

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

Denize da Rosa Fraga

**GLICERINA BRUTA COMO SUPLEMENTO ENERGÉTICO PARA
VACAS LEITEIRAS EM PASTEJO DE AZEVÉM**

**Santa Maria, RS
2016**

Denize da Rosa Fraga

**GLICERINA BRUTA COMO SUPLEMENTO ENERGÉTICO PARA VACAS
LEITEIRAS EM PASTEJO DE AZEVÉM**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Zootecnia.**

Orientador: Prof. Dr. Julio Viégas

Santa Maria, RS
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

da Rosa Fraga, Denize
GLICERINA BRUTA COMO SUPLEMENTO ENERGÉTICO PARA VACAS
LEITEIRAS EM PASTEJO DE AZEVÉM / Denize da Rosa Fraga. -
2016.
73 p.; 30 cm

Orientador: Julio Viêgas
Coorientador: Gilberto Vilmar Kozloski
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia, RS, 2016

1. Glicerol 2. Leite 3. Perfil Metabólico 4. Ureia I.
Viêgas, Julio II. Vilmar Kozloski, Gilberto III. Título.

© 2016

Todos os direitos autorais reservados a Denize da Rosa Fraga. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: denizevet@hotmail.com

Denize da Rosa Fraga

**GLICERINA BRUTA COMO SUPLEMENTO ENERGÉTICO PARA VACAS
LEITEIRAS EM PASTEJO DE AZEVÉM**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Zootecnia**.

Aprovado em 23 de dezembro de 2016:

Julio Viégas, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Adriano Rudi Maixner, Dr. (UFSM)

Fernando Luiz Ferreira de Quadros, Dr. (UFSM)

Jose Antonio Gonzalez da Silva, Dr. (UNIJUÍ)

Lisandre de Oliveira, Dra. (UFPEL)

Santa Maria, RS
2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me guiar nesta caminhada e mostrar-me o caminho certo em todos os momentos de minha vida.

Ao meu esposo Rafael Bianchini Fraga, que sempre teve paciência e apesar de todas as dificuldades não me deixou desistir nunca. Obrigada por estar ao meu lado sempre!

Ao meu filho Gabriel da Rosa Fraga que é e sempre será minha razão de viver, o qual sempre me incentivou a buscar um futuro melhor para nossa família. Te amo filho, obrigada por tudo!

Aos meus pais João Nilson da Rosa e Izaura pelo amor incondicional, incentivo e apoio ao tomar todas as decisões ao longo de minha vida. Ao meu irmão Rafael pela ajuda e preocupação em todos os momentos. A minha avó Rute pelo apoio em todas as etapas da minha vida.

A minha sogra e sogro e minhas cunhadas por todo apoio nesta caminhada.

Ao professor Julio Viégas pela orientação, ensinamentos e oportunidade de aprendizado nestes anos.

Aos funcionários do IRDeR/UNIJUÍ e estagiários do grupo de pesquisa em Saúde Animal (UNIJUÍ), estagiários do NUPLEC (UFSM) e a Tânia da Bromatologia da UNIJUÍ, que não mediram esforços para que este trabalho fosse realizado da melhor forma possível. Obrigado pelo apoio de cada um de vocês.

As colegas e amigas da pós-graduação, em especial a Ana Huttra e Magda Metz, as minhas colegas Lisandre de Oliveira, Cristiane Beck, Luciane Viana e Luciana Viero pelo interesse, apoio em todos os momentos e grande ajuda na condução do experimento. Agradeço imensamente!

A UFSM e aos professores do PPGZ que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e pelos ensinamentos transmitidos durante minha formação.

Ao IRDeR/UNIJUÍ, pela oportunidade de utilizar as instalações e animais para condução do experimento.

As empresas Três Tentos Agroindustrial S/A pela doação da glicerina bruta utilizada o experimento, a Bioclin pela doação dos reagentes para análise bioquímica do plasma e urina.

Ao CNPq pela concessão dos recursos para execução do experimento.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para que eu alcançasse meu objetivo.

Muito obrigado à todos!

“O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou, mas sim pelas dificuldades que superou no caminho.

(Abraham Lincoln)

RESUMO

GLICERINA BRUTA COMO SUPLEMENTO ENERGÉTICO PARA VACAS LEITEIRAS EM PASTEJO DE AZEVÉM

AUTOR: Denize da Rosa Fraga

ORIENTADOR: Julio Viégas

Local e Data de Defesa: Santa Maria, RS, 23 de dezembro de 2016.

Esta tese foi desenvolvida com o objetivo de avaliar o efeito da suplementação com 10% de glicerina bruta na matéria seca (MS) total da dieta, para vacas em lactação, mantidas em sistema de produção em pastagem de azevém (*Lolium multiflorum*), sobre o perfil metabólico, composição e produção do leite. O experimento foi conduzido no Instituto Regional de Desenvolvimento Rural, em Augusto Pestana, RS, Brasil, com 18 vacas da raça holandesa, em um delineamento com blocos (conforme o perfil da lactação) em esquema de reversão simples dos animais (*Cross-over*), em três períodos de 14 dias. As dietas foram constituídas de pastejo em azevém e suplementação com silagem de milho e concentrado, acrescido ou não da adição de 10% de glicerina bruta com base na matéria seca (MS) total. Foram coletadas e analisadas amostras de alimentos, urina, leite e sangue. Foram avaliadas também sobras de alimento no cocho e produção de leite. Os dados foram submetidos à análise de variância e o efeito de tratamento comparado pelo teste T através do programa estatístico SAS. Valores de $P < 0.05$ foram considerados significativos e como tendência quando $P < 0.10$. Verificou-se que a inclusão de 10% de glicerina bruta na MS da dieta reduz à eliminação de ureia via leite e aumenta os níveis sanguíneos de glicose, não tendo efeito deletério sobre a produção de leite e consumo de alimento dos animais. A adição de 10% da MS de glicerina a dieta não apresenta efeito sobre a produção e composição do leite de vacas da raça holandesa, em diferentes períodos de lactação. Conclui-se que a inclusão de 10% de glicerina bruta na MS da dieta de vacas em lactação, em pastejo de azevém, diminui o nível de nitrogênio ureico no leite em função da melhora da eficiência nutricional, pelo seu aporte energético e potencial em aumentar os níveis de glicose sanguínea, sem interferir no desempenho produtivo e na composição do leite.

Palavras-chave: Glicerol. Leite. Perfil Metabólico. Ureia.

ABSTRACT

GROSS GLYCERIN AS AN ENERGY SUPPLEMENT FOR DAIRY COWS IN A ANNUAL RYEGRASS PRODUCTION SYSTEM

AUTHOR: Denize da Rosa Fraga

ADVISING PROFESSOR: Julio Viégas

Date and Defense's Place: Santa Maria, RS, December 23th of 2016.

This thesis was developed with the objective of evaluating the effect of supplementation with 10% crude glycerin in the total dry matter (DM) of the diet for lactating cattle in a annual ryegrass (*Lolium multiflorum*) pasture production system on the metabolic profile, milk composition and production. The experiment was conducted at the Regional Rural Development Institute in Augusto Pestana, RS, Brazil, with 18 Holstein cattle, in a block design (according to lactation days) in a simple cross-over procedure, during three periods of 14 days. The diets were composed of annual ryegrass grazing and supplementation with corn silage and concentrate, with or without addition of 10% crude glycerin based on total dry matter. Samples of diet, urine, milk and blood were collected and evaluated. It were evaluated too milk production and leftover food in the trough. The data were submitted to analysis of variance and the treatment effect compared by the T test through the SAS statistical program. Values of $P < 0.05$ were considered significant and tendency were considered when $P < 0.10$. It was verified that the inclusion of 10% of crude glycerin in diet DM of lactating cows reduces the elimination of urea through milk and increases blood glucose levels, and does not have a deleterious effect on milk production and cows' feed consumption. The addition of 10% DM of glycerin to the diet hasn't effect on milk production and composition of Holstein cows in different lactation periods with different levels of protein in the diet. It was concluded that the inclusion of 10% crude glycerin in diet DM of lactating cows on annual ryegrass pasture reduces the level of milk nitrogen urea. This could be due to the decrease in urea blood levels by the increase of nutritional efficiency, provided by glycerin energy supply, for its energy and potential contribution in increasing blood glucose levels, without interfering in the productive performance and composition of the milk.

Keywords: Crude Glycerin. Metabolic Profile. Milk. Urea.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	-	Matérias primas utilizadas para produção de Biodiesel, perfil nacional.	13
Figura 2	-	Produção do biodiesel.....	13
Figura 3	-	Plantas de Biodiesel autorizadas para operação no Brasil até agosto de 2016.....	14
Figura 4	-	Modelo Conceitual da pesquisa “Efeito do uso do glicerol na dieta de vacas em lactação sobre os níveis de ureia do leite”.....	21

LISTA DE TABELAS

MATERIAL E MÉTODOS

- Tabela 1 - Resultados das análises bromatológicas dos três períodos experimentais, para pastagem de azevém, silagem de milho e concentrado..... 25
- Tabela 2 - Resultados das análises para composição nutricional da dieta dos períodos experimentais (% MS)..... 26

ARTIGO 1

- Tabela 1 - Resultados das análises bromatológicas dos três períodos experimentais, para pastagem de azevém, silagem de milho e concentrado..... 42
- Tabela 2 - Resultados das análises para composição nutricional da dieta dos períodos experimentais (% MS)..... 43
- Tabela 3 - Valores médios para perfil metabólico e produção de leite, de vacas holandesas, em diferentes períodos da lactação..... 44
- Tabela 4 - Valores médios de ureia (sangue, leite e urina), glicose (sangue, urina) e da produção leiteira e sobras de alimento no cocho, em diferentes períodos de lactação, de vacas holandesas, tratadas com dieta acrescida ou não de 10% de glicerina bruta na Matéria Seca total..... 45
- Tabela 5 - Correlações entre ureia sanguínea (mg dL⁻¹), ureia urinária (mg dL⁻¹), nitrogênio ureico no leite (mg dL⁻¹), glicose sanguínea (mg dL⁻¹), glicose urinária (mg dL⁻¹) e produção de leite (litros/dia) de vacas holandesas e sobras de alimento no cocho (g/dia) em dietas com inclusão de glicerina bruta e sem inclusão de glicerina bruta..... 46

ARTIGO 2

- Tabela 1 - Resultados das análises bromatológicas dos três períodos experimentais, para pastagem de azevém, silagem de milho e concentrado..... 58
- Tabela 2 - Resultados das análises para composição nutricional da dieta dos períodos experimentais (% MS)..... 59
- Tabela 3 - Valores médios de gordura, proteína, lactose, sólidos totais, contagem de células somáticas e produção de leite, de vacas holandesas, em diferentes períodos da lactação..... 60
- Tabela 4 - Valores médios de gordura, proteína e lactose, contagem de células somáticas e produção de leite, em diferentes períodos de lactação, de vacas holandesas tratadas com dieta acrescida ou não de 10% de glicerina bruta na Matéria Seca total..... 61

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	10
1.2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
1.3 PROPOSIÇÕES.....	21
1.4 MATERIAL E MÉTODOS	23
2 ARTIGO 1	29
2.1 PERFIL METABÓLICO DE VACAS LEITEIRAS SUBMETIDAS À PASTEJO EM AZEVÉM COM A INCLUSÃO DE GLICERINA BRUTA NA DIETA	29
2.1.1 Resumo	29
2.1.2 Introdução	29
2.1.3 Material e Métodos	31
2.1.4 Resultados e Discussão	35
2.1.5 Conclusões	39
2.1.6 Referências	39
3 ARTIGO 2.....	47
3.1 COMPOSIÇÃO DO LEITE DE VACAS DA RAÇA HOLANDESA SUBMETIDAS AO PASTEJO EM AZEVÉM COM INCLUSÃO DE GLICERINA BRUTA À DIETA	47
3.1.1 Resumo	47
3.1.2 Introdução	47
3.1.3 Material e Métodos	49
3.1.4 Resultados e Discussão	52
3.1.5 Conclusões	54
3.1.6 Referências	54
4 DISCUSSÃO	62
5 CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS.....	65

1 APRESENTAÇÃO

No período de inverno no sul do Brasil, a maioria dos rebanhos leiteiros é mantido em pastagens temperadas, que possuem elevado teor proteico e com suplementação de concentrado no cocho. O azevém (*Lolium multiflorum Lam.*), tem se consolidado como importante opção forrageira para este período, devido a expressiva produção de MS, elevados níveis proteicos e ciclo produtivo longo. Contudo, para vacas em lactação, categoria de alta exigência nutricional, o uso apenas de pastagens e concentrado pode não ser suficiente para manter o equilíbrio nutricional dos animais. Além disto, enfatiza-se a importância do sincronismo da dieta, pois animais em pastagem com altos níveis de nitrogênio solúvel, podem não aproveitar adequadamente os nutrientes e se perder pela ausência de adequados níveis de carboidratos prontamente fermentáveis. Ainda a síntese de proteína microbiana no rúmen depende do crescimento e da eficiência dos microrganismos na utilização dos substratos energéticos e nitrogenados. Dietas adequadamente balanceadas são necessárias para atender a exigência nutricional de vacas de alta produção. O excesso de proteína na dieta causa impacto sobre a sanidade e produção dos animais, tais como, perdas na produtividade e na reprodução das vacas, além de maior liberação de nitrogênio nas fezes e na urina ao meio ambiente, podendo trazer contaminação aos solos e lençóis freáticos.

O consumo de excesso de proteína na dieta pelos animais eleva as concentrações de ureia no sangue, na urina e no leite. Desse modo, o nível de nitrogênio ureico no leite (NUL) vem sendo proposto como um indicador para o acompanhamento da nutrição proteica de vacas em lactação, uma vez que apresenta boa correlação com a concentração de ureia no sangue e urina. Como as amostras são coletadas de forma não invasiva e direta, por meio de amostragem de leite durante as ordenhas, os níveis de NUL tornaram-se um indicador simples, rápido e barato para monitorar o metabolismo protéico de vacas em lactação, servindo como uma ferramenta auxiliar no ajuste de dietas de vacas leiteiras.

Para otimizar a utilização da elevada oferta proteica da forragem deve-se elevar o aporte energético da dieta. Uma alternativa energética é a utilização de um subproduto da indústria de Biodiesel, a glicerina bruta.

Dois os fatores tornam relevante aprofundar os estudos sobre a utilização de glicerina bruta, como ingrediente aditivo na alimentação de vacas leiteiras em pastejo de azevém. O primeiro é seu potencial energético. O segundo fator está atrelado à responsabilidade ambiental, uma vez que, devido à crescente produção de biodiesel, é necessário absorver a produção deste subproduto. Considerando a escassez de pesquisas específicas e informações

sobre a utilização da glicerina bruta na dieta de bovinos de leite em pastejo em azevém, aliada à grande importância da atividade pecuária e à indústria de produção de biodiesel no Brasil, acredita-se que este subproduto possa ser utilizado como fonte energética em dietas de bovinos de leite no período de inverno, quando temos um excesso de proteínas na dieta de vacas em lactação.

1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

Com o aumento na demanda de energia mundial, impulsionada pelo crescimento da população, tem-se utilizado novas fontes de energia. Os biocombustíveis tem se destacado como fonte energética complementar ou substitutiva, entre as quais o biodiesel assume grande relevância, pois além de fonte renovável é considerado ecológico, biodegradável, atóxico, livre de enxofre e compostos aromáticos (STORCK BIODIESEL, 2008).

Desde novembro de 2014, no Brasil, o óleo diesel comercializado em todo o território nacional contém 7% de biodiesel, acarretando em aumento na produção de biodiesel. Em 2015 foi sancionada a Lei nº 613/2015 (BRASIL, 2015), que eleva ainda mais o percentual de mistura de biodiesel ao diesel vendido ao consumidor, passando para 8%, a partir de abril de 2017. A proposta estabelece alta para 8% após a sanção da lei; para 9% até dois anos depois, e 10% no período de três anos. A norma ainda autoriza o Conselho Nacional de Política Energética a elevar a mistura obrigatória para 15%, caso testes validem a utilização dessa mistura em veículos e motores. Os dados de julho de 2016 revelaram uma demanda de 323126 m³ ao mês de Biodiesel (BRASIL, 2016). Os novos percentuais incentivam ainda mais a produção de biodiesel, e reduzem as importações de óleo diesel e favorecem o agronegócio brasileiro e também a agricultura familiar. Na agricultura familiar, as diretrizes do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) fazem referência à inclusão social dos agricultores familiares na cadeia produtiva do biodiesel, como potenciais fornecedores de matéria-prima para a indústria. Para cumpri-la, o programa criou o Selo Combustível Social, uma certificação fornecida pelo governo federal a empresas produtoras que tenham contratos de compra de matéria-prima de produtores familiares agrícolas com preço pré-acordado.

O biodiesel pode ser definido como produto obtido através da transformação química de ácidos graxos de cadeia longa, oriundo de lipídios orgânicos renováveis, óleo ou gordura (vegetal ou animal) por adição de álcool (metanol ou etanol) na presença de catalisador (NaOH ou KOH), para utilização em motores diesel (UNIVERSIDADE DE AÇORES, 2008).

No Brasil, diversas fontes são utilizadas para produção de biodiesel (Figura 1), dentre as quais se destacam o óleo de soja e a gordura bovina, que correspondem respectivamente a 79,64 e 15,88% das fontes utilizadas para produção.

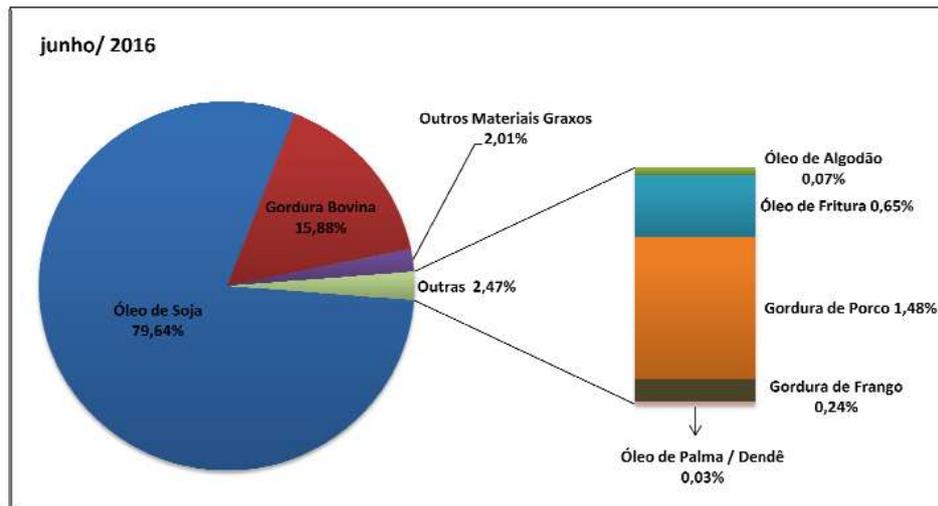


Figura 1- Matérias primas utilizadas para produção de Biodiesel, perfil nacional. Fonte: BRASIL, 2016.

