

UFRRJ
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

TESE

**Glicerina Bruta como Aditivo na Ensilagem do Milho para
Alimentação de Vacas em Lactação**

Almira Biazon França

2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**GLICERINA BRUTA COMO ADITIVO NA ENSILAGEM DO MILHO
PARA ALIMENTAÇÃO DE VACAS EM LACTAÇÃO**

ALMIRA BIAZON FRANÇA

Sob a Orientação do Professor
Mirton José Frota Morenz

e coorientações dos Pesquisadores
Fernando César Ferraz Lopes
Jackson Silva e Oliveira

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal.

Seropédica, RJ
Abril de 2014

636.2142

F814g

T

França, Almira Biazon, 1983-

Glicerina bruta como aditivo na ensilagem do milho para alimentação de vacas em lactação / Almira Biazon França. - 2014.

105 f.: il.

Orientador: Mirton José Frota Morenz.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Bovino de leite - Alimentação e rações - Teses. 2. Rações - Aditivos - Teses. 3. Milho - Silagem - Teses. 4. Glicerina - Teses. 5. Leite - Produção - Teses. I. Morenz, Mirton José Frota, 1971-II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

ALMIRA BIAZON FRANÇA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal.

TESE APROVADA EM ----/----/-----

Prof. Elisa Cristina Modesto
UFRRJ

Dr. Carlos Augusto Miranda Gomide
Embrapa Gado de Leite

Prof. João Carlos de Carvalho Almeida
UFRRJ

Dr. Marco Antonio Sundfeld da Gama
Embrapa Gado de Leite

Dr. Mirton José Frota Morenz
(Orientador)

DEDICATÓRIA

À minha filha, Ana Luísa Biazon França Madeiro, meu presente de Deus e inspiração de cada dia.

Aos meus pais, Geraldo Tavares França e Silvia Benedita Biazon França, pela vida.

Ao meu esposo, Afranio Silva Madeiro, pelo amor e companherismo.

Às minhas irmãs, Mariana Biazon França de Souza e Silvia Helena Biazon Bandeira Perboni, pela nossa eterna amizade.

Aos meus sobrinhos, Arthur Biazon Perboni, Augusto Biazon Perboni, Miguel Biazon França de Souza, pelas alegrias em nossas vidas.

“...Um homem prudente deve sempre começar por caminhos percorridos por grandes homens e imitar os que foram excelentes... fazendo como os arqueiros prudentes que, julgando muito distantes os alvos que pretendem atingir e conhecendo até onde chega a *virtù* de seu arco, orientam a mira para bem mais alto que o lugar destinado, para poder, por meio de mira tão elevada, chegar ao objetivo...” (Nicolau Maquiavel)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelas dificuldades neste longo caminho, e pelas conquistas alcançadas!

À minha filha, Ana Luísa Biazon França Madeiro, pelo apoio, mesmo que inconsciente, para a realização deste trabalho, a qual abdicou de minha presença e cuidados nas diferentes etapas deste trabalho.

Ao meu esposo, Afranio Silva Madeiro, pela paciência e apoio incondicional na realização deste trabalho.

Às minhas amigas Marcia Cristina e Danúbia, sempre presentes nesta jornada, pessoas maravilhosas que Deus pôs em meu caminho, muito obrigada por tudo.

Ao Dr. Mirton José da Frota Morenz, pela amizade, orientação, oportunidades e ensinamentos nesses anos.

Ao Dr. Fernando César Ferraz Lopes, pela orientação e exemplo de dedicação.

Ao Dr. Jackson Silva e Oliveira, pela confiança na condução do experimento.

Ao Dr. Luiz Gustavo Ribeiro Pereira, pelas orientações e condução dos ensaios de produção de gás.

Aos funcionários do Biogás, Meirinha, Mengo e Moreira, pelo acolhimento e ajuda imprescindível na condução do experimento.

