brasildestino-certo-glicerina-gerada-biodiesel-05-06-07.htm>>.
- Bodarski, R., Wertelecki, T., Bommer, F., Gosiewski, S., 2005. The changes of metabolic status and lactation performance in dairy cows under feeding tmr with glycerin (glycerol) supplement at periparturient period. *Electron. J. Pol. Agric. Univ., Anim. Husb.* 8, 1-9.
- Carvalho, E.R., Schmelz-Roberts, N.S., White, H.M., Doane, P.H., Donkin, S.S., 2011. Replacing corn with glycerol in diets for transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94, 908-916.
- Chase, C.C., Hibberd, C.A., 1987. Utilization of low-quality native grass hay by beef cows fed increasing quantities of corn grain. *J. Anim. Sci.* 65, 557-566.
- Chung, Y.H., Rico, D.E., Martinez, C.M., Cassidy, T.W., Noirot, V., Ames, A., Varga, G.A., 2007. Effects of feeding dry glycerin to early postpartum Holstein dairy cows on lactational performance and metabolic profiles. *J. Dairy. Sci.* 90, 5682-5691.
- Dasari, M.A., Kiatsimkul, P.P., Sutterlin, W.R., Suppes, G.J., 2005. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. *Applied Catalysis A: General* 281, 225-231.
- Diniz, G., 2009. De coadjuvante a protagonista: glicerina bruta obtida na produção de biodiesel pode ter muitas aplicações. Retrieved December 16, 2011 from: <http://cienciahoje.uol.com.br/controlPanel/materia/view/3973>.

- Donkin, S.S., Doane, P., 2007. Glycerol as a feed ingredient in dairy rations. Proceeding from the 2007 Tri-State Dairy Nutrition Conference. Fort Wayne, IN. The Ohio State University, Columbus. pp. 97-103.
- Donkin, S.S., Koser, S., White, H., Doane, P.H., Cecava, M.J., 2009. Feeding value of glycerol as a replacement for corn grain in rations fed to lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92, 5111-5119.
- Easley, J.F., McCall, J.T., Davies, G.K., Shirley, R.L., 1965. Analytical methods for feeds and tissues. Nutrition Laboratory, Department of Animal Science, University of Florida, Gainesville, 81 pp.
- Gaines, W.L., Davidson, F.A., 1925. The effect of advance in lactation and gestation on mammary activity. *The J. Gen. Physiol.* 9, 325-332.
- Hobson, P.N., Mann, S.O., 1961. The isolation of glycerol-fermenting and lipolytic bacteria from the rumen of the sheep. *J. Gen. Microbiol.* 25, 227-240.
- Krehbiel, C.R., 2008. Ruminal and physiological metabolism of glycerol. *J. Anim. Sci.* (E-Suppl. 2), 392.
- Lage, J.F., Paulino, P.V., Pereira, L.G.R., Valadares F<sup>o</sup>, S.C., de Oliveira, A.S., Detmann, E., Souza, N.K.P., Lima, J.C.M., 2010. Glicerina bruta na dieta de cordeiros terminados em confinamento. *Pesq. Agrop. Bras.* 45, 1012-1020.
- Lee, S.Y., Lee, S.M., Cho, Y.B., Kam, D.K., Lee, S.C., Kim, C.H., Seo, S., 2011. Glycerol as a feed supplement for ruminants: In vitro fermentation characteristics and methane production. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166-167, 269-274.
- Linke, P.L., DeFrain, J.M., Hippen, A.R., Jardon, P.W., 2004. Ruminal and plasma responses in dairy cows to drenching or feeding glycerol. *J. Dairy Sci.* 87 (Suppl. 1), 343.

- Mach, N., Bach, A., Devant, M. Effects of crude glycerin supplementation on performance and meat quality of Holstein bulls fed high- concentrate diets. *J. Anim. Sci.* 87, 632-638.
- Mackle, T.R., Dwyer, D.A., Ingvarsten, K.L., Chouinard, P.Y., Ross, D.A., Bauman, D.E. Effects of insulin and postruminal supply of protein on use of amino acids by the mammary gland for milk protein synthesis. *J. Dairy Sci.* 83, 93-105.
- Menten, J.F.M., Pereira, P.W.Z., Racanicci, A.M.C., 2008. Avaliação da glicerina proveniente da produção do biodiesel como ingrediente para rações de frango de corte. *Rev. Bras. Ciência Avíc.* 10 (Suppl.), p. 66.
- National Research Council (NRC), 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. National Academic Press, Washington, DC.
- Organisation for Economic Co-operation and Development – Food and Agricultural Organization (OECD-FAO), 2010. *OECD-FAO agricultural outlook 2010–2019*, OECD, Food and Agriculture Organization of the United Nations. OECD Publishing.
- Roger, V., Fonty, G., Andre, C., Gouet, P., 1992. Effects of glycerol on the growth, adhesion and cellulolytic activity of rumen cellulolytic bacteria and anaerobic fungi. *Curr. Microbiol.* 25, 197-201.
- Schröder, A., Südekum, K.H., 1999. Glycerol as a by-product of biodiesel production in diets for ruminants. In: *Proc. 10th Int. Rapeseed Congr.*, Canberra, Australia, September, 26-29, Paper No. 241.
- Van Soest, P.J., 1994. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, 476 p.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B. 1985. *Analysis of forage and fibrous foods – a laboratory manual for animal science*. Ithaca: Cornell University Press, 202 p.

- Wang, C., Liu, Q., Huo, W.J., Yang, W.Z., Dong, K.H., Huang, Y.X., Guo, G., 2009. Effects of glycerol on rumen fermentation, urinary excretion of purine derivatives and feed digestibility in steers. *Livest. Sci.* 121, 15-20.
- Zeoula, L.M., Martins, A.S., Prado, I.N., Alcalde, C.R., Branco, A.F., Santos, G.T., 1999. Solubilidade e Degradabilidade Ruminal do Amido de Diferentes Alimentos. *Rev. Bras. Zootec.* 28, 898-905.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais (g/kg de MS)

Composição	TC	TG4	TG8	TG12
<b>Ingrediente</b>				
Silagem de sorgo	274,1	275,1	271,7	271,4
Feno de alfafa	245,2	246,1	243	242,7
Grão de milho	291,9	249,2	207,7	158,6
Farelo de soja	167,8	168,5	177,4	187,7
Glicerina bruta	-	40,1	79,2	118,6
Núcleo vitamínico e mineral*	20	20	20	20
Bicarbonato de sódio	1	1	1	1
<b>Composição química</b>				
MS	726,1	724,8	726	725,5
MO	924,7	922,4	920,3	917,6
PB	165,7	162,5	162,5	163,1
FDNc**	338	335,3	329,3	326,1
ELI (MJ/kg)	6,53	6,53	6,53	6,53

TC = sem inclusão de glicerina bruta; TG4 = 40 g de glicerina bruta/kg de MS; TG8 = 80 g de glicerina bruta/kg de MS; TG12 = 120 g de glicerina bruta/kg de MS

\*Contém (g/kg): Ca (mínimo) 220 g; P (mínimo) 95 g; Mg (mínimo) 12 g; Na (mínimo) 60 g; S (mínimo) 12 g; Vit. A (mínimo) 120000 UI; Vit. D3 (mínimo) 30000 UI; Vit. E (mínimo) 750 mg; Se 20 mg; Zn 3000 mg; F (máximo) 950 mg.

\*\*Fibra em detergente neutro corrigida para cinzas

Tabela 2. Produção de leite (L/dia), produção de leite corrigido para 40 g de GB/L (PLCG, L/dia), gordura bruta no leite (GB, g/L), produção de gordura bruta (kg/dia), proteína bruta no leite (PB, g/L), produção de proteína bruta (kg/dia), lactose (g/L), produção de lactose (kg/dia), sólidos totais (g/L) e produção de sólidos totais (kg/dia)

Parâmetro	Tratamento					Valor P
	TC	TG4	TG8	TG12	EP	
Produção leite (L)	19,87	19,84	20,90	19,64	0,5182	0,1643
PLCG (L)	19,02	18,84	19,48	17,84	0,5357	0,3029
GB (g/L)	37,7	36,7	35,5	34,0	1,0618	0,2800
Produção GB (kg/dia)	0,74	0,73	0,74	0,67	0,0261	0,3601
PB (g/L)	36,1 <sup>b</sup>	36,2 <sup>ab</sup>	36,9 <sup>ab</sup>	37,2 <sup>a</sup>	0,3300	0,0141
Produção PB (kg/dia)	0,71 <sup>b</sup>	0,72 <sup>ab</sup>	0,77 <sup>a</sup>	0,73 <sup>ab</sup>	0,0186	0,0540
Lactose (g/L)	45,0	45,4	44,9	44,8	0,4247	0,5328
Produção de lactose (kg/dia)	0,90	0,91	0,94	0,88	0,0280	0,2520
Sólidos totais (g/kg)	128,5	128,3	127,7	125,5	1,3855	0,4164
Produção de sólidos totais (kg/dia)	2,54	2,55	2,67	2,47	0,0699	0,1973

<sup>a,b</sup>Letras diferentes, na mesma linha, indicam uma diferença de 5% segundo Tukey (P<0,05).

TC = sem inclusão de glicerina bruta; TG4 = 40 g de glicerina bruta/kg de MS; TG8 = 80 g de glicerina bruta/kg de MS; TG12 = 120 g de glicerina bruta/kg de MS

PLCG = produção de leite corrigido para 40 g de GB/L; GB = gordura bruta; PB = proteína bruta; EP = erro padrão

Tabela 3. Consumo de matéria seca (CMS, kg e g/kg de peso corporal), consumo de matéria orgânica (CMO, kg e g/kg de peso corporal), eficiência alimentar (leite prod./CMS; leite prod./CMO; PLCG/CMS; PLCG/CMO), eficiência energética (ELI prod./ELI cons.)

Parâmetro	Tratamento					Valor P
	TC	TG4	TG8	TG12	EP	
CMS (kg)	19,07	18,52	18,50	18,51	0,4072	0,7474
CMO (kg)	17,72	17,16	17,10	17,09	0,3791	0,6596
CMS (g/kg de PC)	47,1	45,3	45,6	45,0	1,0679	0,4366
CMO (g/kg de PC)	43,8	42,0	42,1	41,6	0,9960	0,3580
Eficiência alimentar (leite prod./CMS)	1,05	1,07	1,12	1,06	0,0207	0,4841
Eficiência alimentar (leite prod./CMO)	1,13	1,16	1,21	1,15	0,0223	0,4264
Eficiência alimentar (PLCG/CMS)	1,01	1,01	1,05	0,96	0,0193	0,3890
Eficiência alimentar (PLCG/CMO)	1,12	1,06	1,13	1,03	0,0208	0,3008
Eficiência energética (ELI prod./ELI cons.)*	0,45	0,43	0,48	0,42	0,0096	0,0447

TC = sem inclusão de glicerina bruta; TG4 = 40 g de glicerina bruta/kg de MS; TG8 = 80 g de glicerina bruta/kg de MS; TG12 = 120 g de glicerina bruta/kg de MS

CMS = consumo de matéria seca; CMO = consumo de matéria orgânica; PC = peso corporal; PLCG = produção de leite corrigido para 40 g de GB/L; ELI = energia líquida de lactação; EP = erro padrão

\*Linear (P = 0,4981); Quadrático (P = 0,4011); Cúbico (P = 0,0353)

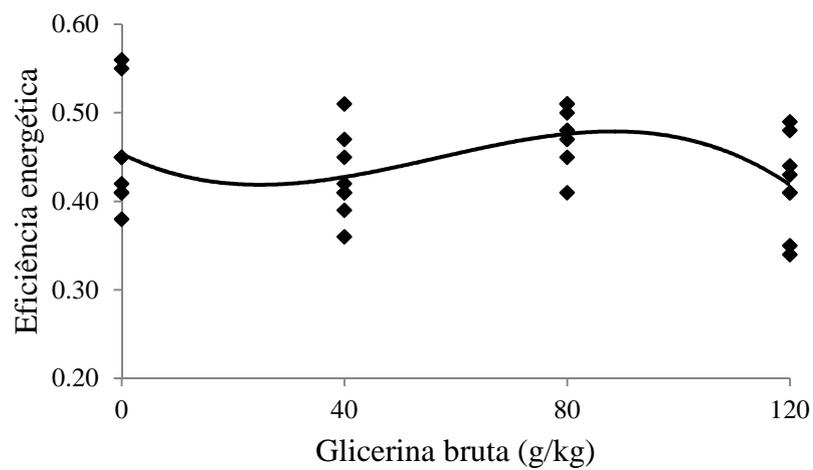


Figura 1. Efeito da inclusão de glicerina bruta (g/kg) sobre a eficiência energética.  
Eficiência energética =  $0,4537 - 0,0031 * \text{glicerina bruta} + 0,00008 * \text{glicerina bruta}^2 - 0,0000005 * \text{glicerina bruta}^3$ ;  $r^2 = 0,1787$

Tabela 4. Coeficientes de digestibilidade da matéria seca (CDMS), matéria orgânica (CDMO) e fibra em detergente neutro (CDFDN)

Parâmetro	Tratamento					Valor P
	TC	TG4	TG8	TG12	EP	
CDMS	0,65	0,65	0,65	0,66	0,0059	0,9295
CDMO	0,68	0,68	0,68	0,69	0,0052	0,9513
CDFDN	0,46	0,47	0,42	0,45	0,0103	0,4070

TC = sem inclusão de glicerina bruta; TG4 = 40 g de glicerina bruta/kg de MS; TG8 = 80 g de glicerina bruta/kg de MS; TG12 = 120 g de glicerina bruta/kg de MS

CDMS = coeficiente de digestibilidade da matéria seca; CDMO = coeficiente de digestibilidade da matéria orgânica; CDFDN = coeficiente de digestibilidade da fibra em detergente neutro; EP = erro padrão

Tabela 5. Parâmetros sanguíneos: glicose (mg/dL), ácidos graxos não-esterificados (AGNE, mmol/L) e uréia (mg/dL)

Parâmetro	Tratamento					Valor P
	TC	TG4	TG8	TG12	EP	
Glicose (mg/dL)*	70,88	66,88	69,31	72,00	0,6735	0,0354
AGNE (mmol/L)	0,21	0,17	0,18	0,19	0,0093	0,3844
Uréia (mg/dL)	51,20	47,64	44,28	48,41	1,1993	0,2348

TC = sem inclusão de glicerina bruta; TG4 = 40 g de glicerina bruta/kg de MS; TG8 = 80 g de glicerina bruta/kg de MS; TG12 = 120 g de glicerina bruta/kg de MS

AGNE = ácidos graxos não-esterificados; EP = erro padrão

\*Linear (P = 0,2946); Quadrático (P = 0,0104); Cúbico (P = 0,2652)

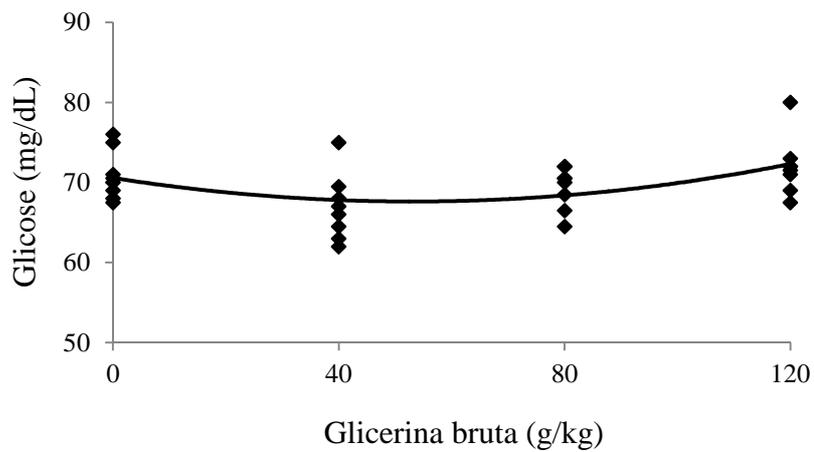


Figura 2. Efeito da inclusão de glicerina bruta (g/kg) sobre a concentração sanguínea de glicose (mg/dL).  $Glicose (mg/dL) = 70,566 - 1,1086 * glicerina\ bruta + 0,1045 * glicerina\ bruta^2$ ;  $r^2 = 0,2288$ .

### **3. CAPÍTULO III<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Artigo elaborado conforme as Normas da Revista Animal Feed Science and Technology (Apêndice 1).

## **Glicerina bruta como aditivo precursor da gliconeogênese durante o período de transição em vacas leiteiras**

### **Resumo**

Foi realizado um experimento com o objetivo de avaliar a glicerina bruta como precursor da gliconeogênese durante o período de transição de vaca seca para vaca lactante. Foram utilizadas 24 vacas da raça Holandês distribuídas entre os seguintes tratamentos: controle (TC - sem o fornecimento de aditivos precursores da gliconeogênese); 1 mL de glicerina bruta (contendo 814,4 g de glicerol/kg de matéria seca)/kg de peso corporal/dia (TG) e; 1 mL de propilenoglicol por kg/peso corporal/dia (TP). Os tratamentos iniciaram 14 dias antes da data prevista de parto e terminaram 14 dias após o parto. A produção de leite foi medida diariamente, através de sistema computadorizado de ordenha. As avaliações de escore de condição corporal (ECC), composição do leite e parâmetros bioquímicos foram realizadas a cada duas semanas, até a décima semana de lactação. O cio era detectado através de pedômetro, associado à detecção visual. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos completamente casualizados, sendo os blocos formados de acordo com a ordem de lactação e a data prevista de parto. Foi observada uma maior produção média diária de leite em quase todos os períodos de estudo no TP ( $P < 0,05$ ). O TP também apresentou uma maior produção média de leite corrigido para 40 g de gordura bruta (GB)/L ( $P < 0,05$ ), enquanto a produção das vacas do TC foi superior à observada no TG ( $P < 0,05$ ). O consumo de aditivo gliconeogênico influenciou negativamente a concentração de GB no leite ( $P < 0,05$ ), entretanto, houve uma diminuição linear com o avançar da lactação no TC. Nos demais tratamentos a concentração permaneceu sem alterações ( $P < 0,05$ ). Este

comportamento deve-se à menor concentração de GB durante o consumo de qualquer um dos aditivos gliconeogênicos, desaparecendo esta diferença em períodos posteriores ( $P < 0,05$ ). A produção média diária de GB foi menor no TG do que nos demais ( $P < 0,05$ ). A concentração de lactose foi menor no TP ( $P < 0,05$ ), porém, este foi o tratamento com maior produção média diária deste componente ( $P < 0,05$ ). A concentração de nitrogênio uréico no leite foi menor no leite das vacas tratadas ( $P < 0,05$ ). Não houve influência dos tratamentos estudados sobre o intervalo parto-1º cio, ECC, glicemia, concentração de ácidos graxos não-esterificados ou de beta-hidroxibutirato ( $P > 0,05$ ). Com o presente trabalho pode-se concluir que o propilenoglicol fornecido durante o período de transição para vacas leiteiras é benéfico para a produção leiteira, diferentemente da glicerina bruta. Entretanto, ambos os aditivos gliconeogênicos estudados causam uma diminuição no teor médio de GB do leite.

**Palavras-chave:** ácidos graxos não-esterificados, beta-hidroxibutirato, composição leite, produção leite, propilenoglicol

**Crude glycerin as a gluconeogenesis additive precursor during the transition  
period in dairy cows**

**Abstract**

An experiment was carried out with the aim of evaluate the crude glycerin as a gluconeogenesis precursor during the transition period from dry to lactating cow. There were used 24 Holstein cows distributed between the following treatments: control (CT –

without any additive intake); 1mL of crude glycerin (containing 814.4 g of glycerol)/kg of body weight (GT) and; 1mL of propylene glycol/kg of body weight (PT). The treatments beginning 14 days pre-partum and were finished 14 days postpartum. The milk production was measured daily, using a computer system. The body condition score (BCS), milk composition and biochemical parameters were evaluated at every two weeks, until the 10<sup>a</sup> lactation week. The occurrence of estrus was detected using pedometer, associated to the visual detection. The experimental design used was the complete casualized blocks, being the blocks formed according the lactation number and the prevision of the partum day. There was observed a greater dairy milk production in almost all periods with the PT ( $P < 0.05$ ). Adittionaly, the PT showed a greater 40 g/L fat-corrected milk production than the others treatments ( $P < 0.05$ ), while the production of the cows from the CT was greater than the observed at the GT ( $P < 0.05$ ). The gluconeogenic intake influenced in a negative manner the milk crude fat (CF) concentration ( $P < 0.05$ ), however, there was a linear decreased with the lactation progress in the CT, without any alteration in any other treatment ( $P < 0.05$ ). This result must be due the minor CF concentration during the intake of anyone of the gluconeogenics, disappearing this difference in posteriors periods ( $P < 0.05$ ). The CF daily mean production was smaller with the GT than in the others treatments ( $P < 0.05$ ). The lactose concentration was smaller in the PT than in the others treatments ( $P < 0.05$ ), but that was the treatment with the greater mean daily production of this milk component ( $P < 0.05$ ). The milk ureic nitrogen was smaller in the milk of the treated cows ( $P < 0.05$ ). There was not influence of the treatments over the partum-first estrus interval, BCS, blood glucose concentration, non-esterified fatty acids or beta-hydroxybutirate ( $P > 0.05$ ). With this experiment it can be concluded that the propylene

glycol provided during the transition period of dairy cows is beneficial to the milk production, differently that the crude glycerin. However, both of the gluconeogenics cause a decreased in the milk fat concentration.

**Keywords:** beta-hydroxybutirate, milk composition, milk production, non-esterified fatty acids, propylene glycol

### 3.1. Introdução

O período de transição em vacas leiteiras pode ser definido como as últimas três semanas de gestação e as três primeiras semanas de lactação (Grummer, 1995). É considerado como o período de maior importância sobre a lactação e de maior ocorrência de distúrbios metabólicos (Drackley, 1999). Entre os principais distúrbios deste período estão a síndrome do fígado gorduroso e a cetose (Hutjens, 1992).

Esses distúrbios têm origem no déficit energético pelo qual as vacas, especialmente aquelas de maior produção, experimentam nas primeiras semanas de lactação. Isto ocorre porque há um grande incremento nas exigências nutricionais por ocasião do desencadeamento da lactação associado a um período de baixo consumo de alimentos. Enquanto o pico de produção é atingido por volta da 6ª semana de lactação, o consumo máximo de matéria seca só é atingido cerca de quatro a seis semanas depois (NRC, 2001).

Como resultado do intenso déficit energético sofrido no início da lactação, a vaca passa a mobilizar seu tecido adiposo, disponibilizando glicerol e ácidos graxos como uma fonte de energia. O glicerol ingressa na rota gliconeogênica, já os ácidos graxos, que entram na circulação na forma de ácidos graxos não-esterificados (AGNE), podem

seguir três rotas no fígado: 1) completa oxidação a dióxido de carbono para fornecimento de energia; 2) oxidação parcial para produção de corpos cetônicos que são liberados no sangue e servem com fontes de energia para outros tecidos ou; 3) serem reconvertidos a triglicerídeos (Goff & Horst, 1997).

Obviamente, a primeira rota a ser seguida é a da oxidação completa, entretanto, há um limite com que o fígado consiga realizar esta tarefa fazendo com que os AGNE entrem no ciclo de Krebs. O passo seguinte seria exportar estes ácidos graxos como lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), porém os ruminantes possuem baixa capacidade para síntese e secreção destas lipoproteínas para exportação de triglicerídeos do fígado (Kleppe et al., 1988; Pullen et al., 1989), no entanto capacidade semelhante a outros mamíferos em recuperar AGNE em triglicerídeos (Kleppe et al., 1988). Aliado a isso, há o fato do tecido hepático destes animais ter uma capacidade maior de esterificar AGNE em triglicerídeos com a aproximação do parto (Grum et al. 1996; Litherland et al., 2003). Assim, estes triglicerídeos acumulam-se nos hepatócitos, e o acetilCoA que não entra no ciclo de Krebs é convertido em acetato e beta-hidroxibutirato (BHBO). A gliconeogênese é inibida, inclusive aquela que usa o propionato como substrato, e o resultado é um estado de hipoglicemia. O consumo diminui, bem como a produção de leite (Goff & Horst, 1997).

Várias estratégias têm sido estudadas para reverter o quadro descrito: reduzir as exigências energéticas através do fornecimento de substâncias capazes de modificar a composição do leite, como os ácidos linoleicos conjugados (CLA) (Bauman & Grinari, 2003); uso de substâncias que modificam a fermentação ruminal, como os antibióticos ionóforos, disponibilizando uma maior concentração de substratos para a gliconeogênese (Juchem et al., 2004); substâncias que atuam em partes específicas da

rota gliconeogênica, como a niacina (Hutjens, 1992); e, finalmente, aditivos precursores da gliconeogênese, como é o caso do propionato, do propilenoglicol (PPG) e do glicerol (Goff et al., 1996; Fonseca et al., 2004; DeFrain et al., 2004).