A partir da produção do Biodiesel é gerado um subproduto: a glicerina, durante o processo de transesterificação, o óleo vegetal reage com álcool (metanol ou etanol) na presença de catalisador (hidróxido de sódio ou potássio), resultando em éster monoalquilado (biodiesel) e glicerina (PLÁ, 2002). Em seguida, por diferença de densidade, ocorre a decantação, permitindo assim a separação do biodiesel (SOUZA, 2006), que com a remoção da glicerina torna-se mais fluido pela redução da viscosidade (VISCARDI, 2005), conforme detalhado na Figura 2.

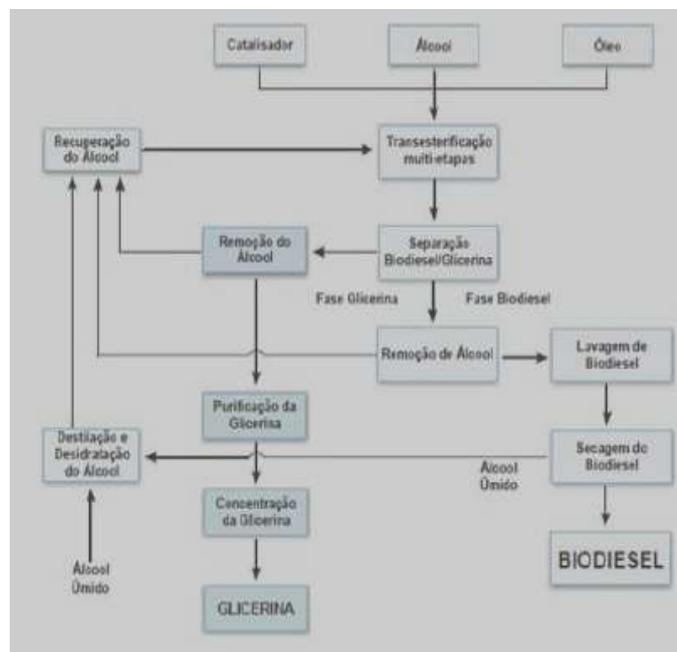
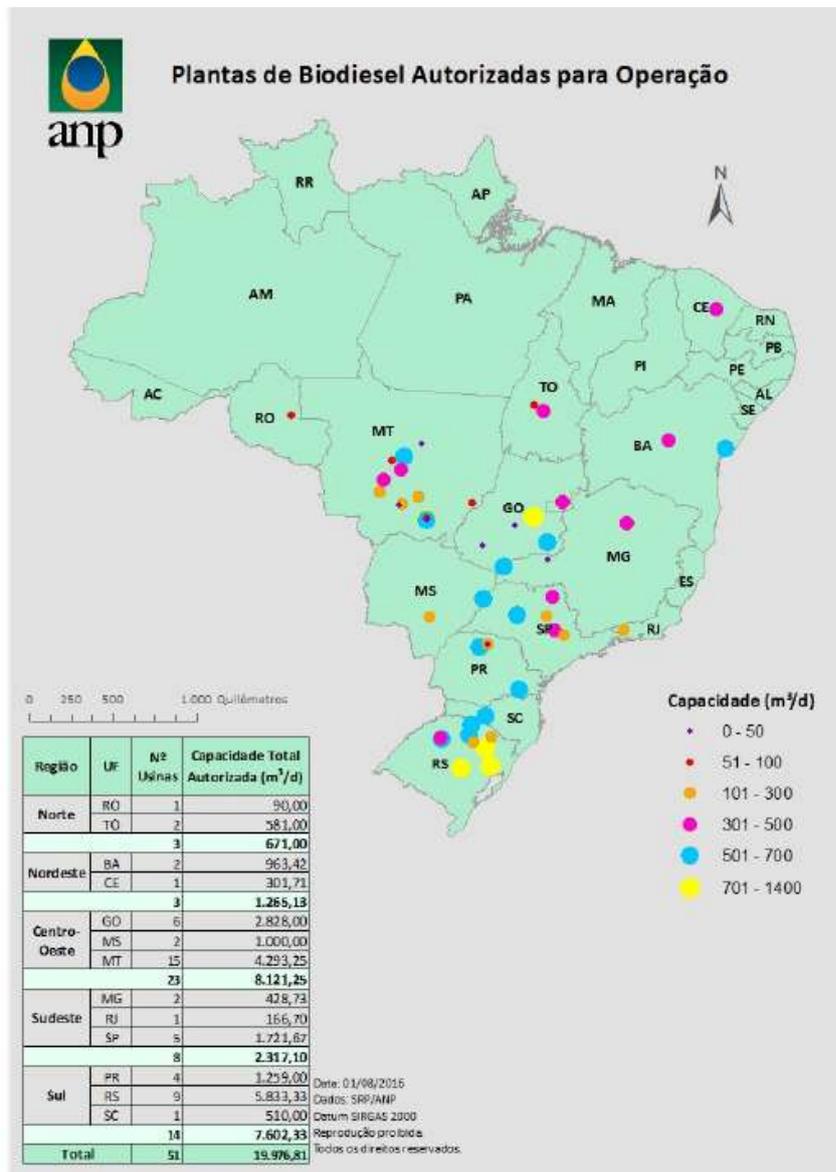


Figura 2- Produção do biodiesel. Adaptado Parente et al. (2003).

Contudo, para que a produção de biodiesel seja biológica e economicamente viável, é necessário dar destino adequado aos subprodutos gerados durante sua obtenção. Para cada tonelada de biodiesel, são produzidos aproximadamente 100 kg de glicerina bruta, ou seja, há uma relação de 10:1, desta forma, a cada 10 kg produzidos de biodiesel, 1 kg é de glicerina bruta (PARENTE, 2003; KNOTHE et al., 2006).

Atualmente existem 51 plantas produtoras de biodiesel (Figura 3) autorizadas para operação no País, correspondendo a uma capacidade total autorizada de 7 milhões 291 mil m³ por ano, o que equivale a cerca de 729 mil m³ de glicerina bruta por ano, ou seja, cerca de 1997 m³ por dia (BRASIL, 2016).



Elaborado por Henrique Cardoso Silva (SRP/ANP).

Figura 3- Plantas de Biodiesel autorizadas para operação no Brasil até agosto de 2016.

O principal mercado para glicerina bruta é formado por indústrias de alimentos, química e farmacêuticas que demandam a glicerina com grau de pureza acima de 95% (VASCONCELOS, 2012). Em virtude disso o excedente de glicerina proveniente do setor de biodiesel não é aproveitada na sua potencialidade, de forma que as empresas relatam a dificuldade de direcionar esse subproduto a mercados mais rentáveis. Em 2010, a glicerina oriunda do processamento do biodiesel foi autorizada na alimentação animal pelo Ministério da Agricultura e Produção Animal, desde que contenha o mínimo de 80% de glicerol, menos de 150ppm de metanol kg^{-1} e no máximo 120g de água kg^{-1} (PAULE, 2010), surgindo assim um novo aditivo autorizado para inclusão à dieta de ruminantes.

Devido ao melhoramento genético, as vacas leiteiras de hoje produzem maiores volumes de leite, e para atender as exigências nutricionais desta vaca torna-se imprescindível o uso de dietas mais elaboradas e equilibradas. No período de inverno, os animais são mantidos no sul do Brasil em pastejo, principalmente com azevém (*Lolium multiflorum* Lam.). O azevém, anual ou perene, existe na natureza como planta diploide ($2n= 2x= 14$ cromossomos), havendo, no entanto, cultivares tetraploides ($2n= 4x= 28$ cromossomos) originadas pelo melhoramento genético vegetal através da técnica de duplicação cromossômica. Plantas de azevém tetraploide apresentam folhas mais largas e de coloração mais escura, menor número de perfilhos, mas de maior tamanho, alta produção total de massa de forragem, ciclo vegetativo mais longo, menor conteúdo de matéria seca e sementes maiores (FARINATTI et al., 2006). Além disso, apresentam aumento do tamanho das células e maior relação conteúdo x parede celular elevando os teores de carboidratos solúveis, proteínas e lipídios (SMITH et al., 2001; NAIR, 2004).

O azevém se caracteriza também como uma gramínea cespitosa de clima temperado, apresentando metabolismo fotossintético de ciclo C3 (TONETTO, 2009). Este fator lhe dá maior conteúdo de nutrientes (carboidratos, proteínas, etc.) do que as gramíneas tropicais (metabolismo C4). Condição esta que proporciona degradação ruminal mais rápida, por apresentar parede celular mais fina e menor teor de compostos indigeríveis como a lignina (VALLE et al., 2001).

Desta forma, essas plantas usualmente apresentam alta digestibilidade, todavia contém altos teores de Nitrogênio (N) solúvel, acima da disponibilidade de carboidratos fermentáveis e da capacidade de captação pelos microorganismos ruminais. Sendo assim, a eficiência do uso do N por animais alimentados com gramíneas de inverno, como o azevém, é usualmente reduzida, consequência da produção em excesso de amônia ruminal, sendo que a utilização de

N pelos microrganismos depende da quantidade de energia disponível. Segundo Miller (1973), deve existir um sincronismo na utilização da proteína e da energia pelos microrganismos para que o uso dos compostos nitrogenados não proteicos tenha resultados positivos no desempenho animal. Por esse motivo, os diferentes alimentos que contêm altos teores de nitrogênio solúvel no rúmen devem ser fornecidos junto com fontes de carboidratos facilmente fermentáveis, para manter a produção de aminoácidos essenciais pelos microrganismos (CAMPOS e RODRIGUES, 1985).

Nos ruminantes, grande parte da proteína que chega para a digestão abomasal e intestinal é de origem microbiana, principal fonte de aminoácidos, e sua estimativa pode ser avaliada pelo balanço dos compostos nitrogenados e da síntese de proteína microbiana. O equilíbrio do ambiente ruminal deve manter-se em condições adequadas de osmolaridade, pH e potencial redox para o crescimento e metabolismo microbiano, atendendo suas exigências de proteína e energia (BERCHIELLI et al., 2006). A amônia ruminal é originada da degradação proteica da dieta, da hidrólise de fontes de nitrogênio não proteico, da ureia reciclada no rúmen e da lise da proteína microbiana. Sua concentração é utilizada como indicador da degradação proteica, da eficiência de utilização do nitrogênio da dieta e do crescimento microbiano (LENG e NOLAN, 1984; RUSSELL et al., 1992; SATTER e SLYTER, 1974). As bactérias do rúmen são capazes de utilizar a amônia como fonte de nitrogênio para síntese de proteína microbiana, mas a fermentação ruminal da proteína, frequentemente, produz mais amônia que os microrganismos podem utilizar. Em muitos casos, mais de 25% das proteínas podem ser perdidas como amônia. Em razão da proteína ser um dos ingredientes mais caros nas dietas de ruminantes, existe considerável interesse na redução da fermentação ruminal da proteína (RUSSELL et al., 1992). Há uma correlação relativamente alta entre o teor de proteína na dieta e a concentração de amônia ruminal que deve ficar entre 2 e 5mg dL⁻¹, considerados como adequados para maximizar a síntese de proteína microbiana e a digestão da parede celular (BERCHIELLI et al., 2006; SATTER e SLYTER, 1974). Mansfield e Stern (1994) afirmaram que a fermentação ruminal pode ser limitada através da disponibilidade de energia ou de proteína e não através da inadequada sincronização na liberação desses nutrientes. No entanto, quando a velocidade de fermentação é intensa pode ocorrer a produção e absorção excessivas de amônia, aumentando com isto a excreção de nitrogênio e o custo de produção (RUSSELL et al., 1992). Por outro lado, o rápido desaparecimento da amônia pode ser atribuído à absorção pela parede ruminal ou à sua utilização pelos microrganismos.

Devido ao excesso de amônia ruminal, tem-se uma elevação dos níveis de nitrogênio ureico no leite. As proteínas dos alimentos são previamente degradadas pelos microorganismos do rúmen, liberando amônia. A amônia originada no rúmen a partir de aminoácidos e do nitrogênio não proteico (ureia) é incorporada em parte como N-microbiano e o restante é absorvido e transformado em ureia no fígado. Uma vez convertida no fígado, ela circula pelo sangue. Por se tratar de uma molécula pequena, solúvel em água e altamente permeável, ela entra em equilíbrio com todas as células e tecidos, incluindo o leite na glândula mamária. Uma parte é reciclada no rúmen e outra é excretada na urina e no leite (KOZLOSKI, 2002). Elevados índices de nitrogênio ureico no leite, superiores a 19mg dL^{-1} estão relacionados à redução na produção de leite e perdas nos índices reprodutivos (ARIAS e ALONSO, 1997; BUTLER et al., 1996; FERGUSON et al., 1993; JONKER et al., 1998;). Para Torrent (2000), os valores ideais encontram-se entre 12 e 18mg dL^{-1} para vacas em lactação. Outros trabalhos citam que a média geral da concentração de NU deve estar entre 10 a 15mg dL^{-1} (JOHNSON e YOUNG, 2003; MEYER et al., 2006), já para ALMEIDA (2012) se situam entre 12 a 16mg dL^{-1} .

Assim, o fornecimento de suplementos energéticos aos animais em pastejo é uma estratégia de manejo para melhorar o equilíbrio nutricional dos animais, reduzindo os níveis de nitrogênio ureico no leite. A inclusão de glicerina bruta na alimentação, principalmente de ruminantes, pode ser uma alternativa. A glicerina é considerada um alimento energético, composta principalmente por glicerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$) que é absorvido pelo epitélio ruminal ou fermentado a ácidos graxos de cadeia curta no rúmen, decorrente da ação do glicerol no ambiente ruminal. Schröder e Südekum (1999) determinaram a energia líquida para lactação (ELL) do glicerol e chegaram aos valores de $2.300\text{ Kcal kg}^{-1}$, quando oferecido em dietas pobres em amido, e entre 1912 e 2031 Kcal kg^{-1} , quando incorporado a dietas ricas em amido. Para comparação, a ELL do milho quebrado, moído e flocculado é, segundo o NRC (2001), 1912 , 2008 e 2079 Kcal kg^{-1} , respectivamente, demonstrando, assim, uma similaridade entre o milho e o glicerol.

Após administração, via oral, da glicerina bruta misturada à dieta dos animais, esta chegará ao rúmen. O glicerol no ambiente ruminal contido na glicerina de acordo com GARTON et al. (1961), será convertido principalmente a ácido propiônico, após ser fermentado. O propionato ao ser absorvido pela corrente sanguínea será metabolizado no fígado, sendo a principal via metabólica do ciclo do ácido carboxílico, onde o succinil-CoA após reações bioquímicas origina o oxaloacetato e este é convertido a fosfoenolpiruvato, que será utilizado para a formação de glicose na via gliconeogênica.

Já o glicerol que for absorvido pelo epitélio ruminal, será convertido à glicose no fígado. A enzima glicerol quinase converte glicerol e ATP em glicerol-3-fosfato e ADP à triose fosfato, direcionando o glicerol para a gliconeogênese. O glicerol também poderá ser utilizado para a síntese de gordura, através da ação da enzima glicerol-cinase, sendo o glicerol livre fosforilado no fígado a glicerol-3-fosfato destinado à formação de gordura. O direcionamento do glicerol para a formação de gordura só ocorrerá em função das concentrações adequadas de glicose circulante, resultando em aumento da deposição de gordura, o que poderá aumentar o peso dos animais e o escore de condição corporal (KREHBIEL, 2008).

Kristensen e Raun (2007) observaram após fornecerem 1088g de glicerina (850g de glicerol kg^{-1} de glicerina), em dose diária única, via cânula ruminal em vacas, apenas 10% do glicerol na veia portal como consequência da absorção direta. Entretanto, como a quase totalidade desse glicerol absorvido foi transformado em glicose pelo fígado, os autores sugeriram que o glicerol não recuperado na veia portal havia sido fermentado no rúmen. Krehbiel (2008) relata que cerca de 13% do glicerol que chega ao rúmen desaparece por passagem direta, 44% por fermentação a propionato e 43% por absorção pelo epitélio ruminal.

O glicerol tem também efeito positivo sobre a retenção de aminoácidos ou nitrogênio (CERRATE et al., 2006), a ação do glicerol inibindo a atividade das enzimas fosfoenolpiruvato carboxiquinase e glutamato desidrogenase resulta em economia dos aminoácidos gliconeogênicos, o que aumenta a quantidade de amônia disponível no líquido ruminal para o desenvolvimento da flora microbiana no rúmen.

A amônia ruminal, ureia no sangue e ureia no leite estão altamente correlacionadas, podendo ser utilizadas para monitoramento do perfil da dieta (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2004). Porém é mais fácil determinar o teor de nitrogênio no leite, sendo que este valor é resultante da multiplicação do teor de ureia do leite pelo fator 0.466. A menor circulação de ureia sanguínea mantém o pH sanguíneo e dos órgãos estáveis, o que segundo Jordan et al. (1983) é fundamental para manutenção de uma gestação. Desta forma, a inclusão de glicerol na dieta tem potencial de melhorar o desempenho reprodutivo das vacas.

Para verificar o efeito da inclusão de glicerina bruta à dieta de bovinos podem-se analisar as variáveis resposta do perfil metabólico (ureia, glicose, nitrogênio ureico) e correlacioná-las ao consumo de alimento e produção de leite. O termo “perfil metabólico” se refere ao estudo de componentes hemato-bioquímicos que servem para avaliar, diagnosticar e prevenir transtornos metabólicos, e fornecem informações valiosas com relação ao status nutricional do rebanho (WITTWER e CONTRERAS, 1980).

O ácido propiônico decorrente da fermentação do glicerol é um precursor de glicose. De acordo com González (2000), a análise bioquímica do sangue é uma estratégia para estimar o metabolismo de ruminantes, determinando a síntese dos nutrientes a partir dos tecidos animais, e ainda o balanço entre o alimento consumido e seu aproveitamento. Quando incorporada na dieta animal, a glicerina bruta pode atuar na síntese de glicogênio hepático, aumentando o aporte energético disponível ao animal e os níveis circulantes de glicose. Este aporte de glicose circulante diminui o balanço energético negativo (BEN), pois o glicerol é transformado em ácidos graxos de cadeia curta no rúmen, principalmente em ácido propiônico (BERGNER et al., 1995), promovendo melhor aporte energético aos animais e manutenção da glicemia, impedindo a lipólise. Com a redução do BEN diminuem-se os riscos de doenças metabólicas pós-parto, tais como, por exemplo, a Cetose.

Wang et al. (2008) avaliaram a utilização da glicerina com 998g de glicerol/ kg glicerina (0, 100, 200 e 300 g de glicerol/dia) em vacas holandesas em lactação encontraram um aumento da concentração de glicose no plasma com a elevação do glicerol. Shin et al. (2009) avaliaram a inclusão de glicerina com 900g de glicerol/kg de glicerina (0, 50 e 100 g de glicerina kg⁻¹ da dieta), em 24 vacas em lactação, e observaram que glicose plasmática não alteraram entre os tratamentos. Donkin et al. (2009), avaliando em sessenta vacas holandesas confinadas o efeito da inclusão de zero, 50, 100 e 150 g de glicerina na MS da dieta (995g de glicerol kg⁻¹ de glicerina), observaram que a concentração de glicose no sangue elevaram-se linearmente com o aumento de glicerina na dieta e o nitrogênio ureico no leite diminuiu.