Aos funcionários da Genizinha, Amarildo, Geraldinho, Tião e Miguel.

Ao funcionário do Laboratório de Cromatografia, Ernando Ferreira Motta.

Aos estagiários, Letícia e Jabá, pelo apoio e dedicação durante a execução do experimento.

Às estagiárias, Carollina Banni Alevato, Ellen de Almeida Moreira, Larissa Gomes dos Reis e Paula Pereira Ribeiro de Moura, pelo apoio e dedicação nos ensaios *in vitro* e análises laboratoriais.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pelo acolhimento e formação no ensino superior.

À Embrapa Gado de Leite, pela estrutura física e financeira para a realização do experimento.

Ao CNPq/PIBIC, pela bolsa de iniciação concedida durante a graduação.

À CAPES, pelas Bolsas concedidas no Mestrado e Doutorado.

BIOGRAFIA

Almira Biazon França, natural de Angra dos Reis, RJ, nascida em nove de novembro de 1983. Em outubro de 2003, ingressou no curso de graduação em Zootecnia na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, concluindo-o no segundo período de 2007. Durante a graduação, realizou estágios e foi Bolsista de Iniciação Científica- PIBIC/CNPq por dois anos e meio consecutivos.

Em março de 2008 ingressou como discente de Mestrado, bolsista CAPES, no curso de Pós-Graduação em Zootecnia da UFRRJ, obtendo o título de Mestre em Ciência Animal em março de 2010.

No mesmo ano da obtenção do título de Mestre iniciou o Doutorado no curso de Pós-Graduação em Zootecnia da UFRRJ, sendo também bolsista da CAPES.

No ano de 2011 foi aprovada em primeiro lugar no Processo de Seleção Pública Simplificada para Professor Substituto do Departamento de Produção Animal do Instituto de Zootecnia (área Bubalinocultura) da UFRRJ. Diante da aprovação cumpriu contrato no período de março a agosto de 2011.

RESUMO

FRANÇA, Almira Biazon. **Glicerina bruta como aditivo na ensilagem do milho para alimentação de vacas em lactação**. 2014. 105p Tese (Doutorado em Zootecnia). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Há poucos relatos na literatura sobre o uso da glicerina como aditivo na ensilagem do milho, entretanto, pela grande disponibilidade de glicerina bruta originária da produção de biodiesel torna-se interessante estudar a viabilidade de usar a silagem como mais uma forma do glicerol ser consumido pelos ruminantes. Desta forma, objetivou-se com este estudo, avaliar o efeito da adição de níveis crescentes de glicerina bruta como aditivo na ensilagem do milho sobre o valor nutritivo, os parâmetros de qualidade da fermentação e a degradabilidade ruminal *in situ* das silagens, sobre o consumo voluntário, a digestibilidade aparente dos nutrientes, a produção fecal, a produção e composição do leite, os parâmetros ruminais, a produção de proteína microbiana e os componentes sanguíneos de vacas Holandês x Gir, avaliar os indicadores internos matéria seca indigestível (MSi), fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) e fibra em detergente ácido indigestível (FDAi), e avaliar o efeito dos níveis de glicerina sobre frações de carboidratos, taxas de degradação das frações de carboidratos, os parâmetros da cinética de fermentação *in vitro* e a produção de metano *in vitro* das silagens de milho e ração total. Foram avaliados quatro níveis de inclusão de glicerina bruta como aditivo na silagem de milho na alimentação de 12 vacas multíparas, no terço médio da lactação. As dietas foram compostas por silagem de milho contendo 0, 5, 10 e 15% de glicerina bruta (base da matéria natural - MN), e concentrado à base de farelo de soja, fubá de milho e minerais, numa proporção volumoso:concentrado de 60:40, e fornecidas na forma de mistura total. A adição da glicerina bruta aumentou ($P<0,05$) o teor de matéria seca (MS), carboidratos não fibrosos (CNF), nutrientes digestíveis totais (NDT) e da digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), e reduziu ($P<0,05$) os teores de proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) das silagens. Sendo observada redução ($P<0,05$) na produção de lactato, acetato e butirato das silagens. Com relação ao consumo de nutrientes foi observado aumento ($P<0,05$) do consumo de glicerol, MS, PB, energia digestível (ED), energia metabolizável (EM) e energia líquida para lactação (EL_{lac}), e redução ($P<0,05$) no consumo de FDA. Foi observado acréscimo ($P<0,05$) na digestibilidade aparente da MS, PB e carboidratos totais (CHT). A produção de leite não foi alterada ($P>0,05$), no entanto, foi observada redução ($P<0,05$) da eficiência alimentar para a produção de leite, e aumento ($P<0,05$) da quantidade de proteína do leite de 11,54%. Foi observado acréscimo ($P<0,05$) na concentração de N-NH₃ no líquido ruminal e da produção de proteína microbiana (Pmic), e redução ($P<0,05$) das concentrações de acetato e aumento ($P<0,05$) das concentrações de propionato no rúmen. A adição de glicerina bruta influenciou positivamente ($P<0,05$) as concentrações plasmáticas de glicose e ureia, enquanto que foi observada redução das concentrações plasmáticas de ácidos graxos não esterificados (NEFA). Foi observado acréscimo ($P<0,05$) das taxas de degradação *in vitro* dos CNF e carboidratos fibrosos (CF) das silagens e da ração total. Para a fermentação *in vitro* da ração total foi observado aumento ($P<0,05$) da produção de propionato sem que a produção de acetato fosse alterada ($P>0,05$), com redução ($P<0,05$) da produção de metano e redução ($P<0,05$) da proporção de metano no período inicial da fermentação.