O glicerol como aditivo precursor da gliconeogênese já foi estudado há muitas décadas, porém sua utilização sempre esbarrava em seu alto preço (Johns, 1953). Atualmente, com a busca por fontes renováveis de combustível, este cenário mudou, já que a glicerina bruta (GLB), contendo até 850 g de glicerol/kg de MS, é um importante resíduo (e potencial subproduto) da produção de biodiesel (para cada litro de biodiesel, são gerados cerca de 100 mL de GLB) (Dasari et al., 2005). No Brasil, especificamente a partir de 2008, passou a existir um grande excedente de GLB a partir da lei N° 11.097, de 13 de janeiro de 2005, que torna obrigatória a inclusão de 20 mL de biodiesel/L de diesel combustível fóssil. A partir de 2010, é permitida a inclusão de até 50 mL de biodiesel. Somente em 2011 foram produzidos 2,64 bilhões de litros de biodiesel, no país (ANP, 2012), com uma produção estimada de cerca de 264 milhões de litros de GLB.

Com este trabalho objetivou-se: 1) avaliar os efeitos do fornecimento de GLB, mesclada ao alimento durante o período de transição em vacas leiteiras, sobre a produção e a composição do leite, escore de condição corporal, intervalo parto-1° cio e parâmetros bioquímicos (ácidos graxos não-esterificados, glicose e beta-hidroxibutirato); 2) comparar a eficácia da GLB com o PPG, precursor da gliconeogênese mais utilizado em rebanhos comerciais em todo o mundo, como aditivo energético consumido durante o período de transição.

### **3.2. Material e métodos**

### 3.2.1. Local

O trabalho foi realizado na Fazenda do Araçá, localizada no município de Viamão (30° 04' 51" de latitude sul e 51° 01' 22" de longitude oeste, altitude média de 111 metros acima do nível do mar), Rio Grande do Sul, Brasil, de julho de 2009 até abril de 2010. As análises bromatológicas dos alimentos foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). As análises de composição do leite foram realizadas no Laboratório de Serviços de Rebanhos Leiteiros (Sarle) da Universidade de Passo Fundo (UPF).

### 3.2.2. Animais experimentais

Foram utilizados 24 animais da raça Holandês (12 multíparas e 12 novilhas), entrando no experimento 14 dias antes da data prevista de parto. As multíparas apresentavam-se entre a segunda e a quinta lactação.

### 3.2.3. Tratamentos

Os tratamentos utilizados foram: controle (TC) - sem o fornecimento de qualquer aditivo precursor da gliconeogênese; propilenoglicol (TP) – fornecimento de 1 mL de PPG/kg de peso corporal (PC); glicerina bruta (TG) – fornecimento de 1 mL de GLB/kg PC. A GLB utilizada apresentava 814,4 g de glicerol/kg de matéria seca (MS) e uma contaminação com metanol inferior a 5 ppm. O PPG utilizado apresentava uma pureza de 998 g/kg MS.

### 3.2.4. Dietas experimentais

A dieta dos animais era composta por pastagem consorciada de aveia (*Avena sativa* L.) e azevém (*Lolium multiflorum*) (inverno e parte da primavera) e milheto (*Pennisetum glaucum*) (verão), silagem de planta inteira de milho, bagaço de laranja, resíduo úmido de cervejaria, farelo de soja, grão de milho moído e núcleo vitamínico e

mineral (Tabela 1). A composição bromatológica média dos alimentos é apresentada na Tabela 2.

### 3.2.5. *Delineamento experimental*

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos completos casualizados com os animais sendo considerados como unidades experimentais. Os blocos foram formados de acordo com a data de parto e a ordem de lactação dos animais. Foram utilizados três animais por bloco, com oito repetições por tratamento.

### 3.2.6. *Manejo experimental*

Os tratamentos (GLB ou PPG) eram mesclados a uma pequena parcela dos alimentos concentrados (cerca de 1 kg), em cochos plásticos, fornecido sempre após a ordenha. Somente após o consumo de todo este alimento, o restante do alimento era fornecido aos animais, garantindo o completo consumo dos aditivos. Este manejo iniciou 14 dias antes da data prevista de parto e teve término 14 dias após o parto.

Os animais eram mantidos soltos em campos com pastagem consorciada de aveia e azevém (inverno e primavera) ou milheto (verão), permanecendo presos individualmente em estábulo somente durante o consumo de alimentos concentrados, sempre após a ordenha da manhã (07:00) e da tarde (19:00).

A pesagem dos animais, avaliação de escore de condição corporal (ECC), coleta de leite e de sangue foi realizada a cada 14 dias. A produção de leite foi medida, individualmente, diariamente. A coleta de leite, individualizada, de duas ordenhas consecutivas (tarde e manhã) foi realizada utilizando copos coletores acoplados ao sistema de canalização do equipamento de ordenha. As amostras eram então homogeneizadas e uma alíquota era armazenada em frascos contendo bromopol,

refrigeradas e enviadas ao laboratório no mesmo dia, sendo o material analisado em até 5 dias.

Após a ordenha era coletada uma amostra de sangue através de venopunção da jugular. A amostra era transferida para tubos, sem a presença de anticoagulante, sendo centrifugada a 8000 RPM durante 10 minutos para a separação do soro tão logo formasse ocorria a coagulação do sangue. O soro foi separado e transferido para Eppendorfs que foram armazenados em freezer (-8°C) para posterior determinação de ácidos graxos não-esterificados (AGNE) e beta-hidroxibutirato (BHBO). Neste momento também foi analisada a concentração plasmática de glicose, utilizando o kit comercial Accu-check® (Abbot Laboratories S.A.).

Posteriormente, os animais tiveram seu peso estimado, utilizando uma fita de medida torácica e o seu ECC era avaliado segundo Wildman et al. (1982).

### 3.2.7. Avaliações

A produção diária de leite era medida através do sistema de gerenciamento de rebanhos Afimilk®, o qual realiza a medição da produção através de um sistema de fluxo contínuo, armazenando os dados em um programa computacional.

A detecção de cio foi realizada através da medição da atividade da vaca, com a utilização de pedômetros, associada à observação visual.

Os componentes do leite - gordura bruta (GB), proteína bruta (PB), lactose, sólidos totais e nitrogênio uréico no leite (NUL) - foram determinados por espectroscopia de infra-vermelho, segundo a AOAC (1996, método 972.16).

A produção média diária foi corrigida para 40 g de GB/L (PLCG), conforme a seguinte equação (Gaines & Davidson, 1925):  $PLCG = (0,4 \times L \text{ de leite}) + (15 \times L \text{ de leite} \times \text{concentração de GB})$ . A produção média diária de cada componente, em kg, foi

obtida através do seguinte cálculo: Produção componente (kg) = concentração do componente (g/L de leite) x produção média diária de leite (L/dia).

As análises de AGNE e BHBO foram realizadas utilizando kits comerciais (Randox<sup>®</sup>) com leitura sendo realizada em um analisador automático Metrolab D-1600<sup>®</sup>.

As análises de FDN e FDA foram realizadas segundo Van Soest & Robertson (1985), as de MS segundo Easley et al. (1965), MO e PB segundo a AOAC (1996) (métodos 934.01, 942.05 e 954.01, respectivamente).

### 3.2.8. Análises estatísticas

Os dados de produção média diária de leite, composição do leite, produção média diária de cada componente do leite, glicose plasmática, concentração sérica de AGNE e de BHBO, ECC de cada vaca foram analisados em blocos completos casualizados em parcelas subdivididas, com medidas repetidas no tempo. Na parcela principal as variáveis estudadas foram: tratamento, bloco e bloco dentro de cada tratamento. Na subparcela as variáveis estudadas foram: tempo pós-parto e a interação tratamento\*tempo pós-parto. Para a medida do intervalo parto-1<sup>o</sup> cio os resultados foram analisados em blocos completos casualizados, sendo que as variáveis estudadas foram tratamento e bloco. Em ambos os casos, a análise da variância foi realizada através do procedimento GLM do aplicativo computacional SAS, versão 9.0 (SAS Institute, Inc., Cary, NC). No caso de ter sido detectada diferença significativa para tratamento, procedeu-se o teste de médias (Tukey) a 5%, utilizando o aplicativo computacional já citado. Diferenças com um  $P > 0,05$  e menor do que 0,10 foram consideradas como tendência. Os dados também foram analisados através do

procedimentos LSMEANS do SAS, possibilitando a comparação das médias de cada tratamento em cada período de duas semanas.

O modelo utilizado para a análise da variância do intervalo parto-1<sup>o</sup> cio foi:  $Y_{ijk} = \mu + T_i + B_j + E_{ijk}$ . Onde:  $Y_{ijk}$  = valor da média obtida em cada observação;  $\mu$  = média geral da variável no experimento;  $T_i$  = efeito do tratamento i;  $B_j$  = efeito do bloco j;  $E_{ijk}$  = Erro experimental.

Para os demais parâmetros estudados foi utilizado o modelo:  $Y_{ijkl} = \mu + T_i + B_j + B_j * T_i + D_k + (TD)_{ik} + E_{ijkl}$ . Onde:  $Y_{ijkl}$  = valor da média obtida em cada observação;  $\mu$  = média geral da variável no experimento;  $T_i$  = efeito do tratamento i;  $B_j$  = efeito do bloco j;  $B_j * T_i$  = efeito da interação entre o bloco j e o tratamento i;  $D_k$  = efeito da data de coleta/medida k;  $(TD)_{ik}$  = efeito da interação entre o tratamento i e a data de coleta/medida k;  $E_{ijkl}$  = Erro experimental.

### 3.3. Resultados

Os tratamentos estudados não influenciaram a produção média diária de leite (L), a concentração ou a produção média diária de proteína bruta (PB, g/kg e kg/dia, respectivamente), ou o intervalo parto-1<sup>o</sup> cio (IPC, dias), avaliando-se os dados médios de todo o período experimental (Tabela 3;  $P > 0,05$ ).

Na Figura 1A pode ser observado que a produção média diária de leite ao longo do tempo de lactação apresentou comportamento semelhante entre os diferentes tratamentos estudados, com o pico de produção sendo atingido por volta da 4<sup>a</sup> semana de lactação (média geral = 30,65 L de leite), sendo mantido até a 10<sup>a</sup> semana (média geral = 29,33 L) ( $P < 0,05$ ).

Apesar de não ser observada diferença entre os tratamentos ao se avaliar a produção média diária de leite durante todo o experimento, correlacionando este parâmetro com o tempo de lactação, foi possível detectar uma maior produção no tratamento propilenoglicol (TP) do que nos demais em todas as semanas de avaliações, com exceção do tratamento glicerina bruta (TG) na 10<sup>a</sup> semana de lactação (Figura 1A;  $P < 0,05$ ).

Não houve efeito da interação tratamento\*tempo pós-parto ( $P > 0,05$ ) porque, independente do tratamento aplicado, a produção média diária seguiu uma variação temporal bastante semelhante (Figura 1A).

A concentração de proteína bruta (PB) sofreu uma diminuição com o avançar da lactação, sendo que esta foi mais marcada entre a 2<sup>a</sup> e a 4<sup>a</sup> semana de lactação (32,0 versus 29,5 g/L de leite). Após a 6<sup>a</sup> semana de lactação esta concentração foi estabilizada até o fim do período de avaliações (média = 28,9 g/L) (Figura 2A;  $P < 0,05$ ). Foi observada uma tendência para uma maior concentração de PB no TC (29,4 g/L) do que no TG (27,1 g/L) na sexta semana de lactação, apenas (Figura 2A;  $P = 0,0529$ ).

A produção média diária de PB foi maior no TP na 2<sup>a</sup> semana de lactação (0,99 kg/dia versus 0,82 kg/dia nos demais tratamentos; Figura 2B;  $P < 0,05$ ). Na sexta ( $P = 0,0587$ ) e na oitava semana de lactação ( $P = 0,0993$ ) foi observada tendência para uma maior produção média diária de PB no TP do que no TG (Figura 2B).

Houve uma maior produção de leite corrigido para 40 g de GB/L de leite (PLCG) no TP do que nos demais grupos, sendo que a superioridade deste tratamento em relação ao TG foi de 21,75% e em comparação ao TC foi de 12,41% (Tabela 3;  $P < 0,05$ ). No entanto, mesmo o TC apresentou uma maior PLCG do que o TG (Tabela 3;  $P < 0,05$ ). Neste caso, a diferença foi de 8,33%.

Como pode ser visto na Figura 1B, a PLCG atingiu seu pico na 6ª semana de lactação no TP (28,14 L/dia), porém no TC o pico ocorreu logo na 4ª semana (25,37 L/dia). No TG foi observado um comportamento bastante irregular com o pico aparecendo na 4ª semana (22,96 L/dia). Dessa forma, foram observadas diferenças na PLCG no período entre a 4ª e a 8ª semana de lactação entre o TG e o TP (Figura 4;  $P < 0,05$ ) e uma tendência para este comportamento no período compreendido entre a 6ª e a 8ª semana de lactação entre o TC e o TP (Figura 1B;  $P = 0,0903$ ).

A PLCG foi maior no TP do que no TG na 6ª e na 8ª semana de lactação (6ª semana: 28,14 vs 21,04 L/dia e 8ª semana: 28,02 vs 21,05 L/dia para o TG e o TP, respectivamente) (Figura 1B;  $P < 0,05$ ). Também foi observada uma tendência ( $P = 0,0903$ ) para uma maior PLCG no TP do que no TC na 8ª semana de lactação (28,02 vs 23,18 L/dia).

A concentração de GB no leite foi maior no TC do que no TG ou no TP (Tabela 3;  $P < 0,05$ ), enquanto na produção média diária de GB no leite, foi observada uma menor produção no TG do que nos dois demais tratamentos (Tabela 3;  $P < 0,05$ ). Entretanto, mais importante do que esta diferença entre as médias, é a observação de que a interação tratamento\*tempo pós-parto influenciou significativamente a concentração de GB (Figura 5;  $P < 0,05$ ) e há uma tendência de que esta mesma interação esteja influenciando a produção média diária de GB (Figura 3B;  $P = 0,0838$ ).

Em ambos os parâmetros, houve uma diminuição linear com o avançar do tempo de lactação no TC (concentração de GB:  $r^2 = 0,41$ ; produção média diária de GB:  $r^2 = 0,09$ ;  $P < 0,05$ ). Nos demais tratamentos o tempo de lactação não influenciou estes parâmetros ( $P > 0,05$ ).

A concentração média de lactose de todo o período experimental foi menor no TP (Tabela 3,  $P < 0,05$ ), mesmo resultado observado ao se analisar os diferentes períodos de avaliação (Figura 4A;  $P < 0,05$ ). Entretanto a produção média diária deste componente foi maior justamente por estes animais, do TP, mesmo sendo observada uma concentração de lactose 5,78% superior no TG ou no TC (Tabela 3;  $P < 0,05$ ).

A concentração de nitrogênio uréico no leite (NUL) das vacas tratadas foi menor do que no TC: 18,53% menor no TG e 13,59% menor no TP (Tabela 3;  $P < 0,05$ ). Não foram observadas diferenças na concentração de NUL dos diferentes tratamentos estudados em nenhuma data de avaliação deste parâmetro ou influência do tempo de lactação sobre este (Tabela 3; Figura 5;  $P > 0,05$ ).

Os tratamentos estudados não influenciaram o ECC, a glicemia ou as concentrações médias de AGNE ou BHBO (Tabela 4;  $P > 0,05$ ).

Os tratamentos aplicados não influenciaram o ECC em nenhuma das datas de avaliação, entretanto, foi observado um menor ECC na 2ª (2,59) e na 4ª (2,64) semana de lactação em comparação com o período pré-parto (2,77) na média dos tratamentos (Figura 6;  $P < 0,05$ ).

Não foi observada diferença na glicemia dos animais em nenhuma das medidas repetidas no tempo. Porém, houve uma maior concentração média de glicose no dia do parto (83,54 mg/dL) do que nas demais medidas (64,32 mg/dL) (Figura 7A;  $P < 0,05$ ).

Os tratamentos estudados não influenciaram a concentração sérica de AGNE. Porém, houve um ligeiro incremento na sua concentração no dia do parto (0,5919 mmol/L), com uma rápida diminuição posterior a este (0,3336 mmol/L), atingindo um platô a partir dos 28 dias de lactação ( $\mu = 0,1943$  mmol/L) (Figura 7B,  $P < 0,05$ ).

Não foi detectada diferença entre os tratamentos em nenhuma das datas de medida da concentração sérica de BHBO ou influência de data de avaliação sobre este parâmetro (Tabela 4; Figura 7C).

### 3.4. Discussão

Durante o período de consumo dos tratamentos (até a 2ª semana de lactação), pode-se afirmar que, pelo menos parcialmente, a maior produção de leite no TP seja fruto do maior conteúdo energético do PPG, já que se trabalhou com uma GLB contendo 814,4 g de glicerol/kg, enquanto o PPG utilizado possuía uma pureza de 99,98%. Assumindo que é totalmente digestível (Emery et al., 1964), o PPG fornece 23,681 MJ de ED/kg. Enquanto isso, assumindo também a completa digestibilidade da GLB, esta aportou 14,523 MJ de ED/kg. Com as vacas apresentando um PC médio de 546 kg durante o período de consumo dos tratamentos, isso significa uma diferença de 5 MJ de ED/dia.

Utilizando modelo do NRC (2001), o teor de ELI contido em cada litro de leite do presente experimento foi de 2,30 MJ para o TG e TP, enquanto para o TC foi de 2,46 MJ. Assim, mesmo que toda a energia contida no PPG fosse disponibilizada para a produção leiteira, somente este fator não seria capaz de explicar a diferença de 5,22 L na produção média diária entre os TP e TG nas primeiras duas semanas de lactação (Figura 1A), e muito menos a sustentação destes efeitos até seis semanas após o período de consumo dos gliconeogênicos (8ª semana de lactação).

Outro indício de que somente a diferença de conteúdo energético dos aditivos não explique este resultado é a não observância de diferença entre o TC e o TG, mesmo com o fornecimento adicional de, em média, 4,48 MJ de ELI/dia (utilizando-se modelos do

NRC, 2001, foi estimada uma ELI de 8,20 MJ/kg de GLB) até a segunda semana de lactação neste último tratamento.

Uma alteração no consumo de MS também poderia causar estas diferenças, porém, apesar desta avaliação não ter sido realizada neste experimento, diversos autores não observaram influência positiva do consumo de PPG sobre o consumo de MS (Fisher et al., 1973; Miyoshi et al., 2001; Pickett et al., 2003).

Apesar de vários autores não observarem influência do consumo de PPG no período de transição sobre a produção leiteira (Studer et al., 1993; Formigoni et al., 1996; Lucci et al., 1998; Pickett et al., 2003; Juchem et al., 2004), Fonseca et al. (2004) observaram um incremento na produção na 4<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup> e 7<sup>a</sup> semana de lactação ( $P < 0,05$ ), com uma tendência para a manutenção deste resultado também na 6<sup>a</sup> semana de lactação ( $P < 0,10$ ).

Com relação ao teor de PB no leite a não observância de diferença entre os tratamentos (Tabela 3), concorda com os resultados de experimentos de outros autores (Pickett et al., 2003; DeFrain et al., 2004; Juchem et al., 2004; Chung et al., 2007; Osborne et al., 2008). Mackle et al. (2000) demonstraram que um aumento na concentração sanguínea de insulina tem reflexo positivo sobre a síntese de proteína do leite, mesmo que não haja um aporte adicional de aminoácidos, demonstrando a habilidade da glândula mamária em adequar a disponibilidade de nutrientes às suas necessidades. Este mecanismo ainda não está totalmente esclarecido, porém, analisando a Tabela 4, observa-se que os tratamentos estudados não influenciaram a concentração sanguínea de glicose, dessa forma, provavelmente, os tratamentos estudados também não influenciaram a concentração de insulina.

A maior produção média diária de PB nos primeiros 14 dias de lactação, com o TP, deve-se a maior produção de leite neste período com este tratamento (30,88 L versus 25,66 L no TG e 25,81 L no TC; Figura 1A;  $P < 0,05$ ). Dessa forma, enquanto no TP foi produzido, em média, 0,99 kg de PB/dia até a segunda semana de lactação, nos TG e TC foram produzidos 0,82 kg/dia (Figura 2B,  $P < 0,05$ ).

A maior PLCG no TP do que nos demais tratamentos deve-se ao fato de sua produção média diária de leite ter sido 18% maior do que no TC e 15% maior do que no TG. Mesmo que estas diferenças não tenham sido estatisticamente significativas, a associação desta maior produção, com um leite contendo 7% a mais de GB é que determinou a maior PLCG em comparação ao TG. Enquanto a diferença entre o TP e o TC é fruto da maior produção média com o consumo do gliconeogênico, mesmo que esta não tenha sido significativa (Tabela 3,  $P > 0,05$ ). Enquanto isso, a maior PLCG do TC em relação ao TG deve-se, exclusivamente, a maior concentração de GB no leite das vacas do TC (Tabela 3), já que não foi observada diferença na produção média diária de leite nestes dois tratamentos (Figura 3).

A hipótese mais provável para a diminuição no teor de GB em função do consumo de glicerol ou de propilenoglicol é de que estes provoquem alterações na formação e relações entre os principais ácidos graxos voláteis (AGVs) produzidos no rúmen. Esta hipótese ganha ainda mais força quando se observa que a única diferença entre os tratamentos foi observada nos primeiros 14 dias pós-parto (Figura 3A). Tanto o glicerol quanto o PPG apresentam rápida fermentação e grande disponibilidade, sendo transformados, em grande parte, em propionato através da fermentação ruminal (Johns, 1953; Garton et al., 1961; Grummer et al., 1994; Bergner et al., 1995; DeFrain et al., 2004; Nielsen et al., 2004; Carvalho et al., 2011). Rémond et al. (1993), por exemplo,

observaram que a proporção de glicerol transformado em propionato variou de 0,35 a 0,69. Também é relatada uma diminuição na produção de acetato, principal precursor dos ácidos graxos presentes no leite (Emery et al., 1964; Christensen et al., 1997; Carvalho et al., 2011). Porém, mais importante quando se estuda a concentração de GB no leite, é a proporção de cada um destes AGVs em relação à produção total de AGVs. Vários pesquisadores tem observado uma diminuição na relação acetato:propionato com estes dois gliconeogênicos (Grummer et al., 1994; Christensen et al., 1997; Schröder & Südekum, 1999; DeFrain et al., 2004; Nielsen et al., 2004; Wang et al., 2009). Assim, esta hipótese baseia-se no princípio de que havendo um incremento maior na disponibilidade do principal precursor da lactose (propionato) do que no principal precursor da gordura (acetato), em termos relativos, quando se lança mão de aditivos como o glicerol e o PPG haja uma menor concentração de GB devido a um efeito de diluição, já que a lactose é o principal componente determinante para o volume de leite produzido. Entretanto, para que existisse este efeito de diluição, deveria haver uma maior produção de lactose nos grupos tratados, o que não aconteceu no TG (Tabela 3).

Outra hipótese para uma menor concentração de GB no leite de vacas consumindo precursores da gliconeogênese é que, com a utilização de PPG ou GLB haja uma menor mobilização de reservas corporais, não havendo, assim, um aumento na concentração de AGNE, que poderiam ser utilizados como fonte de ácidos graxos para a formação da GB do leite (Bell et al., 1995). Entretanto, no presente trabalho esta hipótese pode ser descartada, já que não foi observada nenhuma influência do consumo de PPG ou GLB sobre a concentração de AGNE (Tabela 4), muito em razão da baixa condição corporal dos animais experimentais. Feitas estas considerações, fica evidente a necessidade de

novas pesquisas a respeito da influência de baixos níveis de consumo de GLB sobre a concentração de GB no leite.

Na produção diária de GB, desapareceu a diferença entre o TC e o TP, devido à diferença de 5,34 L/dia na produção média diária de leite entre ambos (Tabela 3). Contrariamente, a diferença de apenas 0,78 L de leite/dia entre o TG e o TC não foi suficiente para contornar a diferença de 17% entre os resultados da concentração de GB no leite. Entretanto, deve-se observar que o comportamento de ambos os parâmetros ao longo do tempo de avaliação foi semelhante (Figura 3). Enquanto no TC foi observada uma diminuição linear na concentração de GB ( $P < 0,05$ ) e uma tendência a este comportamento para a produção média diária de GB ( $P = 0,0616$ ), nos demais tratamentos este parâmetro não apresentou influência ou tendência para uma influência do período de avaliação. Conforme já comentado, foi observado que este comportamento derivava do maior teor de GB no TC na segunda semana de lactação ( $P < 0,05$ ), já que nos períodos posteriores não foi observada nenhuma diferença entre os tratamentos, enquanto a diminuição linear na produção de GB no TC nada mais é do que um reflexo do resultado observado no teor de GB.