Segundo Manella et al. (2003), os parâmetros ruminais de bovinos em pastejo com suplementação de proteína alteram a proporção de Ácidos Graxos Voláteis, diminuindo a relação acetato: propionato, decorrente do aumento da concentração do ácido propiônico, em associação com à diminuição de ácido acético. As dietas a base de forragem tendem a aumentar a síntese de metano no rúmen, uma vez que a fermentação da forragem leva a uma maior produção de H₂, que é utilizado pelas bactérias metanogênicas para formar CH₄. Isso ocorre devido a relação acetato: propionato, quanto maior esta relação maior a produção de metano, pois o acetato juntamente com o butirato leva a maior liberação de H₂ no rúmen (JOHNSON e JOHNSON, 1995), porém a administração de glicerol na dieta tende a reduzir a quantidade disponível de carbono e hidrogênio para produção de gás metano dos animais, devido ao aumento de propionato no rúmen, reduzindo assim a produção de metano por estes animais (BOADI et al., 2004). Ainda por ser líquida a glicerina bruta pode trazer dificuldades de inclusão a dieta e oferta aos animais.

Em relação à produção e composição do leite, o uso de glicerol na dieta pode favorecer o aumento da produção do leite e interferir na composição do mesmo visto que o glicerol aumenta a oferta de ácido propiônico. Conforme Fonseca e Santos (2000) a glicose que a vaca precisa para a síntese de lactose é produzida no fígado, via gliconeogênese, principalmente pelo metabolismo do ácido propiônico. Uma vez que a glicose chega a células secretoras de leite na glândula mamária a maioria (60-70%) é usada na síntese de lactose, e o restante estimula a síntese de proteína, ou pode ser utilizada como fonte de glicerol para formação de gordura e como precursora na síntese de gordura. A secreção de lactose no lúmen alveolar causa a entrada de água, exercendo importante controle no volume de leite.

Para Donkin e Doane (2007) a produção e composição do leite não foram alteradas ao avaliaram em vacas lactantes a resposta a adição de glicerina bruta à dieta. Wang et al. (2008) avaliaram a utilização da glicerina com 998g de glicerol kg^{-1} glicerina (0, 100, 200 e 300 g de glicerol dia^{-1}) em vacas holandesas em lactação, e não observaram efeito para o consumo de matéria seca, produção leiteira e teor de lactose do leite, porém, houve um efeito linear decrescente no teor de proteína e gordura no leite com a elevação do fornecimento de glicerol. Donkin et al. (2009), avaliando em sessenta vacas holandesas confinadas o efeito da inclusão de zero, 50, 100 e 150 g de glicerina na MS da dieta (995g de glicerol kg^{-1} de glicerina), observaram que o consumo de MS, produção, contagem de células somáticas e composição de leite foram semelhantes entre os tratamentos.

Shin et al. (2009) avaliaram a inclusão de glicerina com 900g de glicerol kg^{-1} de glicerina (0, 50 e 100 g de glicerina kg^{-1} da dieta), em 24 vacas em lactação, e observaram que a produção leiteira não alteraram entre os tratamentos. Já Zacaroni (2010), avaliando a inclusão de glicerina na dieta (controle e 123g kg^{-1} da MS da dieta) de dezoito vacas lactantes confinadas, observou que o consumo e composição do leite não diferiram entre os tratamentos em estudo, mas houve diminuição da produção leiteira com a inclusão de glicerina.

1.3 PROPOSIÇÕES

Observando os estudos descritos na literatura com glicerina há similaridade dos efeitos observados, ressaltando que a maioria das pesquisas foi conduzida com vacas lactantes confinadas, ou em substituição ao milho da dieta, necessitando então elucidar os efeitos com animais em pastagem, tendo em vista que é o principal sistema de produção leiteira no Brasil. Diante deste cenário, buscou-se avaliar o efeito da inclusão de 10% de glicerina bruta na Matéria Seca total da dieta, de vacas em lactação, em pastejo em azevém. As inter-relações do modelo conceitual da pesquisa e hipóteses estão demonstradas na Figura 4.

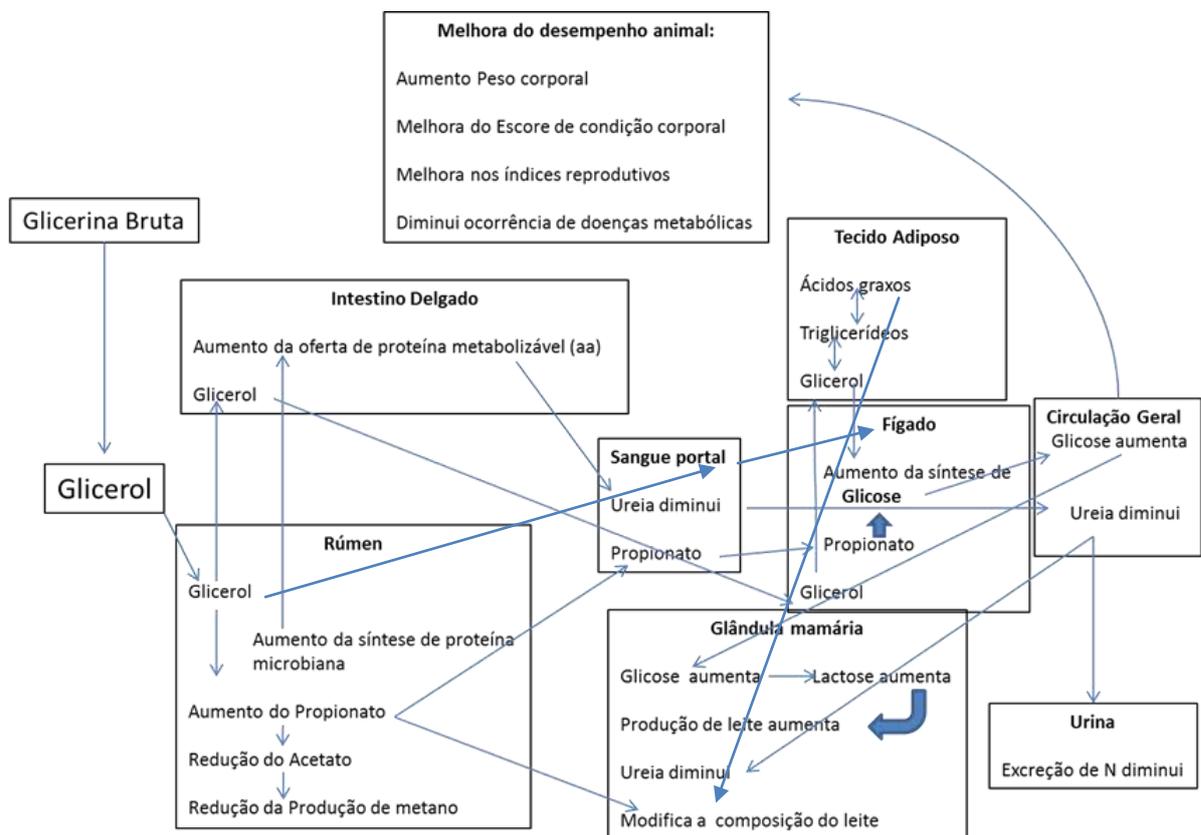


Figura 4 - Modelo Conceitual da pesquisa “Efeito do uso do glicerol na dieta de vacas em lactação sobre os níveis de ureia do leite”.

Com base nas hipóteses apresentadas no modelo conceitual da pesquisa, o trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar o potencial do uso da suplementação com 10% de glicerina bruta na Matéria Seca total da dieta para vacas holandesas, em lactação, mantidas em sistema semi-intensivo de produção em pastagem de azevém (*Lolium multiflorum*).

Desta forma teve como objetivos específicos: avaliar o potencial do uso de glicerina bruta na redução do nível de nitrogênio ureico do leite, o efeito sobre os indicadores do perfil metabólico (ureia e glicose) sanguíneos e urinários; comparar o desempenho produtivo e a composição do leite (gordura, proteína, sólidos totais, lactose, contagem de células somáticas) de vacas leiteiras consumindo ou não glicerina bruta na dieta.

1.4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido de acordo com os padrões éticos e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, com o protocolo de pesquisa n.09/2014, parecer: 019/2014. O ensaio experimental foi conduzido no Instituto Regional de Desenvolvimento Rural (IRDeR) da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ), localizado no município de Augusto Pestana, no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, no período de julho a agosto de 2015.

Os dados resultantes foram divididos para compor dois artigos um sobre o perfil metabólico de vacas em lactação com inclusão de glicerina na dieta e outro sobre a composição e produção do leite de vacas com inclusão de glicerina bruta na dieta.

Dezoito vacas da raça holandesa em lactação (600 ± 50 kg de peso corporal (PC)) foram divididas entre os tratamentos: 1) Dieta basal sem adição de glicerina bruta, 2) Dieta com adição de 10% de glicerina bruta na Matéria Seca (MS) total. O período experimental teve duração de 56 dias, dividido em quatro períodos de 14 dias, sendo que, no primeiro período experimental todas as vacas receberam a mesma dieta para padronização, a base de pastagem de azevém, silagem de milho e ração comercial (denominado período de adaptação). Posteriormente, foi atribuído aleatoriamente às vacas em pares, bloqueadas por DEL (de 60 a 120 dias, 121 a 200 dias e 201 a 320 dias) e produção de leite similar, em uma sequência de três períodos (denominados 1, 2 e 3), em reversão simples.

No início do período de adaptação todos os animais foram avaliados, sendo que apenas animais saudáveis ao exame clínico e ginecológico foram incluídos no experimento.

As vacas foram mantidas em pastagem de Azevém (*Lolium multiflorum* Lam.), cultivar Bar HQ[®], tetraploide, sob pastejo rotacionado, em um único rebanho na área experimental, manejadas de forma a proporcionar uma oferta mínima de matéria seca de 25 kg/animal/dia. A área total de pastagem (20 ha) foi dividida em 11 piquetes com tamanho médio de 1,8 ha. Os animais permaneciam em média dois dias e duas noites em cada piquete, cada piquete ficava em descanso em média 20 dias. . Em relação à adubação na base foram aplicados 200 kg ha⁻¹ (5-20-20) 40 kg de P₂O₅ e K₂O e 77,5 kg de N, parcelados em 4 aplicações, sendo 10 kg ha⁻¹ na base e os demais divididos em 3 aplicações e em cobertura 150 kg ha⁻¹ de ureia, em três aplicações, distribuídas ao longo do período experimental.

As vacas de cada tratamento foram submetidas às mesmas condições de manejo e alimentação, pastejo em azevém no intervalo entre ordenhas e oferta de concentrado

(conforme produção de leite) mais oferta de 10 kg de silagem de milho dia⁻¹ no cocho, diferindo apenas entre os tratamentos a inclusão de 10% ou não de glicerina bruta na MS total da dieta. Todos os animais foram pesados, em balança, no início de cada período experimental, para determinar o consumo de glicerina bruta diária, com base em 3% de consumo de matéria seca mediante o peso vivo. Após a alimentação no canzil as sobras de alimentos no cocho foram pesadas e os dados compilados, formando uma média de sobras ao final de cada período, por animal.

O concentrado utilizado foi comercial peletizado com 17% de proteína bruta, que detinha na sua composição básica farelo de soja, como fonte proteica, milho moído e farelo de arroz como fonte de alimentos energéticos. A quantidade de concentrado fornecido para cada animal foi alterada sempre que necessário e seguiu, como critério prático, o fornecimento de um kg de concentrado para cada cinco litros de leite produzidos por vaca dia⁻¹. Os animais foram ordenhados mecanicamente duas vezes ao dia, às 7 hs e 17 hs, e receberam o alimento concentrado em canzils individuais, com cochos separados, logo após a ordenha no período da manhã e antes da ordenha no período da tarde. Durante o tempo restante, os animais permaneceram nas áreas de pastagens, com livre acesso à água potável.

A glicerina bruta utilizada foi líquida, de textura oleosa e coloração amarelo escura, produzida com matéria prima de 100% de soja, com 80% de teor de glicerol, 12% de água, 1% de metanol, 2% de cinzas, 3% de matéria orgânica e 2% de cloreto de sódio, comercializada pela empresa Três Tentos Agroindustrial S/A de Ijuí, Rio Grande do Sul, Brasil.

As coletas de amostra da forragem foram coletadas por simulação de pastejo na entrada de cada piquete durante o experimento, sendo realizada posteriormente uma amostra composta para cada período. As amostras foram mantidas congeladas até serem encaminhadas ao laboratório para análise. Amostras da silagem de milho e do concentrado foram coletadas a cada período também. Nas amostras dos alimentos foram avaliados os teores de matéria seca, matéria mineral, matéria orgânica, proteína bruta, fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido, extrato etéreo e fibra bruta de todos os componentes da dieta. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Bromatologia da Universidade do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ), Tabela 1.

Tabela 1- Resultados das análises bromatológicas dos três períodos experimentais, para pastagem de azevém, silagem de milho e concentrado.

Período	Itens	Alimentos		
		Pastagem de Azevém	Silagem de Milho	Concentrado
1	MS%	9.24	23.43	83.50
	MM% na MS	15.54	4.62	10.83
	MO% na MS	84.46	95.38	89.17
	PB% na MS	31.81	7.49	17.05
	FDN% na MS	50.87	59.98	-
	FDA% na MS	43.93	51.84	-
	EE% na MS	5.45	4.21	4.16
	FB% na MS	-	-	8.56
2	MS%	13.70	23.43	83.50
	MM% na MS	13.25	4.62	10.83
	MO% na MS	86.75	95.38	89.17
	PB% na MS	21.95	7.49	17.05
	FDN% na MS	58.45	59.98	-
	FDA% na MS	38.51	51.84	-
	EE% na MS	3.46	4.21	4.16
	FB% na MS	-	-	8.56
3	MS%	10.27	23.43	83.50
	MM% na MS	14.34	4.62	10.83
	MO% na MS	85.66	95.38	89.17
	PB% na MS	28.88	7.49	17.05
	FDN% na MS	54.00	59.98	-
	FDA% na MS	43.28	51.84	-
	EE% na MS	3.83	4.21	4.16
	FB% na MS	-	-	8.56

*MS= matéria seca, MM= matéria mineral, MO=matéria orgânica, PB=Proteína Bruta, FDN=Fibra em detergente neutro, FDA= Fibra em detergente ácido, EE=Extrato Etéreo, FB= Fibra Bruta

O material verde foi seco em estufa com circulação forçada de ar (55°C) até peso constante, moído (peneira de um mm) e armazenado para posterior análise. Os teores de matéria seca (MS) das amostras de alimentos foram determinados por secagem em estufa a 105°C até peso constante. O conteúdo de cinzas foi determinado por combustão a 600°C durante 4 horas e a matéria orgânica (MO) por diferença de massa. O nitrogênio total (N) das amostras de alimentos foi determinado pelo método Kjeldahl (MÉTODO 984.13; AOAC, 1997) e determinada proteína bruta e fibra bruta. A análise de fibra em detergente neutro (FDN) foi baseada nos procedimentos descritos por Mertens (2002) com uso de α -amilase termoestável, exceto que as amostras foram pesadas dentro de sacos filtro de poliéster (porosidade de 16 μ m) e tratadas com detergente neutro em autoclave a 110°C por 40 minutos (SENGER et al., 2008). As concentrações de fibra em detergente ácido (FDA) em detergente

ácido (LDA) foram analisadas de acordo com o Método 973.18 da AOAC (1997), exceto que as amostras foram pesadas dentro de sacos filtro de poliéster (porosidade de 16 µm) e tratadas com detergente ácido em autoclave a 110°C por 40 minutos (SENGER et al., 2008). Os teores de extrato etéreo (EE) foram obtidos por extração com éter etílico em um sistema de refluxo a 180°C durante 2 horas. A análise da dieta referente a cada período experimento com e sem glicerina bruta encontra-se detalhada na Tabela 2.

Tabela 2- Resultados das análises para composição nutricional da dieta dos períodos experimentais (% MS).

Período	Itens	Dieta	
		Com Glicerina bruta	Sem Glicerina bruta
1	MS%	18.40	17.00
	CNF% na MS	35.70	29.40
	CHO Fem.% na MS	43.70	41.70
	PB% na MS	20.44	22.71
	FDN% na MS	18.10	20.50
	EE% na MS	4.60	5.10
	FS% na MS	8.80	2.10
2	MS%	24.80	23.00
	CNF% na MS	35.70	29.40
	CHO Fem.% na MS	45.50	43.70
	PB% na MS	16.56	18.41
	FDN% na MS	19.90	22.60
	EE% na MS	3.80	4.20
	FS% na MS	8.80	2.10
3	MS%	20.00	18.50
	CNF% na MS	35.70	29.40
	CHO Fem.% na MS	44.40	42.50
	PB% na MS	19.28	21.43
	FDN% na MS	18.80	21.30
	EE% na MS	4.00	4.40
	FS% na MS	8.80	2.10

*MS= matéria seca, CNF= carboidratos não fibrosos, CHO Fem.= carboidratos fermentáveis, PB=Proteína Bruta, FDN=Fibra em detergente neutro, EE=Extrato Etéreo, FB= Fibra Bruta

Dois dias ao final de cada período experimental, uma alíquota (aproximadamente 40 mL) de leite de cada animal de ambas as ordenhas (60% da manhã e 40% da tarde) foi coletada e acondicionada em frasco contendo conservante Bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanodiol). Os frascos com as amostras foram identificados com o número do animal e enviados ao Laboratório da Universidade de Passo Fundo (UPF), Serviço de Análise de

Rebanhos Leiteiros (SARLE), para fins de análise do nitrogênio ureico, composição do leite (gordura, proteína, sólidos totais e lactose) e contagem de células somáticas. Sendo que a composição do leite e o nitrogênio ureico foram analisados pelo método infravermelho e a contagem de células somáticas por citometria de fluxo. Os resultados foram compilados com base em uma média das amostras por animal, a cada período experimental.

A produção de leite (litros dia^{-1}) foi analisada nos últimos seis dias de cada período experimental, através da mensuração da produção das ordenhas da manhã e tarde, mediante pesagens do leite através de sistema semi automatizado de ordenha, após foi realizada uma média de produção, por período experimental, por animal. A produção de leite também foi analisada sendo corrigida para produção de 4% de gordura, conforme a fórmula: $[(0,4) \times (\text{produção de leite}) + 15 (\text{produção de leite} \times \% \text{ gordura}/100)]$ (NRC, 2001).

Amostras de sangue foram coletadas de todos os animais por punção da veia ou artéria coccígea, no último dia de cada período, sempre no período da manhã, após a alimentação, utilizando-se tubos vacuolizados de 10 mL (BD Vacuotainer® com ativador de coágulo), ao final de cada período experimental. O soro sanguíneo foi separado e congelado, após as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Análises Clínicas da UNIJUÍ para análise da glicose e ureia, através de kits de análise da empresa Bioclin®.