Palavras-chave: Alimentos alternativos. Consumo. Energia. Metano. Propionato.

ABSTRACT

FRANÇA, Almira Biazon. **Crude glycerin as additive in corn silage for feeding dairy cows.** 2014. 105p Thesis (Doctor Science in Animal Science). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

There are few reports on the use of glycerin as an additive in corn silage, however, the wide availability of crude glycerin originating from the production of biodiesel becomes interesting to study the feasibility of using silage as another form of glycerol is consumed by ruminants. Thus, this study aimed to evaluate the effect of adding increasing levels of crude glycerin as an additive in corn silage on the nutritive value, quality parameters of fermentation and *in situ* degradability of silages, on feed intake, apparent digestibility of nutrients, fecal production, milk production and composition, ruminal parameters, microbial protein production and blood components of Holstein x Gir cows, evaluate internal markers indigestible dry matter (iMS), indigestible neutral detergent fiber (iNDF) and indigestible acid detergent fiber (iADF), and evaluate the effect of levels of glycerin on carbohydrate fractions, degradation rate of carbohydrate fractions, the ruminal fermentation *in vitro* and production of methane *in vitro* of corn silage and total mixed ration. Four levels of inclusion of crude glycerin as an additive in corn silage in the diet of 12 multiparous cows in mid lactation were evaluated. Diets were composed of corn silage with 0, 5, 10 and 15% crude glycerin (based nature matter - NM), and concentrate based on soybean meal, corn meal and minerals, a forage:concentrate ration of 60:40, and supplied as total mixture. The addition of crude glycerin increased ($P<0.05$) content of dry matter (DM), non-fiber carbohydrates (NFC), total digestible nutrients (TDN) and *in vitro* digestibility of dry matter (IVDDM), and reduced ($P<0.05$) content of crude protein (CP), neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF) of silages. Reduction ($P<0.05$) in the production of lactate, acetate and butyrate of silages were observed. With respect to nutrient intake, increase ($P<0.05$) in the intake of glycerol, MS, CP, digestible energy (DE), metabolizable energy (ME) and net energy for lactation (ELlac) were observed, and reduction ($P<0.05$) in the intake of ADF was observed. Increase ($P<0.05$) in the apparent digestibility of DM, CP, and total carbohydrates (TC) were observed. Milk production was not changed ($P>0.05$), however reduction ($P<0.05$) in feed conversion efficiency for milk production was observed, and increase ($P<0.05$) in quantity of protein milk of 11.54% was observed. Increase ($P<0.05$) in concentrations of N-NH₃ and propionate in rumen fluid, and in microbial protein production were observed, but reduction ($P<0.05$) in concentrations of acetate in rumen fluid was observed. The addition of crude glycerin influenced positively ($P<0.05$) plasma concentrations of glucose and urea, whereas decreased plasma concentrations of non-esterified fatty acids (NEFA). Increase ($P<0.05$) on rates of *in vitro* degradation of NFC and fiber carbohydrates (FC) of silages and total mixed ration were observed. For the *in vitro* fermentation of total mixed ration, increase ($P<0.05$) on propionate production was observed, without affected ($P>0.05$) on acetate production, with reduction ($P<0.05$) of methane production and reduction ($P<0.05$) in proportion of methane in the initial period of the fermentation.