A lactose é o componente de menor variação no leite, não sendo observada nenhuma influência do fornecimento de glicerol (DeFrain et al., 2004; Bodarski et al., 2005; Chung et al., 2007; Osborne et al., 2008) ou PPG (Cozzi et al., 1996) sobre este componente, contrariamente aos resultados observados no presente trabalho (Tabela 3).

O fator de maior influência sobre a concentração de lactose no leite é o estado sanitário da glândula mamária, havendo uma forte correlação negativa entre CCS e teor de lactose no leite devido a alterações no equilíbrio osmótico e passagem de lactose da glândula mamária para a corrente sanguínea (Shuster et al., 1991). Entretanto, no

presente trabalho foi observada, inclusive uma menor CCS com o TP ou com o TG do que no TC (Tabela 3,  $P < 0,05$ ). Resultados de alguns autores sugerem haver uma relação do teor de lactose com a subnutrição (Sobhani et al., 1998; Ponce Ceballo & Hernandez, 2001; Marques, 2004). Porém, os animais experimentais não experimentavam uma condição de subnutrição e, além do mais, a dieta basal consumida por estes era absolutamente igual, independente do tratamento aplicado. Esta afirmativa é corroborada pelos demais resultados observados, principalmente aqueles relacionados à concentração de AGNE e ECC.

Juchem et al. (2004) também observaram uma diminuição no teor de lactose do leite com a utilização de PPG, sem que uma explicação concreta para tal tenha sido encontrada.

A maior produção média diária de lactose é fruto da maior produção diária de leite, em termos numéricos, pelas vacas do TP (34,70 versus 30,14 L/dia do TG e 29,36 L/dia do TC) (Tabela 3;  $P > 0,05$ ) possibilitando o aparecimento de uma diferença de 11,94% em favor do TP contra o TC e de 9,49% contra o TG (Tabela 3,  $P < 0,05$ ). Na Figura 4 é apresentada a evolução da concentração e da produção de lactose ao longo de todo o período de avaliações. Nela pode ser visto de maneira bastante ilustrativa que, apesar de haver uma menor concentração de lactose no TP ao longo de todo o período estudado, fundamental para a maior produção de média diária de lactose no TP durante todo o período experimental, foi a maior produção média diária de leite com este tratamento, que diferiu em várias das semanas de lactação em que esta foi avaliada (Figura 1A).

À exemplo deste trabalho, Donkin et al. (2009) também observaram uma diminuição na concentração de NUL, entretanto, tratava-se de um experimento em que a GLB foi utilizada como substituto do grão de milho na dieta de vacas, sendo

consumida durante todo o período de avaliações. Formigoni et al. (1996) também observaram uma diminuição na concentração de NUL, neste caso sim utilizando o PPG como aditivo precursor da gliconeogênese durante o período de transição. DeFrain et al. (2004) também observaram uma diminuição na concentração de NUL com o fornecimento de GLB durante o período de transição, porém, novamente, o período de avaliações foi realizado somente durante o período de consumo do aditivo. Entretanto, como no presente trabalho não foi observado qualquer efeito de tratamento no período em que os aditivos foram consumidos não é correta a hipótese de que a menor concentração de NUL no leite das vacas tratadas decorra do maior aporte de energia prontamente disponível para a fermentação ruminal, proporcionados pelo TG e pelo TP, mas os resultados demonstram que o consumo de glicerina bruta ou de propilenoglicol possui um efeito benéfico sobre a disponibilidade de energia à fermentação ruminal mais duradouro do que se supunha inicialmente.

Mesmo havendo um retardo de, no mínimo, 18 dias no aparecimento do 1º cio das vacas do TC (Tabela 3) não foi possível detectar uma diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos. Provavelmente, para este parâmetro, seja necessário realizar novos estudos com um número maior de repetições. Formigoni et al. (1996), por exemplo, observaram uma diminuição no retorno a ciclicidade ovariana com o fornecimento de 300 mL de PPG durante o período de transição utilizando 39 vacas divididas em dois grupos.

Normalmente, não são observados efeitos do consumo de glicerol ou de PPG durante o período de transição sobre o ECC (Formigoni et al., 1996; Pickett et al., 2003; DeFrain et al., 2004; Chung et al., 2007), concordando com este experimento (Tabela 4).

Mesmo um aumento de 48% na concentração de AGNE na média dos tratamentos estudados no dia do parto em relação a 14 dias pré-parto, com uma diminuição de 76% nas primeiras duas semanas pós-parto não resultou em uma diferença significativa em função do tempo de lactação (Figura 7B;  $P > 0,10$ ). Um dos motivos é que os animais experimentais apresentavam um baixo ECC (em média 2,77) no início do experimento (sabe-se que há uma forte relação entre a condição corporal e a concentração sanguínea de AGNE (Pedron et al., 1993).

Da mesma forma que para a concentração de AGNE, os tratamentos estudados não influenciaram a concentração de BHBO ou ocorrência de quadros de cetose (Tabela 4). O baixo ECC das vacas ao parto, também neste caso, auxilia no entendimento deste resultado, já que existe uma forte correlação entre a mobilização de reservas corporais de tecido adiposo e a ocorrência de cetose (Gillund et al., 2001). Entretanto, apenas uma vaca do grupo controle foi diagnosticado com cetose clínica, enquanto nenhuma vaca dos demais tratamentos apresentou este distúrbio, seja clínica ou subclínicamente.

Conforme citado, tanto o glicerol quanto o PPG, são precursores da gliconeogênese, gerando, rapidamente, glicose. Diferentemente dos trabalhos em que foi observado um incremento na glicemia dos animais (Miyoshi et al., 2001; DeFrain et al., 2004; Osman et al., 2008), em que a coleta de sangue ocorreu em até 8 horas após o fornecimento do aditivo aos animais, neste experimento a coleta era realizada cerca de 12 horas após o fornecimento de metade da quantidade diária de GLB/PPG. Dessa forma, fica evidenciado que os efeitos do glicerol/PPG sobre a glicemia acontecem em um curto espaço de tempo. Além disso, estes resultados positivos se sustentaram somente durante o período de fornecimento do gliconeogênico, enquanto no presente experimento as avaliações prosseguiram até a 10<sup>a</sup> semana de lactação, sendo assim, diferenças na

glicemia entre os tratamentos, se houvessem, provavelmente seriam detectadas somente entre o intervalo compreendido entre 14 dias pré até 14 dias pós-parto.

### **3.5. Conclusões**

O propilenoglicol fornecido durante o período de transição para vacas leiteiras é benéfico para a produção média diária de leite nas dez primeiras semanas de lactação, diferentemente da glicerina bruta, que não influenciou esta medida. Entretanto, ambos os tratamentos causam uma diminuição no teor médio de gordura bruta do leite, porém, este efeito é observado somente durante o período de consumo do aditivo, sem efeito posterior.

São necessários mais estudos comparando os efeitos da glicerina bruta com o propilenoglicol sobre parâmetros bioquímicos e intervalo parto-1<sup>o</sup>cio, principalmente com animais mais propensos ao desenvolvimento de distúrbios metabólicos, principalmente cetose.

### **Agradecimentos**

Os autores gostariam de agradecer ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e a empresa Granol S.A. pelo financiamento deste experimento.

### **Referências**

- Agência Nacional do Petróleo (ANP). Retrieved March 3, 2012, from:  
<http://www.anp.gov.br>
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1996. Official Methods of Analysis. 16th ed. AOAC, Washington, DC., USA.

- Bauman, D.E., Griinari, J.M., 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Ann. Rev. Nutr.* 23, 203–227.
- Bell, A.W., 1995. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J. Anim. Sci.* 73, 2804-2819.
- Bergner, H., Kijora, C., Ceresnakova, Z., Szakacs, J., 1995. In vitro studies on glycerol transformation by rumen microorganisms. *Arch. Tierernähr.* 48, 245–256.
- Bodarski, R., Wertelecki, T., Bommer, F., Gosiewski, S., 2005. The changes of metabolic status and lactation performance in dairy cows under feeding tmr with glycerin (glycerol) supplement at periparturient period. *Electron. J. Pol. Agric. Univ., Anim. Husb.* 8, 1-9.
- Carvalho, E.R., Schmelz-Roberts, N.S., White, H.M., Doane, P.H., Donkin, S.S., 2011. Replacing corn with glycerol in diets for transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94, 908-916.
- Christensen, J.O., Grummer, R.R., Rasmussen, F.E., Bertics, S.J., 1997. Effect of method of delivery of propylene glycol on plasma metabolites of feed-restricted cattle. *J. Dairy Sci.* 80, 563-568.
- Chung, Y.H., Rico, D.E., Martinez, C.M., Cassidy, T.W., Noirot, V., Ames, A., Varga, G.A., 2007. Effects of feeding dry glycerin to early postpartum Holstein dairy cows on lactational performance and metabolic profiles. *J. Dairy Sci.* 90, 5682-5691.
- Cozzi, G., Berzaghi, P., Gottardo, F., Gabai, G., Andrighetto, I., 1996. Effects of feeding propylene glycol to mid-lactating dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 64, 43-51.
- Dasari, M.A., Kiatsimkul, P.P., Sutterlin, W.R., Suppes G.J., 2005. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. *Appl. Catal. Gen.* 281, 225–231.

- DeFrain, J.M., Hippen, A.R., Kalscheur, K.F., Jardon, P.W., 2004. Feeding glycerol to transition dairy cows: effects on blood metabolites and lactation performance. *J. Dairy Sci.* 87, 4195–4206.
- Donkin, S.S., Koser, S., White, H., Doane, P.H., Cecava, M.J., 2009. Feeding value of glycerol as a replacement for corn grain in rations fed to lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92, 5111-5119.
- Drackley, J.K. 1999. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? *J. Dairy Sci.* 82, 2259-2273.
- Easley, J.F., McCall, J.T., Davies, G.K., Shirley, R.L., 1965. Analytical methods for feeds and tissues. Nutrition Laboratory, Department of Animal Science, University of Florida, Gainesville, 81 pp.
- Emery, R.S., Burg, N., Brown, L.D., Blank, G.N., 1964. Detection, occurrence and prophylactic treatment of borderline ketosis with propylene glycol feeding. *J. Dairy Sci.* 47, 1074–1079.
- Fisher, L.J., Erfle, J.D., Lodge, G.A., Sauer, F.D., 1973. Effects of propylene glycol or glycerol supplementation of the diet of dairy cows on feed intake, milk yield and composition, and incidence of ketosis. *Can. J. Anim. Sci.* 53, 289–296.
- Fonseca, L.F.L., Rodrigues, P.H.M., Santos, M.V.S., Lima, A.P., Lucci, C.S., 2004. Supplementation of dairy cows with propylene glycol during the periparturient period: effects on body condition score, milk yield, first estrus post-partum, b-hydroxybutyrate, non-esterified fatty acids and glucose concentrations. *Cienc. Rural* 34, 897-903.
- Formigoni, A., Cornil, M., Prandi, A., Mordenti, A., Rossi, A., Portetelle, D., Renaville, R., 1996. Effect of propylene glycol supplementation around parturition on milk yield,

- reproduction performance and some hormonal and metabolic characteristics in dairy cows. *J. Dairy Res.* 63, 11–24.
- Gaines, W.L., Davidson, F.A., 1925. The effect of advance in lactation and gestation on mammary activity. *The J. Gen. Physiol.* 9, 325-332.
- Garton, G.A., Lough, A.K., Vioque, E., 1961. Glyceride hydrolysis and glycerol fermentation by sheep rumen contents. *J. Gen. Microbiol.* 25, 215–225.
- Gillund, P., Reksen, O., Gröhn, Y.T., Karlberg, K., 2001. Body condition related to ketosis and reproductive performance in Norwegian dairy cows. *J. Dairy Sci.* 84, 1390–1396.
- Goff, J.P., Horst, R.L., 1997. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J. Dairy Sci.* 80, 1260–1268.
- Goff, J.P., Horst, R.L., Jardon, P.W., Borelli, C., Wedam, J., 1996. Field trials of an oral calcium propionate paste as an aid to prevent milk fever in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 79, 378-383.
- Grum, D.E., Drackley, J.K., Younker, R.S., LaCount, D.W., Veenhuizen J.J., 1996. Nutrition during the dry period and hepatic lipid metabolism of periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 79, 1850–1864.
- Grummer, R.R., Winkler, J.C., Bertics, S.J., Studer, V.A., 1994. Effect of propylene glycol dosage during feed restriction on metabolites in blood of prepartum Holstein heifers. *J. Dairy Sci.* 77, 3618–3623.
- Grummer, R. R. 1995. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *J. Anim. Sci.* 73, 2820-2833.
- Hutjens, M.F. 1992. Selecting feed additives. In: Van Horn, H.H., Wilcox, C.J. (Ed.), *Large dairy herd management*. Champaign, EUA. pp.309-317.

- Johns, A. T. 1953. Fermentation of glycerol in the rumen of sheep. *N. Z. J. Sci. Tech.* 5, 262–269.
- Juchem, S.O., Santos, F.A. Imaizumi, H., Pires, A.V., Barnabe, E.C., 2004. Production and blood parameters of Holstein cows treated prepartum with sodium monensin or propylene glycol. *J. Dairy Sci.* 87, 680–689.
- Kleppe, B.B., Aiello, R.J., Grummer, R.R., Armentano, L.E., 1988. Triglyceride accumulation and very low-density lipoprotein secretion by rat and goat hepatocytes in vitro. *J. Dairy Sci.* 71, 1813-1822.
- Litherland, N.B., Dann, H.M., Hansen, A.S., Drackley, J.K., 2003. Prepartum nutrient intake alters metabolism by liver slices from peripartal dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86(Suppl. 1), 105-106 (abstr.).
- Lucci, C.S., Fonseca, L.F., Rodrigues, P.H.M., Santos, M.V., Lima, A.P., 1998. Supplementation of propylene glycol to dairy cows in periparturient period: effects on body condition score, milk yield and first estrus postpartum. *J. Dairy Sci.* 81 (Suppl. 1), 321.
- Mackle, T.R., Dwyer, D.A., Ingvarsten, K.L., Chouinard, P.Y., Ross, D.A., Bauman, D.E. Effects of insulin and postruminal supply of protein on use of amino acids by the mammary gland for milk protein synthesis. *J. Dairy Sci.* 83, 93-105.
- Marques, L.T. 2004. Ocorrência do leite instável não ácido (LINA) e seu efeito sobre a composição química e aspectos físicos. Master Science Dissertation, Universidade Federal de Pelotas, Brazil.
- Miyoshi, S., Pate, J.L., Palmquist, D.L., 2001. Effects of propylene glycol drenching on energy balance, plasma glucose, plasma insulin, ovarian function and conception in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 68, 29–43.

- Nielsen, N.I., Ingvarsen, K.L., 2004. Propylene glycol for dairy cows: A review of the metabolism of propylene glycol and its effects on physiological parameters, feed intake, milk production and risk of ketosis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 115, 191–213.
- National Research Council (NRC), 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. National Academic Press, Washington, DC.
- Osborne, V.R., Odongo, N.E., Cant, J.P., Swanson, K.C., McBride, B.W., 2009. Effects of supplementing glycerol and soybean oil in drinking water on feed and water intake, energy balance, and production performance of periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92, 698–707.
- Osman, M.A., Allen, P.S., Mehya, N.A., Bobe, G., Coetzee, J.F., Koehler, K.J., Beitz, D.C., 2008. Acute Metabolic Responses of Postpartal Dairy Cows to Subcutaneous Glucagon Injections, Oral Glycerol, or Both. *J. Dairy Sci.* 91, 3311–3322.
- Pedron, O., Cheli, F., Senatore, E., Baroli, D., Rizzi, R., 1993. Effect of body condition score at calving on performance, some blood parameters, and milk fatty acid composition in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76, 2528-2535.
- Pickett, M.M., Piepenbrink, M.S., Overton, T.R., 2003. Effects of propylene glycol or fat drench on plasma metabolites, liver composition and production of dairy cows during the periparturient period. *J. Dairy Sci.* 86, 2113–2121.
- Ponce Ceballo, P., Hernandez, R., 2001. Propriedades físico-químicas do leite e sua associação com transtornos metabólicos e alterações na glândula mamária. In: González, F.H.D., Dürr, J.W., Fontaneli, R.S. (Ed.), *Uso do leite para monitorar a nutrição e metabolismo de vacas leiteiras*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, pp. 58-68

- Pullen, D.L., Palmquist, D.L., Emery, R.S., 1989. Effect of days of lactation and methionine hydroxy analog on incorporation of plasma fatty acids into plasma triglycerides. *J. Dairy Sci.* 72, 49-58.
- Rémond, B., Souday, E., Jouany, J.P., 1993. In vitro and in vivo fermentation of glycerol by rumen microbes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 41, 121-132.
- Schröder, A., Südekum, K.H., 1999. Glycerol as a by-product of biodiesel production in diets for ruminants. In: *Proc. 10th Int. Rapeseed Congr.*, Canberra, Australia, September, 26-29, Paper No. 241.
- Shuster, D.E., Harmon, R.J., Jackson, J.A., Hemken, R.W., 1991. Reduced Lactational Performance Following Intravenous Endotoxin Administration to Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 74, 3407-3411.
- Sobhani, S., Valizadeh, R., Naserian, A., 1998. Alcohol stability of milk and its relation to milk and blood composition in Holstein dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 85 (suppl. 1), p.58.
- Studer, V.A., Grummer, R.R., Bertics, S.J., Reynolds, C.K., 1993. Effect of prepartum propylene glycol administration on periparturient fatty liver in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76, 2931–2939.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B. 1985. *Analysis of forage and fibrous foods – a laboratory manual for animal science.* Ithaca: Cornell University Press, 202 p.
- Wang, C., Liu, Q., Huo, W.J., Yang, W.Z., Dong, K.H., Huang, Y.X., Guo, G., 2009. Effects of glycerol on rumen fermentation, urinary excretion of purine derivatives and feed digestibility in steers. *Livestock Science* 121, 15-20.

Wildman, E.E., Jones, G.M., Wagner, P.E., Boman, R.L., Troutt Jr., H.F., Lesch, T.N.,  
1982. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected  
production characteristics. *J. Dairy Sci.* 65, 495–501.

Tabela 1. Composição das dietas (porção fornecida no cocho; g/kg de MS)

<u>Componente</u>	<u>g/kg de MS</u>
Resíduo úmido de cervejaria	380,0
Bagaco de laranja	73,0
Silagem de milho	115,0
Farelo de soja	152,0
Grão de milho	260,0
Núcleo vitamínico e mineral*	20,0

\*Contém (g/kg): Ca (mínimo) 220 g; P (mínimo) 95 g; Mg (mínimo) 12 g; Na (mínimo) 60 g; S (mínimo) 12 g; Vit. A (mínimo) 120000 UI; Vit. D3 (mínimo) 30000 UI; Vit. E (mínimo) 750 mg; Se 20 mg; Zn 3000 mg; F (máximo) 950 mg.

Tabela 2. Composição química dos alimentos (g/kg MS)

Alimento	MS	MO	PB	FDNc	FDA
Resíduo úmido de cervejaria	236,0	940,8	272,6	561,2	214,3
Bagaço de laranja	154,7	943,4	105,8	356,4	275,3
Silagem de milho	340,8	883,4	73,1	600,4	369,8
Farelo de soja	849,8	932,8	517,1	320,9	90,7
Grão de milho	852,4	987,6	96,8	251,8	26,3
Pastagem de aveia/azevém	171,3	895,8	180,2	536,3	281,0
Pastagem de milheto	162,4	894,5	153,9	642,4	300,5

MS = matéria seca; MO = matéria orgânica; PB = proteína bruta; FDNc = fibra em detergente neutro corrigida para cinzas; FDA = fibra em detergente ácido

Tabela 3. Produção de leite (L/dia), produção de leite corrigido para 40 g de GB/L (PLCG, L/dia), gordura bruta no leite (GB, g/L), produção de gordura bruta (kg), proteína bruta no leite (PB, g/L), produção de proteína bruta (kg), lactose (g/L), produção de lactose (kg), nitrogênio uréico no leite (NUL, mg/dL), intervalo parto- 1º cio (IPC, dias)

Parâmetro	Tratamento				P		
	TC	TG	TP	EP	Tratamento	TPP	Tratamento*TPP
Produção leite (L)	29,36	30,14	34,70	0,7049	0,1147	0,0048	0,9851
PLCG (L)	23,46 <sup>b</sup>	21,66 <sup>c</sup>	26,37 <sup>a</sup>	0,5385	0,0382	<0,0001	0,9851
GB (g/L)	26,3 <sup>a</sup>	22,4 <sup>b</sup>	24,0 <sup>b</sup>	0,0476	0,0091	0,0208	0,0108
PB (g/L)	29,6	28,9	28,4	0,0223	0,2464	<0,0001	0,2128
Lactose (g/L)	45,6 <sup>a</sup>	45,7 <sup>a</sup>	43,2 <sup>b</sup>	0,0223	0,0259	0,0004	0,7514
GB (kg)	0,78 <sup>a</sup>	0,66 <sup>b</sup>	0,83 <sup>a</sup>	0,0698	0,0380	0,1550	0,0838
PB (kg)	0,86	0,86	0,99	0,0830	0,1714	0,0176	0,9134
Lactose (kg)	1,34 <sup>b</sup>	1,37 <sup>b</sup>	1,50 <sup>a</sup>	0,1291	0,3887	<0,0001	0,9590
NUL (mg/dL)	8,44 <sup>a</sup>	7,12 <sup>b</sup>	7,43 <sup>b</sup>	0,1623	0,0163	0,6563	0,3901
CCS (mil)	374	210	203	32,7123	0,0151	0,0184	0,5151
IPC (dias)	72,75	54,63	53,00	6,7538	0,3235	-	-

<sup>a,b,c</sup>Letras diferentes, na mesma linha, indicam uma diferença de 5% segundo Tukey (P<0,05).