As amostras de urina, 100 mL, foram coletadas por meio de massagem perineal ou vulvar de cada vaca após a ordenha da manhã e da tarde. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos, posteriormente filtradas em gaze e uma alíquota de 10 mL foi separada e diluída com 1 mL de ácido sulfúrico a 20%, a fim de manter o pH abaixo de 3,0, completando até 50 mL com água destilada. Após foram homogeneizadas e conferiu-se com fitas de pH se o mesmo estava abaixo de 3,0. Após homogeneização, as alíquotas foram armazenadas congeladas a -20°C . De cada uma destas coletas retirou-se 5 mL e colocou-se em um pote, 5 mL em cada uma das coletas (manhã e tarde, por 7 dias). No final obteve-se uma amostra composta do período (70 mL) por vaca. Estas amostras foram destinadas à quantificação da concentração de glicose e ureia, através de kits de análise da empresa Bioclin®.

Para fins de análise a inclusão de glicerina bruta foi considerada como efeito fixo e o bloco como efeito aleatório (bloqueado dias em lactação). Para o estudo do efeito da inclusão de glicerina bruta no perfil metabólico avaliou-se níveis de ureia no sangue e urina, nitrogênio ureico no leite, glicose no sangue e urina, sobras no cocho e produção de leite em litros dia^{-1} e corrigida para 4% de gordura, sendo os resultados de cada tratamento, por período, incorporados à média dos grupos (tratado ou não). Os resultados referentes às variáveis

metabólicas (urina, sangue e leite), produção de leite e consumo foram analisados utilizando o procedimento MIXED do SAS 9.2 (SAS Inst. Inc., Cary, NC). Submetidos os dados à análise de variância e o efeito de tratamento foi avaliado pelo teste de Tukey para dados pareados, os contrastes foram considerados significativos quando o valor de $P < 0.05$ e tendência quando $P < 0.10$. Ainda avaliou-se o nível de correlação entre as variáveis analisadas.

Para o estudo do efeito da inclusão de glicerina bruta na composição do leite, avaliou-se a produção de leite em litros dia⁻¹ e também a produção corrigida para produção de 4% de gordura, conforme a fórmula: $[(0,4) \times (\text{produção de leite}) + 15 (\text{produção de leite} \times \% \text{gordura}/100)]$ (NRC, 2001). As variáveis expressas como porcentagens (gordura, proteína, lactose e sólidos totais) foram transformadas pela aplicação do arcosseno da raiz quadrada de seus valores percentuais e posteriormente analisadas (MARKUS, 1973). Os valores de contagem de células somáticas foram transformados pela aplicação do logaritmo base 10 e posteriormente analisados (NG-KWAI-HANG et al., 1982). Embora a análise estatística tenha sido feita com os valores transformados, os seus valores originais estão apresentados nas tabelas para facilitar a interpretação. Os resultados referentes às variáveis da composição e produção de leite foram analisados utilizando o procedimento MIXED do SAS 9.2 (SAS Inst. Inc., Cary, NC). Os resultados de cada animal foram incorporados à média dos grupos (tratado ou não). Os dados foram submetidos à análise de variância e o efeito de tratamento foi avaliado pelo teste de Tukey para dados pareados, os contrastes foram considerados significativos quando o valor de $P < 0.05$ e tendência quando $P < 0.10$.

2 ARTIGO 1

Revista Brasileira de Zootecnia

2.1 PERFIL METABÓLICO DE VACAS LEITEIRAS EM PASTEJO COM AZEVÉM E INCLUSÃO DE GLICERINA BRUTA NA DIETA

2.1.1 Resumo

Com o objetivo de avaliar o efeito da inclusão de glicerina bruta sobre o perfil metabólico, de vacas em lactação, em pastejo de azevém foi conduzido um experimento com dezoito animais, da raça holandesa, divididas entre os tratamentos: 1) Dieta basal sem adição de glicerina bruta, 2) Dieta com adição de 10% de glicerina bruta na Matéria Seca total. O período experimental teve duração de 56 dias, dividido em quatro períodos de 14 dias, sendo o primeiro período utilizado apenas para padronização da dieta, seguindo posteriormente de 3 períodos, em delineamento de reversão simples. Foram analisados, bloqueando o período de lactação, resultados referentes à produção de leite (litros dia⁻¹ e corrigida para produção de 4% de gordura), nível de ureia e glicose no sangue e urina, nível de nitrogênio ureico do leite e sobra de alimento no cocho. O efeito da inclusão de glicerina bruta na dieta sobre as variáveis foi avaliado. Verificou-se que a inclusão de 10% de glicerina bruta na MS total de vacas em lactação, em pastejo de azevém, reduz a eliminação de ureia via leite e aumenta os níveis sanguíneos de glicose, não tendo efeito deletério sobre a produção de leite e consumo de alimento dos animais.

Palavras-chave: BOVINOS; GLICEROL; GLICOSE; NITROGÊNIO UREICO; UREIA

2.1.2 Introdução

Bovinos de leite, de regiões de clima subtropical, no período de inverno, tem sua dieta baseada na utilização de plantas forrageiras cultivadas (MITTELMENN et al., 2014), com destaque para o azevém (*Lolium multiflorum lam.*), forragem que possui uma alta concentração de proteína bruta (CONFORTIN et al, 2009).

A ingestão de proteína pelos bovinos chega ao rúmen e cerca de 60 a 80% é transformada em amônia, que é utilizada pelos microorganismos ruminais para a síntese de suas proteínas estruturais, sendo o excedente absorvido através da parede ruminal para a circulação geral. A amônia absorvida chega ao fígado via sanguínea, onde é transformada em ureia, a qual se excreta, em parte como ureia na urina e no leite, sendo que uma fração pode voltar ao rúmen através da saliva, ou por difusão na parede ruminal reintegrando-se ao ciclo (GONZÁLEZ et al., 2000).

O excesso de proteína na dieta de vacas leiteiras pode prejudicar a sanidade e a produção dos animais (BUTLER, 1998). Sendo assim, a busca por alimentos como fontes alternativas de energia que possam equilibrar a dieta de bovinos, é crescente. No Brasil, temos disponível a glicerina bruta, que surge como uma fonte energética de baixo custo e com potencial de melhorar a eficiência produtiva dos animais, sendo subproduto da indústria de biodiesel (COOPER e WEBER, 2012).

A glicerina bruta possui grande assimilação pelos microorganismos da flora ruminal, com ampla metabolização no fígado (ABO El-NOR et al., 2010), tendo potencial para diminuir a biohidrogenação no rúmen (KRUEGER et al., 2010) e aumentar o aporte energético através do incremento de propionato (LEE et al., 2011). O incremento no propionato proporciona o aumento na síntese de glicose no fígado, a partir de moléculas precursoras na via da gliconeogênese. Sendo que a glicose é vital para manutenção e incremento da produção de leite (BERCHIELLI et al., 2006).

Para avaliar o efeito da inclusão de glicerina bruta à dieta de vacas, em pastagem de azevém, pode-se utilizar e correlacionar os dados das variáveis do perfil metabólico dos animais (ureia e glicose sanguínea e urinária e nível de nitrogênio ureico no leite). Assim como é importante definir o efeito sobre o consumo de alimento e produção de leite. Desta forma, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de verificar o efeito da inclusão de

10% glicerina bruto na MS total da dieta, sobre o perfil metabólico e produção de leite, de vacas holandesas em lactação, em pastejo em azevém.

2.1.3 Material e Métodos

Este trabalho foi conduzido de acordo com os padrões éticos e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, com o protocolo de pesquisa n.09/2014, parecer: 019/2014. O ensaio experimental foi conduzido no Instituto Regional de Desenvolvimento Rural (IRDeR) da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ), localizado no município de Augusto Pestana, no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, no período de julho a agosto de 2015.

Dezoito vacas da raça holandesa em lactação (600 ± 50 kg de peso corporal (PC)) foram divididas entre os tratamentos: 1) Dieta basal sem adição de glicerina bruta, 2) Dieta com adição de 10% de glicerina bruta na Matéria Seca (MS) total. O período experimental teve duração de 56 dias, dividido em quatro períodos de 14 dias, sendo que, no primeiro período experimental todas as vacas receberam a mesma dieta para padronização, a base de pastagem de azevém, silagem de milho e ração comercial (denominado período de adaptação). Posteriormente, foi atribuído aleatoriamente às vacas em pares, bloqueadas por DEL (de 60 a 120 dias, 121 a 200 dias e 201 a 320 dias) e produção de leite similar, em uma sequência de três períodos (denominados 1, 2 e 3), em reversão simples. No início do período de adaptação todos os animais foram avaliados, sendo que apenas animais sadios ao exame clínico e ginecológico foram incluídos no experimento.

As vacas foram mantidas em pastagem de Azevém (*Lolium multiflorum* Lam.), cultivar Bar HQ®, tetraploide, sob pastejo rotacionado, em um único rebanho na área experimental, manejadas de forma a proporcionar uma oferta mínima de matéria seca de 25 kg/animal/dia. A área total de pastagem (20 ha) foi dividida em 11 piquetes com tamanho médio de 1,8 ha.

Os animais permaneciam em média dois dias e duas noites em cada piquete, cada piquete ficava em descanso em média 20 dias. Em relação à adubação na base foram aplicados 200 kg ha⁻¹ (5-20-20) 40 kg de P₂O₅ e K₂O e 77,5 kg de N, parcelados em 4 aplicações, sendo 10 kg ha⁻¹ na base e os demais divididos em 3 aplicações e em cobertura 150 kg ha⁻¹ de ureia, em três aplicações, distribuídas ao longo do período experimental.

Os animais de cada tratamento foram submetidos às mesmas condições de manejo e alimentação, pastejo em azevém no intervalo entre ordenhas e oferta de concentrado (conforme produção de leite) mais oferta de 10 kg de silagem de milho dia⁻¹ no cocho, diferindo apenas entre os tratamentos a inclusão de 10% ou não de glicerina bruta. Todos os animais foram pesados, em balança, no início de cada período experimental, para determinar o consumo de glicerina bruta diária, com base em 3% de consumo de matéria seca mediante o peso vivo. Após a alimentação no canzil as sobras de alimentos no cocho foram pesadas e os dados compilados, formando uma média de sobras ao final de cada período, por animal.

Um concentrado comercial peletizado foi utilizado com 17% de proteína bruta, que detinha na sua composição básica farelo de soja, como fonte proteica, milho moído e farelo de arroz como fonte de alimentos energéticos. A quantidade de concentrado fornecido para cada animal foi alterada sempre que necessário e seguiu, como critério prático, o fornecimento de um Kg de concentrado para cada cinco litros de leite produzidos por vaca dia⁻¹. Os animais foram ordenhados mecanicamente duas vezes ao dia, às 7 hs e 17 hs, e receberam o alimento concentrado em canzils individuais, com cochos separados, logo após a ordenha no período da manhã e antes da ordenha no período da tarde. Durante o tempo restante, os animais permaneceram nas áreas de pastagens, com livre acesso à água potável.

A glicerina bruta utilizada foi líquida, de textura oleosa e coloração amarelo escura, produzida com matéria prima de 100% de soja, com 80% de teor de glicerol, 12% de água, 1% de metanol, 2% de cinzas, 3% de matéria orgânica e 2% de cloreto de sódio,

comercializada pela empresa Três Tentos Agroindustrial S/A de Ijuí, Rio Grande do Sul, Brasil.

As coletas de amostra da forragem foram coletadas por simulação de pastejo na entrada de cada piquete durante o experimento, sendo realizada posteriormente uma amostra composta para cada período. As amostras foram mantidas congeladas até serem encaminhadas ao laboratório para análise. Amostras da silagem de milho e do concentrado foram coletadas a cada período também. Nas amostras dos alimentos foram avaliados os teores de matéria seca, matéria mineral, matéria orgânica, proteína bruta, fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido, extrato etéreo e fibra bruta de todos os componentes da dieta. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Bromatologia da Universidade do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ), Tabela 1. A análise da dieta referente a cada período experimento com e sem glicerina bruta encontra-se detalhada na Tabela 2.

O material verde foi seco em estufa com circulação forçada de ar (55°C) até peso constante, moído (peneira de um mm) e armazenado para posterior análise. Os teores de matéria seca (MS) das amostras de alimentos foram determinados por secagem em estufa a 105°C até peso constante. O conteúdo de cinzas foi determinado por combustão a 600°C durante 4 horas e a matéria orgânica (MO) por diferença de massa. O nitrogênio total (N) das amostras de alimentos foi determinado pelo método Kjeldahl (MÉTODO 984.13; AOAC, 1997) e determinada proteína bruta e fibra bruta. A análise de fibra em detergente neutro (FDN) foi baseada nos procedimentos descritos por MERTENS (2002) com uso de α -amilase termoestável, exceto que as amostras foram pesadas dentro de sacos filtro de poliéster (porosidade de 16 μ m) e tratadas com detergente neutro em autoclave a 110°C por 40 minutos (SENGER et al., 2008). As concentrações de fibra em detergente ácido (FDA) em detergente ácido (LDA) foram analisadas de acordo com o Método 973.18 da AOAC (1997), exceto que as amostras foram pesadas dentro de sacos filtro de poliéster (porosidade de 16 μ m) e tratadas

com detergente ácido em autoclave a 110°C por 40 minutos (SENGER et al., 2008). Os teores de extrato etéreo (EE) foram obtidos por extração com éter etílico em um sistema de refluxo a 180°C durante 2 horas.

Nos dois últimos dias de cada período experimental, uma alíquota (aproximadamente 40 mL) de leite de cada animal de ambas as ordenhas (60% da manhã e 40% da tarde) foi coletada e acondicionada em frasco contendo conservante Bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanodiol). Os frascos com as amostras foram identificados com o número do animal e enviados ao Laboratório da Universidade de Passo Fundo (UPF), Serviço de Análise de Rebanhos Leiteiros (SARLE), para fins de análise do nitrogênio ureico, pelo método Infravermelho. Os resultados foram compilados com base em uma média das amostras por animal, a cada período experimental.

A produção de leite (litros dia⁻¹) foi analisada nos últimos seis dias de cada período experimental, através da mensuração da produção das ordenhas da manhã e tarde, mediante pesagens do leite através de sistema semi automatizado de ordenha, após foi realizada uma média de produção, por período experimental, por animal. A produção de leite também foi analisada sendo corrigida para produção de 4% de gordura, conforme a fórmula: $[(0,4) \times (\text{produção de leite}) + 15 (\text{produção de leite} \times \% \text{ gordura}/100)]$ (NRC, 2001).

Amostras de sangue foram coletadas de todos os animais por punção da veia ou artéria coccígea, no último dia de cada período, sempre no período da manhã, após a alimentação, utilizando-se tubos vacuolizados de 10 mL (BD Vacuotainer® com ativador de coágulo), ao final de cada período experimental. O soro sanguíneo foi separado e congelado, após as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Análises Clínicas da UNIJUÍ para análise da glicose e ureia, através de kits de análise da empresa Bioclin®.

As amostras de urina, 100 mL, foram coletadas por meio de massagem perineal ou vulvar de cada vaca após a ordenha da manhã e da tarde. As amostras foram centrifugadas a

3000 rpm por 10 minutos, posteriormente filtradas em gaze e uma alíquota de 10 mL foi separada e diluída com 1 mL de ácido sulfúrico a 20%, a fim de manter o pH abaixo de 3,0, completando até 50 mL com água destilada. Após foram homogeneizadas e conferiu-se com fitas de pH se o mesmo estava abaixo de 3,0. Após homogeneização, as alíquotas foram armazenadas congeladas a -20°C . De cada uma destas coletas retirou-se 5 mL e colocou-se em um pote, 5 mL em cada uma das coletas (manhã e tarde, por 7 dias). No final obteve-se uma amostra composta do período (70 mL) por vaca. Estas amostras foram destinadas à quantificação da concentração de glicose e ureia, através de kits de análise da empresa Bioclin[®].

Para fins de análise a inclusão de glicerina bruta foi considerada como efeito fixo e o bloco como efeito aleatório (bloqueado dias em lactação). Para o estudo do efeito da inclusão de glicerina bruta no perfil metabólico avaliou-se níveis de ureia no sangue e urina, nitrogênio ureico no leite, glicose no sangue e urina, sobras no cocho e produção de leite em litros dia⁻¹ e corrigida para 4% de gordura, sendo os resultados de cada tratamento, por período, incorporados à média dos grupos (tratado ou não). Os resultados referentes às variáveis metabólicas (urina, sangue e leite), produção de leite e consumo foram analisados utilizando o procedimento MIXED do SAS 9.2 (SAS Inst. Inc., Cary, NC). Submetidos os dados à análise de variância e o efeito de tratamento foi avaliado pelo teste de Tukey para dados pareados, os contrastes foram considerados significativos quando o valor de $P < 0.05$ e tendência quando $P < 0.10$. Ainda avaliou-se o nível de correlação entre as variáveis analisadas.

2.1.4 Resultados e Discussão

Os níveis de ureia sanguínea (Tabela 3) encontraram-se dentre dos valores descritos para vacas em lactação que são de 42.8 a 64.2 mg dL⁻¹ (KANeko et al., 1997). Já os níveis de ureia na urina das vacas foram superiores, estes valores normalmente são superiores aos valores apresentados no sangue, porque os rins têm grande capacidade de excretar a ureia e

mantêm a substância em quantidade superior na urina em relação à concentração plasmática (ORTOLANI, 2002), corroborando com o verificado neste estudo, sem efeito do período de lactação, Tabela 3.

Em relação ao teor de nitrogênio ureico no leite, os valores preconizados para vacas em lactação sofrem divergência entre as literaturas para TORRENT (2000) devem estar entre 12 a 18 mg dL⁻¹, para JOHNSON e YOUNG (2003); MEYER et al. (2006) entre 10 a 15 mg dL⁻¹. Já para FERGUSON et al. (1993); ARIAS e ALONSO (1997); JONKER et al. (1998); BUTLER et al. (1996) os valores são considerados elevados quando superiores a 19 mg dL⁻¹ e estes autores relacionam altos níveis à redução na produção de leite e a perdas nos índices reprodutivos. ALMEIDA (2012) cita que a média geral da concentração deve estar entre 12 a 16 mg dL⁻¹. De forma geral, os valores médios encontrados neste estudo (Tabela 3), não diferiram entre os períodos da lactação, mas mantiveram-se acima dos valores descritos na literatura, provavelmente devido ao elevado teor de proteína bruta ofertado na dieta (Tabela 2), que refletiu também na ocorrência de glicosúria (Tabela 3).

Porém neste estudo, a glicemia sanguínea se manteve nos parâmetros fisiológicos para a espécie. Para bovinos a concentração de glicose sanguínea é de 45 a 75 mg dL⁻¹ conforme KANEKO et al., (1997) e de 50 a 80 mg dL⁻¹ conforme FERNANDES et al. (2012).