Key words: By product. Energy. Intake. Methane. Propionate.

INDICE DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1.	Valor nutritivo da planta inteira de milho utilizada para ensilagem.....	23
Tabela 2.	Composição química, digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca, densidade e pH da glicerina bruta utilizada no experimento.....	24
Tabela 3.	Quantidades adicionadas de glicerina bruta.....	24
Tabela 4.	Valor nutritivo da planta inteira de milho após a adição da glicerina bruta.....	24
Tabela 5.	Valor nutritivo das silagens de milho aditivadas com glicerina bruta.....	28
Tabela 6.	Parâmetros de qualidade da fermentação das silagens de milho aditivadas com glicerina bruta.....	31
Tabela 7.	Avaliação da eficiência do processo fermentativo.....	32
Tabela 8.	Degradabilidade ruminal <i>in situ</i> da matéria seca (MS) e fibra em detergente neutro (FDN) das silagens de milho aditivadas com glicerina bruta.....	33

CAPÍTULO II

Tabela 1.	Valor nutritivo da planta inteira de milho utilizada para ensilagem.....	43
Tabela 2.	Composição química, digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca, densidade e pH da glicerina bruta utilizada no experimento.....	43
Tabela 3.	Quantidades adicionadas de glicerina bruta.....	43
Tabela 4.	Valor nutritivo da planta inteira de milho após a adição da glicerina bruta.....	44
Tabela 5.	Participação dos ingredientes na ração total.....	44
Tabela 6.	Composição química das silagens de milho utilizadas na mistura total das rações.....	45
Tabela 7.	Composição química do fubá de milho e farelo de soja utilizados na mistura total da ração	45
Tabela 8.	Composição da ração total.....	45
Tabela 9.	Consumo de nutrientes por vacas em lactação.....	50
Tabela 10.	Taxa de passagem ruminal da silagem de milho aditivada com níveis crescentes de glicerina bruta (Kp_s) e do suplemento concentrado (Kp_{sc}).....	52
Tabela 11.	Indicadores externos MSi, FDNi e FDAi utilizados na estimativa da produção fecal e digestibilidade aparente dos nutrientes.....	52
Tabela 12.	Estatística descritiva para as médias de produção fecal e digestibilidade aparente dos nutrientes, estimadas pelos indicadores MSi, FDNi e FDAi	53
Tabela 13.	Digestibilidade aparente dos nutrientes da ração total.....	54

Tabela 14.	Produção e composição do leite de vacas alimentadas com silagens de milho aditivadas com glicerina bruta.....	55
Tabela 15.	Parâmetros ruminais e produção de proteína microbiana em vacas alimentadas com silagens de milho aditivadas com níveis crescentes de glicerina bruta.....	56
Tabela 16.	Parâmetros ruminais de vacas alimentadas com silagens de milho aditivadas com glicerina bruta em função dos tempos de coleta após a alimentação.....	58
Tabela 17.	Concentração plasmática de glicose e ácidos graxos não esterificados (NEFA) em vacas leiteiras alimentadas com silagens de milho aditivadas com glicerina bruta.....	61