TC = controle; TG = tratamento glicerina bruta; TP = tratamento propilenoglicol; TPP = tempo pós-parto; PLCG = produção de leite corrigido para 40 g de GB/L; GB = gordura bruta; PB = proteína bruta; NUL = nitrogênio uréico no leite; IPC = intervalo parto-1º cio; EP = erro padrão

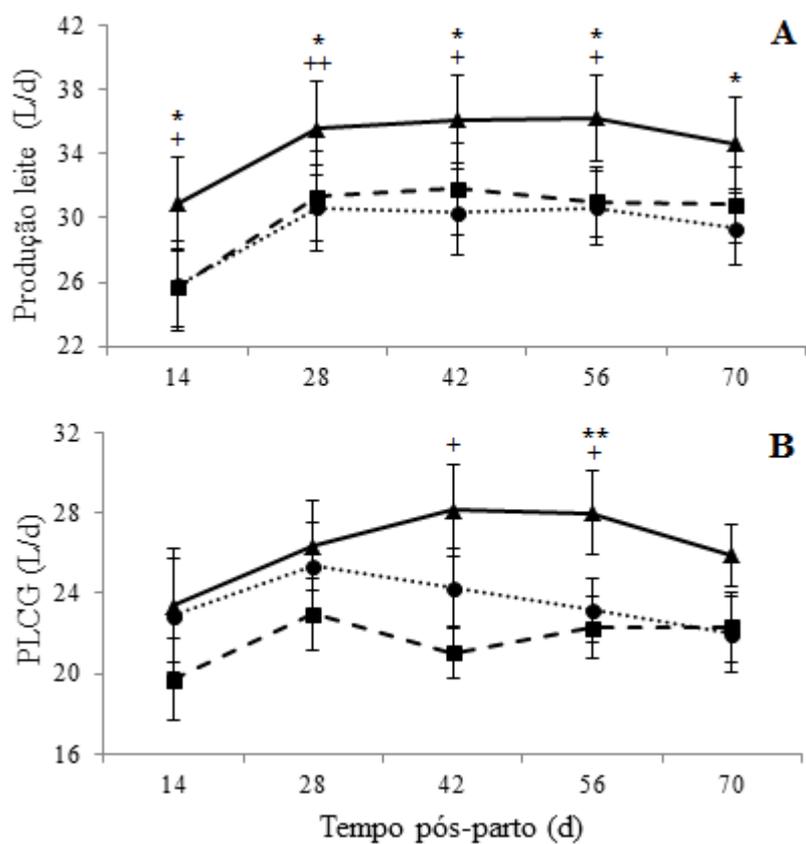


Figura 1. Produção média diária de leite (A) e produção média diária de leite corrigido para 40 g de gordura bruta/L (B) de vacas do tratamento controle (●), glicerina bruta (■) e propilenoglicol (▲)

\*P<0,05 – controle vs propilenoglicol

\*\*P<0,10 – controle vs propilenoglicol

+P<0,05 – propilenoglicol vs glicerina bruta

++P<0,10 – propilenoglicol vs glicerina bruta

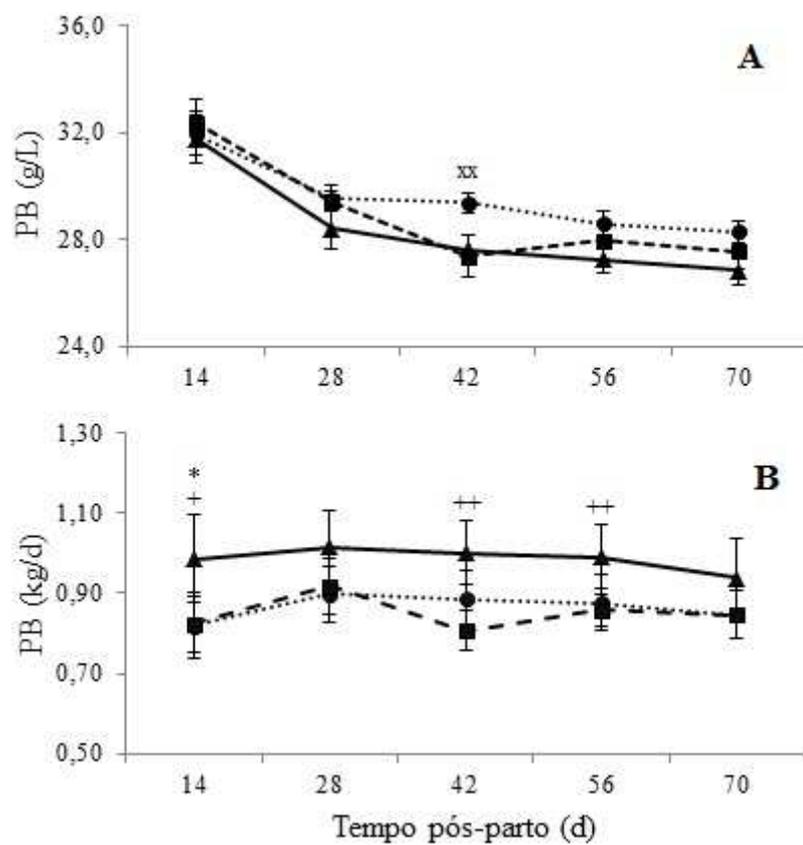


Figura 2. Concentração de proteína bruta no leite (A) e produção média diária de proteína bruta (B) de vacas do tratamento controle (●), glicerina bruta (■) e propilenoglicol (▲)

\*P<0,05 – controle vs propilenoglicol

<sup>+</sup>P<0,05 – propilenoglicol vs glicerina bruta

<sup>++</sup>P<0,10 – propilenoglicol vs glicerina bruta

<sup>xx</sup>P<0,10 – controle vs glicerina bruta

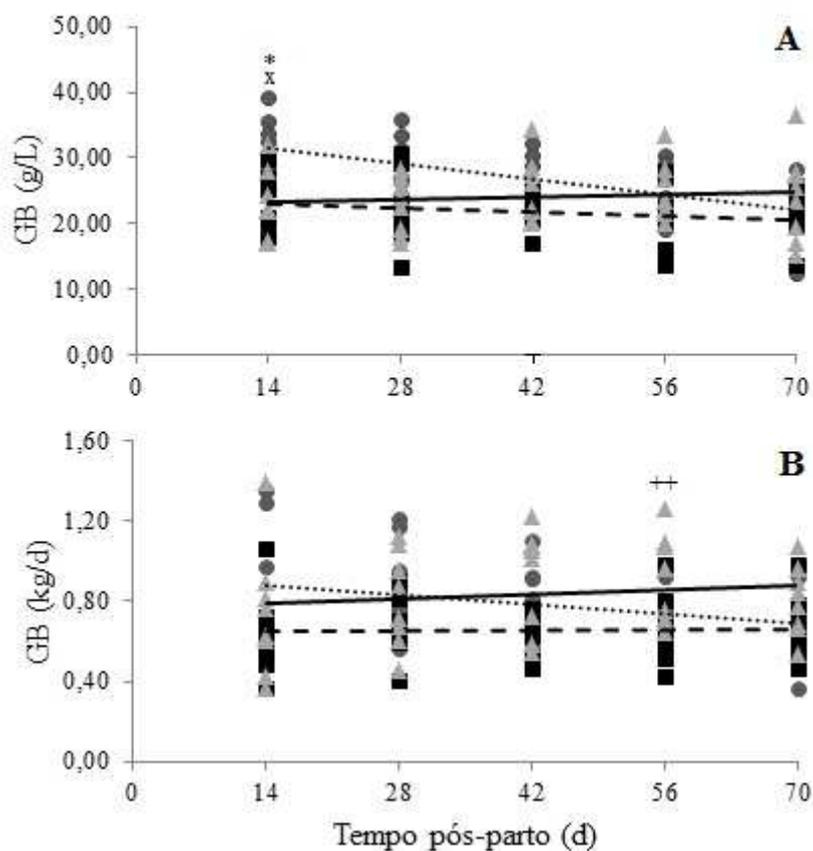


Figura 3. Efeito da interação entre tratamento e tempo pós-parto sobre a concentração de gordura bruta do leite (A) e produção média diária de gordura bruta (B) de vacas do tratamento controle (●, ---), glicerina bruta (■, - - -) e propilenoglicol (▲, ———). Controle: GB (g/L) = 33,947 - 0,1709\*tempo pós-parto;  $r^2 = 0,4067$ . Controle: GB (kg/d) = 0,9284 - 0,0035\*tempo pós-parto;  $r^2 = 0,0942$ .

\*P<0,05 – controle vs propilenoglicol

<sup>x</sup>P<0,05 – controle vs glicerina bruta

<sup>++</sup>P<0,10 – propilenoglicol vs glicerina bruta

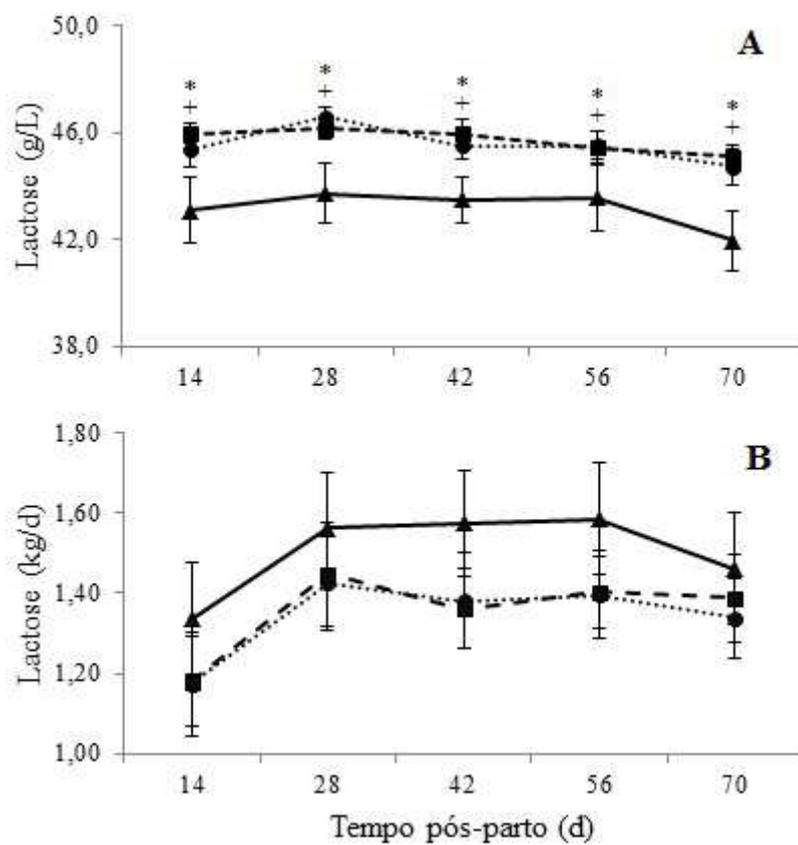


Figura 4. Concentração de lactose no leite (A) e produção média diária de lactose (B) de vacas do tratamento controle (●), glicerina bruta (■) e propilenoglicol (▲)

\*P<0,05 – controle vs propilenoglicol

+P<0,05 – propilenoglicol vs glicerina bruta

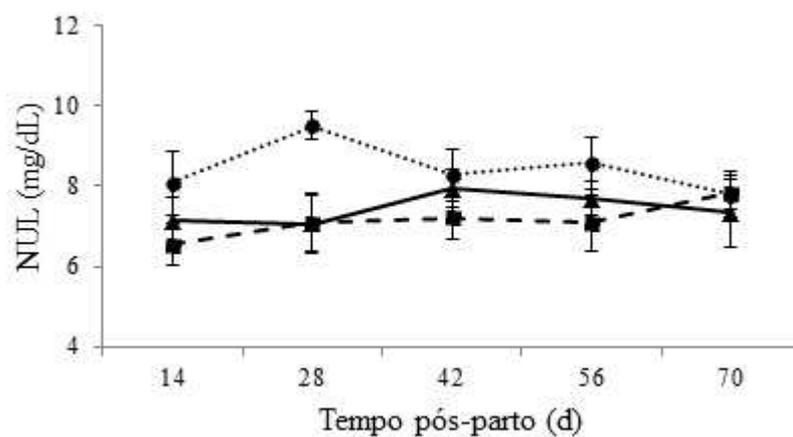


Figura 5. Nitrogênio uréico no leite (NUL, mg/dL) de vacas do tratamento controle (●), glicerina bruta (■), propilenoglicol (▲)

Tabela 4. Escore de condição corporal (ECC), concentração sanguínea de glicose, ácidos graxos não-esterificados (AGNE) e beta-hidroxibutirato (BHBO)

Parâmetro	Tratamento				Tratamento	P	
	TC	TG	TP	EP		TPP	Tratamento*TPP
ECC	2,64	2,67	2,72	0,019	0,7076	0,0017	0,7509
Glicose (mg/dL)	67,2	67,6	66,4	1,1301	0,8872	<0,0001	0,1377
AGNE (mmol/L)	0,28	0,31	0,31	0,0173	0,4496	<0,0001	0,3967
BHBO (mg/L)	0,52	0,49	0,46	0,0088	0,1424	0,2947	0,2918

TC = controle; TG = tratamento glicerina bruta; TP = tratamento propilenoglicol; TPP = tempo pós-parto; ECC = escore de condição corporal; AGNE = ácidos graxos não-esterificados; BHBO = beta-hidroxibutirato; EP = erro padrão

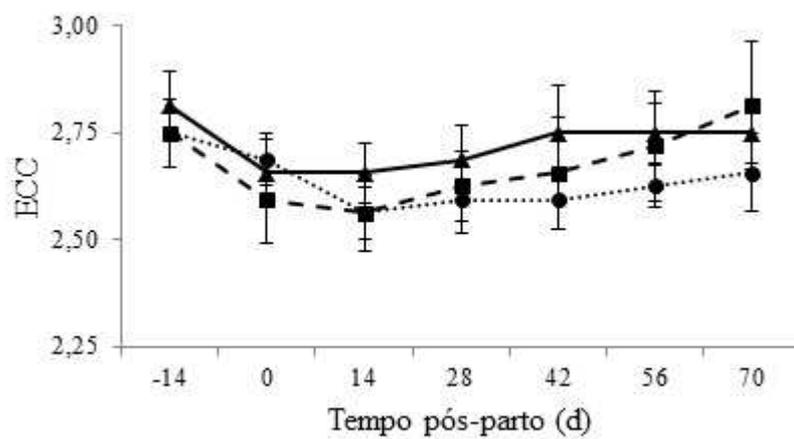


Figura 6. Escore de condição corporal (ECC) de vacas do tratamento controle (●), glicerina bruta (■), propilenoglicol (▲)

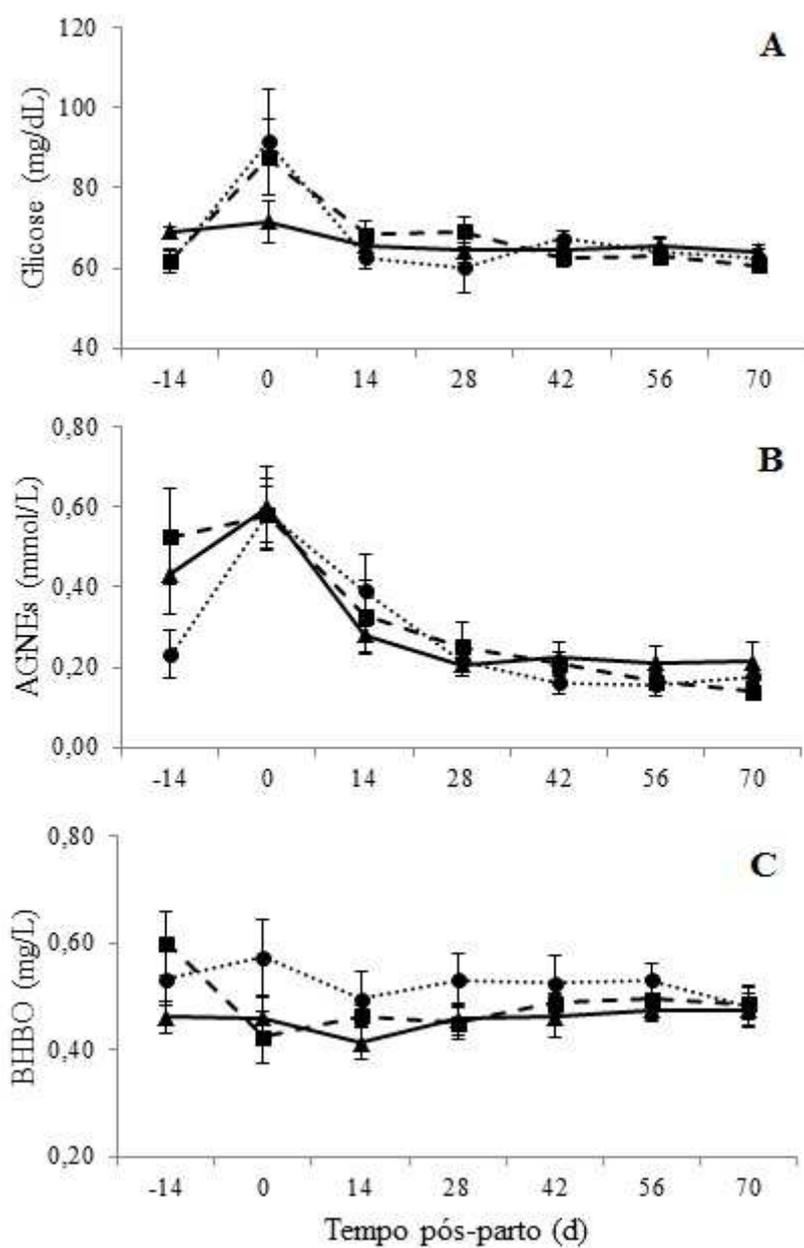


Figura 7. Concentração sanguínea de glicose (A), ácidos graxos não-esterificados (B) e de beta-hidroxibutirato (C) de vacas do tratamento controle (●), glicerina bruta (■), propilenoglicol (▲)

## **4. CAPÍTULO IV**

### **Considerações finais**

Ao concluir o presente trabalho pode-se afirmar que os objetivos, tanto gerais quanto específicos foram atingidos com a realização dos dois ensaios aqui apresentados. Também pode-se afirmar que várias das hipóteses feitas durante a concepção do trabalho foram confirmadas com os resultados observados no presente trabalho, porém algumas considerações devem ser feitas, como recomendações para trabalhos futuros, já que, de forma alguma, pretendeu-se esgotar o tema estudado neste único trabalho.

Na revisão bibliográfica ficou evidente que novos usos da glicerina são essenciais devido ao grande excedente deste subproduto e, aparente, incapacidade dos consumidores usuais em absorverem toda a produção. Esta torna-se uma necessidade ainda mais premente quando há uma, bem fundamentada, expectativa de um crescente incremento na produção mundial de biodiesel. Com o Brasil apresentando uma das maiores capacidades de produção desta fonte de energia renovável em todo o mundo, aumenta ainda mais a responsabilidade em proporcionar um destino adequado para os seus subprodutos. No Capítulo 1, também ficou constatado que os estudos realizados até o presente não esgotaram, de forma alguma, o tema, mas demonstraram que a glicerina bruta apresenta grande potencial como alimento alternativo para animais ruminantes.

No Capítulo II ficou comprovado que a glicerina bruta é um excelente alimento alternativo energético para vacas no terço médio de lactação, em um nível de inclusão de até 12% da matéria seca total, substituindo, parcialmente, o grão de milho. A decisão de utilizá-la ou não deve ser tomada considerando o preço destes dois insumos. Níveis maiores de inclusão merecem ser testados, porém, devem ser estudados novos métodos de fornecimento e processamento deste subproduto, já que, por se tratar de um alimento líquido, uma das maiores dificuldades enfrentadas durante a execução do ensaio foi, justamente, a oferta do alimento. Uma alternativa que parece bastante promissora, até mesmo porque quase todo o biodiesel brasileiro é produzido a partir de grão de soja e por empresas que comercializam soja e seus subprodutos, é a inclusão da glicerina bruta diretamente nas matérias-primas utilizadas para a fabricação de ração animal.

No Capítulo III foi demonstrado que a utilização de glicerina bruta como aditivo precursor da gliconeogênese não trouxe benefícios, seja em relação ao metabolismo energético ou resultados produtivos, diferentemente do propilenoglicol que influenciou positivamente a produção média diária de leite. A hipótese de que ambos os precursores da gliconeogênese levam a uma diminuição da concentração de gordura bruta no leite foi confirmada, porém, esta diferença desaparece logo após o término do tratamento com estes aditivos. Mesmo com estes resultados, novos estudos devem ser realizados pois deve ser considerado que no presente ensaio trabalhou-se com um número limitado de animais. E mesmo estes animais não se apresentavam nas melhores condições para o experimento: foi necessário utilizar primíparas, dessa forma, não havia um histórico das lactações prévias de todos os animais; o período experimental foi muito longo devido a indisponibilidade de um grande número de animais com partos próximos; as vacas utilizadas não apresentavam uma condição corporal adequada para os fins deste experimento

(conforme apresentado no capítulo I, as vacas de maior escore de condição corporal apresentam uma maior propensão ao desenvolvimento de distúrbios metabólicos, principalmente ao desenvolvimento de cetose); vacas de maior produção média, que passam por um maior desafio, seriam mais adequadas.

Segundo o epistemólogo argentino Mário Bunge (1919 -), a ciência deve se ocupar, principalmente, da resolução de problemas, especialmente em se tratando de países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, como é o Brasil, e com poucos recursos destinados à pesquisa científica. O presente trabalho foi concebido dentro desta linha de pensamento e, como tal, cumpriu com os objetivos propostos inicialmente, servindo como subsídio para elevar o patamar da glicerina bruta proveniente das usinas de biodiesel, passando de resíduo para importante subproduto.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABO EL-NOR, S. et al. Effects of differing levels of glycerol on rumen fermentation and Bacteria. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.162, n.3-4, p.99-105, 2010.

ABUGHAZALEH, A.A.; ABO EL-NOR, S.; IBRAHIM, S.A. The effect of replacing corn with glycerol on ruminal bacteria in continuous culture fermenters. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v.95, n.3, p.313–319, 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Anvisa). **Resolução nº 386, de 5 de agosto de 1999**. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/386\\_99.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/386_99.htm)>. Acesso em: 24 out. 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DO BIODIESEL – ANP (2012). **Dados estatísticos mensais**. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/?pg=59236&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1331140470638>. Acesso em: 03 de março de 2012.

AIELLO, R.J.; KENNA, T.M.; HERBEIN, J.H. Hepatic gluconeogenic and ketogenic interrelationships in the lactating cow. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.67, n.8, p.1707-1715, 1984.

ANIL, M.H.; FORBES, J.M. The roles of hepatic nerves in the reduction of food intake as a consequence of intraportal sodium propionate administration in sheep. **Quarterly Journal of Experimental Physiology**, Hoboken, v.73, p.539-546.

ANNISON, E.F., BICKERSTAFFE, R.; LINZELL, J.L. Glucose and fatty acid metabolism in cows producing milk of low fat content. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v.82, n.1, p.87-95, 1974.

ARMENTANO, L.E. et al. Effects of Energy Balance on Hepatic Capacity for Oleate and Propionate Metabolism and Triglyceride Secretion. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.74, n.1, p.132-139, 1991.

AVILA, J.S. et al. Effects of replacing barley grain in feedlot diets with increasing levels of glycerol on in vitro fermentation and methane production. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.166–167, n.6, p.25-268, 2011.

BAIRD, G.D. et al. Net hepatic and splanchnic metabolism of lactate, pyruvate and propionate in dairy cows in vivo in relation to lactation and nutrient supply. **Biochemistry Journal**, Washington, v.186, n.1, p.47-57, 1980.

BALDWIN, R.L. Estimation of theoretical calorific relationships as a teaching technique. A review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.51, n.1, p.104-111, 1968.

BATISTA, F.. Brasil não tem destino certo para glicerina gerada por biodiesel. **Gazeta Mercantil**, São Paulo. 05 jun. 2007. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/noticias/biodiesel/brasil-destino-certo-glicerina-gerada-biodiesel-05-06-07.htm>>. Acesso em: 18 abr. 2009.

BAUMAN, D.E. Bovine somatotropin: review of an emerging animal technology. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.75, n.11, p.3432-3440, 1992.

BAUMAN, D.E.; CURRIE, W.B. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.63, n.9, p.1514-1529, 1980.

BAUMAN, D.E.; VERNON, R.G. Effects of exogenous bovine somatotropin on lactation. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v.13, p.437-461, 1993.

BEEDE, D. et al. Mineral and vitamin nutrition, and feeding management practices. In: **Managing the Dry Cow for More Profit Notebook**, Michigan State University, Dairy Programs Group, 1996.

BELL, A.W. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.73, n.9, p.2804-2819, 1995.

BENNINK, M.R. et al. Glucose oxidation and entry rate as affected by the initiation of lactation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 55, p.712-713 (abstr.), 1972.

BERGMAN, E.N. Energy contribution of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**, Washington, v.70, n.2, p.567-590, 1990.

BERGMAN, E.N. Production and utilization of metabolites by the alimentary tract as measured in portal and hepatic blood. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RUMINANT PHYSIOLOGY, 1975, Armidale. **Proceedings...** Armidale: University of New England, 1975. p.292-395.

BERGNER, H. et al. In vitro studies on glycerol transformation by rumen microorganisms. **German Arch Tierernahr**, Berlin, v.48, n.3, p.245-256, 1995.

BODARSKI, R. et al. 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**, Warsaw, v.8, n.4, p.1-9, 2005.

BROCKMAN, R.P. Effect of insulin on the utilization of propionate in gluconeogenesis in sheep. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.64, n.1, p.95-101, 1990.

BROCKMAN R.P.; GREER, C. Effects of somatostatin and glucagon on the utilization of propionate in glucose production *in vivo* in sheep. **Australian Journal of Biological Science**, Melbourne, v.33, n.4, p.457-464, 1980.

BROSTER, W.H.; BROSTER, V.J. Body score of dairy cows. **Journal of Dairy Research**, London, v.65, n.1, p.155–173, 1998.

BUTLER, W.R.; EVERETT, R.W.; COPPOCK, C.E. The relationships between energy balance, milk production and ovulation in postpartum Holstein cows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.53, n.9, p.742-752, 1981.

CÂMARA, G.M.S. **Biodiesel Brasil – Estado atual da arte**. Disponível em: <[http://www.cib.org.br/pdf/biodiesel\\_brasil.pdf](http://www.cib.org.br/pdf/biodiesel_brasil.pdf)>. Acesso em: 10 fev. 2012.

CLAPPERTON, J.L.; CZERKAWSKI, J.W. Metabolism of propane-1:2-diol infused into the rumen of sheep. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.27, n.3, p.553-560, 1972.

CAVALHEIRO, L.G. et al. Glicerina bruta na dieta de novilhas de corte terminadas em confinamento: peso e citometria de fígado e rim. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, XXII, 2010, Jaboticabal. **Anais do XXII Congresso de Iniciação Científica**. Jaboticabal: Unesp, 2010. p.1239 - 1242.