Os níveis de uréia no sangue (P=0.6473), urina (P=0.6158), nitrogênio ureico no leite (P=0.6782), glicose sanguínea (P=0.1009), glicose na urina (P=0.8328) não sofreram efeito do período de lactação, já a produção de leite em litros (P=0.0001) e corrigida para 4% de gordura (P=0.0008) apresentaram efeito significativo, Tabela 3.

Segundo BUTLER (2001) a ingestão excessiva de proteína degradável no rúmen resulta na elevação dos níveis plasmáticos e teciduais de amônia, ureia e outros compostos nitrogenados, considerando-se que a maior parte da amônia absorvida no trato digestivo é convertida a ureia pelo fígado, sendo responsável pelo aumento nos níveis circulantes no

sangue e pelo aumento na excreção urinária ou no leite. Neste estudo, a inclusão de 10% glicerina bruta na MS da dieta apresentou diferença significativa para o nitrogênio ureico no leite ($P=0.0452$), esta redução na excreção no leite pode estar relacionada ao efeito da glicerina bruta em incrementar diretamente a oferta de energia metabolizável aos animais e, indiretamente, em potencializar o crescimento microbiano ruminal e a digestibilidade da fibra, porém não houve efeito significativo para ureia no sangue ($P=0.3648$) e ureia na urina ($P=0.3716$), Tabela 4. Sendo que o grupo tratado com glicerina bruta na dieta manteve o nível de nitrogênio ureico no leite cerca de dois pontos percentuais abaixo do nível do grupo não tratado.

Após administração, via oral, da glicerina bruta misturada à dieta dos animais ao chegar ao rúmen, tem o glicerol de sua composição convertido principalmente a ácido propiônico, após ser fermentado, segundo GARTON et al. (1961). O propionato ao ser absorvido pela corrente sanguínea é metabolizado no fígado, que será utilizado para a formação de glicose na via gliconeogênica (ZAWADSKI et al., 2010). Já o glicerol que for absorvido pelo epitélio ruminal, será convertido à glicose no fígado (KREHBIEL, 2008). Sendo que o glicerol também exerce efeito positivo sobre a retenção de aminoácidos ou nitrogênio (CERRATE et al., 2006), age inibindo a atividade das enzimas fosfoenolpiruvato carboxiquinase e glutamato desidrogenase e resulta em economia dos aminoácidos gliconeogênicos, o que aumenta a quantidade de amônia disponível no líquido ruminal para o desenvolvimento da flora microbiana no rúmen.

Sendo assim, neste caso a amônia liberada no líquido ruminal, oriunda da degradação dos compostos nitrogenados do azevém, juntamente com o fornecimento adequado de energia, via glicerina bruta, provavelmente foi utilizada na síntese proteica dos microrganismos ruminais o que acarretou em menor liberação de ureia no leite.

AVILA-STAGNO et al. (2014), trabalhando com inclusão de glicerina até 15% na MS em dietas à base de forragens, encontraram o aumento do propionato seguido do aumento do butirato. O uso da glicerina bruta pode disponibilizar elevada quantidade de componentes gliconeogênicos devido a maior conversão em propionato e, assim, aumentar a disponibilidade de carbonos que podem ser utilizados na síntese de ácidos graxos (VERSEMANN et al., 2008), causando alterações na produção de leite. Observou-se aumento significativo sobre os níveis de glicose sanguínea ($P=0.0283$) quando incluída glicerina bruta na dieta, porém para produção em litros ($P=0.7051$) e corrigida para 4% de gordura ($P=0.7051$) e para glicose na urina ($P=0.2692$) não houve efeito significativo, Tabela 4.

PYATT et al. (2007) relataram que dietas que possuem até 10% de glicerina bruta na MS podem gerar efeitos positivos sobre a eficiência alimentar. Os autores observaram aumento de 19% na eficiência alimentar de bovinos que receberam glicerina bruta. Neste estudo a falta de efeito da inclusão de glicerina bruta, na sobra de alimentos no cocho, ($P=0.8789$, Tabela 4), está de acordo com a hipótese de EDWARDS et al. (2012), fundamentados em estudos in vitro, reportaram que a suplementação com glicerina purificada de 8 a 15% na MS da dieta não afeta a digestibilidade da MS no rúmen, sendo que neste caso a inclusão de glicerina bruta possivelmente não acarretou em mudança no ambiente ruminal ao ponto de ter prejudicado o consumo de alimento dos animais.

De acordo com GONZÁLEZ et al. (2000) o aumento da ingestão de energia pode influir inversamente na concentração de amônia ruminal devido ao aumento da síntese proteica microbiana, o que reduz também a ureia circulante no organismo do animal e excretada. E ainda segundo DePETERS e FERGUNSON (1992) os valores de nitrogênio ureico no leite estão fortemente correlacionados à concentração de ureia no plasma. A ureia devido ao seu baixo peso molecular difunde-se igualmente pelos fluídos orgânicos, incluindo o leite na glândula mamária (FERGUSON e CHALUPA, 1989). O nível no leite é utilizado para

monitorar o metabolismo protéico em vacas lactantes (BUTLER, 1998). Estudos confirmam que a excreção urinária de nitrogênio tem correlação linear e positiva com os teores no sangue e leite (KAUFFMAN e ST-PIERRE, 2001). Este estudo confirmou a correlação linear positiva entre ureia sanguínea, ureia urinária e nitrogênio ureico no leite (Tabela 5), tanto no grupo com quanto no sem adição de glicerina bruta. O nitrogênio ureico no leite é um indicativo da adequação ou excesso de amônia ruminal em relação à energia disponível para o crescimento microbiano no rúmen. Alta quantidade de proteína disponível no rúmen (degradável/solúvel) em relação à quantidade de carboidratos disponíveis resulta em altos níveis de nitrogênio ureico no leite. Sendo que quando não se adicionou glicerina bruta na dieta dos animais não houve efeito de correlação significativa entre os níveis de ureia no leite e de glicose sanguínea. Demonstrando assim o potencial quando adicionado glicerina bruta a dieta em aumentar a glicose sanguínea e reduzir o nitrogênio ureico ($r = -0.9695$), Tabela 5.

2.1.5 Conclusões

A inclusão de 10% de glicerina bruta na MS de vacas holandesas, em lactação, em pastejo de azevém, reduz a eliminação de ureia via leite e aumenta os níveis sanguíneos de glicose, não tendo efeito sobre a produção de leite e consumo de alimento dos animais, sendo recomendada sua utilização na dieta.

Agradecimentos:

CNPq, UFSM, UNIJUÍ, 3 Tentos Agroindustrial S/A, Bioclin[®]

2.1.6 Referências

- Abo El-Nor, S.; Abughazaleh, A. A.; Potu, R. B.; Hastings, D. e Khattab, M. S. A. 2010. Effects of differing levels of glycerol on rumen fermentation and bacteria. *Animal Feed Science and Technology* 162:99-105.
- Almeida, R. 2012. Nitrogênio Ureico no Leite como Ferramenta para Ajuste de Dieta. *Revista Leite Integral* 43:8-12.
- AOAC - Association of Oficial Analytical Chemistry. 1990. *Oficial methods of analysis*. 15th ed. AOAC International, Arlington, VA.

- Arias, J. e Alonso, A. N. 1997. Importância dos níveis de nitrogênio ureico no leite e no sangue de vacas leiteiras. *Latin América Animal Science Meeting* 73-84.
- Avila-Stagno, J.; Chaves, A. V.; He, M. L.; Harstad, O. M.; Beauchemin, K. A.; Mcginn, S. M. e Mcallister, T. A. 2013. Effects of increasing concentrations of glycerol in concentrate diets on nutrient digestibility, methane emissions, growth, fatty acid profiles and carcass traits of lambs. *Journal of Animal Science* 91: 829-837.
- Berchielli, T. T.; Pires, A. V. e Oliveira, S. G. 2006. *Nutrição de Ruminantes*. Funep, Jaboticabal.
- Butler, W. R. 2001. Nutritional effects on resumption of ovarian cyclicity and conception rate in postpartum dairy cows. *Animal Science* 26:133-145.
- Butler, W. R.; Calaman, J. J. e Beam, S. W. 1996. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. *Journal of Animal Science* 74:858-65.
- Butler, W. R. 1998. Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 81,9:2533-2539.
- Cerrate, S.; Yan, F.; Wang, Z.; Coto, C.; Sacakli, P. e Waldroup, P.W. 2006. Evaluation of glicerine from biodiesel production as a feed ingredient for broilers. *International Journal Poul. Science* 5:1001-1007.
- Confortin, A. C. C., Quadros, F. L. F., Rocha, M. G., Kuinchtner, B. C., Glienke, C. L., Camargo, D. G. e Machado, J. M. 2009. Fluxo de tecido foliar em azevém anual manejado sob três intensidades de pastejo. *Ciência Rural*, 39:1193-1199.
- Cooper, G. e Weber, J. A. 2012. An outlook on world biofuel production and its implications for the animal feed. . p. 1-12. In: H. P. S. Makkar. *Biofuel co-products as livestock feed - Opportunities and challenges*. Rome.
- Depeters, E. J e Ferguson, J. D. Nonprotein nitrogen and protein distribution in the milk of cows. *Journal of Dairy Science*, v.75, p.3192-3209, 1992.
- Edwards, H. D.; Anderson, R. C.; Miller, R. K.; Taylor, T. M.; Hardin, M. D.; Smith, S. B.; Krueger, N. A. e Nisbet, D. J. 2012. Glycerol inhibition of ruminal lipolysis in vitro. *Journal of Dairy Science* 95,9:5176-5181.
- Ferguson, J. D. e Chalupa, W. 1989. Impact of protein nutrition on reproduction in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 72, 3:747-66.
- Ferguson, J. D.; Galligan D. T.; Blanchard T. e Reeves M. 1993. Serum urea nitrogen and conception rate: The usefulness of test information. *Journal of Dairy Science* 76:3742-3746.
- Fernandes, S. R.; de Freitas J. A; de Souza D. F.; Kowalski L. H.; Dittrich R. L.; Junior P. R. e da Silva C. J. A. 2012. Lipidograma como ferramenta na avaliação do metabolismo energético em ruminantes. *Revista Brasileira de Agrociência*, 8,1:21-32.
- Garton, G. A.; Louch, A. K. e Vioque, E. 1961. Glyceride hydrolysis and glycerol fermentation by sheep rumen contents. *Journal of General Microbiology* 25:215-225.
- González, F. H., Barcellos, J., Patiño, H. O. e Ribeiro, L. A. 2000. Perfil metabólico em ruminantes. Seu uso em nutrição e doenças nutricionais. p.106. ed. Editora UFRGS, Porto Alegre.
- González, F. H. D e Silva, S. C. 2008. *Patologia clínica veterinária: texto introdutório*. p. 79-98. Editora UFRGS, Porto Alegre.
- Johnson, R. G. e Young, A. J. 2003. The association between milk urea nitrogen and DHI production variables in Western commercial dairy herds. *Journal of Dairy Science* 86:3008-3015.
- Jonker, J. S.; Kohn, R. A. e Erdman, R. A. 1998. Using milk urea nitrogen to predict nitrogen excretion and utilization efficiency in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 81:2681-2692.

- Kaneko, J. J.; Harvey, J. W. e Bruss, M.L. 1997. Clinical biochemistry of domestic animals. 5th ed. Academic Press, New York.
- Kauffman, A. J. e St-Pierre, N. R. 2001. The relationship of milk urea nitrogen to urine nitrogen excretion in Holstein and Jersey Cows. *Journal of Dairy Science*, 84:2284-2294.
- Krehbiel, C. R. 2008. Ruminal and physiological metabolism of glycerin. *Journal of Animal Science*, 86:392.
- Krueger, N. A.; Anderson, R. C.; Tedeschi, L. O.; Callaway, T. R.; Edrington, T. S. e Nisbet, D. J. 2010. Evaluation of feeding glycerol on free-fatty acid production and fermentation kinetics of mixed ruminal microbes in vitro. *Bioresource Technology*, Barking. 101,21: 8469-8472.
- Lee, S. Y.; Lee, S. M.; Cho, Y. B.; Kam, D. K.; Lee, S. C.; Kim, C. H. e Seo, S. 2011. Glycerol as a feed supplement for ruminants: In vitro fermentation characteristics and methane production. *Animal Feed Science and Technology*, 166:269-274.
- Mertens, D. R. 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: a collaborative study. *Journal of AOAC International* 85:1217-1240.
- Meyer, P. M.; Machado, P. F.; Coldebella, A. Cassoli L. D.; Coelho K. O. e Rodrigues P. H. M. 2006. Fatores não-nutricionais e concentração de nitrogênio ureico no leite de vacas da raça Holandesa. *Revista Brasileira de Zootecnia* 35:1114-1121.
- Mittelmenn, A.; Kopp, M. M.; Pilon, M.; Fae, G. S.; Fontanelli, R. S.; Bender, S. E. 2014. Planejamento forrageiro - cultivares Embrapa. In: *Tecnologias para produção de leite na agricultura familiar*. Pelotas: Embrapa Clima Temperado,17.
- National Research Council - NRC. 2001. Nutrients requirements of the dairy cattle. 7.ed. Washington
- Orotolani, E. 2002. Diagnóstico de doenças nutricionais e metabólicas por meio de exame de urina em ruminantes. In: 29º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. Gramado.
- Pyatt, N. A.; Doane, P. H. e Cecava, M. J. 2007. Effect of crude glycerin in finishing cattle diets. *Journal of Animal Science* 85:409-412.
- Senger, C. C. D.; Kozloski, G. V.; Sanchez L. M. B.; Mesquita F. R.; Alves T. P. e Castagnino D.S. 2008. Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology*, 146:169-174.
- Torrent, J. 2000. Nitrogênio ureico no leite e qualidade do leite. p. 98. In: *Simpósio internacional sobre qualidade do leite*, Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa, Curitiba.
- Versemann, B. A.; Wiegand, B. R.; Kerley, M. S.; Porter, J. H.; Roberts, K. S. e Evans, H. L. 2008. Dietary inclusion of crude glycerol changes beef steer growth performance and intramuscular fat deposition. *Journal of Animal Science* 86,2:478.
- Zawadski, F.; Valero, M. V. e Prado, I. V. 2010. Uso de aditivos na dieta de bovinos de corte. In: Prado, I. N. (Organizador). *Produção de Bovinos de Corte e Qualidade da Carne*. Eduem, Maringá.

Tabela 1- Resultados das análises bromatológicas dos três períodos experimentais, para pastagem de azevém, silagem de milho e concentrado.

Período	Itens	Alimentos		
		Pastagem de Azevém	Silagem de Milho	Concentrado
1	MS%	9.24	23.43	83.50
	MM% na MS	15.54	4.62	10.83
	MO% na MS	84.46	95.38	89.17
	PB% na MS	31.81	7.49	17.05
	FDN% na MS	50.87	59.98	-
	FDA% na MS	43.93	51.84	-
	EE% na MS	5.45	4.21	4.16
	FB% na MS	-	-	8.56
2	MS%	13.70	23.43	83.50
	MM% na MS	13.25	4.62	10.83
	MO% na MS	86.75	95.38	89.17
	PB% na MS	21.95	7.49	17.05
	FDN% na MS	58.45	59.98	-
	FDA% na MS	38.51	51.84	-
	EE% na MS	3.46	4.21	4.16
	FB% na MS	-	-	8.56
3	MS%	10.27	23.43	83.50
	MM% na MS	14.34	4.62	10.83
	MO% na MS	85.66	95.38	89.17
	PB% na MS	28.88	7.49	17.05
	FDN% na MS	54.00	59.98	-
	FDA% na MS	43.28	51.84	-
	EE% na MS	3.83	4.21	4.16
	FB% na MS	-	-	8.56

*MS= matéria seca, MM= matéria mineral, MO=matéria orgânica, PB=Proteína Bruta, FDN=Fibra em detergente neutro, FDA= Fibra em detergente ácido, EE=Extrato Etéreo, FB= Fibra Bruta

Tabela 2- Resultados das análises para composição nutricional da dieta dos períodos experimentais (% MS).

Período	Itens	Dieta	
		Com Glicerina bruta	Sem Glicerina bruta
1	MS%	18.40	17.00
	CNF% na MS	35.70	29.40
	CHO Fem.% na MS	43.70	41.70
	PB% na MS	20.44	22.71
	FDN% na MS	18.10	20.50
	EE% na MS	4.60	5.10
	FS% na MS	8.80	2.10
2	MS%	24.80	23.00
	CNF% na MS	35.70	29.40
	CHO Fem.% na MS	45.50	43.70
	PB% na MS	16.56	18.41
	FDN% na MS	19.90	22.60
	EE% na MS	3.80	4.20
	FS% na MS	8.80	2.10
3	MS%	20.00	18.50
	CNF% na MS	35.70	29.40
	CHO Fem.% na MS	44.40	42.50
	PB% na MS	19.28	21.43
	FDN% na MS	18.80	21.30
	EE% na MS	4.00	4.40
	FS% na MS	8.80	2.10

*MS= matéria seca, CNF= carboidratos não fibrosos, CHO Fem.= carboidratos fermentáveis, PB=Proteína Bruta, FDN=Fibra em detergente neutro, EE=Extrato Etéreo, FB= Fibra Bruta

Tabela 3- Valores médios para perfil metabólico e produção de leite, de vacas holandesas, em diferentes períodos da lactação.

Variáveis	60- 120 (dias)	121-200 (dias)	201-320 (dias)	Valor de P	CV (%)
Ureia Sangue (mg dL ⁻¹)	51 ^a	54 ^a	56 ^a	0.6473	23.95
Ureia Urina (mg dL ⁻¹)	162 ^a	176 ^a	195 ^a	0.6158	52.03
Nitrogênio Ureico no leite (mg dL ⁻¹)	21 ^a	22 ^a	23 ^a	0.6782	23.91
Glicose Sangue (mg dL ⁻¹)	68 ^a	66 ^a	61 ^a	0.1009	11.47
Glicose Urina (mg dL ⁻¹)	18 ^a	14 ^a	12 ^a	0.8328	172.82
Produção (litros dia ⁻¹)	36 ^a	28 ^b	26 ^c	0.0001	15.62
Produção (corrigida a 4% gordura)	30 ^a	25 ^b	24 ^c	0.0008	17.26

*Letras diferentes na mesma linha são significativas para P<0.05, Test Tukey.

Tabela 4- Valores médios de ureia (sangue, leite e urina), glicose (sangue, urina) e da produção leiteira e sobras de alimento no cocho, em diferentes períodos de lactação, de vacas holandesas, tratadas com dieta acrescida ou não de 10% de glicerina bruta na Matéria Seca total.