CAPÍTULO III

Tabela 1.	Valor nutritivo da planta inteira de milho utilizada para ensilagem.....	72
Tabela 2.	Composição química, digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca, densidade e pH da glicerina bruta utilizada no experimento.....	73
Tabela 3.	Quantidades adicionadas de glicerina bruta.....	73
Tabela 4.	Composição química das silagens de milho utilizadas na mistura total das rações.....	73
Tabela 5.	Participação dos ingredientes na ração total.....	74
Tabela 6.	Composição química do fubá de milho e farelo de soja utilizados na mistura total da ração	74
Tabela 7.	Composição química da ração total.....	75
Tabela 8.	Teores de carboidratos totais e frações de carboidratos das silagens de milho aditivadas com glicerina bruta.....	79
Tabela 9.	Teores de carboidratos totais e frações de carboidratos das rações fornecidas como mistura total.....	80
Tabela 10.	Cinética de fermentação <i>in vitro</i> das silagens de milho aditivadas com glicerina bruta.....	80
Tabela 11.	Cinética de fermentação <i>in vitro</i> das rações fornecidas como mistura total.....	81
Tabela 12.	Parâmetros da fermentação <i>in vitro</i> das silagens de milho aditivadas com glicerina bruta....	82
Tabela 13.	Parâmetros da fermentação <i>in vitro</i> das rações fornecidas como mistura total.....	83
Tabela 14.	Produção e proporção de metano (CH ₄) <i>in vitro</i> das silagens de milho aditivadas com glicerina bruta.....	84
Tabela 15.	Produção e proporção de metano (CH ₄) <i>in vitro</i> das rações fornecidas como mistura total..	85

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1.	Varição do pH ruminal após a alimentação.....	57
Figura 2.	Varição das concentrações ruminais de N-NH ₃ após a alimentação.....	59
Figura 3.	Varição das concentrações ruminais de AGV total, propionato, acetato e butirato após a alimentação.....	60

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO DE LITERATURA	3
1 Produção de Leite no Brasil.....	3
2 Glicerina.....	3
3 Metabolismo do Glicerol.....	6
4 Glicerina na Alimentação de Vacas em Lactação.....	9
5 Ensilagem.....	10
6 Uso da Glicerina como Aditivo na Ensilagem.....	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
CAPÍTULO I – GLICERINA BRUTA COMO ADITIVO NA ENSILAGEM DO MILHO	19
RESUMO	20
ABSTRACT	21
1 INTRODUÇÃO	22
2 MATERIAL E MÉTODOS	23
2.1 Valor Nutritivo e Parâmetros de Qualidade da Fermentação das Silagens.....	25
2.2 Degradabilidade Ruminal <i>In Situ</i> das Silagens.....	26
2.3 Análises Estatísticas.....	26
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
3.1 Valor Nutritivo das Silagens.....	28
3.2 Parâmetros de Qualidade da Fermentação das Silagens.....	30
3.3 Degradabilidade Ruminal <i>In Situ</i> das Silagens.....	32
4 CONCLUSÕES	35
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
CAPÍTULO II – DESEMPENHO DE VACAS EM LACTAÇÃO ALIMENTADAS COM SILAGENS DE MILHO ADITIVADAS COM GLICERINA BRUTA	38
RESUMO	39
ABSTRACT	40
1 INTRODUÇÃO	41
2 MATERIAL E MÉTODOS	42
2.1 Determinação do Consumo e Estimativa da Digestibilidade Aparente dos Nutrientes.....	46
2.2 Produção e Composição do Leite.....	47
2.3 Parâmetros Ruminais.....	48
2.4 Componentes Sanguíneos.....	48
2.5 Análises Estatísticas.....	48
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
3.1 Consumo e Digestibilidade Aparente dos Nutrientes.....	50
3.2 Produção e Composição do Leite.....	54
3.3 Parâmetros Ruminais.....	56
3.4 Componentes Sanguíneos.....	60