CERRATE, S. et al. Evaluation of glycerine from biodiesel production as a feed ingredient for broilers. **International Journal of Poultry Science**, Faisalabad, v.5, n.11, p.1001-1007, 2006.

CHASE, L.E. **What is new in dry cow nutrition. Northeast winter dairy management school**. Ithaca: Cornell University, 1992. 38 p.

CHEW, B.P. et al. Effects of ovariectomy during pregnancy and of prematurely induced parturition on progesterone, estrogens, and calving traits. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.62, n.4, p.557-566, 1979.

CHUNG, Y.H. et al. Effect of feeding dry glycerin to early postpartum Holstein dairy cows on milk production and metabolic profiles. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.90, n.12, p.5682-5691, 2007.

CZERKAWSKI, J.W.; BRECKENRIDGE, G. Fermentation of various glycolytic intermediates and other compounds by rumen micro-organisms, with particular reference to methane production. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.27, n.1, p.131-146, 1972.

DANFAER, A.; TETENS, V.; AGERGAARD, N. Review and an experimental study on the physiological and quantitative aspects of gluconeogenesis in lactating ruminants. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Amsterdam, v.111B, n.2, p.201-210, 1995.

DASARI, M.A. et al. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. **Applied Catalysis. A, General**, Amsterdam, v.281, n.1-2, p.225-231, 2005.

DEFRAIN, J.M. et al. 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, 2004.

DINIZ, G. **De coadjuvante a protagonista: glicerina bruta obtida na produção de biodiesel pode ter muitas aplicações.** Ciência Hoje On-Line. Disponível em: <<http://cienciahoje.uol.com.br/controlPanel/materia/view/3973>>. Acesso em: 24 ago. 2008.

DONKIN, S.S.; DOANE, P. Glycerol as a feed ingredient in dairy rations. In: TRI-STATE DAIRY NUTRITION CONFERENCE, 12<sup>th</sup>., 2007, Ft. Wayne. **Proceeding from the 2007 Tri-State Dairy Nutrition Conference.** Columbus: The Ohio State University, 2007. p.97-103.

DRACKLEY, J.K. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.82, n.11, p.2259-2273, 1999.

DROUILLARD, J.S. Glycerin as a feed for ruminants: using glycerin in high concentrate diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.86 (suppl. 2), p.392 (abstr.), 2008.

DYK, P.; EMERY, R. Reducing the incidence of peripartum health problems. In: TRI-STATE DAIRY NUTRITION CONFERENCE, 1<sup>st</sup>., 1996, Ft. Wayne. **Proceeding from the 1996 Tri-State Dairy Nutrition Conference.** Columbus: The Ohio State University, 1996. p.41.

ELLIOT, J.M. The glucose economy of the lactating dairy cow. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS, 38<sup>th</sup>., 1976, Ithaca. **Proceedings of the Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers.** Ithaca: Cornell University, 1976. p.59-66.

EMERY, R.S. et al. Detection, occurrence, and prophylactic treatment of borderline ketosis with propylene glycol feeding. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.47, n.10, p.1074-1079, 1964.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **SUBSTANCES GENERALLY RECOGNIZED AS SAFE - Table of Contents.** Disponível em:

<[http://edocket.access.gpo.gov/cfr\\_2002/aprqrtr/21cfr582.1320.htm](http://edocket.access.gpo.gov/cfr_2002/aprqrtr/21cfr582.1320.htm)>. Acesso em: 23 fev. 2012.

FERRARO, S. M. et al. In vitro gas production and ruminal fermentation of glycerol, propylene glycol and molasses. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.154, n.1-2, p.112–118, 2009.

FISHER, L.J. et al. Effects of propylene glycerol or glycerol supplementation of the diet of dairy cows on feed intake, milk yield and composition, and incidence of ketosis. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v.53, p.289–296. 1973

FONSECA, L.F.L. et al. Suplementação de propilenoglicol para vacas no período peri-parto: efeitos sobre incidência de cetose, produção leiteira, escore corporal e primeiro estro pós-parto. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v.25, n.1, p.177-183, 2003.

FORMIGONI, A. et al. Effect of propylene glycol supplementation around parturition on milk yield, reproduction performance, and some hormonal and metabolic characteristics in dairy cows. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.63, n.1, p.11-24, 1996.

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

GENTHNER, B.R.S.; DAVIS, C.L.; BRYANT, M.P. Features of rumen and sewage sludge strains of *Eubacterium limosum*, a methanol- and H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>-utilizing species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.42, n.1, p.12-19, 1981.

GOES, T., ARAÚJO, M., MARRA, R. **Biodiesel e sua Sustentabilidade**, EMBRAPA, 2010, 19p. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2010>>. Acesso em: 20 abr.2011.

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

GOFF, J.P.; HORST, R.L. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.80, n.7, p.1260-1268, 1997.

GOFF, J.P. et al. Field trials of an oral calcium propionate paste as an aid to prevent milk fever in periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.79, n.3, p.378-383, 1996.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. **Introdução à Bioquímica Clínica**. 2ª ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2006. 360 p.

GORDON, R.C. FDA Policy on Use of Biodiesel-Derived Glycerin in Animal Feed. **National Grain And Feed Association Newsletter**, Washington, v.66, n.3, p.6, 2009.

GOTT, P. **Variation in the chemical composition of crude glycerin**. Disponível em: <[https://kb.osu.edu/dspace/bitstream/1811/37082/1/Paige\\_N\\_Gott\\_HONORS\\_THESIS.pdf](https://kb.osu.edu/dspace/bitstream/1811/37082/1/Paige_N_Gott_HONORS_THESIS.pdf)>. Acesso em: 10 fev. 2012.

GRANT, R.J.; ALBRIGHT, J.L. Feeding behavior and management factors during the transition period in dairy cattle. **Journal Of Animal Science**, Champaign, v.73, n.9, p.2791-2803, 1995.

GRUM, D.E. et al. Nutrition during the dry period and hepatic lipid metabolism of periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.79, n.10, p.1850-1864, 1996.

GRUMMER, R.R. Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.76, n.12, p.3882-3896, 1993.

GRUMMER, R.R. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.73, n.9, p.2820-2833, 1995.

GRUMMER, R.R. et al. Effect of propylene glycol dosage during feed restriction on metabolites in blood of prepartum Holstein heifers. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.77, n.12, p.3618-3623, 1994.

GUNN, P.J. et al. Effects of crude glycerin on performance and carcass characteristics of finishing wether lambs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.88, n.5, p.1771-1776, 2010.

HOBSON, P.N.; MANN S.O. The isolation of glycerol-fermenting and lipolytic bacteria from the rumen of the sheep. **Journal of General Microbiology**, London, v.25, n.2, p.227-240, 1961.

HOLANDA, A. Biodiesel e inclusão social. In: DEPUTADOS, Câmara Dos. **Série Cadernos de Altos Estudos**. Brasília: Coordenação de Publicações, 2004. p.13-60.

INGVARTSEN, K.L., ANDERSEN, J.B. Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.83, n.7, p.573–1597, 2000.

JESSE, B.W.; EMERY, R.S.; THOMAS, J.W. Control of bovine hepatic fatty oxidation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.69, n.9, p.2290-2297, 1986.

JOHNS, A. Fermentation of glycerol in the rumen of sheep. **New Zealand Journal of Science and Technology**, Wellington, v.5, p.262–269, 1953.

JOHNSON, R. The treatment of ketosis with glycerol and propylene glycol. **Cornell Veterinarian**, Ithaca, v.44, n.1, p.6–21, 1954.

KIJORA, C. et al. Investigation on the metabolism of glycerol in the rumen of bulls. **German Arch Tierernahr**, Berlin, v.51, n.4, p.341–348, 1998.

KIJORA, C. et al. Glycerol as a feed componente in fattening pigs. **German Arch Tierernahr**, Berlin, v.47, n.4, p.345-360, 1995.

KLEPPE, B.B. et al. Triglyceride accumulation and very low-density lipoprotein secretion by rat and goat hepatocytes in vitro. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.71, n.7, p.1813-1822, 1988.

KREHBIEL, C.R. Ruminal and physiological metabolism of glycerin. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.86 (suppl.2), p.392 (abstr.), 2008.

KUNZ, P.L. et al. Effects of different energy intakes before and after calving on food-intake, performance and blood hormones and metabolites in dairy cows. **Animal Production**, v.40, n.2, p.219-231, 1985.

LAGE, J.F. et al. Glicerina bruta na dieta de cordeiros terminados em confinamento. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.45, n.9, p.1012-1020, 2010.

LAGES, F.; SILVA-GRAÇA, M.; LUCAS, C. Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. **Microbiology**, Reading, v.45, n.9, p.2577-2585, 1999.

LAMMERS, P.J. et al. Digestible and metabolizable energy of crude glycerol for growing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.86, n.1, p.602-608, 2008.

LEE, S.Y. et al. Glycerol as a feed supplement for ruminants: In vitro fermentation characteristics and methane production. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.166–167, n.6, p.269-274, 2011.

LENG, R.A. Glucose synthesis in ruminants. **Advances in veterinary science**, New York, v.14, p.209-260, 1970.

LINKE, P.L. et al. Ruminal and plasma responses in dairy cows to drenching or feeding glycerol. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.87, p.343 (abstr.), 2004.

LITHERLAND, N.B. et al. Prepartum nutrient intake alters metabolism by liver slices from periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86 (suppl. 1), p.105-106 (abstr.), 2003.

LOMAX, M.A.; BAIRD, G.D. Blood flow and nutrient exchange across the liver and gut of the dairy cows. Effects of lactation and fasting. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.49, n.3, p.481-496, 1983.

MACH, N.; BACH, A.; DEVANT, M. Effects of crude glycerin supplementation on performance and meat quality of Holstein bulls fed high- concentrate diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.87, n.2, p.632-638, 2009.

MAPLESDEN, D.C. Propylene glycol in the treatment of ketosis. **Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science**, Ottawa, v.18, n.8, p.287-293, 1954.

MATTOS, L.L. Perspectivas em alimentação e manejo de vacas em lactação. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 32ª, 1995, Brasília. **Anais da 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**. Brasília: Unb, 1995. p.147-155.

MENTEN, J.F.M. et al. Avaliação da glicerina proveniente da produção do biodiesel como ingrediente para rações de frango de corte. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, São Paulo, suppl. 10, p.66, 2008.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Instrução Normativa N° 42, de 16 de dezembro de 2010**. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 24 out. 2011.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. 7<sup>th</sup>. ed. Washington: National Academy Press, 2001. 408 p.

NATIONAL BIODIESEL BOARD. **How much biodiesel has been produced in the US?** Disponível em: <<http://www.biodiesel.org/resources/faqs/>>. Acesso em: 23 fev. 2012.

NETT, T.M. Function of hypothalamic-hipophysial axis during the post-partum period in ewes and cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.34 (suppl.3), p.261-275., 1987.

NIELSEN, N.; INGVARTSEN, K. Propylene glycol for dairy cows. A review of the metabolism of propylene glycol and its effects on physiological parameters,

feed intake, milk production and risk of ketosis. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.115, n.1-2, p.191–213, 2004.

OBA, M.; ALLEN, M.S. Effects of intraruminal infusion of sodium, potassium, and ammonium on hypophagia from propionate in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, n.4, p.1398-1404, 2003.

OGBORN, Kathleen L. **Effects of method of delivery of glycerin on performance and metabolism of dairy cows during the transition period.** 2006. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Cornell University, Ithaca, 2006.

OOI, T.L. et al. Glycerol residue – a rich source of glycerol and medium chain fatty acids. **Journal of Oleo Science**, Tokyo, v.53, n.1, p.29-33, 2004.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT – FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION (OECD-FAO). **OECD-FAO agricultural outlook 2010–2019.** Paris: OECD, 2010.

OSBORNE, V. R. et al. Effects of supplementing glycerol and soybean oil in drinking water on feed and water intake, energy balance, and production performance of periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 2, p.698-707, 2009.

OSMAN, M.A. et al. Acute Metabolic Responses of Postpartal Dairy Cows to Subcutaneous Glucagon Injections, Oral Glycerol, or Both. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.91, n.9, p.3311–3322, 2008.

OVERTON, T.R. Substrate utilization for hepatic gluconeogenesis in the transition dairy cow. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS, 60<sup>th</sup>., 1998, Ithaca. **Proceedings of the Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers.** Ithaca: Cornell University, 1998, 237-246.

PACHAURI, N.; HE, B. Value-added Utilization of Crude Glycerol from Biodiesel Production: A Survey of Current Research Activities. In: 2006 ASABE ANNUAL INTERNATIONAL MEETING, 1., 2006, Portland. **ASABE Annual International Meeting.** Portland: Asabe, 2006. p. 1 - 16.

PAGGI, R.A., FAY, J.P.; FERNANDEZ, H.M. Effect of short-chain acids and glycerol on the proteolytic activity of rumen fluid. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.78, n.3-4, p.341–347, 1999.

PALMQUIST, D.L.; JENKINS, T.C. Fat in lactation rations: review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.63, n.1, p.1-14, 1980.

PARSONS, G.I.. **Effects of crude glycerin in feedlot cattle.** 2010. 67 f. Tese (Doutorado) - Kansas State University, Manhattan, 2010.

PARSONS, G.L.; SHELOR, M.K.; DROUILLARD, J.S. Performance and carcass traits of finishing heifers fed crude glycerin. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.87, n.2, p.653-657, 2009.

PEHRSON, B. The effect of orally administered glycogenic substance to dairy cows. **Nordisk Veterinaermedicin**, Copenhagen, v.24, n.9, p.409–426, 1972.

PEREIRA, L.G.R. Influência da glicerina bruta na cinética de fermentação ruminal in vitro. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 45<sup>a</sup>, 2008, Lavras. **Anais da 45<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**. Lavras: UFLA, 2008. CD-ROM.

PETTERSON, J.A. et al. Pregnancy and undernutrition alter glucose metabolic responses to insulin in sheep. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.123, n.7, p.1286-1295, 1993.

PETTERSON, J.A. et al. Pregnancy but not moderate undernutrition attenuates insulin suppression of fat mobilization in sheep. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.124, n.12, p.2431-2442, 1994.

PICKETT, M.M.; PIEPENBRINK, M.S.; OVERTON, T.R. Effects of propylene glycol or fat drench on plasma metabolites, liver composition, and production of dairy cows during the periparturient period. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, n.6, p.2113-2121, 2003.

PINTO, A.C. et al. Biodiesel: An overview. **Journal Brazilian Chemistry Society**, São Paulo, v.16, n.6B, p.1313-1330, 2005.

POL, A.; DEMEYER, D.I. Fermentation of methanol in the sheep rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, n.3, p.832-834, 1988.

PULLEN, D.L.; PALMQUIST, D.L.; EMERY, R.S. Effect of days in lactation and methionine hydroxy analog on incorporation of plasma fatty acids into plasma triglycerides. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.72, n.1, p.49, 1989.

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

REYNOLDS, C.K. et al. Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, n.4, p.1201-1217, 2003.

REYNOLDS, C.K. et al. Visceral tissue mass and rumen volume in dairy cows during the transition from late gestation to early lactation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.87, n.4, p.961-971, 2004.

REYNOLDS, C.K.; HARMON, D.L.; CECAVA, M.J. Absorption and delivery of nutrients for milk protein synthesis by portal-drained viscera. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.77, n.9, p.2787-2808, 1994.

REYNOLDS, C.K. et al. Net portal- drained visceral and hepatic metabolism of glucose, L-lactate and nitrogenous compounds in lactating holstein cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.71, n.7, p.1803-1812, 1988.

REYNOLDS, C.K. Glucose balance in cattle. In: FLORIDA RUMINANT NUTRITION CONFERENCE, 16., 2005, Gainesville. **Proceedings of the 2005 Florida Ruminant Nutrition Conference**. Gainesville: University Of Florida, 2005. p. 143 - 154.

RIVALDI, J.D. et al. Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.37, p.44-51, 2008.

ROCHE, J.F.; CROWE, M.A.; BOLAND, M.P. Postpartum anoestrus in dairy and beef cows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.28, n.6, p.703-712, 1992.

ROCHE, J.F.; MACKEY, D.; DISKIN, M.D. Reproductive management of postpartum cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.60-61, p.703-712, 2000.

ROGER, V. et al Effects of glycerol on the growth, adhesion and cellulolytic activity of rumen cellulolytic bacteria and anaerobic fungi. **Current Microbiology**, New York, v.25, n.4, p.197-201, 1992.

ROWE, J.B. et al. Secondary fermentation in the rumen of a sheep given a diet based on molasses. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.41, n.2, p.393-397, 1979.

RUKKWAMSUK, T. et al. Effect of fatty liver on hepatic gluconeogenesis in periparturient period. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.82, n.3, p.500-505, 1999.

SANTOS, G.T.; CAVALIERI, F.L.B.; DAMASCENO, J.C. Manejo da vaca leiteira no período transição e início da lactação. In: SANTOS, G.T. et al. (Org.). Sul-leite simpósio sobre sustentabilidade da pecuária leiteira na região sul do Brasil, II, 2002, Maringá. **Anais do II Sul-leite simpósio sobre sustentabilidade da pecuária leiteira na região sul do Brasil**. Maringá: UEM, 2002, p.143-165.

SANTOS, J.E., AMSTALDEN, M. Effects of nutrition on bovine reproduction. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, p.19-89, 1998.

SANTOS, G.T.; PRADO, I.N.; BRANCO, A.F. **Aspectos do manejo do gado leiteiro especializado**: Apontamentos, 22. Maringá: UEM, 1993. 23 p.

SCHMIDT, G.H.; SCHULTZ, L.H. Effect of feeding sodium propionate on milk and fat production, roughage consumption, blood sugar and blood ketones of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.41, n.1, p.169-175, 1958.

SCHRÖDER, A.; SÜDEKUM, K.H. Glycerol as a by-product of biodiesel production in diets for ruminants. In: INTERNATIONAL RAPESEED CONGRESS, 10, 1999, Canberra. **PROCEEDINGS FROM THE 10<sup>th</sup> INTERNATIONAL RAPESEED CONGRESS**. Gosford: The Regional Institute Ltd., 1999. paper 241.

SCHULTZ, L.H. Use of sodium propionate in the prevention of ketosis in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.41, n.11, p.160-168, 1958.

SELLERS, R.S. Glycerin as a feed ingredient, official definition(s) and approvals. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.86, n.2, p.392 (abstr.), 2008.

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

SOAP AND DETERGENT ASSOCIATION (THE). **Glycerin: an overview**. New York: The Soap And Detergent Association, 1990. 27 p.

SOBERANES, J.A. A importância do estado físico e das reservas corporais. **Revista do Gado Holandês**, n.52, p.101-104, 1989.

STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W.; CLARK, J.H. Relationship between ovarian activity and energy status during the early postpartum period of high producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.73, n.4, p.938-947, 1990.

STUDER, V.A. et al. Effect of prepartum propylene glycol administration on periparturient fatty liver in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.76, n.10, p.2931-2939, 1993.

THATCHER, W.W. et al. Control and management of ovarian follicles in cattle to optimize fertility. **Reproduction Fertility and Development**, Melbourne, v.8, n.2, p.203, 1996.

TRABUE, S. et al. Ruminal fermentation of propylene glycol and glycerol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.55, n.17, p.7043-7051, 2007.

TUCKER, H.A. Endocrine and neural control of the mammary gland. In: LARSON, B.L. **Lactation: A Comprehensive Treatise**. Ames: Iowa State Univ. Press, 1985. p.39.

UNITED STATES SOYBEAN EXPORT COUNCIL (USSEC). **Glycerin Market Analysis**. Indianapolis: ABG, 2007. 33 p.

VAN GERPEN, J. Biodiesel processing and production. **Fuel Processing Technology**, Amsterdam, v.86, n.10, 1097-1107, 2005.

VAN SAUN, R.J. Blood profiles as indicators of nutritional status. **Advances In Dairy Technology**, Alberta, v.12, p.401-410, 2000.

VERNON, R.G.; TAYLOR, E. Insulin, dexamethasone and their interactions in the control of glucose metabolism in adipose tissue from lactating and nonlactating sheep. **Biochemistry Journal**, London, v.256, n.2, p.509-519, 1988.

VILLA-GODOY, A. et al. Influence of Energy Balance and Body Condition on Estrus and Estrous Cycles in Holstein Heifers. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.73, n.10, p.2759-2765, 1990.

WALTNER, S.S.; MCNAMARA, J.P.; HILLERS, J.K. Relationships of Body Condition Score to Production Variables in High Producing Holstein Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.76, n.11, p.3410-3419, 1993.

WANG, C. et al. Effects of glycerol on rumen fermentation, urinary excretion of purine derivatives and feed digestibility in steers. **Livestock Science**, Amsterdam, v.121, p.15-20, 2009.

YAVAS, Y.; WALTON, J.S. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review. **Theriogenology**, New York, v.54, n.1, p.25-55, 2000.

YOUNG, J.W. Gluconeogenesis in cattle: significance and methodology. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.60, n.1, p.1-15, 1977.

## **6. APÊNDICES**

Apêndice 1. Normas da Revista Animal Feed Science and Technology utilizadas na elaboração dos capítulos II e III



## ANIMAL FEED SCIENCE AND TECHNOLOGY

An International Scientific Journal Covering Research on Animal Nutrition, Feeding and Technology

### AUTHOR INFORMATION PACK

#### TABLE OF CONTENTS

●	<b>Description</b>	<b>p.1</b>
●	<b>Audience</b>	<b>p.1</b>
●	<b>Impact Factor</b>	<b>p.1</b>
●	<b>Abstracting and Indexing</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Editorial Board</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Guide for Authors</b>	<b>p.4</b>



ISSN: 0377-8401

#### DESCRIPTION

if2011\_1720.jpg

*Animal Feed Science and Technology* is a unique journal publishing scientific papers of international interest focusing on animal feeds and their feeding.

Papers describing research on feed for ruminants and non-ruminants, including poultry, horses, companion animals and aquatic animals, are welcome.

The journal covers the following areas:

Nutritive value of feeds (e.g., assessment, improvement) Methods of conserving and processing feeds that affect their nutritional value Agronomic and climatic factors influencing the nutritive value of feeds Utilization of feeds and the improvement of such Metabolic, production, reproduction and health responses, as well as potential environmental impacts, of diet inputs and feed technologies (e.g., feeds, feed additives, feed components, mycotoxins) Mathematical models relating directly to animal-feed interactions Analytical and experimental methods for feed evaluation Environmental impacts of feed technologies in animal production

The journal does not encourage papers with emphasis on animal products, molecular biology, genetics or management, or the regulatory or legal aspects of feeds as well as animal production studies with a focus on animal nutrition that do not have a direct link to a feed or feed technology.

#### AUDIENCE

Animal Scientists, Crop Scientists, Feed Manufacturers, Feed Additive Producers.