Dias em lactação	Com Glicerina Bruta	Sem Glicerina Bruta	Valor de P	CV (%)
Ureia Sangue (mg dL⁻¹)				
60 a 120	49	52		
121 a 200	51	56		
201 a 320	53	58		
Média e Desvio Padrão	51^a ± 14	55^a ± 12	0.3648	23.95
Ureia Urina (mg dL⁻¹)				
60 a 120	157	166		
121 a 200	166	186		
201 a 320	167	223		
Média e Desvio Padrão	163^a ± 88	192^a ± 94	0.3716	52.03
Nitrogênio Ureico no leite (mg dL⁻¹)				
60 a 120	20.28	21.79		
121 a 200	21.47	23.51		
201 a 320	22.64	23.43		
Média e Desvio Padrão	21^b ± 5	23^a ± 6	0.0452	23.91
Glicose Sangue (mg dL⁻¹)				
60 a 120	71	64		
121 a 200	69	63		
201 a 320	64	58		
Média e Desvio Padrão	68^a ± 5	62^b ± 9	0.0283	11.47
Glicose Urina (mg dL⁻¹)				
60 a 120	24	12		
121 a 200	18	10		
201 a 320	15	9		
Média e Desvio Padrão	19^a ± 24	10^a ± 22	0.2692	172.82
Produção de leite (litros dia⁻¹)				
60 a 120	36	36		
121 a 200	28	27		
201 a 320	27	25		
Média e Desvio Padrão	30^a ± 6	29^a ± 7	0.6187	15.62
Produção de leite (corrigida para 4% gordura)				
60 a 120	30	29		
121 a 200	25	24		
201 a 320	24	23		
Média e Desvio Padrão	26^a ± 8	25^a ± 9	0.7051	17.26
Sobras (gramas)				
60 a 120	561	506		
121 a 200	440	427		
201 a 320	548	577		
Média e Desvio Padrão	516^a ± 263	503^a ± 306	0.8789	55.95

Letras diferentes na mesma linha são significativas para P<0.05 para a inclusão de glicerina bruta, Test Tukey.

Tabela 5- Correlações entre ureia sanguínea (mg dL^{-1}), ureia urinária (mg dL^{-1}), nitrogênio ureico no leite (mg dL^{-1}), glicose sanguínea (mg dL^{-1}), glicose urinária (mg dL^{-1}) e produção de leite (litros/dia) de vacas holandesas e sobras de alimento no cocho (g/dia) em dietas com inclusão de glicerina bruta e sem inclusão de glicerina bruta.

Com Glicerina Bruta						
Variáveis	Ureia sanguínea	Ureia urinária	Nitrogênio ureico leite	Glicose sanguínea	Glicose urinária	Produção de leite
Ureia sanguínea	-	-	-	-	-	-
Ureia urinária	0.9078	-	-	-	-	-
Nitrogênio ureico leite	1.0000	0.9099	-	-	-	-
Glicose sanguínea	-0.9707	-0.7805	-0.9695	-	-	-
Glicose urinária	-0.9820	-0.9707	-0.9829	0.9078	-	-
Produção de leite	-0.9122	-0.9999	-0.9142	0.7871	0.9732	-
Sobras	-0.0979	-0.5061	-0.1027	-0.1440	0.2842	0.4969
Sem Glicerina Bruta						
Variáveis	Ureia sanguínea	Ureia urinária	Nitrogênio ureico leite	Glicose sanguínea	Glicose urinária	Produção de leite
Ureia sanguínea	-	-	-	-	-	-
Ureia urinária	0.9357	-	-	-	-	-
Nitrogênio ureico leite	0.9306	0.7416	-	-	-	-
Glicose sanguínea	-0.8486	-0.9807	-0.5960	-	-	-
Glicose urinária	-1.0000	-0.9357	-0.9306	0.8486	-	-
Produção de leite	-0.9869	-0.8665	-0.9775	0.7521	0.9869	-
Sobras	0.2981	0.6157	-0.0719	-0.7580	-0.2981	-0.1403

3 ARTIGO 2

Journal of Dairy Research

3.1 COMPOSIÇÃO E PRODUTIVIDADE DO LEITE DE VACAS DA RAÇA HOLANDESA EM PASTEJO COM AZEVÉM E INCLUSÃO DE GLICERINA BRUTA À DIETA

3.1.1 Resumo

Com o objetivo de avaliar o efeito da inclusão de glicerina bruta na dieta, de vacas em lactação, sobre a composição e produção de leite, conforme o período de lactação, um experimento foi conduzido com dezoito vacas da raça holandesa, divididas entre os tratamentos: 1) Dieta basal sem adição de glicerina bruta, 2) Dieta com adição de 10% de glicerina bruta na Matéria Seca. O período experimental teve duração de 56 dias, dividido em quatro períodos de 14 dias, sendo o primeiro apenas para padronização da dieta. Posteriormente, uma sequência de três períodos, de 14 dias cada um, em reversão simples. Amostras de leite individuais foram coletadas para fins de análise do percentual de Gordura, Proteína, Lactose, Sólidos Totais e Contagem de Células Somáticas (Céls mL⁻¹), bem como avaliou-se a produção de leite (litros dia⁻¹ e corrigida para 4% de gordura). Amostras da dieta dos animais foram encaminhadas para análises bromatológicas. Os dados foram compilados e avaliou-se o efeito da adição de glicerina bruta sobre a composição do leite e produção sobre as variáveis e a inter-relação com o tratamento. Conclui-se que a adição de glicerina bruta na dieta não apresentou efeito significativo sobre a produção e composição do leite de vacas da raça holandesa.

Palavras-chave: Azevém, Bovinos, Glicerol, Nutrição.

3.1.2 Introdução

O incremento da produção de leite em volume e composição é dependente da utilização de forragens de excelente valor nutritivo (Ribeiro Filho *et al.*, 2009). Neste contexto, o azevém-anual (*Lolium multiflorum Lam.*), forragem de elevado teor proteico, tem sido amplamente utilizado durante a estação fria na Região Sul do Brasil.

Porém, destaca-se que para vacas em lactação é necessário equilibrar a oferta entre proteína e energia na dieta. Sendo assim, cresceu o interesse pela inclusão de subprodutos energéticos na dieta de vacas em lactação, visando este equilíbrio, utilizando fontes alternativas de baixo custo, principalmente quando submetemos os animais ao pastejo em gramíneas como azevém, o que é visto comumente no sul do Brasil.

Dentro deste contexto destaca-se um subproduto da indústria de Biodiesel, denominado glicerina bruta, que possui baixo custo e tem elevado valor energético para ruminantes, pois o principal componente da mesma é o glicerol, o qual os ruminantes têm a capacidade de utilizar como precursor gliconeogênico (Chung *et al.*, 2007). Atualmente, há disponibilidade de glicerina bruta no mercado devido ao aumento da produção de Biodiesel das indústrias brasileiras (Brasil, 2016). A utilização de glicerina bruta na alimentação animal está permitida no Brasil desde 2010. Contudo, as pesquisas com glicerina para vacas leiteiras focaram, inicialmente, na sua utilização estratégica como forma de prevenção de distúrbios metabólicos associados ao período de transição, com bons resultados e pouco avançaram com animais em pastejo.

Segundo Krehbiel (2008) a maior parte do glicerol, contido na glicerina bruta sofre fermentação por microrganismos ruminais, proporcionando elevados níveis de produção de ácidos graxos voláteis no rúmen, principalmente propionato e butirato, que serão por sua vez, metabolizados no fígado a oxaloacetato, por meio do ciclo de Krebs, podendo ser utilizado para formar glicose pela via gliconeogênica. Uma pequena quantidade do glicerol apenas é absorvida diretamente pela parede do rúmen, neste caso o glicerol é metabolizado no fígado e direcionado para a gliconeogênese pela ação da enzima glicerol quinase, que o converte em glicose (Boyd *et al.*, 2009).

Devido a este aumento no aporte energético de produção de glicose, a inclusão de glicerina bruta apresenta também potencial de alterar a composição do leite, uma vez que a glicose chega a células secretoras de leite na glândula mamária a maioria (60-70%) é usada na síntese de lactose, e o restante estimula a síntese de proteína, ou pode ser utilizada como fonte de glicerol para formação de gordura e como precursora na síntese de gordura. A secreção de lactose no lúmen alveolar causa a entrada de água, exercendo importante controle no volume de leite.

Estudos mostraram que a utilização da glicerina também causa diminuição na atividade celulolítica no rúmen, segundo Roger *et al.* (1992) e Paggi *et al.* (2004), por meio da inibição do crescimento de microrganismos, como *Ruminococcus flavefaciens* e *Fibrobacter succinogenes*. Essa inibição pode ocorrer devido a queda do pH (Rémond *et al.*, 1993). Ramos & Kerley (2012), também encontraram redução linear no pH ruminal quando promoveram a substituição do milho pela glicerina bruta na dieta de bovinos em teores de 0% a 20% na MS. Esta redução no pH ruminal, acarreta em acidose metabólica, com potencial de inversão do perfil de gordura e proteína no leite (Berchielli *et al.*, 2006), o que precisa ser

esclarecido em relação a animais em pastejo com inclusão de glicerina bruta se ocorre também.

Diante do exposto e devido à escassez de dados que revelem o efeito da inclusão de glicerina bruta à dieta de vacas sobre a composição e produtividade de leite, objetivou-se avaliar o efeito da inclusão de 10% de glicerina bruta na matéria seca da dieta total, de vacas em lactação, em pastejo em azevém.

3.1.3 Material e Métodos

O ensaio experimental foi conduzido no Instituto Regional de Desenvolvimento Rural (IRDeR) da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ), localizado no município de Augusto Pestana no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, no período de julho a agosto de 2015.

O protocolo de pesquisa (n.09/2014, parecer: 019/2014) seguiu as diretrizes recomendadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul. Dezoito vacas da raça holandesa em lactação (600 ± 50 kg de peso corporal (PC), Dias em lactação (DEL) > 60 dias) foram divididas entre os tratamentos: 1) Dieta basal sem adição de glicerina bruta, 2) Dieta com adição de 10% de glicerina bruta na Matéria Seca (MS) total da dieta. O período experimental teve duração de 56 dias, dividido em quatro períodos de 14 dias, sendo que, no primeiro período experimental todas as vacas receberam a mesma dieta para padronização (denominado período de adaptação). Posteriormente, foi atribuído aleatoriamente às vacas em pares, por DEL (de 60 a 120 dias, 121 a 200 dias e 201 a 320 dias) e produção de leite similar, em uma sequência de três períodos (1, 2 e 3), em reversão simples (*Cross-over*).

No início do período de adaptação todos os animais foram avaliados, sendo que apenas animais sadios ao exame clínico e ginecológico foram incluídos no experimento.

As vacas foram mantidas em pastagem de Azevém (*Lolium multiflorum* Lam.), cultivar Bar HQ®, tetraploide, sob pastejo rotacionado, em um único rebanho na área experimental, manejadas de forma a proporcionar uma oferta mínima de matéria seca de 25 kg/animal/dia. A área total de pastagem (20 ha) foi dividida em 11 piquetes com tamanho médio de 1,8 ha. Os animais permaneciam em média dois dias e duas noites em cada piquete, cada piquete ficava em descanso em média 20 dias. Em relação à adubação na base foram aplicados 200 kg ha⁻¹ (5-20-20) 40 kg de P₂O₅ e K₂O e 77,5 kg de N, parcelados em 4 aplicações, sendo 10 kg ha⁻¹ na base e os demais divididos em 3 aplicações e em cobertura 150 kg ha⁻¹ de ureia, em três aplicações, distribuídas ao longo do período experimental.

As vacas de cada tratamento foram submetidas às mesmas condições de manejo e alimentação, pastejo em azevém no intervalo entre ordenhas e oferta de concentrado (conforme produção de leite) mais a oferta de 10 kg de silagem de milho por dia, diferindo apenas entre os tratamentos a inclusão de 10 % ou não de glicerina bruta. Todos os animais foram pesados, em balança, no início de cada período experimental, para determinar o consumo de glicerina bruta diária, com base em 3% de consumo de matéria seca mediante o peso vivo.

O concentrado utilizado foi comercial peletizado com 17% de proteína bruta, que detinha na sua composição básica farelo de soja, como fonte proteica, milho moído e farelo de arroz como fonte de alimentos energéticos. A quantidade de concentrado fornecido para cada animal foi alterada sempre que necessário e seguiu, como critério prático, o fornecimento de 1kg de concentrado para cada 5 litros de leite produzidos por vaca dia⁻¹. Os animais foram ordenhados mecanicamente duas vezes ao dia, às 7hs e 17hs, e receberam o alimento concentrado em canzins individuais, com cochos separados, logo após a ordenha no período da manhã e antes da ordenha no período da tarde. Durante o tempo restante, os animais permaneceram nas áreas de pastagens, com livre acesso à água potável.

A glicerina bruta utilizada se apresentava líquida, de textura oleosa e coloração amarelo escura, produzida com matéria prima de 100% de soja, com 80% de teor de glicerol mínimo, 12% de água, 2% de metanol, 3% de cinzas, 2% de matéria orgânica e 1% de cloreto de sódio, comercializada pela empresa Três Tentos Agroindustrial S/A de Ijuí, Rio Grande do Sul, Brasil.

As coletas de amostra da forragem foram coletadas por simulação de pastejo na entrada de cada piquete durante o experimento, sendo realizada posteriormente uma amostra composta para cada período. As amostras foram mantidas congeladas até serem encaminhadas ao laboratório para análise. Amostras da silagem de milho e do concentrado foram coletadas a cada período também. Nas amostras dos alimentos foram avaliados os teores de matéria seca, matéria mineral, matéria orgânica, proteína bruta, fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido, extrato etéreo e fibra bruta de todos os componentes da dieta. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Bromatologia da Universidade do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ), Tabela 1. A análise da dieta referente a cada período experimento com e sem glicerina bruta encontra-se detalhada na Tabela 2.

O material verde foi seco em estufa com circulação forçada de ar (55°C) até peso constante, moído (peneira de um mm) e armazenado para posterior análise. Os teores de matéria seca (MS) das amostras de alimentos foram determinados por secagem em estufa a

105°C até peso constante. O conteúdo de cinzas foi determinado por combustão a 600°C durante 4 horas e a matéria orgânica (MO) por diferença de massa. O nitrogênio total (N) das amostras de alimentos foi determinado pelo método Kjeldahl (MÉTODO 984.13; AOAC, 1997) e determinada proteína bruta e fibra bruta. A análise de fibra em detergente neutro (FDN) foi baseada nos procedimentos descritos por Mertens (2002) com uso de α -amilase termoestável, exceto que as amostras foram pesadas dentro de sacos filtro de poliéster (porosidade de 16 μ m) e tratadas com detergente neutro em autoclave a 110°C por 40 minutos (Senger *et al.*, 2008). As concentrações de fibra em detergente ácido (FDA) em detergente ácido (LDA) foram analisadas de acordo com o Método 973.18 da AOAC (1997), exceto que as amostras foram pesadas dentro de sacos filtro de poliéster (porosidade de 16 μ m) e tratadas com detergente ácido em autoclave a 110°C por 40 minutos (Senger *et al.*, 2008). Os teores de extrato etéreo (EE) foram obtidos por extração com éter etílico em um sistema de refluxo a 180°C durante 2 horas. Após a alimentação no canzil as sobras de alimentos no cocho foram pesadas e os dados compilados, formando uma média de sobras ao final de cada período, por animal.

Dois dias ao final de cada período experimental, uma alíquota (aproximadamente 40 mL) de leite de cada animal de ambas as ordenhas (manhã e tarde) foi coletada e acondicionada em frasco contendo conservante Bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanodiol). Os frascos com as amostras foram identificados com o número do animal e enviados ao Laboratório da Universidade de Passo Fundo (UPF) Serviço de Análise de Rebanhos Leiteiros (SARLE), para fins de análise do percentual de Gordura, Proteína, Lactose, Sólidos Totais e Contagem de Células Somáticas (Céls mL⁻¹). Sendo que a composição do leite foi analisada pelo método infravermelho e a contagem de células somáticas por citometria de fluxo.

A produção de leite (litros dia⁻¹) foi analisada nos últimos seis dias de cada período experimental, através da mensuração da produção das ordenhas da manhã e tarde, mediante pesagens do leite através de sistema semi automatizado de ordenha, após foi realizada uma média de produção por período experimental por animal. A produção de leite também foi analisada sendo corrigida para produção de 4% de gordura, conforme a fórmula: [(0,4) x (produção de leite) + 15 (produção de leite x % gordura/100)] (NRC, 2001).

As variáveis expressas como porcentagens (gordura, proteína, lactose e sólidos totais) foram transformadas pela aplicação do arco seno da raiz quadrada de seus valores percentuais e posteriormente analisadas (Markus, 1973). Os valores de contagem de células somáticas foram transformados pela aplicação do logaritmo base 10 e posteriormente analisados (Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1982). Embora a análise estatística tenha sido feita com os valores

transformados, os seus valores originais são apresentados nas tabelas que seguem, para facilitar a interpretação.

Os resultados referentes às variáveis da composição e produção de leite foram analisados utilizando o procedimento MIXED do SAS 9.2 (SAS Inst. Inc., Cary, NC). A inclusão de glicerina bruta foi considerada como efeito fixo e o bloco como efeito aleatório (bloqueando dias em lactação). Os resultados de cada animal foram incorporados à média dos grupos (tratado ou não). Os dados foram submetidos à análise de variância e o efeito de tratamento foi avaliado pelo teste de Tukey para dados pareados, os contrastes foram considerados significativos quando o valor de P foi <0.05 e tendência para $P<0.10$.

3.1.4 Resultados e Discussão

Ao avaliar a composição do leite, conforme o período de lactação, verificou-se aumento significativo da gordura ($P= 0.0024$), da proteína ($P=0.0242$), dos sólidos totais ($P=0.0164$) e da contagem de células somáticas ($P=0.0017$) proporcional ao aumento dos dias em lactação. Já a produção em litros ($P=0.0001$) e a produção corrigida para 4% de gordura ($P=0.0008$) do leite teve efeito significativo com maiores valores no início da lactação, Tabela 3.

Dentre os componentes do leite, o teor de gordura é o que pode variar mais facilmente em função da alimentação, de modo geral, diminuindo com o aumento no volume de produção, o que foi verificado neste estudo. Enquanto a gordura pode variar de 2 a 3 unidades percentuais, o teor de proteína do leite tem amplitude de variação bem menor, oscilando de 0,3 a 0,4% (Wittwer, 2000). Sendo que neste caso, observou-se desta mesma forma, conforme dados apresentados na Tabela 3.

A diferença significativa observada nos sólidos totais nos diferentes dias de lactação, era esperada, visto o efeito sobre a gordura e proteína do leite encontrado. Alterações no teor de gordura podem informar sobre a fermentação no rúmen, as condições de saúde da vaca e funcionamento do manejo alimentar. De acordo com o NRC (2001), numa situação anormal de fermentação, em decorrência de excesso de ácidos poli-insaturados na dieta, diminui certas atividades enzimáticas no úbere, com prejuízo na síntese de ácidos graxos com menos de 16 carbonos, tendo o ácido acético como principal precursor, e, em consequência, reduz o teor de gordura do leite.

O teor de lactose no leite não sofreu influência do período da lactação ($P=0.3611$, Tabela 3), o que era previsível, pois a lactose é o componente do leite que menos sofre alteração, tendo em vista seu importante papel osmótico no leite (Fonseca & Santos, 2000).