4 CONCLUSÕES.....	63
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
CAPÍTULO III – FRAÇÕES DE CARBOIDRATOS E CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA SILAGEM DE MILHO E RAÇÃO TOTAL COM GLICERINA BRUTA.....	68
RESUMO.....	69
ABSTRACT.....	70
1 INTRODUÇÃO.....	71
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	72
2.1 Determinação das Frações de Carboidratos.....	75
2.2 Cinética de Fermentação <i>In Vitro</i>	76
2.2.1 Taxa de degradação das frações de carboidratos.....	76
2.2.2 Parâmetros da fermentação <i>in vitro</i>	77
2.3 Análises Estatísticas.....	77
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
3.1 Determinação das Frações de Carboidratos.....	79
3.2 Cinética de Fermentação <i>In Vitro</i>	80
3.2.1 Taxa de degradação das frações de carboidratos.....	80
3.2.2 Parâmetros da fermentação <i>in vitro</i>	82
4 CONCLUSÕES.....	87
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
CONCLUSÕES GERAIS.....	91

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil possui rebanho leiteiro, de aproximadamente, 23 milhões de cabeças, que embora apresente baixos índices de produtividade, especialmente quando comparados com os de outros países, contribui para a produção nacional de leite.

No entanto, mesmo apresentando baixo nível de produtividade a redução do número de pequenos produtores e o aumento do rebanho mais especializado promoveram incrementos na produtividade brasileira ao longo dos anos. De forma que o Brasil atualmente é o quarto maior produtor de leite do mundo, com produção registrada no ano de 2011 de, aproximadamente, 32 bilhões de litros/ano, ficando atrás apenas dos Estados Unidos, Índia e China.

Desta forma, visando o aumento na competitividade e lucratividade e na tentativa de reduzir gastos com a alimentação dos animais, cada vez mais o produtor de leite busca informações para a utilização de alimentos alternativos de baixo custo, os quais possam substituir aqueles tradicionalmente utilizados.

Pesquisas referentes ao uso de glicerina bruta em substituição ao milho em dietas de ruminantes se intensificaram a partir do ano 2000, e no Brasil ela já vem sendo incorporada aos concentrados destinados a vacas leiteiras (CARVALHO et al., 2011; DUQUE, 2012; FARIAS, et al., 2012).

Substituir parte do milho fornecido às vacas, por glicerina bruta adicionada à silagem poderá reduzir o custo da alimentação desses animais, além de proporcionar aumento da densidade energética da dieta sem que ocorra sobrecarga dietética de carboidratos de rápida fermentação ruminal. Atualmente, a possibilidade de reduzir a quantidade de milho nas dietas é interessante já que em outros países esse grão vem sendo direcionado para a produção de álcool, o que tende a médio prazo, aumentar os preços dessa *commoditie* nos mercados internacional e locais.

A glicerina, também conhecida como 1, 2, 3 trihidroxipropano, é um líquido viscoso de sabor adocicado, inodoro, incolor, com alta solubilidade em água e ampla aplicação na indústria química, farmacêutica, alimentícia e de cosméticos. Em função do desenvolvimento da tecnologia para produção do biodiesel, grande quantidade de glicerina tem sido gerada, já que para cada 100 litros de biodiesel são produzidos, aproximadamente, 10 litros de glicerina bruta como subproduto do processo de transesterificação (MORIN et al., 2007). Segundo a Agência Nacional do Petróleo (ANP, 2013), a produção de biodiesel puro no Brasil no ano de 2012 foi de 2,7 milhões de m³, o que correspondeu a um aumento de 1,7% em relação ao ano de 2011.