#### IMPACT FACTOR

2010: 1.720 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2011

## ABSTRACTING AND INDEXING

---

Biological Abstracts  
 Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences  
 Herbage Abstracts  
 Index Veterinarius  
 Nutrition Abstracts  
 Scopus  
 Veterinary Bulletin

## EDITORIAL BOARD

---

### *Editors-in-Chief:*

**P.H. Robinson**, Dairy & Nutrition, Department of Animal Science, University of California, Davis, CA 95616-8521, USA

**P. Udén**, Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Animal Nutrition and Management, Box 7024, S-750 07, Uppsala, Sweden

**G.G. Mateos**, Departamento de Produccion Animal, E.T.S.I. Agronomos, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain

**R. Blank**, Institute of Animal Nutrition, Christian-Albrechts-University Kiel, D-24098 Kiel, Germany

### *Statistical Advisors:*

**J. Craigon**, Nottingham UK

**J.G. Fadel**, Davis, CA, USA

**M.A. Ibáñez**, Madrid, Spain

### *Book Review Editor:*

**G. Flachowsky**, Braunschweig, Germany

### *Senior Editorial Advisory Board:*

**D. Colombatto**, Buenos Aires, Argentina

**J.W. Cone**, Wageningen, The Netherlands

**M. Fondevilla**, Zaragoza, Spain

**V. Ravindran**, Palmerston North, New Zealand

**M. Spanghero**, Udine, Italy

**K.-H. Südekum**, Bonn, Germany

**B. Svihus**, Ås, Norway

**R.T. Zijlstra**, Edmonton, AB, Canada

### *Editorial Advisory Board:*

**J.F. Aguilera**, Granada, Spain

**A. Bach**, Barcelona, Spain

**M.A. Bamikole**, Benin City, Nigeria

**H. Ben Salem**, Ariana, Tunisia

**G. Broderick**, Madison, WI, USA

**A.R. Cabrita**, Vairão, VC, Portugal

**S. Calsamiglia**, Barcelona, Spain

**R. Campbell**, Willaston, SA, Australia

**R. Carabaño**, Madrid, Spain

**P. Chilubroste**, Paysandu, Uruguay

**C. de Blas**, Madrid, Spain

**J. De Boever**, Melle, Belgium

**R. Dixon**, Rockhampton, Australia

**E. Evans**, Ontario, Canada

**L. Fiems**, Melle, Belgium

**J. Garcia**, Madrid, Spain

**F. Grosjean**, Le Plesis Pâé, France

**P.C. Hoffman**, Marshfield, WI, USA

**S.S.O. Hung**, Davis, CA, USA

**K.F. Kalscheur**, Brookings, SD, USA

**K.M. Koenig**, Alberta, Canada

**J. Kowalczyk**, Jablonna, Poland

**U. Krishnamoorthy**, Bangalore, India

**M.D. Lindemann**, Lexington, KY, USA

**C.J. Lopez-Bote**, Madrid, Spain

**J. Miron**, Bet-Dagan, Israel  
**V. Mlambo**, St Augustine, Trinidad & Tobago  
**B. Mullan**, South Perth, Western Australia  
**P. O'Kiely**, Dunsany, Co. Meath, Ireland  
**F.N. Owens**, Johnston, IA, USA  
**D.L. Palmquist**, Wooster, OH, USA  
**H. Petit**, Sherbrooke, QC, Canada  
**M. Rinne**, Jokioinen, Finland  
**H.S. Rostagno**, Viçosa, Brazil  
**C. Rymer**, Reading, UK  
**K. Swanson**, Urbana, IL, USA  
**H. Volden**, Ås, Norway

## GUIDE FOR AUTHORS

---

### INTRODUCTION

#### *Types of article*

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles
3. Short Communications
4. Book Reviews

*Original Research Papers* should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

*Review Articles* should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest.

A *Short Communication* is a concise but complete description of a limited investigation, which will not be included in a later paper. Short Communications should be as completely documented, both by reference to the literature and description of the experimental procedures employed, as a regular paper. They should not occupy more than six printed pages (about 12 manuscript pages, including figures, tables and references).

*Book Reviews* will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than two years old. Book reviews will be solicited by the Book Review Editor. Unsolicited reviews will not usually be accepted, but suggestions for appropriate books for review may be sent to the Book Review Editor:

Professor G. Flachowsky  
Federal Research Centre of Agriculture  
Institute of Animal Nutrition  
Bundesallee 50  
D-38116 Braunschweig  
Germany

Manuscripts describing the use of commercial feed products are welcome, but should include the following information: major components, contents of active ingredients (for example enzyme activities). Independent verification, as opposed to a manufacturers guarantee, is always desirable and often avoids difficulties in the review process, especially where there are no, or few, treatment impacts. The Editors reserve the right to reject any manuscript employing such products, wherein this information is not disclosed.

Submissions concerning feedstuff composition are welcome when published and/or accepted analytical procedures have been employed. However, unusual feedstuffs and/or a wide range of data are pre-requisites.

Submissions concerning NIRS may be suitable when more accurate, precise or robust equations are presented. Mathematical, technical and statistical advancement, may constitute the foundation for acceptance. For more details see the editorial in Vol. 118/3-4.

#### *Contact details for submission*

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to [AuthorSupport@elsevier.com](mailto:AuthorSupport@elsevier.com). Authors can determine the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

#### *Page charges*

This journal has no page charges.

### BEFORE YOU BEGIN

#### *Ethics in Publishing*

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

### **Policy and ethics**

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans* <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; *EU Directive 2010/63/EU for animal experiments* [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/legislation\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm); *Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals* <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article.

### **Conflict of interest**

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

### **Submission declaration**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

### **Changes to authorship**

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

*Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

*After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

### **Retained author rights**

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

### **Funding body agreements and policies**

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

### **Language and language services**

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageediting> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

### **Submission**

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Poorly written and/or presented manuscripts (relative to the journal's guidelines) may be returned to authors for upgrading by the editorial office, prior to a review for scientific merit.

Before preparing their manuscript, it is suggested that authors examine the editorial by the Editors-in-Chief in Vol. 134/3-4, which outlines several practices and strategies of manuscript preparation that the Editors-in-Chief have found to be successful. This editorial also outlines practices that can lead to difficulties with reviewers and/or rejection of the manuscript for publication. There is also an example of an Animal Feed Science and Technology manuscript available on the journal website at <http://www.elsevier.com/locate/anifeedsci>.

#### *Submit your article*

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/anifee/>

### **Referees**

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of 3 potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

## **PREPARATION**

Use past tense for current findings, and the present tense for "truths" and hypotheses.

### **Article Structure**

Manuscripts should have **numbered lines**, with wide margins and **double spacing** throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered continuously.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

#### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### *Material and methods*

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

If reference is made to AOAC, ISO or similar analytical procedure(s), the specific procedure identification number(s) must be cited. A number of references for neutral and acid detergent fibre (NDF, ADF) assays exist, and an alternative reference to the now out-of-print USDA Agriculture Handbook 379 must be used. There are many options for NDF and ADF assays (e.g. sodium sulfite, alpha amylase, residual ash), which must be specified in the text. For more details see the editorial in Vol. 118/3-4.

The following definitions should be used, as appropriate:

a. aNDFom-NDF assayed with a heat stable amylase and expressed exclusive of residual ash.

- b. NDFom-NDF not assayed with a heat stable amylase and expressed exclusive of residual ash.
- c. aNDF-NDF assayed with a heat stable amylase and expressed inclusive of residual ash.
- d. NDF-NDF assayed without a heat stable amylase and expressed inclusive of residual ash.
- e. ADFom-ADF expressed exclusive of residual ash.
- f. ADF-ADF expressed inclusive of residual ash.
- g. Lignin (sa)-Lignin determined by solubilization of cellulose with sulphuric acid.
- h. Lignin (pm)-Lignin determined by oxidation of lignin with permanganate.

While expressions of NDF and ADF inclusive of residual ash will continue to be acceptable (i.e., the terms aNDF, NDF and ADF above), the Editors-in-Chief highly recommend reporting all fibre values, including digestibilities, on an OM basis. Silica is partially soluble in ND, is quantitatively recovered in AD, and so may contribute to the 'fibre' values and to subsequent digestibility coefficients.

Reporting 'hemicellulose' values as the difference between NDF and ADF is generally only acceptable if the analyses have been sequential on the same sample. Crude fibre (CF), nitrogen-free extract (NFE) and total digestible nutrients (TDN) are not acceptable terms for describing feeds and should only be referred to in a historical context.

#### *Results*

Results should be clear and concise.

#### **Discussion**

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. Avoid extensive citations and discussion of published literature. Combined 'Results and Discussion' sections are only acceptable for 'Short Communications', except under compelling circumstances.

#### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

#### **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

#### **Abstract**

The abstract should be clear, descriptive and not longer than 400 words. It should contain the following specific information: purpose of study; experimental treatments used; results obtained, preferably with quantitative data; significance of findings; conclusions; implications of results if appropriate.

#### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

#### **Abbreviations**

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/> for further information.

Authors and Editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

SI or SI-derived units should be used throughout (e.g. MJ and not Kcal for energy concentrations). Concentrations should be expressed on a 'per kg' basis (w/w); however, w/v, v/v, mol/mol or M may be accepted depending on the circumstances. In addition, 'units' and 'equivalents' are acceptable. Normality should be avoided, as it may be ambiguous for certain acids. If analytical standards have been used, they should be specified by name (e.g. yeast RNA) and form (e.g. lactose monohydrate). Percents should only be used when describing a relative increase or decrease in a response. Proportions should be maximum 1.0 or  $\leq 1.0$ . For more details see the editorial in Vol. 118/3-4.

Percent is *only* used to indicate relative changes. For composition, both w/w (often solids composition g/kg) and w/v (e.g. g/L), v/v (e.g. mL), mol/mol or M can be accepted depending on the circumstances. Specify units (e.g. g/L) and never as percent.

Digestibility/metabolisability and degradability should always be expressed as a coefficient (not %), and the content of, for example, the digestible component should be expressed as g/kg: thus, the coefficient of digestibility of dry matter is 0.8, while the content of digestible dry matter is 800g/kg. A distinction between true and apparent digestibility should be made, as well as between faecal and ileal (e.g. coefficient of total tract apparent digestibility - CTTAD). The terms 'availability' and 'bioavailability' should be avoided without definition in context.

In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca<sup>2+</sup>, not as Ca<sup>++</sup>. Isotope numbers should precede the symbols e.g. <sup>18</sup>O. The repeated use of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>).

### Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

If differences between treatments are statistically significant, this should be indicated by adding the actual 'P' value obtained. If  $0.10 > P > 0.05$ , then differences can be considered to suggest a trend, or tendency, to a difference, but the actual 'P' value should be stated. Further information on this issue can be found in *Animal Feed Science and Technology* Vol. 129/1-2.

Spaces should be used between all values and units, except for the following: Between the value and degrees or percent. In equations around \* and /. In probability expressions (P<0.05). When probability values are given, the 'P' should be a capital letter.

### Artwork

### *Electronic artwork*

#### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply "as is".

#### **Please do not:**

- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

All data in figures should have a measure of variation either on the plot (e.g., error bars), in the figure legend itself, or by reference to a table with measures of variation in the figure legend.

Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the figures should be kept to a minimum.

If a scale is given, use bar scales (instead of numerical scales) that must be changed with reduction.

#### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

#### **Tables**

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

#### **References**

All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list. The accuracy of the references is the responsibility of the author(s).

References published in other than the English language should be avoided, but are acceptable if they include an English language 'Abstract' and the number of non-English language references cited are reasonable (in the view of the handling Editor) relative to the total number of references cited.

In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed - if necessary - by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that...". "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp. 12-16)".

If reference is made in the text to a publication written by more than two authors, the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.

References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on authors' names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates - publications of the same author with one co-author - publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 2001a, 2001b, etc.

#### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

#### *Reference style*

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by "et al." and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ...."

*List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

#### *Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51-59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

#### *Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

#### **Video data**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video

file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### **Supplementary data**

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

### **Submission checklist**

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

#### **Ensure that the following items are present:**

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

### **Additional Information**

Authors should use the 'Track Changes' option when revising their manuscripts, so that any changes made to the original submission are easily visible to the Editors. Those revised manuscripts upon which the changes are not clear may be returned to the author.

Specific comments made in the Author Comments in response to referees' comments must be organised clearly. For example, use the same numbering system as the referee, or use 2 columns of which one states the comment and the other the response.

## **AFTER ACCEPTANCE**

### **Use of the Digital Object Identifier**

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal

medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

### **Proofs**

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

### **Offprints**

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

### **AUTHOR INQUIRIES**

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs (<http://www.elsevier.com/authorFAQ>) and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

## Apêndice 2. Percentual de PB, GB, lactose e sólidos totais no leite, Capítulo II

Vaca	Quad.	Trat.	Per.	GB (%)	PB (%)	Lactose (%)	Sólidos Totais (%)
85	1	0	3	3,88	3,41	4,53	12,81
127	2	0	3	4,39	3,82	4,19	13,40
143	1	0	4	3,66	3,82	4,26	12,69
157	1	0	1	3,19	3,42	4,67	12,16
184	2	0	2	3,13	3,39	4,68	12,18
205	2	0	1	3,32	3,53	4,58	12,33
200	2	0	4	3,76	3,68	4,64	13,10
203	1	0	2	4,79	3,78	4,48	14,14
85	1	1	4	3,63	3,53	4,42	12,53
127	2	1	4	4,01	3,83	3,98	12,79
143	1	1	2	4,41	3,77	4,39	13,59
157	1	1	3	4,53	3,73	4,62	13,92
184	2	1	1	2,31	3,38	4,73	11,20
190	2	1	3	3,24	3,46	4,87	12,57
200	2	1	2	4,13	3,56	4,62	13,57
203	1	1	1	3,14	3,73	4,72	12,49
85	1	2	2	4,25	3,53	4,46	13,26
127	2	2	1	2,70	3,73	3,88	11,08
143	1	2	1	3,63	3,70	4,34	12,59
157	1	2	4	4,04	3,88	4,51	13,47
184	2	2	4	3,13	3,56	4,58	12,17
190	2	2	2	2,67	3,37	4,85	11,85
200	2	2	3	4,08	3,75	4,70	13,57
203	1	2	3	3,92	3,97	4,63	14,19
85	1	3	1	3,27	3,45	4,49	12,09
127	2	3	2	3,42	3,80	3,98	12,12
143	1	3	3	3,80	3,83	4,30	12,92
157	1	3	2	3,92	3,72	4,57	13,23
184	2	3	3	2,94	3,49	4,67	12,07
190	2	3	4	2,90	3,70	4,59	12,20
200	2	3	1	2,96	3,64	4,71	12,19
203	1	3	4	3,96	4,12	4,51	13,61

## Apêndice 3. Produção de leite, leite corrigido para 4% de GB, GB, PB, lactose e sólidos totais no leite (kg), Capítulo II

Vaca	Quad.	Trat.	Per.	Prod. (kg)	PCG (4%, kg)	GB (kg)	PB (kg)	Lactose (kg)	Sólidos Totais (kg)
85	1	0	3	17,02	16,71	0,66	0,58	0,77	2,18
127	2	0	3	14,18	15,02	0,62	0,54	0,59	1,90
143	1	0	4	19,99	18,96	0,73	0,76	0,85	2,54
157	1	0	1	24,11	21,18	0,77	0,82	1,13	2,93
184	2	0	2	21,27	18,51	0,67	0,72	1,00	2,59
190	2	0	1	21,25	19,08	0,71	0,75	0,97	2,62
200	2	0	4	21,71	20,95	0,82	0,80	1,01	2,84
203	1	0	2	19,44	21,74	0,93	0,73	0,87	2,75
85	1	1	4	17,73	16,74	0,64	0,63	0,78	2,22
127	2	1	4	13,53	13,56	0,54	0,52	0,54	1,73
143	1	1	2	23,40	24,85	1,03	0,88	1,03	3,18
157	1	1	3	21,76	23,48	0,98	0,81	1,00	3,03
184	2	1	1	23,01	17,18	0,53	0,78	1,09	2,58

190	2	1	3	19,51	17,29	0,63	0,68	0,95	2,45
200	2	1	2	20,46	20,84	0,84	0,73	0,95	2,78
203	1	1	1	19,29	16,79	0,61	0,72	0,91	2,41
85	1	2	2	18,06	18,74	0,77	0,64	0,81	2,39
127	2	2	1	17,07	13,75	0,46	0,64	0,66	1,89
143	1	2	1	25,54	24,14	0,93	0,94	1,11	3,22
157	1	2	4	22,81	22,95	0,92	0,89	1,03	3,07
184	2	2	4	22,69	19,72	0,71	0,81	1,04	2,76
190	2	2	2	22,14	17,71	0,59	0,75	1,07	2,62
200	2	2	3	19,97	20,20	0,81	0,75	0,94	2,71
203	1	2	3	18,88	18,64	0,74	0,75	0,87	2,68
85	1	3	1	18,54	16,52	0,61	0,64	0,83	2,24
127	2	3	2	13,41	12,26	0,46	0,51	0,53	1,63
143	1	3	3	18,67	18,10	0,71	0,72	0,80	2,41
157	1	3	2	23,26	22,99	0,91	0,86	1,06	3,08
184	2	3	3	21,31	17,92	0,63	0,74	1,00	2,57
190	2	3	4	21,60	18,03	0,63	0,80	0,99	2,63
200	2	3	1	21,26	17,95	0,63	0,77	1,00	2,59
203	1	3	4	19,04	18,92	0,75	0,78	0,86	2,59

#### Apêndice 4. Eficiência alimentar e energética, Capítulo II

Vaca	Quad.	Trat.	Per.	Efic. Alimentar (kg/kg MS)	Efic. Alimentar (kg/kg MO)	Efic. Alimentar (kg PCG/kg MS)	Efic. Alimentar (kg PCG/kg MO)	Efic. Energética (ELI prod./ELI cons.)
85	1	0	3	1,04	1,12	1,02	1,10	0,42
127	2	0	3	0,99	1,07	1,05	1,13	0,41
143	1	0	4	0,90	0,97	0,85	0,92	0,41
157	1	0	1	1,16	1,24	1,02	1,09	0,45
184	2	0	2	1,15	1,23	1,00	1,07	0,45
190	2	0	1	0,90	0,97	0,81	1,15	0,38
200	2	0	4	1,17	1,27	1,13	1,23	0,55
203	1	0	2	1,07	1,15	1,20	1,28	0,56
85	1	1	4	1,02	1,11	0,97	1,05	0,39
127	2	1	4	0,88	0,96	0,89	0,96	0,36
143	1	1	2	1,02	1,10	1,09	1,17	0,47
157	1	1	3	1,00	1,08	1,08	1,16	0,45
184	2	1	1	1,24	1,34	0,93	1,00	0,41
190	2	1	3	1,07	1,15	0,95	1,02	0,42
200	2	1	2	1,17	1,26	1,19	1,28	0,51
203	1	1	1	1,16	1,25	1,01	0,87	0,41
85	1	2	2	0,98	1,06	1,02	1,10	0,48
127	2	2	1	1,02	1,10	0,88	0,94	0,41
143	1	2	1	1,25	1,34	1,18	1,27	0,51
157	1	2	4	1,08	1,18	1,09	1,19	0,48
184	2	2	4	1,25	1,36	1,09	1,18	0,5
190	2	2	2	1,23	1,32	0,98	1,06	0,45
200	2	2	3	1,11	1,21	1,13	1,22	0,51
203	1	2	3	1,04	1,13	1,03	1,11	0,47
85	1	3	1	1,07	1,16	0,96	1,03	0,41

127	2	3	2	0,84	0,91	0,77	0,83	0,34
143	1	3	3	0,87	0,95	0,85	0,92	0,35
157	1	3	2	1,08	1,17	1,07	1,16	0,48
184	2	3	3	1,20	1,30	1,01	1,09	0,43
190	2	3	4	1,08	1,18	0,90	0,98	0,41
200	2	3	1	1,25	1,36	1,06	1,09	0,44
203	1	3	4	1,09	1,19	1,08	1,17	0,49

Apêndice 5. Consumo de MS, MO, FDN (kg e % do peso vivo), Capítulo II

Vaca	Quad.	Trat.	Per.	CMS (kg)	CMO (kg)	CFDN (kg)	CMS (% PV)	CMO (% PV)	CFDN (% PV)
85	1	0	3	16,37	15,19	5,16	3,89	3,61	1,22
127	2	0	3	14,34	13,28	4,32	3,25	3,01	0,98
143	1	0	4	22,27	20,59	7,29	5,17	4,78	1,69
157	1	0	1	20,83	19,43	7,18	4,81	4,49	1,66
184	2	0	2	18,54	17,28	6,48	4,88	4,55	1,71
190	2	0	1	23,57	21,95	8,99	5,82	5,42	2,22
200	2	0	4	18,49	17,08	6,16	5,28	4,88	1,76
203	1	0	2	18,19	16,96	6,39	4,61	4,29	1,62
85	1	1	4	17,33	15,95	5,51	3,97	3,66	1,26
127	2	1	4	15,30	14,09	4,81	3,46	3,19	1,09
143	1	1	2	22,88	21,32	8,15	5,22	4,87	1,86
157	1	1	3	21,83	20,18	7,34	4,96	4,59	1,67
184	2	1	1	18,49	17,21	6,40	4,93	4,59	1,71
190	2	1	3	18,29	16,91	6,21	4,44	4,10	1,51
200	2	1	2	17,44	16,23	6,03	5,05	4,71	1,75
203	1	1	1	16,57	15,42	5,57	4,19	3,90	1,41
85	1	2	2	18,38	17,04	6,31	4,17	3,86	1,43
127	2	2	1	15,69	14,59	5,19	3,48	3,23	1,15
143	1	2	1	20,51	19,05	7,07	5,13	4,76	1,77
157	1	2	4	21,10	19,37	6,59	4,60	4,22	1,44
184	2	2	4	18,15	16,69	5,51	4,74	4,36	1,44
190	2	2	2	18,07	16,75	5,91	4,63	4,29	1,52
200	2	2	3	17,92	16,53	5,89	5,12	4,72	1,68
203	1	2	3	18,16	16,75	6,00	4,60	4,24	1,52
85	1	3	1	17,28	16,02	5,75	4,05	3,75	1,35
127	2	3	2	15,96	14,78	5,06	3,51	3,25	1,11
143	1	3	3	21,40	19,75	6,93	5,03	4,65	1,63
157	1	3	2	21,47	19,88	7,22	4,72	4,37	1,59
184	2	3	3	17,79	16,41	5,64	4,81	4,44	1,52
190	2	3	4	19,95	18,31	6,34	4,63	4,25	1,47
200	2	3	1	16,94	15,67	5,56	4,90	4,53	1,61
203	1	3	4	17,27	15,87	5,34	4,37	4,02	1,35

## Apêndice 6. Digestibilidade da MS, MO e FDN (%), Capítulo II

Vaca	Quad.	Trat.	Per.	DMS (%)	DMO (%)	DFDN (%)
85	1	0	3	69,36	71,46	50,28
127	2	0	3	65,08	70,61	43,00
143	1	0	4	63,24	67,42	49,56
157	1	0	1	61,94	63,76	36,34
184	2	0	2	59,28	61,66	37,20
190	2	0	1	71,14	72,51	56,06
200	2	0	4	62,67	67,97	49,24
203	1	0	2	64,62	67,44	46,27
85	1	1	4	72,19	74,78	61,38
127	2	1	4	59,98	66,27	46,33
143	1	1	2	64,55	67,66	48,38
157	1	1	3	65,40	67,32	44,13
184	2	1	1	67,25	68,61	45,17
190	2	1	3	59,67	61,83	38,77
200	2	1	2	65,12	67,78	45,99
203	1	1	1	65,21	68,24	44,78
85	1	2	2	67,08	69,34	39,46
127	2	2	1	66,58	68,09	45,45
143	1	2	1	64,85	66,33	38,50
157	1	2	4	63,98	69,43	45,50
184	2	2	4	66,72	70,29	47,95
190	2	2	2	63,88	65,42	37,35
200	2	2	3	63,95	66,64	40,67
203	1	2	3	62,03	66,91	41,28
85	1	3	1	68,90	70,49	47,96
127	2	3	2	68,52	70,62	48,68
143	1	3	3	68,66	70,82	48,32
157	1	3	2	70,08	72,00	49,99
184	2	3	3	64,28	66,34	39,30
190	2	3	4	59,66	66,06	47,83
200	2	3	1	62,47	63,98	33,32
203	1	3	4	63,41	68,32	44,73

## Apêndice 7. Parâmetros bioquímicos: concentrações séricas de AGNE, uréia, nitrogênio uréico e glicose, e de nitrogênio uréico no leite, Capítulo II

Vaca	Quad.	Trat.	Per.	AGNE (mmol/L)	Uréia (mg/dL)	BUN (mg/dL)	NUL (mg/dL)	Glicose
85	1	0	3	0,2882	49,56	23,16	22,38	70,5
127	2	0	3	0,2037	42,11	19,68	19,03	70
143	1	0	4	0,1368	43,03	20,11	19,44	75
157	1	0	1	0,2734	49,75	23,25	22,47	68
184	2	0	2	0,2391	53,64	25,07	24,22	67,5
190	2	0	1	0,2379	60,36	28,21	27,25	71
200	2	0	4	0,1360	65,11	30,42	29,39	69

203	1	0	2	0,1521	46,06	21,52	20,81	76
85	1	1	4	0,1169	47,18	22,05	21,31	67
127	2	1	4	0,1308	32,16	15,03	14,55	63
143	1	1	2	0,1714	53,77	25,13	24,28	75
157	1	1	3	0,2060	50,74	23,71	22,92	66
184	2	1	1	0,1664	61,09	28,55	27,58	62
190	2	1	3	0,2346	51,40	24,02	23,21	69,5
200	2	1	2	0,2117	40,92	19,12	18,49	64,5
203	1	1	1	0,1301	43,82	20,48	19,80	68
85	1	2	2	0,1128	39,14	18,29	17,69	72
127	2	2	1	0,1858	39,34	18,38	17,78	70,5
143	1	2	1	0,2329	41,65	19,46	18,82	64,5
157	1	2	4	0,1513	44,48	20,79	20,10	70
184	2	2	4	0,1193	50,94	23,80	23,01	70,5
190	2	2	2	0,2399	40,46	18,91	18,29	72
200	2	2	3	0,1561	51,33	23,99	23,18	66,5
203	1	2	3	0,2227	46,85	21,89	21,17	68,5
85	1	3	1	0,2203	48,57	22,69	21,94	80
127	2	3	2	0,1652	50,21	23,46	22,68	69
143	1	3	3	0,2922	42,77	19,98	19,32	72
157	1	3	2	0,1534	46,46	21,71	20,99	73
184	2	3	3	0,1646	48,43	22,63	21,88	71,5
190	2	3	4	0,1240	48,83	22,82	22,06	72
200	2	3	1	0,2320	51,53	24,08	23,27	67,5
203	1	3	4	0,1469	50,48	23,59	22,80	71