O aumento linear na produção de leite foi coerente com a redução dos dias em lactação, Tabela 3. Os dias em lactação não afetaram a produção de lactose mas houve influência dos dias em lactação sobre a contagem das células somáticas do leite, que aumentaram com o aumento dos dias em lactação. Esses resultados eram previsíveis, visto que ao final da lactação, verifica-se um acréscimo na CCS, devido a uma maior descamação natural do epitélio da glândula mamária (Monardes, 1994).

O aumento da proteína do leite concomitante ao aumento de células somáticas verificado neste estudo também foi observado por Carvalho *et al.* (2002). Esse aumento é decorrente não só da proteína celular, mas também da mudança na permeabilidade da membrana alveolar mamária, levando a aumento do influxo de lactalbumina e imunoglobulinas para o interior da glândula (Pereira *et al.*, 1999). Concomitantemente ao aumento das proteínas séricas do leite, ocorre a diminuição na caseína, pela sua degradação por proteases bacterianas e leucocitárias e pela diminuição de sua síntese, o que constitui efeito indesejável (Fonseca & Santos, 2000). Ribas *et al.* (2003) observaram que a proteína láctea comporta-se de modo inverso à produção de leite ao longo da lactação, ocorrendo elevação gradual até o final da lactação, corroborando os dados deste trabalho.

Já a maior produção de leite em litros dia⁻¹ e corrigida para 4% de gordura ocorreu no início da lactação, Tabela 3. A diminuição da produção ao final da lactação coincide com o aumento de células somáticas o que indica que vacas com processos inflamatórios mamários sofrem redução significativa na produção, coincidindo com os dados reportados por Carvalho *et al.* (2002).

Em relação a inclusão de glicerina bruta na dieta, os ruminantes tem a capacidade de utilizar o glicerol, principal componente da glicerina, como precursor gliconeogênico (Chung *et al.*, 2007) para a manutenção dos níveis plasmáticos de glicose, pois grande parte do glicerol, contido na dieta sofre fermentação por microrganismos ruminais, proporcionando elevados níveis de produção de ácidos graxos voláteis no rúmen, principalmente propionato e butirato, que serão utilizados como principais fontes de energia pelo animal (Boyd *et al.* 2009). Quando absorvido diretamente pela parede do rúmen, o glicerol é metabolizado no fígado e direcionado para a gliconeogênese pela ação da enzima glicerol quinase, que o converte em glicose. Parte do glicerol pode ser fermentado, a propionato, no rúmen, que, por sua vez, é metabolizado a oxaloacetato, por meio do ciclo de Krebs, no fígado, e pode ser utilizado para formar glicose pela via gliconeogênica (Krehbiel, 2008).

Apesar de apresentar este papel, neste estudo a inclusão de 10% de glicerina bruta na dieta não ocasionou efeito significativo para nenhuma variável resposta avaliada em relação à

composição do leite ou à produção de leite (Tabela 4). Apenas para contagem de células somáticas verificou-se tendência ($P=0.0640$) a aumentar quando incluída glicerina bruta à dieta dos animais, porém para esta variável o coeficiente de variação da análise foi elevado, o que sugere que mais estudos devem ser conduzidos para esclarecer este efeito, Tabela 4.

Estudos realizados por Fisher *et al.* (1973); DeFrain *et al.* (2004) e Ogborn (2006) também não verificaram efeitos significativos da inclusão de glicerina na composição do leite ou na produção de leite. DeFrain *et al.* (2004) relataram tendências para uma menor produção de gordura no leite quando incluída glicerina bruta, neste estudo não ocorreu esta tendência (Tabela 4).

Donkin *et al.* (2009), testando os tratamentos 0, 5, 10 e 15% de inclusão de glicerina na matéria seca das dietas, fornecendo como volumoso a silagem de milho, afirmaram que o glicerol é um substituto adequado para o grão de milho em rações para o gado leiteiro em lactação e que pode ser incluído em rações para um nível de até 15% da matéria seca, sem efeitos adversos sobre a produção de leite ou a composição do leite. Estas evidências estão de acordo com o encontrado neste trabalho, em que não houve redução da produção de leite ou alteração em sua composição, uma vez que, a inclusão de glicerol foi semelhante (10% na MS) apesar de avaliarmos em condição de pastejo acrescido à dieta a glicerina bruta. Khalili *et al.* (1997); DeFrain *et al.* (2004); Bodarski *et al.* (2005) testaram a inclusão de níveis menores de 10% na MS de glicerol e também não encontraram diferença significativa sobre a produção de leite.

3.1.5 Conclusões

A adição de 10% de glicerina bruta na MS da dieta total não afeta a produção nem a composição do leite de vacas da raça holandesa, em diferentes períodos de lactação.

Agradecimentos: CNPq, UFSM, UNIJUÍ, 3 Tentos Agroindustrial S/A, Bioclin[®]

3.1.6 Referências

- Berchielli, T. T.; Pires, A. V.; Oliveira, S. G. 2006. Nutrição de Ruminantes. Jaboticabal: Funep,
- Bodarski, R.; Odongo N. E.; Cant J. P.; Swanson, K. C.; McBride B. W. 2005. The change of metabolic status and lactational performance in dairy cows under feeding tmr with glycerin

- (glycerol) supplement at periparturient period. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Animal Husbandry*, v.8, p.1:9.
- Boyd, J.; West, J. W.; Bernard, J. K. 2009. Effects of increasing concentrations of dietary glycerol on ruminal environment and digestibility in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.92, p.1:88.
- Brasil. 2016. Agência Nacional do Petróleo – ANP. Gás Natural e Biocombustíveis. Boletim eletrônico.
- Carvalho, G. F.; Cunha, R. P. L.; Molina, L. R. et al. Milk yield, somatic cell count and physico-chemical characteristics of raw milk collected from dairy cows in Minas Gerais State. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE QUALIDADE DO LEITE E CONTROLE DA MASTITE, 2., 2002, Ribeirão Preto. Anais... Ribeirão Preto, 2002 (CD-ROM).
- Chung, Y. H.; Rico, D. E.; Martinez, C. M.; Cassidy, T.W.; Noiro, V.; Ames, A.; Varga, G. A. 2007. Effects of feeding dry glycerin to early postpartum Holstein dairy cows on lactational performance and metabolic profiles. *Journal of Dairy Science, Madison*, v.90, n.8, p.5682:5691.
- 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. *Journal of Dairy Science*, v.87, n.12, p.4195:4206.
- Donkin, S. S.; Koser, S. L.; White, H. M.; Doane, P. H. Cecava, M. J. 2009. Feeding value of glycerol as a replacement for corn grain in rations fed to lactating dairy cow. *Journal of Dairy Science*, v.92, n.10, p.5111:5119.
- 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. Journal Animal Science*. v.53, p.289:296.
- Fonseca, L. F. L.; Santos, M. V. 2000. Qualidade do leite e controle de mastite. p.17-26. Lemos Editorial, São Paulo
- Khalili, H., Varvikko, T., Toivonen, V., Hissa, K., Suvitie, M. 1997. The effects of added glycerol or unprotected free fatty acids or a combination of the two on silage intake, milk production, rumen fermentation and diet digestibility in cows given grass silage based diets. *Agric. Food Sci. Finl.* v.6, p.349:362.
- Krehbiel, C. R. 2008. Ruminal and physiological metabolism of glycerin. *Journal of Dairy Science*, v.86, n.4, p.345-360.
- Markus, R. 1973. Elementos da estatística aplicada. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Diretório Acadêmico Leopoldo Cortês, Porto Alegre.

- Mertens, D. R. 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: a collaborative study. *J. AOAC*, v.85, p.217-1240.
- Monardes, H. 1994. Somatic cell counting and Genetic Improvement of Resistance to Mastitis. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 31, 1994, Maringá. Anais....Maringá: UEM, p.1:19.
- Mühlbach, P. R. F. 2004. Produção e manejo de bovinos de leite. Porto Alegre: UFRGS, 119p.
- National Research Council - NRC. 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7.ed. DC: National Research Council. National Academic, Washington.
- Ng-Kwai-Hang, K. F., Hayes, J. F., Moxley, J. E., Monardes, H. G. 1982. Environmental influences on protein content and composition of bovine milk. *Journal of Dairy Science*, v.65, p.1993:1998.
- Ogborn, K. L. 2006. Effects of method of delivery of glycerol on performance and metabolism of dairy cows during the transition period. MS thesis. Cornell University, Ithaca, NY.
- Paggi, R. A.; Fay, J. P.; Faverin, C. In vitro ruminal digestibility of oat hay and cellulolytic activity in the presence of increasing concentrations of short-chain acids and glycerol. *Journal of Agriculture Science*, v.142, n.1, p.89:96.
- 2004.
- Pereira, A. R.; Prada e Silva, L.F.; Molon, L.K. et al. 1999. Efeito do nível de células somáticas sobre os constituintes do leite. I. Gordura e proteína. *Revista Brasileira de Pesquisa Veterinária e Ciência Animal*, v.36, p.121:124.
- Ramos, M. H.; Kerley, M. S. 2012. Effect of dietary crude glycerol level on ruminal fermentation in continuous culture and growth performance of beef calves. *Journal of Animal Science*, v. 90, n. 3, p. 892:899.
- Rémond, B., Souday, E.; Jouany, J. P. 1993. In vitro and in vivo fermentation of glycerol by rumen microbes. *Animal Feed Science and Technology*, v.41, p.121:132.
- Ribas, N. P.; Paula, M. C.; Andrade, U. V. C. et al. Sólidos totais em amostras de leite de tanques nos estados de Santa Catarina, Paraná e São Paulo. In: Brito, J. R.; Portugal, J. A. (Eds.) *Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos*. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2003. p.19:26.

- Ribeiro Filho, H. M. N.; Heydt, M. S.; Baade, E. A. S.; Thaler Neto, A. 2009. Consumo de forragem e produção de leite de vacas em pastagem de azevém-anual com duas ofertas de forragem. R. Bras. Zootec. vol.38, n.10, pp.2038-2044.
- 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. Current Microbiology, v. 25, n. 4, p. 197-201.
- SAS. Statistic Analysis System. User's Guide. Version 9.2. SAS Institute. Cary, NC. USA, 2000.
- Senger, C. C. D. et al. 2008. Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. Animal Feed Science and Technology, v. 146, p. 169-174.
- Van Soest, P. J.; Robertson, J. B.; Lewis, B. A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. Journal of Dairy Science, v.74, p.3583-3597.
- Wittwer, F. 2000. Diagnóstico dos desequilíbrios metabólicos de energia. In: Gonzalez, F. H. D.; Barcellos, J. O.; Ospina, H. et al. (Eds.) Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2000. p.9:22.

Tabela 1- Resultados das análises bromatológicas dos três períodos experimentais, para pastagem de azevém, silagem de milho e concentrado.

Período	Itens	Alimentos		
		Pastagem de Azevém	Silagem de Milho	Concentrado
1	MS%	9.24	23.43	83.50
	MM% na MS	15.54	4.62	10.83
	MO% na MS	84.46	95.38	89.17
	PB% na MS	31.81	7.49	17.05
	FDN% na MS	50.87	59.98	-
	FDA% na MS	43.93	51.84	-
	EE% na MS	5.45	4.21	4.16
	FB% na MS	-	-	8.56
2	MS%	13.70	23.43	83.50
	MM% na MS	13.25	4.62	10.83
	MO% na MS	86.75	95.38	89.17
	PB% na MS	21.95	7.49	17.05
	FDN% na MS	58.45	59.98	-
	FDA% na MS	38.51	51.84	-
	EE% na MS	3.46	4.21	4.16
	FB% na MS	-	-	8.56
3	MS%	10.27	23.43	83.50
	MM% na MS	14.34	4.62	10.83
	MO% na MS	85.66	95.38	89.17
	PB% na MS	28.88	7.49	17.05
	FDN% na MS	54.00	59.98	-
	FDA% na MS	43.28	51.84	-
	EE% na MS	3.83	4.21	4.16
	FB% na MS	-	-	8.56

*MS= matéria seca, MM= matéria mineral, MO=matéria orgânica, PB=Proteína Bruta, FDN=Fibra em detergente neutro, FDA= Fibra em detergente ácido, EE=Extrato Etéreo, FB= Fibra Bruta.

Tabela 2- Resultados das análises para composição nutricional da dieta dos períodos experimentais (% MS).

Período	Itens	Dieta	
		Com Glicerina bruta	Sem Glicerina bruta
1	MS%	18.40	17.00
	CNF% na MS	35.70	29.40
	CHO Fem.% na MS	43.70	41.70
	PB% na MS	20.44	22.71
	FDN% na MS	18.10	20.50
	EE% na MS	4.60	5.10
	FS% na MS	8.80	2.10
2	MS%	24.80	23.00
	CNF% na MS	35.70	29.40
	CHO Fem.% na MS	45.50	43.70
	PB% na MS	16.56	18.41
	FDN% na MS	19.90	22.60
	EE% na MS	3.80	4.20
	FS% na MS	8.80	2.10
3	MS%	20.00	18.50
	CNF% na MS	35.70	29.40
	CHO Fem.% na MS	44.40	42.50
	PB% na MS	19.28	21.43
	FDN% na MS	18.80	21.30
	EE% na MS	4.00	4.40
	FS% na MS	8.80	2.10

*MS= matéria seca, CNF= carboidratos não fibrosos, CHO Fem.= carboidratos fermentáveis, PB=Proteína Bruta, FDN=Fibra em detergente neutro, EE=Extrato Etéreo, FB= Fibra Bruta

Tabela 3- Valores médios de gordura, proteína, lactose, sólidos totais, contagem de células somáticas e produção de leite, de vacas holandesas, em diferentes períodos da lactação.

Variáveis	60-120 (dias)	121-200 (dias)	201-320 (dias)	Valor de P	CV (%)
Gordura (%)	2.72 ^c	3.17 ^b	3.27 ^a	0.0024	15.23
Proteína (%)	3.11 ^c	3.16 ^b	3.35 ^a	0.0242	8.39
Lactose (%)	4.62 ^a	4.57 ^a	4.54 ^a	0.3611	3.91
Sólidos Totais (%)	11.48 ^c	11.94 ^b	12.22 ^a	0.0164	6.25
Contagem de Células Somáticas (céls mL⁻¹)	151 ^c	314 ^b	395 ^a	0.0017	30.05
Produção de leite (litros dia⁻¹)	36 ^a	28 ^b	26 ^c	0.0001	15.62
Produção de leite (corrigida a 4% gordura)	30 ^a	25 ^b	24 ^c	0.0008	17.26

*Letras diferentes na mesma linha são significativas para P<0.05, Test Tukey.

Tabela 4- Valores médios de gordura, proteína e lactose, contagem de células somáticas e produção de leite, em diferentes períodos de lactação, de vacas holandesas tratadas com dieta acrescida ou não de 10% de glicerina bruta na Matéria Seca total.

Dias em lactação	Com Glicerina Bruta	Sem Glicerina Bruta	Valor de P	CV (%)
Gordura (%)				
60 a 120	2.80	2.63		
121 a 200	3.18	3.15		
201 a 320	3.21	3.32		
Média e Desvio Padrão	3.06^a ± 0.42	3.03^a ± 0.60	0.8027	15.23
Proteína (%)				
60 a 120	3.15	3.07		
121 a 200	3.16	3.16		
201 a 320	3.39	3.31		
Média e Desvio Padrão	3.23^a ± 0.29	3.18^a ± 0.27	0.5013	8.39
Lactose (%)				
60 a 120	4.59	4.65		
121 a 200	4.57	4.56		
201 a 320	4.55	4.52		
Média e Desvio Padrão	4.57^a ± 0.03	4.58^a ± 0.03	0.8681	3.91
Sólidos Totais (%)				
60 a 120	11.56	11.39		
121 a 200	11.95	11.92		
201 a 320	12.21	12.22		
Média e Desvio Padrão	11.91^a ± 0.65	11.84^a ± 0.93	0.7564	6.25
Contagem de Células Somáticas (cél/s mL⁻¹)				
60 a 120	181	120		
121 a 200	404	223		
201 a 320	453	336		
Média e Desvio Padrão	346^a ± 295	226^b ± 177	0.0640	30.05
Produção de leite (litros dia⁻¹)				
60 a 120	36	36		
121 a 200	28	27		
201 a 320	27	25		
Média e Desvio Padrão	30^a ± 6	29^a ± 7	0.6187	15.62
Produção de leite (corrigida para 4% de gordura)				
60 a 120	30	29		
121 a 200	25	24		
201 a 320	24	23		
Média e Desvio Padrão	26^a ± 8	25^a ± 9	0.7051	17.26

*Letras diferentes na mesma linha são significativas para P<0.05 e tendência para P<0.10, Test Tukey.

4 DISCUSSÃO

Estratégias que diminuam os custos de alimentação sem interferir negativamente na produção são constantemente pesquisadas. No sul do Brasil, durante o inverno, é comum a produção de ruminantes com nutrição a base de gramíneas de estação fria (C3) como o azevém e suplementação de concentrados. Porém, para vacas de alta produção é necessário equilibrar a dieta e para isto torna-se necessária a inclusão de um aditivo energético a dieta, sendo que neste caso estudou-se o efeito da inclusão de glicerina bruta como fonte de energia.

Uma das hipóteses do trabalho era que a glicerina bruta teria o potencial de aumentar a oferta de energia e proteína metabolizável em animais alimentados com pastagem de azevém. A glicerina bruta serviria de substrato energético (fonte de carbono) para bactérias ruminais, com potencial de aumentar o seu crescimento e síntese de proteína microbiana ruminal assim, conseqüentemente, a glicerina bruta aumentaria a captação de amônia, a síntese de proteína microbiana ruminal e o fluxo de aminoácidos para o intestino delgado, reduzindo a liberação de amônia para a corrente sanguínea. Dentro do rúmen, o glicerol pode seguir duas rotas metabólicas: absorção direta pelo epitélio da parede ruminal (RÉMOND et al., 1993) ou transformação em ácidos graxos voláteis (AGV) pelas bactérias ruminais (CZERKAWSKI e BRECKENRIDGE, 1972), principalmente o ácido propiônico. Após chegar ao fígado, através da corrente sanguínea, tanto o glicerol como o propionato são transformados em glicose por gluconeogênese. Por isso, maior aporte de glicose decorrente do consumo de glicerol pode resultar em melhoria do aporte energético dos animais ou em maior produção de leite nos casos em que o potencial produtivo é limitado pela quantidade de energia disponível para o animal.