Em 2012 foram gerados 274,7 mil m³ de glicerina como subproduto na produção de biodiesel, 0,5% a mais que em 2011. A maior geração de glicerina se deu na região Centro-Oeste (47% do total), seguida das regiões Sul (28,8%), Nordeste (11,1%) Sudeste (9,2%) e Norte (3,9%) do país (ANP, 2013).

Este patamar de produção de glicerina é bastante superior à quantidade empregada atualmente nas principais aplicações comerciais, demandando a criação de novas aplicações para este produto. Sem isso, o excesso de glicerina poderá se tornar um problema principalmente no que se refere ao meio ambiente já que o programa para produção de biodiesel não define de forma clara e segura o destino que deve ser dado aos subprodutos. Neste sentido, o uso da glicerina como ingrediente na dieta de ruminantes desponta como importante alternativa.

O principal problema que essa proposta pretende enfrentar é criar uma alternativa de uso para a glicerina bruta produzida pelas usinas de biodiesel que utilizam a rota etílica. Ao mesmo tempo, e não menos importante, aumentar a densidade energética e reduzir a quantidade do milho nas rações para vacas leiteiras.

Porém, alguns fatores podem trazer limitações ao uso da glicerina bruta como ingrediente na alimentação animal, como por exemplo, a falta de padronização da sua composição química.

O uso da glicerina com diferentes composições em estudos gera resultados contraditórios na literatura, o que pode dificultar a tomada de decisão para o seu uso na alimentação animal.

Há poucos relatos na literatura sobre o uso da glicerina como aditivo na ensilagem da planta inteira do milho (OLIVEIRA et al., 2011; GOMES, 2013), talvez pelo alto preço do glicerol comumente disponível no passado. Entretanto, pela grande disponibilidade de glicerina bruta originária da produção de biodiesel torna-se interessante estudar a viabilidade de usar a silagem como mais uma forma do glicerol ser consumido pelos ruminantes.

Em estudo realizado em silos experimentais na Embrapa Gado de Leite foi relatado que a adição de glicerina bruta até o nível de 10% do peso verde da forragem de milho não comprometeu o pH nem a concentração de ácidos orgânicos, diminuiu a concentração de nitrogênio amoniacal e aumentou o teor de matéria seca (MS) da silagem (OLIVEIRA et al., 2011). Tais resultados demonstraram a possibilidade de uso da glicerina como aditivo para silagens e o efeito que essa adição pode ter sobre o desempenho, metabolismo e ambiente ruminal dos animais, e sobre os processos fermentativos e a estabilidade da silagem.

Assim, objetivou-se avaliar o efeito da adição de níveis crescentes de glicerina bruta como aditivo na ensilagem do milho sobre o valor nutritivo, os parâmetros de qualidade da fermentação e a degradabilidade ruminal *in situ* das silagens, sobre o consumo voluntário, a digestibilidade aparente dos nutrientes, a produção fecal, a produção e composição do leite, os parâmetros ruminais, a produção de proteína microbiana e os componentes sanguíneos de vacas Holandês x Gir, avaliar os indicadores internos matéria seca indigestível (MSi), fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) e fibra em detergente ácido indigestível (FDAi), e avaliar o efeito dos níveis de glicerina sobre frações de carboidratos, taxas de degradação das frações de carboidratos, os parâmetros da cinética de fermentação *in vitro* e a produção de metano *in vitro* das silagens de milho e ração total.

REVISÃO DE LITERATURA

1 Produção de Leite no Brasil

Segundo a FAO, a produção mundial de leite de vaca em 2011 foi de 606,7 milhões de toneladas, o que representou incremento de 1,5% em relação à do ano de 2010.