Apêndice 8. Tabela de Anova para produção de leite (kg), Capítulo II

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Quadrado	1	5,4203	5,4203	4,13	0,0603
Vaca*quadrado	6	210,0690	35,0115	26,65	<0,0001
Período	3	22,3833	7,4611	5,68	0,0084
Tratamento	3	7,6998	2,5666	1,95	0,1643
Quadrado*trat	3	1,1038	0,3679	0,28	0,8389
Resíduo	15	19,7039	1,3136		
Total	31	266,3801			

Apêndice 9. Tabela de Anova para produção de leite corrigido para 4% de GB (kg), Capítulo II

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Quadrado	1	53,7685	53,7685	18,54	0,0006
Vaca*quadrado	6	160,7504	26,7917	9,24	0,0002
Período	3	9,5615	3,1872	1,10	0,3802
Tratamento	3	11,5387	3,8462	1,33	0,3029
Quadrado*trat	3	5,3473	1,7824	0,61	0,6161
Resíduo	15	43,5046	2,9003		
Total	31	284,4710			

Apêndice 10. Tabela de Anova para teor de GB (%), Capítulo II

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
--------------------	----	----	----	---	-----

Quadrado	1	2,4920	2,4920	17,15	0,0009
Vaca*quadrado	6	2,2661	0,3777	2,60	0,0625
Período	3	3,2509	1,0836	7,46	0,0028
Tratamento	3	0,6127	0,2042	1,41	0,2800
Quadrado*trat	3	0,3839	0,1280	0,88	0,4733
Resíduo	15	2,1796	0,1453		
Total	31	11,1852			

Apêndice 11. Tabela de Anova para produção de GB (kg), Capítulo II

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Quadrado	1	0,1815	0,1815	21,22	0,0003
Vaca*quadrado	6	0,2507	0,0418	4,88	0,0059
Período	3	0,0567	0,0189	2,21	0,1294
Tratamento	3	0,0296	0,0099	1,15	0,3601
Quadrado*trat	3	0,0200	0,0067	0,78	0,5229
Resíduo	15	0,1283	0,0086		
Total	31	0,6667			

Apêndice 12. Tabela de Anova para teor de PB (%), Capítulo II

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Quadrado	1	0,0903	0,0903	19,99	0,0004
Vaca*quadrado	6	0,6554	0,1092	24,18	<0,0001
Período	3	0,1697	0,0566	12,52	0,0002
Tratamento	3	0,0667	0,0222	4,92	0,0141
Quadrado*trat	3	0,0309	0,0103	2,28	0,1208
Resíduo	15	0,0678	0,0045		
Total	31	1,0808			

Apêndice 13. Tabela de Anova para produção de PB (kg), Capítulo II

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Quadrado	1	0,0231	0,0231	13,09	0,0025
Vaca*quadrado	6	0,2482	0,0414	23,42	<0,0001
Período	3	0,0178	0,0059	3,36	0,0469
Tratamento	3	0,0169	0,0056	3,19	0,0540
Quadrado*trat	3	0,0045	0,0015	0,84	0,4917
Resíduo	15	0,0265	0,0018		
Total	31	0,3370			

Apêndice 14. Tabela de Anova para teor de Lactose (%), Capítulo II

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Quadrado	1	0,0038	0,0038	0,46	0,5086
Vaca*quadrado	6	1,5765	0,2627	31,47	<0,0001
Período	3	0,0662	0,0221	2,64	0,0871
Tratamento	3	0,0191	0,0064	0,76	0,5328
Quadrado*trat	3	0,0007	0,0002	0,03	0,9933

Resíduo	15	0,1252	0,0083
Total	31	1,7916	

Apêndice 15. Tabela de Anova para produção de Lactose (kg), Capítulo II

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Quadrado	1	0,0045	0,0045	1,44	0,2493
Vaca*quadrado	6	0,6813	0,1135	36,15	<0,0001
Período	3	0,0423	0,0141	4,49	0,0194
Tratamento	3	0,0143	0,0048	1,51	0,2520
Quadrado*trat	3	0,0019	0,0006	0,21	0,8909
Resíduo	15	0,0471	0,0031		
Total	31	0,7914			

Apêndice 16. Tabela de Anova para teor de Sólidos Totais (%), Capítulo II

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Quadrado	1	3,9903	3,9903	26,92	0,0001
Vaca*quadrado	6	4,9888	0,8315	5,61	0,0032
Período	3	6,3044	2,1015	14,18	0,0001
Tratamento	3	0,4484	0,1495	1,01	0,4164
Quadrado*trat	3	1,0725	0,3575	2,41	0,1074
Resíduo	15	2,2237	0,1482		
Total	31	19,0282			

Apêndice 17. Tabela de Anova para produção de Sólidos Totais (kg), Capítulo II

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Quadrado	1	0,5075	0,5075	16,38	0,0011
Vaca*quadrado	6	3,5705	0,5951	19,21	<0,0001
Período	3	0,0751	0,0250	0,81	0,5087
Tratamento	3	0,1639	0,0546	1,76	0,1973
Quadrado*trat	3	0,0683	0,0228	0,74	0,5471
Resíduo	15	0,4647	0,0310		
Total	31	4,8501			

Apêndice 18. Análise de regressão para teor de PB (%), Capítulo II

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Linear	1	0,0640	0,0640	1,7700	0,1945
Quadrática	1	0,0004	0,0004	0,0100	0,9120
Cúbica	1	0,0022	0,0022	0,0600	0,8050
Resíduo	28	1,0140	0,0362		
Total	31	1,0807			

Apêndice 19. Análise de regressão para produção de PB (kg), Capítulo II

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Linear	1	0,0038	0,0038	0,3300	0,5687
Quadrática	1	0,0050	0,0050	0,4400	0,5138

Cúbica	1	0,0081	0,0081	0,7100	0,4064
Resíduo	28	0,3200	0,0114		
Total	31	0,3370			

Apêndice 20. Tabela de Anova para eficiência alimentar (kg de leite produzido/kg de MS consumida), Capítulo II

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Quadrado	1	0,0162	0,0162	1,72	0,2094
Vaca*quadrado	6	0,2049	0,0342	3,63	0,0200
Período	3	0,0377	0,0126	1,33	0,3008
Tratamento	3	0,0242	0,0081	0,86	0,4841
Quadrado*trat	3	0,0041	0,0014	0,15	0,9312
Resíduo	15	0,1413	0,0094		
Total	31	0,4284			

Apêndice 21. Tabela de Anova para eficiência alimentar (kg de leite produzido/kg de MO consumida), Capítulo II

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Quadrado	1	0,0195	0,0195	1,86	0,1923
Vaca*quadrado	6	0,2408	0,0401	3,84	0,0161
Período	3	0,0390	0,0130	1,24	0,3292
Tratamento	3	0,0309	0,0103	0,98	0,4264
Quadrado*trat	3	0,0042	0,0014	0,13	0,9392
Resíduo	15	0,1569	0,0105		
Total	31	0,4913			

Apêndice 22. Tabela de Anova para eficiência alimentar (kg de leite corrigido para GB/kg de MS consumida), Capítulo II

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Quadrado	1	0,0176	0,0176	1,83	0,1956
Vaca*quadrado	6	0,1624	0,0271	2,83	0,0480
Período	3	0,0148	0,0049	0,51	0,6786
Tratamento	3	0,0309	0,0103	1,08	0,3890
Quadrado*trat	3	0,0014	0,0005	0,05	0,9847
Resíduo	15	0,1437	0,0096		
Total	31	0,3709			

Apêndice 23. Tabela de Anova para eficiência alimentar (kg de leite corrigido para GB/kg de MO consumida), Capítulo II

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Quadrado	1	0,0041	0,0041	0,30	0,5914
Vaca*quadrado	6	0,1358	0,0226	1,68	0,1937
Período	3	0,0166	0,0055	0,41	0,7472
Tratamento	3	0,0538	0,0179	1,33	0,3008
Quadrado*trat	3	0,0201	0,0067	0,50	0,6894

Resíduo	15	0,2019	0,0135
Total	31	0,4323	

Apêndice 24. Tabela de Anova para consumo de MS (% do PV), Capítulo II

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Quadrado	1	0,0098	0,0098	0,13	0,7228
Vaca*quadrado	6	9,7078	1,6180	21,57	<0,0001
Período	3	0,1168	0,0389	0,52	0,6754
Tratamento	3	0,2162	0,0721	0,96	0,4366
Quadrado*trat	3	0,1349	0,0450	0,60	0,6252
Resíduo	15	1,1249	0,0750		
Total	31	11,3104			

Apêndice 25. Tabela de Anova para consumo de MO (% do PV), Capítulo II

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Quadrado	1	0,0091	0,0091	0,14	0,7141
Vaca*quadrado	6	8,3715	1,3953	21,34	<0,0001
Período	3	0,1575	0,0525	0,80	0,5115
Tratamento	3	0,2274	0,0758	1,16	0,3580
Quadrado*trat	3	0,1151	0,0384	0,59	0,6329
Resíduo	15	0,9809	0,0654		
Total	31	9,8615			

Apêndice 26. Tabela de Anova para consumo de FDN (% do PV), Capítulo II

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Quadrado	1	0,0018	0,0018	0,09	0,7642
Vaca*quadrado	6	1,4032	0,2339	12,12	<0,0001
Período	3	0,1654	0,0551	2,86	0,0722
Tratamento	3	0,1030	0,0343	1,78	0,1942
Quadrado*trat	3	0,0521	0,0174	0,90	0,4643
Resíduo	15	0,2894	0,0193		
Total	31	2,0149			

Apêndice 27. Tabela de Anova para consumo de MS (kg), Capítulo II

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Quadrado	1	22,6296	22,6296	14,41	0,0018
Vaca*quadrado	6	111,7108	18,6185	11,85	<0,0001
Período	3	1,6876	0,5625	0,36	0,7840
Tratamento	3	1,9366	0,6455	0,41	0,7474
Quadrado*trat	3	3,0225	10,0751	0,64	0,6001
Resíduo	15	23,5578	15,7052		
Total	31	164,5449			

Apêndice 28. Tabela de Anova para consumo de MO (kg), Capítulo II

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
--------------------	----	----	----	---	-----

Quadrado	1	19,5469	19,5469	14,36	0,0018
Vaca*quadrado	6	95,9608	15,9935	11,75	<0,0001
Período	3	1,9682	0,6561	0,48	0,6997
Tratamento	3	2,2216	0,7405	0,54	0,6596
Quadrado*trat	3	2,5239	0,8413	0,62	0,6139
Resíduo	15	20,4150	1,3610		
Total	31	142,6363			

Apêndice 29. Tabela de Anova para consumo de FDN (kg), Capítulo II

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Quadrado	1	2,7028	2,7028	6,94	0,0188
Vaca*quadrado	6	17,0126	2,8354	7,28	0,0009
Período	3	2,1133	0,7044	1,81	0,1890
Tratamento	3	1,2707	0,4236	1,09	0,3848
Quadrado*trat	3	0,8909	0,2970	0,76	0,5327
Resíduo	15	5,8456	0,3897		
Total	31	29,8359			

Apêndice 30. Tabela de Anova para digestibilidade da MO (%), Capítulo II

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Quadrado	1	22,8488	22,8488	2,25	0,1541
Vaca*quadrado	6	54,2096	9,0349	0,89	0,5256
Período	3	6,9129	2,3043	0,23	0,8759
Tratamento	3	3,4311	1,1437	0,11	0,9513
Quadrado*trat	3	27,9201	9,3067	0,92	0,4559
Resíduo	15	152,0815	10,1388		
Total	31	267,4038			

Apêndice 31. Tabela de Anova para digestibilidade da FDN (%), Capítulo II

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Quadrado	1	37,3032	37,3032	1,08	0,3151
Vaca*quadrado	6	124,5737	20,7623	0,60	0,7253
Período	3	182,4149	60,8049	1,76	0,1977
Tratamento	3	106,7872	35,5957	1,03	0,4070
Quadrado*trat	3	92,0005	30,6668	0,89	0,4697
Resíduo	15	517,8726	34,5248		
Total	31	1060,9522			

Apêndice 32. Tabela de Anova para digestibilidade da MS (%), Capítulo II

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Quadrado	1	26,7363	26,7363	2,19	0,1599
Vaca*quadrado	6	74,3922	12,3987	1,01	0,4528
Período	3	18,4343	6,1448	0,50	0,6863
Tratamento	3	5,4232	1,8077	0,15	0,9295
Quadrado*trat	3	36,5161	12,1720	1,00	0,4219

Resíduo	15	183,4469	12,2298
Total	31	344,9489	

Apêndice 33. Tabela de Anova para eficiência energética (EL produzida/ ELI consumida), Capítulo II

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Quadrado	1	0,0019	0,0019	1,23	0,2856
Vaca*quadrado	6	0,0409	0,0068	4,29	0,0103
Período	3	0,0078	0,0026	1,64	0,2225
Tratamento	3	0,0163	0,0054	3,42	0,0447
Quadrado*trat	3	0,0005	0,0001	0,11	0,9519
Resíduo	15	0,0238	0,0015		
Total	31	0,0915			

Apêndice 34. Tabela de Anova para concentração sérica de glicose (mg/dL), Capítulo II

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Quadrado	1	51,2578	51,2578	4,82	0,0442
Vaca*quadrado	6	61,6719	10,2786	0,97	0,4796
Período	3	21,9609	7,3203	0,69	0,5729
Tratamento	3	118,2734	39,4245	3,71	0,0354
Quadrado*trat	3	37,3984	12,4661	1,17	0,3530
Resíduo	15	159,4297	10,6286		
Total	31	449,9922			

Apêndice 35. Tabela de Anova para concentração sérica de AGNE (mmol/L), Capítulo II

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Quadrado	1	0,0001	0,0001	0,06	0,8130
Vaca*quadrado	6	0,0082	0,0014	0,69	0,6579
Período	3	0,0373	0,0124	6,34	0,0055
Tratamento	3	0,0064	0,0021	1,09	0,3844
Quadrado*trat	3	0,0039	0,0013	0,66	0,5911
Resíduo	15	0,0294	0,0020		
Total	31	0,0852			

Apêndice 36. Tabela de Anova para concentração sérica de nitrogênio uréico (mg/dL), Capítulo II

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Quadrado	1	59,2688	59,2688	1,44	0,2481
Vaca*quadrado	6	401,8170	66,9695	1,63	0,2064
Período	3	40,6001	13,5334	0,33	0,8040
Tratamento	3	195,0798	65,0266	1,58	0,2348
Quadrado*trat	3	114,4658	38,1553	0,93	0,4506
Resíduo	15	615,7128	41,0475		

Total	31	1426,9443
-------	----	-----------

Apêndice 37. Tabela de Anova para concentração de NUL (mg/dL), Capítulo II

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Quadrado	1	12,0418	12,0418	1,45	0,2479
Vaca*quadrado	6	81,5332	13,5889	1,63	0,2065
Período	3	8,2314	2,7438	0,33	0,8042
Tratamento	3	39,5277	13,1759	1,58	0,2354
Quadrado*trat	3	23,2470	7,7490	0,93	0,4503
Resíduo	15	124,9556	83,3038		
Total	31	289,5368			

Apêndice 38. Análise de regressão para a concentração sanguínea de glicose em função do tratamento utilizado, Capítulo II

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Linear	1	13,5141	13,5141	1,14	0,2946
Quadrática	1	89,4453	89,4453	7,55	0,0104
Cúbica	1	15,3141	15,3141	1,29	0,2652
Resíduo	28	331,7188	11,8471		
Total	31	449,9922			

Apêndice 39. Concentração sérica de glicose (mg/dL), Capítulo III

Animal	Tratamento	Bloco	-14	0	14	28	42	56	70
221	Controle	1	55	61	55	61	70	55	49
268	Controle	2	75	118	63	76	62	69	68
217	Controle	3	56	84	58	22	69	73	59
271	Controle	4	53	79	69	67	71	66	65
226	Controle	5	68	74	58	56	57	50	58
264	Controle	6	61	163	67	69	71	64	68
3	Controle	7		43	52	75	67	69	68
254	Controle	8	63	110	80	55	73	68	64
165	Glicerol	1	61	71	82	72	58	68	61
258	Glicerol	2	61	123	77	75	71	63	59
170	Glicerol	3	64	60	52	83	60	55	51
267	Glicerol	4	67	92	67	70	56	56	66
238	Glicerol	5	56	50	70	55	53	60	58
257	Glicerol	6	73	85	71	61	64	67	62
180	Glicerol	7	56	125	62	56	67	67	58
275	Glicerol	8	58	95	66	81	72	67	70
207	Propilenoglicol	1	77	95	65	65	53	66	68
273	Propilenoglicol	2	68	86	69	57	68	68	67
210	Propilenoglicol	3	68	69	66	74	60	69	57
260	Propilenoglicol	4	70	72	71	68	76	72	68
223	Propilenoglicol	5	66	46	55	60	62	64	66
261	Propilenoglicol	6	69	76	70	72	65	57	68
231	Propilenoglicol	7	65	71	52	49	70	58	58
263	Propilenoglicol	8	69	57	77	71	63	71	62

Apêndice 40. Concentração sérica de beta-hidroxibutirato (mg/dL), Capítulo III

Animal	Tratamento	Bloco	-14	0	14	28	42	56	70
221	Controle	1	0,5983	0,4549	0,6218	0,6107	0,4086	0,4072	0,6506
268	Controle	2	0,4574	0,6160	0,4285	0,5253	0,4807	0,5817	0,3051
217	Controle	3	0,6654	0,4916	0,5143	0,5480	0,5935	0,4982	0,5301
271	Controle	4	0,5416	0,4201	0,4182	0,3304	0,6578	0,5145	0,5355
226	Controle	5	0,6919	0,6628	0,7299	0,7884	0,7316	0,6432	0,5020
264	Controle	6	0,3641	0,4384	0,3008	0,4509	0,3545	0,4487	0,4025
3	Controle	7		0,9764	0,4462	0,4154	0,3774	0,4767	0,3977
254	Controle	8	0,4052	0,5240	0,5009	0,5789	0,5982	0,6791	0,5243
165	Glicerol	1	0,9025	0,5398	0,4328	0,3571	0,4960	0,6101	0,4854
258	Glicerol	2	0,6123	0,3109	0,3890	0,4631	0,4941	0,4911	0,4651
170	Glicerol	3	0,6989	0,3556	0,4119	0,6323	0,5276	0,6807	0,6020
267	Glicerol	4	0,4466	0,5039	0,4630	0,4565	0,5342	0,4117	0,6084
238	Glicerol	5	0,5300	0,3532	0,4997	0,4449	0,5485	0,4882	0,4462
257	Glicerol	6	0,3845	0,3323	0,4209	0,3731	0,4446	0,4212	0,3466
180	Glicerol	7	0,5218	0,6914	0,5250	0,4439	0,4614	0,3722	0,4852
275	Glicerol	8	0,7041	0,2977	0,5626	0,4377	0,3902	0,4926	0,4441
207	Propilenoglicol	1	0,4839	0,5831	0,4333	0,3529	0,4088	0,4097	0,3537
273	Propilenoglicol	2	0,4873	0,5246	0,4307	0,5126	0,5049	0,5294	0,5822
210	Propilenoglicol	3	0,4599	0,4373	0,4277	0,4345	0,4183	0,4556	0,5085
260	Propilenoglicol	4	0,2705	0,2605	0,2209	0,4972	0,2541	0,5022	0,3813
223	Propilenoglicol	5	0,4658	0,4655	0,4125	0,5285	0,5382	0,3948	0,4225
261	Propilenoglicol	6	0,4593	0,4910	0,4538	0,3830	0,5391	0,5429	0,5050
231	Propilenoglicol	7	0,5715	0,5837	0,5083	0,3952	0,6284	0,5553	0,5389
263	Propilenoglicol	8	0,4882	0,3287	0,4214	0,5524	0,4056	0,4075	0,5079

Apêndice 41. Concentração sérica de AGNE (mmol/L), Capítulo III

Animal	Tratamento	Bloco	-14	0	14	28	42	56	70
221	Controle	1	0,594	0,6349	0,6727	0,3632	0,134	0,1433	0,2605
268	Controle	2	0,2729	0,4724	0,2469	0,1775	0,3111	0,1134	0,1492
217	Controle	3	0,1909	0,4389	0,8743	0,1607	0,0882	0,078	0,1540
271	Controle	4	0,17	0,3779	0,1468	0,0582	0,174	0,1291	0,1607
226	Controle	5	0,0786	0,7181	0,2935	0,2402	0,1901	0,2635	0,2257
264	Controle	6	0,1769	0,4809	0,3208	0,4000	0,1419	0,2732	0,2167
3	Controle	7		1,1132	0,4606	0,1999	0,1615	0,1241	0,1567
254	Controle	8	0,1409	0,4201	0,1110	0,1312	0,0885	0,1313	0,0962
165	Glicerol	1	1,2391	0,9487	0,2502	0,1295	0,1562	0,1201	0,1093
258	Glicerol	2	0,7823	0,3474	0,2115	0,1466	0,2034	0,1705	0,2077
170	Glicerol	3	0,2024	0,6948	0,5586	0,4974	0,2093	0,1284	0,1233
267	Glicerol	4	0,2842	0,5056	0,1357	0,1469	0,1675	0,1748	0,0863
238	Glicerol	5	0,3686	0,3633	0,1215	0,2607	0,2498	0,1602	0,1578
257	Glicerol	6	0,303	0,6659	0,2842	0,1098	0,0903	0,0822	0,0861
180	Glicerol	7	0,4026	0,4479	0,8810	0,5493	0,2569	0,2220	0,1660
275	Glicerol	8	0,6205	0,6679	0,1875	0,1692	0,3365	0,2607	0,1792
207	Propilenoglicol	1	0,1509	0,4306	0,2555	0,2018	0,1051	0,1833	0,2032
273	Propilenoglicol	2	0,2512	0,6402	0,2137	0,1418	0,1328	0,1451	0,158
210	Propilenoglicol	3	0,6214	0,5002	0,2909	0,1705	0,2218	0,3313	0,4477
260	Propilenoglicol	4	0,7711	0,3642	0,2087	0,1186	0,1532	0,1213	0,0655
223	Propilenoglicol	5	0,0922	0,8482	0,5973	0,308	0,3340	0,2360	0,1606
261	Propilenoglicol	6	0,4134	0,898	0,082	0,1789	0,1981	0,1561	0,1705
231	Propilenoglicol	7	0,8510	1,2864	0,3042	0,3539	0,4499	0,0871	0,1377

---

263 Propilenoglicol	8	0,3058	0,5122	0,2977	0,1766	0,1986	0,4303	0,3694
---------------------	---	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

---

**Apêndice 42. Produção média diária de leite (kg), Capítulo III**

Animal	Tratamento	Bloco	14	28	42	56	70
221	Controle	1	36,2	40,2	37,2	38,4	31
268	Controle	2	20,2	22,5	22,6	25	23,4
217	Controle	3	24,8	31,4	31,6	31,5	31,9
271	Controle	4	21,8	28,3	28,4	25,7	25,6
226	Controle	5	40	44,1	45	42,2	43,4
264	Controle	6	21,6	24,5	24,2	24,8	25,7
3	Controle	7	18,2	27,6	30,4	30,6	29,1
254	Controle	8	23,7	26,6	23,4	27,2	24,5
165	Glicerol	1	24,3	29,1	29,6	26,8	26,2
258	Glicerol	2	18,9	23	22,7	22,9	20,5
170	Glicerol	3	31,7	36,2	37,2	36,9	30,3
267	Glicerol	4	24,3	27,8	27	25,5	27,1
238	Glicerol	5	27,2	30,7	30,8	35,1	34,1
257	Glicerol	6	19,2	25,7	23,4	29,4	30,6
180	Glicerol	7	39,2	48,3	46,9	40,9	43,7
275	Glicerol	8	20,5	30,1	36,9	30,7	34
207	Propilenoglicol	1	40,1	42,3	46,4	47,6	49,4
273	Propilenoglicol	2	21,6	25	26,4	29,5	28,3
210	Propilenoglicol	3	33,1	39,7	38,1	37,7	35,1
260	Propilenoglicol	4	24,4	31,7	31,2	28,4	29,5
223	Propilenoglicol	5	43,5	49,2	46,6	46,4	43,7
261	Propilenoglicol	6	21,1	25,5	27,2	29,1	27,1
231	Propilenoglicol	7	34,8	35,2	37,8	33,2	29,3
263	Propilenoglicol	8	28,4	36,2	35,5	38	34,81