Com base nos resultados, verificou-se, que vacas em lactação com a inclusão de 10% de glicerina bruta na MS total da dieta, em pastejo de azevém, reduziram à eliminação de ureia via leite e aumentaram os níveis sanguíneos de glicose, não havendo efeito deletério sobre a produção de leite e consumo de alimento dos animais. Segundo Chung et al. (2007) maior concentração de glicose sanguínea foi encontrada quando vacas foram alimentadas com glicerina seca (65% de glicerol) comparadas aos animais que não receberam glicerina. De acordo com Rennó et al. (2000) este efeito de redução da excreção de ureia é justificado, considerando que as concentrações de ureia e N-ureico no leite é um parâmetro que reflete a relação da proteína e energia da dieta, portanto, à medida que a glicerina foi inclusa na dieta, a relação proteína e energia foi equilibrada, provavelmente, propiciando maior eficiência de utilização do N-amoniaco e, conseqüentemente, menores teores deste no leite. Shin et al.,

(2012) reportaram menor quantidade de amônia no rúmen de vacas suplementadas com 10% de inclusão de glicerina bruta na MS. Donkin et al., (2009) e Shin et al., (2012) relataram também em seus trabalhos diminuição da concentração do nitrogênio ureico no sangue de vacas alimentadas com dietas contendo glicerina bruta.

A adição de 10% da glicerina bruta na MS total neste estudo não apresentou efeito significativo deletério sobre a produção e composição do leite, de vacas da raça holandesa, em diferentes períodos de lactação. O aumento da contagem de células somáticas no leite deve ser melhor investigado, visto que neste estudo o coeficiente de variação para esta variável foi muito elevado. Os estudos descritos na literatura não revelam efeito deletério sobre a CCS com a inclusão de glicerina bruta.

Desta forma, recomenda-se a inclusão de 10% de glicerina bruta na MS da dieta de vacas em lactação, em pastejo de azevém, porém deve-se frequentemente avaliar o nível de nitrogênio ureico no leite para adequar o fornecimento.

5 CONCLUSÃO

A inclusão de 10% de glicerina bruta na Matéria Seca total da dieta, de vacas em lactação, em pastejo de azevém, diminui o nível de nitrogênio ureico no leite, decorrente da queda dos níveis sanguíneos em função do incremento da eficiência nutricional, pelo seu aporte energético e potencial em incrementar a glicemia sem interferir no desempenho produtivo e na composição do leite.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R. Nitrogênio Ureico no Leite como Ferramenta para Ajuste de Dieta. Revista Leite Integral, Belo Horizonte, v.43, p.8-12, 01 set. 2012.

ARIAS, J.; ALONSO, A. N. Importância dos níveis de nitrogênio ureico no leite e no sangue de vacas leiteiras. Latin América Animal Science Meeting, p.73-84, 1997.

BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. Nutrição de Ruminantes. Jaboticabal: Funep, 2006. 583 p.

BERGNER, H. et al. In vitro studies on glycerol transformation by rumen microorganisms. Archiv fur Tierernaehrung, v. 45, p. 245-256, 1995. Disponível em:

<http://europepmc.org/abstract/med/8585798>. Acesso em: 13 de junho de 2016. DOI: 10.1080/17450399509381845

BOADI, D. et al. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: update review. Canadian Journal of Animal Science, Ottawa, v. 84, n. 3, p. 319-335, 2004.

Disponível em: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.4141/A03-109#.WDoISdIrJH1>. Acesso em 02 de julho de 2016. DOI: 10.4141/A03-109

BRASIL. 2015. Lei Nº 613, de 23 de Março de 2016. Dispõe sobre Dispõe sobre o percentual e prazos de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado no território nacional, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 25 de set. 2014. Disponível em:

http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2011-2014/2014/Lei/L13033.htm. Acesso em: 03 de setembro de 2016.

BRASIL. 2016. Agência Nacional do Petróleo – ANP. Gás Natural e Biocombustíveis. Boletim eletrônico, Julho. 2016. Disponível em:

<http://www.anp.gov.br/wwwanp/publicacoes/boletins-anp/2386-boletim-mensal-do-biodiesel>. Acesso em: 03 de agosto de 2016.

BUTLER, W. R.; CALAMAN, J. J.; BEAM, S. W. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. Journal of Animal Science, Champaign, v.74, p.858-65, 1996. Disponível em:

<https://dl.sciencesocieties.org/publications/jas/abstracts/74/4/858>. Acesso em 05 de dezembro de 2015. DOI: 10.2527/1996.744858x

CAMPOS, O.F.; RODRIGUES, A.A. Uréia para bovinos em crescimento. Coronel Pacheco: EMBRAPA/CNPGL, 1985. 42p.

CERRATE, S. et al. Evaluation of glicerine from biodiesel production as a feed ingredient for broilers. International Journal Poul. Science, v.5, p.1001-1007, 2006. Disponível em:

<http://scialert.net/abstract/?doi=ijps.2006.1001.1007> Acesso em 20 de março de 2016. DOI: 10.3923/ijps.2006.1001.1007

CHUNG, Y.H.; RICO, D.E; MARTINEZ, C.M. et al. Effects of feeding dry glycerin to early postpartum Holstein dairy cows on lactational performance and metabolic profiles. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 90, p. 5682 – 5691, 2007. Disponível em:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030207720428> . Acesso em 20 de março de 2016. DOI: 10.3168/jds.2007-0426

CZERKAWSKI, J.W.; BRECKENRIDGE, G. Fermentation of various glycolytic intermediates and other compounds by rumen micro-organisms, with particular reference to methane production. *Britânica Journal of Nutrition*, v. 27, p. 131-146, 1972. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5059377> Acesso em 20 de março de 2016.

DONKIN, S. S.; DOANE, P. Glycerol as a feed ingredient in dairy rations. In: THREE-STATE DAIRY NUTRITION CONFERENCE, 2007, Fort Wayne. Proceedings... Fort Wayne: The Ohio State University, Michigan State University, Purdue University, 2007. p. 97-103. Disponível em: <ftp://s173-183-201-52.ab.hsia.telus.net/Inetpub/wwwroot/DairyWeb/Resources/3SDNC2007/Donkin.pdf> Acesso em: 10 de outubro de 2016.

DONKIN, S. S. et al. Feeding value of glycerol as a replacement for corn grain in rations fed to lactating dairy cow. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.92, n.10, p.5111-5119, oct. 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19762829>. Acesso em: 10 de outubro de 2016.

FARINATTI, L. H. E. et al. Desempenho de ovinos recebendo suplementos ou mantidos exclusivamente em pastagem de azevém (*Lolium multiflorum Lam.*). *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.35, n.2, p.527-534, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbz/v35n2/a27v35n2.pdf>. Acesso em 05 de dezembro de 2015.

FERGUSON, J. D. et al. Serum urea nitrogen and conception rate: The usefulness of test information. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.76, p.3742-3746, 1993. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030293777164>. Acesso em abril de 2016. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(93)77716-4

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. Qualidade do leite e controle de mastite. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. p.17-26.

GARTON, G. A.; LOUCH, A. K.; VIOQUE, E. Glyceride hydrolysis and glycerol fermentation by sheep rumen contents. *Journal of General Microbiology*, v.25, p.215-225, 1961. Disponível em: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-25-2-215>. Acesso em 11 de outubro de 2016. DOI: 10.1099/00221287-25-2-215

GONZÁLEZ, F. H. D.; DÜRR, J. W.; FONTANELI, R. S. Perfil metabólico em ruminantes: Seu uso em nutrição e doenças nutricionais. Porto Alegre: Gráfica UFRGS, 2000, 106p. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/lacvet/restrito/pdf/perfil%20nutricional%20ruminantes.pdf>. Acesso em 02 de abril de 2015.

JOHNSON, K. A.; JOHNSON, D. E. Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*, Champaign, v.73, n. 8, p. 2483-2492, 1995. Disponível em: [https://www.animalsciencepublications.org/publications/search?volume=73&issue=8&first-page=2483&num-results=10&sort=relevance&journal\[jas\]=jas](https://www.animalsciencepublications.org/publications/search?volume=73&issue=8&first-page=2483&num-results=10&sort=relevance&journal[jas]=jas). Acesso em: 10 de outubro de 2016. DOI: 10.2527/1995.7382483x

JOHNSON, R. G.; YOUNG, A. J. The association between milk urea nitrogen and DHI production variables in Western commercial dairy herds. *Journal of Dairy Science*, Champaignn, v.86, p.3008-3015, 2003. Disponível em: [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(03\)73899-5/abstract](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(03)73899-5/abstract). Acesso em: 10 de outubro de 2016. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73899-5

JONKER, J. S.; KOHN, R. A.; ERDMAN, R. A. Using milk urea nitrogen to predict nitrogen excretion and utilization efficiency in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, Champaignn, v. 81, p. 2681-2692, 1998. Disponível em: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.519.3103&rep=rep1&type=pdf>. Acesso em 10 de outubro de 2016. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(98)75825-4

JORDAN, E. R. et al. Relationship of dietary crude protein to composition of uterine secretions and blood in high-producing postpartum dairy cows. *Journal of Dairy Science*, Champaignn, v.66, p.1854-1861, 1983. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030283820232>. Acesso em: 10 de outubro de 2016. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(83)82023-2

KNOTHE, G. et al. Manual do biodiesel. São Paulo: Edgard Blucher. 2006. 340p.

KOZLOSKI, G. V. Bioquímica dos ruminantes. 1 ed. Santa Maria: UFSM. 2002, 140p.

KREHBIEL, C. R. Ruminal and physiological metabolism of glycerin. *Journal of Animal Science*, Champaignn, v.86, p.392, (E-Suppl. 2), 2008.

KRISTENSEN, N.B.; RAUN, B.M.L. Ruminal fermentation, portal absorption, and hepatic metabolism of glycerol infused into the rumen of lactating dairy cows. In: ENERGY AND PROTEIN METABOLISM AND NUTRITION. I., 2007. Neetherlands. Proceedings..., v.124, 646p. EAAP Publication Wageningen Academic Publisherd, 2007.

LENG, R. A.; NOLAN, J. V. Nitrogen-metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*, Champaignn, v.67, n.5, p.1072-1089, 1984. Disponível em: [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(84\)81409-5/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(84)81409-5/pdf). Acesso em: 10 de outubro de 2016. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(84)81409-5.

MANELLA, M. Q.; LOURENÇO, A. J.; LEME, P. R. Recria de bovinos Nelore em pastos de *Brachiaria brizantha* com suplementação protéica ou com acesso a banco de proteína de *Leucaena leucocephala*. Característica de fermentação ruminal. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.32, n.4, p. 1002-1012, 2003. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982003000400028. Acesso em: 10 de outubro de 2016. DOI: 10.1590/S1516-35982003000400028.

MARKUS, R. Elementos da estatística aplicada. Porto Alegre: Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Diretório Acadêmico Leopoldo Cortês, 1973. 329p.

MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: a collaborative study. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, v.85, p.1217-1240, 2002. Disponível em:

<https://www.researchgate.net/publication/10995536> Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles Collaborative study. Acesso em: 10 de outubro de 2016.

MANSFIELD, H.R.; STERN, M.D. Effects of soybean hulls and liginosulfonate-treated soybean meal on ruminal fermentation in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.77, n.4, p.1070-1083, 1994.

MEYER, P. M. et al. Fatores não-nutricionais e concentração de nitrogênio ureico no leite de vacas da raça Holandesa. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.35, p.1114-1121, 2006 (supl.). Disponível em: **http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982006000400024**. Acesso em: 10 de outubro de 2016. DOI: 10.1590/S1516-35982006000400024.

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO AGRÁRIO. Cartilha Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel, Inclusão Social e Desenvolvimento Territorial. Book Final. 2010 p. 38. Disponível em: **http://www.mda.gov.br/sitemda/sites/sitemda/files/user_arquivos_64/Biodiesel_Book_Final_Low_Completo.pdf**. Acesso em: 17 maio 2016

MILLER, E.L. Symposium on nitrogen utilization by the ruminant. Evaluation of foods as sources of nitrogen and amino acids. *The Proceedings of the Nutrition Society*, n.79, p.1-32, 1973.

NAIR, R. Developing tetraploid perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) populations. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, Wellington, v. 47, n. 1, p. 45- 49, 2004. Disponível em: **<https://www.researchgate.net/publication/233203821> Developing tetraploid perennial ryegrass Lolium perenne L populations.** Acesso em: 10 de outubro de 2016. DOI: 10.1080/00288233.2004.9513569

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. Nutrients requirements of the dairy cattle. 7.ed. Washington, D.C.: 2001. 381p.

NG-KWAI-HANG, K. F. et al. Environmental influences on protein content and composition of bovine milk. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.65, p.1993, 1982. Disponível em: **<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6890960>**. Acesso em 20 de março de 2016. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(82)82449-1

OLIVEIRA Jr., et al. Avaliação de indicadores para estimar a digestibilidade dos nutrientes em novilhos Nelore. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.33, n.3, p.749-758, 2004. Disponível em: **http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982004000300024** Acesso em: 10 de outubro de 2016. DOI: 10.1590/S1516-35982004000300024

PARENTE, E. J. Biodiesel – Uma aventura tecnológica num país engraçado. Fortaleza: Editora Unigráfica. 2003. 66 p.

PAULE, B. J. A. 2010. Glicerina, subproduto da indústria do biodiesel, perspectivas de uso na alimentação animal. In: BRASIL. 2016. Agência Nacional do Petróleo – ANP. Gás Natural e

Biocombustíveis. Boletim eletrônico, Julho. 2016. p.14. Disponível em:
<http://www.anp.gov.br/wwwanp/publicacoes/boletins-anp/2386-boletim-mensal-do-biodiesel>. Acesso em: 03 de agosto de 2016.

PLÁ, J. A. Perspectivas do biodiesel no Brasil. Indicadores Econômicos FEE, Porto Alegre, v.30, n.2, p.179-190, set. 2002. Disponível em:
<http://revistas.fee.tche.br/index.php/indicadores/article/viewFile/1396/1758>. Acesso em: 10 de outubro de 2016.

RENNÓ, L. N. et al. Níveis de ureia na ração de novilhos de quatro grupos genéticos: parâmetros ruminais, ureia plasmática e excreções de ureia e creatinina. Revista Brasileira de Zootecnia, v.37, n.3, p.556-562, 2008. Disponível em:
<http://www.scielo.br/pdf/rbz/v37n3/22.pdf> Acesso em 20 de março de 2016.

RÉMOND, B. et al. In vitro and in vivo fermentation of glycerol by rumen microbes. Anim. Feed Sci. Technol. V. 41, p. 121-132, 1993. Disponível em:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0377840193901184>. Acesso em 20 de março de 2016. DOI: 10.1016/0377-8401(93)90118-4

RUSSEL, J. B. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. ruminal fermentation. Journal of Dairy Science, v.70, n.11, p.3551-3561, 1992.

SAS. Statistic Analysis System. User's Guide. Version 9.2. SAS Institute. Cary, NC. USA, 2000.

SATTER, L. D.; SLYTER, L. L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. Brazilian Journal Nutrition, v.32, p.199-205, 1974. Disponível em:
<https://www.cambridge.org/core/journals/british-journal-of-nutrition/article/effect-of-ammonia-concentration-on-rumen-microbial-protein-production-in-vitro/0DE23B24E08BAB457ECF4282A7D0D644>. Acesso em: 10 de outubro de 2016. DOI: 10.1079/BJN19740073

SCHRÖEDER, A.; SÜDEKUM, K.H. Glycerol as a by-product of biodiesel production in diets for ruminants. In: INTERNATIONAL RAPESEED CONGRESS, 10., 1999, Camberra. New Horizons for an Old Crop. Proceedings...Camberra: The Regional Institute, 1999. Paper n. 241. Disponível em: <http://www.regional.org.au/au/gcirc/1/241.htm> Acesso em: 14 de setembro de 2016.

SENGER, C. D. et al. Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. Animal Feed Science and Technology, v.146, p.169-174, 2008. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840107005445> Acesso em: 10 de outubro de 2016. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2007.12.008

SHIN, J. H. et al. Glycerol supplementation for lactating dairy cows. Journal of Dairy Science, Champaign, v.92, n.1, p.88, 2009.

SMITH, K. et al. The effects of ploidy and a phenotype conferring a high water soluble carbohydrate concentration on carbohydrate accumulation, nutritive value and morphology of perennial ryegrass (*Lolium perenne*). Journal of Agricultural Science, Cambridge, v. 136, n. 1, p. 65-74, 2001. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of>

agricultural-science/article/the-effects-of-ploidy-and-a-phenotype-conferring-a-high-water-soluble-carbohydrate-concentration-on-carbohydrate-accumulation-nutritive-value-and-morphology-of-perennial-ryegrass-lolium-perenne-1/783ADB80B8D71C7CBCBCA54ED31B2B48. Acesso em: 10 de outubro de 2016.

SOUZA, C. A. 2006. Sistemas catalíticos na produção de biodiesel por meio de óleo residual. In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE GERAÇÃO DISTRIBUÍDA E ENERGIA NO MEIO RURAL, 6, 2006, Campinas. Anais... Campinas: Universidade Estadual de Campinas. Disponível em:
http://www.proceedings.scielo.br/scielo.php?pid=MSC000000022006000200040&script=sci_arttext. Acesso em: 10 de outubro de 2016.

STORCK BIODIESEL. 2008. O que é o biodiesel? Curitiba. Disponível em:
www.storckbiodiesel.com.br. Acesso em: 10 de outubro de 2016.

TONETTO, C. J. Avaliação de genótipos de azevém diplóide e tetraplóide com manejos distintos de cortes visando duplo propósito. 2009. 54p. Tese (Doutorado em Agronomia) Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, 2009.

TORRENT, J. Nitrogênio ureico no leite e qualidade do leite. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 2., 2000, Curitiba. Anais... Curitiba: Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa, 2000. p. 98.

UNIVERSIDADE DE AÇORES. Energia renováveis. Biocombustíveis. Disponível em:
<http://www.lamtec-id.com/energias/biocombustiveis.php>. 05 maio 2008.

VALLE, L. C. S.; SILVA, J. M.; SCHUNKE, R. M. Ganho de peso de bovinos em pastagens de Brachiaria decumbens pura e consorciada com Stylosanthes spp. cv. Campo Grande. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001, Piracicaba. Anais... Piracicaba: FEALQ, 2001. p. 175-176.

VASCONCELOS, Y. Glicerina: resíduos bem-vindos. Revista Pesquisa FAPESP, n.196, p. 58-63, 2012. Disponível em: **<http://revistapesquisa.fapesp.br/2012/06/14/residuos-bem-vindos/>** Acesso em 20 de março de 2016.

VISCARDI F. A. P. D. Análise de viabilidade técnica e econômica do biodiesel no Brasil. IN: Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, 3., 2005, Salvador/BA. Anais... Salvador/BA Disponível em:
http://www.portalabpg.org.br/PDPetro/3/trabalhos/IBP0659_05.pdf. Acesso em: 04 de setembro de 2016

WANG, C. et al. Effects of glycerol on lactation performance, energy balance and metabolites in early lactation Holstein dairy cows. Animal Feed Science and Technology, Amsterdam, v.151, n.1, p.12-20, May. 2008. Disponível em:
<http://revistapesquisa.fapesp.br/2012/06/14/residuos-bem-vindos/>. Acesso em: 10 de outubro de 2016.

WITTEWER, F.; CONTRERAS P. A. Empleo de los perfiles metabólicos en el sur de Chile. Arch. Med. Vet. v.12, p.178-188. 1980.

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