**Apêndice 43. Produção média diária de leite corrigida para 4% de GB (kg), Capítulo III**

Animal	Tratamento	Bloco	14	28	42	56	70
221	Controle	1	33,81	34,23	28,61	26,45	23,61
268	Controle	2	17,93	19,58	17,50	21,46	19,30
217	Controle	3	24,50	24,00	24,90	26,43	24,82
271	Controle	4	17,81	25,57	21,78	19,55	19,83
226	Controle	5	36,34	35,18	34,48	31,57	31,16
264	Controle	6	18,29	22,97	21,44	18,77	17,90
3	Controle	7	15,14	22,28	26,02	21,97	17,14
254	Controle	8	19,13	19,13	19,50	19,26	
165	Glicerol	1	20,58	20,68	22,17	19,68	18,77
258	Glicerol	2	15,23	19,75	16,13	16,92	15,49
170	Glicerol	3	22,74	26,76	26,40	26,79	23,94
267	Glicerol	4	19,35	20,74	21,06	20,62	20,91
238	Glicerol	5	19,25	25,77	22,58	28,83	24,98
257	Glicerol	6	15,00	19,21	17,12	20,58	21,39
180	Glicerol	7	31,67	32,72	18,76	26,24	32,29
275	Glicerol	8	13,69	18,07	24,17	18,62	20,64
207	Propilenoglicol	1	29,45	33,10	33,76	33,49	32,36
273	Propilenoglicol	2	17,72	20,12	19,31	22,18	22,95
210	Propilenoglicol	3	25,40	32,68	30,97	34,09	27,51
260	Propilenoglicol	4	16,15	23,45	28,61	22,73	27,91

223	Propilenoglicol	5	38,35	33,92	36,94	34,97	27,44
261	Propilenoglicol	6	13,88	17,09	19,10	21,35	18,81
231	Propilenoglicol	7	25,40	23,16	31,34	23,99	22,05
263	Propilenoglicol	8	20,66	27,55	25,11	31,33	28,34

#### Apêndice 44. Teor médio de GB (%) no leite, Capítulo III

Animal	Tratamento	Bloco	14	28	42	56	70
221	Controle	1	3,56	3,01	2,46	1,93	2,41
268	Controle	2	3,25	3,13	2,50	3,06	2,83
217	Controle	3	3,92	2,43	2,59	2,93	2,52
271	Controle	4	2,78	3,36	2,45	2,40	2,50
226	Controle	5	3,39	2,65	2,44	2,32	2,12
264	Controle	6	2,98	3,59	3,24	2,38	1,98
3	Controle	7	2,88	2,72	3,04	2,12	1,26
254	Controle	8	2,71	2,13	2,89	2,05	
165	Glicerol	1	2,98	2,07	2,33	2,23	2,11
258	Glicerol	2	2,70	3,06	2,07	2,26	2,37
170	Glicerol	3	2,12	2,26	2,06	2,17	2,60
267	Glicerol	4	2,64	2,31	2,53	2,72	2,48
238	Glicerol	5	2,05	2,93	2,22	2,81	2,22
257	Glicerol	6	2,54	2,32	2,21	2,00	1,99
180	Glicerol	7	2,72	1,85		1,61	2,26
275	Glicerol	8	1,78	1,34	1,70	1,38	1,38
207	Propilenoglicol	1	2,23	2,55	2,18	2,02	1,70
273	Propilenoglicol	2	2,80	2,70	2,21	2,35	2,74
210	Propilenoglicol	3	2,45	2,82	2,75	3,36	2,56
260	Propilenoglicol	4	1,74	2,27	3,45	2,67	3,64
223	Propilenoglicol	5	3,21	1,93	2,62	2,36	1,52
261	Propilenoglicol	6	1,72	1,80	2,02	2,23	1,96
231	Propilenoglicol	7	2,20	1,72	2,86	2,15	2,35
263	Propilenoglicol	8	2,18	2,41	2,05	2,83	2,76

#### Apêndice 45. Teor médio de PB (%) no leite, Capítulo III

Animal	Tratamento	Bloco	14	28	42	56	70
221	Controle	1	2,94	2,90	2,93	3,06	2,88
268	Controle	2	3,11	3,17	3,02	2,99	2,86
217	Controle	3	3,30	2,93	2,96	2,85	2,69
271	Controle	4	3,18	2,92	2,89	2,81	2,82
226	Controle	5	3,08	2,73	2,71	2,65	2,70
264	Controle	6	3,67	3,08	2,98	2,77	2,86
3	Controle	7	2,99	3,00	2,98	2,97	3,01
254	Controle	8	3,30	2,87	3,03	2,76	
165	Glicerol	1	3,44	2,89	2,81	3,15	3,03
258	Glicerol	2	3,56	3,15	2,94	2,97	2,74
170	Glicerol	3	3,30	2,90	2,73	2,69	2,49
267	Glicerol	4	3,46	3,02	3,02	2,91	2,94
238	Glicerol	5	2,99	2,88	2,72	2,62	2,63
257	Glicerol	6	3,22	2,99	2,51	2,82	2,86
180	Glicerol	7	2,88	2,81		2,56	2,74
275	Glicerol	8	3,05	2,90	2,43	2,65	2,61
207	Propilenoglicol	1	3,45	3,00	2,90	2,87	2,99
273	Propilenoglicol	2	3,12	2,57	2,67	2,59	2,56

210	Propilenoglicol	3	3,30	3,06	2,92	2,71	2,80
260	Propilenoglicol	4	3,21	2,97	2,85	2,86	2,62
223	Propilenoglicol	5	3,28	2,80	2,81	2,81	2,73
261	Propilenoglicol	6	2,98	2,95	2,77	2,75	2,67
231	Propilenoglicol	7	2,67	2,46	2,47	2,45	2,55
263	Propilenoglicol	8	3,41	2,91	2,69	2,76	2,56

Apêndice 46. Teor médio de lactose (%) no leite, Capítulo III

Vaca	Trat.	Bloco	14	28	42	56	70
221	Controle	1	4,39	4,69	4,54	4,79	4,70
268	Controle	2	4,78	4,67	4,87	4,81	4,66
217	Controle	3	4,36	4,64	4,59	4,43	4,51
271	Controle	4	4,52	4,80	4,54	4,53	4,38
226	Controle	5	4,73	4,52	4,55	4,49	4,30
264	Controle	6	4,53	4,68	4,55	4,44	4,53
3	Controle	7	4,25	4,55	4,46	4,44	4,24
254	Controle	8	4,72	4,73	4,33	4,49	
165	Glicerol	1	4,43	4,58	4,58	4,37	4,39
258	Glicerol	2	4,56	4,70	4,80	4,83	4,68
170	Glicerol	3	4,65	4,60	4,58	4,52	4,40
267	Glicerol	4	4,80	4,75	4,75	4,78	4,52
238	Glicerol	5	4,58	4,46	4,60	4,48	4,62
257	Glicerol	6	4,50	4,52	4,36	4,49	4,60
180	Glicerol	7	4,58	4,72		4,41	4,53
275	Glicerol	8	4,67	4,58	4,50	4,48	4,35
207	Propilenoglicol	1	4,53	4,48	4,44	4,68	4,49
273	Propilenoglicol	2	4,28	4,28	4,44	4,56	4,23
210	Propilenoglicol	3	4,97	5,06	4,86	4,82	4,82
260	Propilenoglicol	4	4,09	4,24	4,18	4,20	4,08
223	Propilenoglicol	5	4,10	4,16	4,19	4,11	3,99
261	Propilenoglicol	6	3,96	4,14	4,17	4,03	3,98
231	Propilenoglicol	7	4,05	4,12	4,13	3,85	3,94
263	Propilenoglicol	8	4,50	4,49	4,39	4,60	4,03

Apêndice 47. Escore de condição corporal, Capítulo III

Vaca	Tratamento	Bloco	-14	0	14	28	42	56	70
221	Controle	1	2,75	2,75	2,50	2,25	2,50	2,50	2,50
268	Controle	2	2,75	2,50	2,50	2,75	2,50	2,50	2,50
217	Controle	3	2,75	2,75	3,00	3,00	3,00	2,75	3,00
271	Controle	4	2,75	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
226	Controle	5	2,75	2,75	2,50	2,50	2,50	2,50	2,25
264	Controle	6	2,75	2,50	2,50	2,50	2,50	2,75	2,75
3	Controle	7		3,00	2,50	2,75	2,75	2,75	3,00
254	Controle	8	2,75	2,75	2,50	2,50	2,50	2,75	2,75
165	Glicerol	1	3,00	3,00	3,00	3,00	3,25	3,50	3,75
258	Glicerol	2	2,50	2,50	2,50	2,75	3,00	3,00	3,00

170	Glicerol	3	3,00	2,75	2,75	2,50	2,75	2,50	2,75
267	Glicerol	4	2,75	2,50	2,75	2,75	2,75	2,75	2,75
238	Glicerol	5	2,50	2,50	2,50	2,75	2,50	2,50	2,50
257	Glicerol	6	2,50	2,00	2,25	2,25	2,00	2,50	2,50
180	Glicerol	7	3,00	2,75	2,25	2,50	2,50	2,50	2,75
275	Glicerol	8	2,75	2,75	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
207	Propilenoglicol	1	3,00	2,75	2,75	3,00	3,00	2,75	2,75
273	Propilenoglicol	2	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,75	2,75
210	Propilenoglicol	3	2,75	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
260	Propilenoglicol	4	3,00	2,75	2,50	2,50	2,75	2,75	2,75
223	Propilenoglicol	5	3,00	2,75	2,75	2,75	3,00	3,00	3,00
261	Propilenoglicol	6	2,75	2,75	2,50	2,75	3,00	2,75	2,75
231	Propilenoglicol	7	3,00	2,50	2,75	2,50	2,50	2,50	2,50
263	Propilenoglicol	8	2,50	2,25	2,50	2,50	2,25	2,50	2,50

#### Apêndice 48. Peso dos animais experimentais, Capítulo III

Vaca	Tratamento	Bloco	-14	0	14	28	42	56	70
221	Controle	1	600	600	570	563	570	570	577
268	Controle	2	424	420	424	435	449	483	490
217	Controle	3	650	620	637	637	637	637	644
271	Controle	4	476	434	424	449	449	449	449
226	Controle	5	497	511	518	504	518	504	533
264	Controle	6	490	497	476	497	504	490	511
3	Controle	7		610	555	585	585	618	630
254	Controle	8	563	585	577	570	577	600	615
165	Glicerol	1	659	659	650	659	674	689	716
258	Glicerol	2	533	511	518	533	570	577	577
170	Glicerol	3	600	563	548	540	563	555	585
267	Glicerol	4	462	452	483	483	504	504	504
238	Glicerol	5	510	500	504	504	483	490	504
257	Glicerol	6	570	548	570	570	533	533	533
180	Glicerol	7	659	644	615	607	600	600	630
275	Glicerol	8	548	540	511	533	533	530	540
207	Propilenoglicol	1	666	630	622	637	630	644	637
273	Propilenoglicol	2	469	450	446	469	483	500	540
210	Propilenoglicol	3	600	580	592	600	615	600	600
260	Propilenoglicol	4	504	475	469	518	540	518	533
223	Propilenoglicol	5	630	640	622	630	630	607	622
261	Propilenoglicol	6	563	518	483	526	526	526	570
231	Propilenoglicol	7	607	577	537	563	615	572	570
263	Propilenoglicol	8	533	518	526	540	518	548	526

#### Apêndice 49. Intervalo parto-1º cio (dias), Capítulo III

Vaca	Tratamento	Bloco	Intervalo parto-1º cio
221	Controle	1	69

268	Controle	2	40
217	Controle	3	19
271	Controle	4	79
226	Controle	5	80
264	Controle	6	91
3	Controle	7	45
254	Controle	8	159
165	Glicerol	1	45
258	Glicerol	2	17
170	Glicerol	3	30
267	Glicerol	4	116
238	Glicerol	5	61
257	Glicerol	6	88
180	Glicerol	7	16
275	Glicerol	8	64
207	Propilenoglicol	1	24
273	Propilenoglicol	2	69
210	Propilenoglicol	3	38
260	Propilenoglicol	4	66
223	Propilenoglicol	5	52
261	Propilenoglicol	6	41
231	Propilenoglicol	7	66
263	Propilenoglicol	8	68

Apêndice 50. Concentração de nitrogênio uréico no leite (mg/dL), Capítulo III

Animal	Tratamento	Bloco	14	28	42	56	70	MÉDIA
221	Controle	1	7,69	11,07	10,32	8,10	9,06	9,25
268	Controle	2	10,51	8,52	9,94	9,11	7,70	9,16
217	Controle	3	4,93	9,45	10,10	7,62	7,37	7,90
271	Controle	4	8,29	8,65	5,86	10,17	7,17	8,03
226	Controle	5	9,89	8,68	8,30	11,89	10,45	9,84
264	Controle	6	6,60	10,43	7,10	7,68	7,05	7,77
3	Controle	7	10,88	8,91	8,88	6,17	5,77	8,12
254	Controle	8	5,78	10,33	5,72	7,89		7,43
165	Glicerol	1	9,12	10,05	8,51	7,01	8,36	8,61
258	Glicerol	2	7,65	7,08	6,47	6,68	7,83	7,14
170	Glicerol	3	5,55	7,35	6,70	6,35	9,13	7,02
267	Glicerol	4	7,14	9,55	7,71	11,64	8,80	8,97
238	Glicerol	5	5,63	5,99	4,74	4,89	8,35	5,92
257	Glicerol	6	4,56	7,37	7,73	7,24	7,29	6,84
180	Glicerol	7	7,16	4,26		6,10	5,16	5,67
275	Glicerol	8	5,53	5,11	8,58	6,84	7,83	6,78
207	Propilenoglicol	1	10,03	10,27	10,26	10,07	5,46	9,22
273	Propilenoglicol	2	8,07	8,85	7,37	8,13	5,21	7,53
210	Propilenoglicol	3	7,42	7,76	6,26	7,40	10,08	7,78
260	Propilenoglicol	4	7,81	7,81	7,38	7,40	10,91	8,26
223	Propilenoglicol	5	7,24	5,54	8,86	6,89	6,44	6,99
261	Propilenoglicol	6	5,80	3,80	9,04	5,96	6,29	6,18

231	Propilenoglicol	7	5,92	6,13	6,93	7,97	5,07	6,40
263	Propilenoglicol	8	4,87	6,39	7,34	7,68	9,16	7,09

Apêndice 51. Tabela de Anova para produção média diária de leite (kg), Capítulo III

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Tratamento	2	453,6233	226,8116	2,54	0,1147
Bloco	7	1954,6926	279,2418	3,91	0,0144
Bloco*trat	14	763,3302	54,5235	6,26	<0,0001
Tempo lactação	4	140,8238	35,2059	4,04	0,0048
Trat*tempo	8	10,7620	1,3452	0,23	0,9851
Resíduo	84	498,5815	5,9354		
Total	119	7095,8080			

Apêndice 52. Tabela de Anova para produção média diária de leite corrigida para 4% de GB (kg), Capítulo III

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Tratamento	2	666,3915	333,1957	4,16	0,0382
Bloco	7	3593,1806	513,3115	5,12	0,0046
Bloco*trat	14	1838,1033	131,2931	22,12	<0,0001
Tempo lactação	4	488,7889	122,1972	20,59	<0,0001
Trat*tempo	8	10,7620	1,3452	0,23	0,9851
Resíduo	83	8,7062			
Total	118	4105,6985			

Apêndice 53. Tabela de Anova para concentração sérica de AGNE (mmol/L), Capítulo III

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Tratamento	2	0,0511	0,0255	0,85	0,4496
Bloco	7	0,4579	0,0654	2,17	0,1034
Bloco*trat	14	0,4227	0,0301	1,04	0,4172
Tempo lactação	6	3,3031	0,5505	18,99	<0,0001
Trat*tempo	12	0,3698	0,0308	1,06	0,3967
Resíduo	124	3,5942	0,0289		
Total	165	8,1909			

Apêndice 54. Tabela de Anova para concentração sérica de beta-hidroxibutirato (mg/dL), Capítulo III

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Tratamento	2	0,1225	0,0612	2,25	0,1424
Bloco	7	0,2374	0,0339	1,24	0,3435
Bloco*trat	14	0,3816	0,0272	2,83	0,001
Tempo lactação	6	0,0710	0,0118	1,23	0,2947
Trat*tempo	12	0,1382	0,0115	1,20	0,2918
Resíduo	125	1,2026	0,0096		
Total	166	2,1604			

Apêndice 55. Tabela de Anova para concentração de nitrogênio uréico (mg/dL) no leite, Capítulo III

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Tratamento	2	35,4232	17,7116	5,60	0,0163
Bloco	7	63,4416	9,0630	2,87	0,0443
Bloco*trat	14	44,2477	3,1605	1,32	0,2116
Tempo lactação	4	5,8278	1,4569	0,61	0,6563
Trat*tempo	8	20,4913	2,5614	1,07	0,3901
Resíduo	82	195,737	2,3870		
Total	117	363,441			

Apêndice 56. Tabela de Anova para concentração de GB (%) no leite, Capítulo III

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Tratamento	2	3,7091	1,8545	6,69	0,0091
Bloco	7	4,4619	0,6374	2,30	0,0200
Bloco*trat	14	3,8761	0,2768	1,66	0,0803
Tempo lactação	4	2,0469	0,5117	3,07	0,0208
Trat*tempo	8	3,6044	0,4505	2,70	0,0108
Resíduo	82	13,6679	0,1666		
Total	117	31,3173			

Apêndice 57. Tabela de Anova para concentração de PB (%) no leite, Capítulo III

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Tratamento	2	0,2709	0,1354	1,55	0,2464
Bloco	7	0,8093	0,1156	1,32	0,3095
Bloco*trat	14	1,2228	0,0873	5,59	<0,0001
Tempo lactação	4	3,1657	0,7914	50,64	<0,0001
Trat*tempo	8	0,1739	0,0217	1,39	0,2128
Resíduo	82	1,2816	0,0156		
Total	117	6,8748			

Apêndice 58. Análise de regressão para a interação GB\*tempo de lactação (grupo controle), Capítulo III

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Linear	1	4,3403	4,3403	23,99	<0,0001
Quadrática	1	0,0122	0,0122	0,07	0,7962
Cúbica	1	0,00001	0,00001	0,00	0,9932
Resíduo	35	6,3327	0,1809		
Total	38	10,6854			

Apêndice 59. Análise de regressão para a interação GB\*tempo de lactação (grupo glicerol), Capítulo III

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
--------------------	----	----	----	---	-----

Linear	1	0,3380	0,3380	1,85	0,1828
Quadrática	1	0,1365	0,1365	0,75	0,3934
Cúbica	1	0,0005	0,0005	0,00	0,9586
Resíduo	35	6,4028	0,1829		
Total	38	6,8779			

Apêndice 60. Análise de regressão para a interação GB\*tempo de lactação (grupo propilenoglicol), Capítulo III

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Linear	1	0,1256	0,1256	0,48	0,4925
Quadrática	1	0,0766	0,0766	0,29	0,5914
Cúbica	1	0,1008	0,1008	0,39	0,5384
Resíduo	36	9,4044	0,2612		
Total	39	9,7075			

Apêndice 61. Tabela de Anova para concentração sérica de glicose (mg/dL), Capítulo III

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Tratamento	2	37,7261	18,8631	0,12	0,8872
Bloco	7	3929,7459	561,3923	3,59	0,0200
Bloco*trat	14	2188,5595	156,3257	1,03	0,4243
Tempo lactação	6	7760,8917	1293,4820	8,56	<0,0001
Trat*tempo	12	2696,0201	224,6683	1,49	0,1377
Resíduo	125	18892,7857	151,1423		
Total	166	35405,2695			

Apêndice 62. Tabela de Anova para escore de condição corporal, Capítulo III

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Tratamento	2	0,1859	0,0930	0,35	0,7076
Bloco	7	2,2231	0,3176	1,21	0,3587
Bloco*trat)	14	3,6708	0,2622	10,35	<0,0001
Tempo lactação	6	0,5742	0,0957	3,78	0,0017
Trat*tempo	12	0,2121	0,0177	0,70	0,7509
Resíduo	125	3,1652	0,0253		
Total	166	10,0127			

Apêndice 63. Tabela de Anova para concentração de lactose (%) no leite, Capítulo III

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Tratamento	2	1,6141	0,8071	4,80	0,0259
Bloco	7	1,4066	0,2009	1,19	0,3667
Bloco*trat	14	2,3557	0,1683	13,12	<0,0001
Tempo lactação	4	0,2916	0,0729	5,68	0,0004
Trat*tempo	8	0,0645	0,0081	0,63	0,7514
Resíduo	82	1,0520	0,0128		

Total 117 6,8641

Apêndice 64. Tabela de Anova para peso dos animais experimentais (kg), Capítulo III

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Tratamento	2	19206,9436	9603,4718	0,75	0,4883
Bloco	7	422746,6542	60392,3792	4,75	0,0064
Bloco*trat	14	178103,3353	12721,6668	38,52	<0,0001
Tempo lactação	6	15077,4441	2512,9074	7,61	<0,0001
Trat*tempo	12	2715,7176	226,3098	0,69	0,7631
Resíduo	125	41286,0676	330,2885		
Total	166	680477,9521			

Apêndice 65. Tabela de Anova para intervalo parto-1º cio (dias), Capítulo III

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Tratamento	2	1923,2500	961,6250	1,22	0,3235
Bloco	7	12262,6250	1751,8035	2,23	0,0954
Resíduo	14	10992,75000	785,19643		
Total	23	25178,6250			

Apêndice 66. Tabela de Anova para produção de GB no leite (kg), Capítulo III

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Tratamento	2	0,5838	0,2919	4,17	0,0097
Bloco	7	2,1104	0,3015	4,31	0,0380
Bloco*trat	14	0,9804	0,0700	3,22	0,0004
Tempo lactação	6	0,1489	0,0372	1,71	0,1550
Trat*tempo	12	0,3173	0,0397	1,83	0,0838
Resíduo	82	1,7815	0,0217		
Total	117	5,9167			

Apêndice 67. Tabela de Anova para produção de PB no leite (kg), Capítulo III

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Tratamento	2	0,4097	0,2048	2,01	0,1714
Bloco	7	2,7708	0,3958	3,88	0,0149
Bloco*trat	14	1,4295	0,1021	15,56	<0,0001
Tempo lactação	6	0,0835	0,0209	3,18	0,0176
Trat*tempo	12	0,0214	0,0027	0,41	0,9134
Resíduo	82	0,5382	0,0066		
Total	117	5,2517			

Apêndice 68. Tabela de Anova para produção de lactose no leite (kg), Capítulo III

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Tratamento	2	0,6002	0,3001	1,01	0,3887
Bloco	7	6,9147	0,9878	3,33	0,0264

Bloco*trat	14	4,1535	0,2967	19,24	<0,0001
Tempo lactação	6	1,0385	0,2596	16,84	<0,0001
Trat*tempo	12	0,0386	0,0048	0,31	0,9590
Resíduo	82	1,2644	0,0154		
Total	117	13,8633			

Apêndice 69. Análise de regressão para a interação produção de GB (kg)\*tempo de lactação (grupo controle), Capítulo III

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Linear	1	0,1793	0,1793	3,73	0,0616
Quadrática	1	0,0271	0,0271	0,56	0,4578
Cúbica	1	0,0119	0,0119	0,25	0,6211
Resíduo	35	1,6835	0,0481		
Total	38	1,9019			

Apêndice 70. Análise de regressão para a interação produção de GB (kg)\*tempo de lactação (grupo glicerol), Capítulo III

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Linear	1	0,0012	0,0012	0,04	0,8352
Quadrática	1	0,0008	0,0008	0,03	0,8693
Cúbica	1	0,0092	0,0092	0,32	0,5769
Resíduo	35	1,0199	0,0291		
Total	38	1,0312			

Apêndice 71. Análise de regressão para a interação produção de GB (kg)\*tempo de lactação (grupo propilenoglicol), Capítulo III

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	P>F
Linear	1	0,0409	0,0409	0,68	0,4144
Quadrática	1	0,1189	0,1189	1,98	0,1679
Cúbica	1	0,0105	0,0105	0,18	0,6772
Resíduo	36	2,1619	0,0600		
Total	39	2,3323			