O Brasil está posicionado entre os maiores produtores de leite do mundo, ocupando a 4ª posição, encontrando-se atrás apenas dos Estados Unidos, Índia e China. Mesmo com a crise econômica global de 2008 e 2009, a produção de leite no Brasil continua apresentando crescimento significativo, tendo sido ofertado em 2011, 32,1 bilhões de litros de leite frente aos 27,6 bilhões de litros ofertados em 2008. Isso representa uma taxa média de crescimento anual de 5,3% (SIQUEIRA et al., 2013).

Os principais estados brasileiros produtores de leite são Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Goiás, São Paulo, Paraná e Santa Catarina, que, em 2008, foram responsáveis por 81,7% do total produzido no País.

O leite é um dos seis produtos mais importantes da agropecuária brasileira, ficando à frente de outros tradicionalmente obtidos, como o café beneficiado. O agronegócio do leite e seus derivados desempenha papel relevante no suprimento de alimentos e na geração de emprego e renda para a população.

O Brasil possui um grande rebanho leiteiro, fator este que contribui para a alta produção nacional de leite, a despeito dos baixos índices de produtividade, especialmente quando comparados com os de outros países. Segundo Siqueira et al. (2013), este cenário, porém, vem apresentando mudanças. Nos últimos anos, com o crescimento econômico do Brasil, cresceu também o setor agropecuário, e em especial, o lácteo. Entre 2000 e 2011, foi observado aumento de 62,4% na oferta de leite no País, ultrapassando a marca de 32 bilhões de litros/ano, o que pode ser explicado principalmente por dois fatores: tamanho de rebanho e produtividade.

Embora esteja evoluindo na produção de leite, o Brasil apresenta baixo consumo *per capita* se comparado, por exemplo, com o dos Estados Unidos e da União Europeia. Nos países desenvolvidos o consumo *per capita* do leite ultrapassa os 270 kg/habitante/ano, enquanto que no Brasil ele está em torno de 170 kg/habitante/ano (SIQUEIRA et al., 2013).

O consumo *per capita* aumentou cerca de 20,5% de 2008 até 2011, passando de 143 para 173 litros/habitante/ano. Segundo Siqueira et al. (2013), esse aumento é decorrente, principalmente, da elevação real da renda da população.

De acordo com dados da TetraPak, em 2012 foram consumidos 1,745 bilhões de litros de bebidas no mundo. Desse total, 17,6% (307,3 bilhões de litros) foram lácteos. No entanto, entre 2009 e 2012 as vendas de lácteos cresceram 2,6%, estando à frente do aumento do consumo de cerveja e refrigerante. Dentre os lácteos, o leite branco, que inclui leite fluido (cru, pasteurizado ou UHT) e em pó, representam 68% do consumo.

Entre os derivados lácteos, os que apresentaram maiores incrementos percentuais no período de 2009 a 2012 foram o leite infantil (8,8%) e o leite acidificado (8,3%). Este último, no entanto, não é comercializado no Brasil, sendo muito consumido na China.

2 Glicerina

Glicerina é o nome comercial de um líquido viscoso, incolor, inodoro, higroscópico e com sabor adocicado. O termo é muito utilizado na literatura como sinônimo de glicerol, apesar da glicerina ser composta por proporções variáveis de glicerol e outros compostos. Quanto maior o conteúdo em glicerol, mais pura é a glicerina, e maior seu valor comercial. Devido à característica higroscópica e ao teor de energia, o glicerol é muito utilizado na indústria de cosméticos, alimentícia e farmacêutica (DONKIN, 2008).

A glicerina é produzida como resultado do processo de transesterificação ou alcoólise, uma reação reversível, na qual triglicerídeos provenientes de óleos vegetais ou gordura animal reagem com álcool, gerando o biodiesel, composto por uma mistura de ésteres, e a glicerina, rica em glicerol (MORIN et al., 2007). Como a reação é reversível, o álcool é adicionado em excesso para deslocar a reação no sentido dos produtos. Os alcoóis utilizados são o metanol e etanol, sendo mais comum o uso do metanol na presença de catalisadores (hidróxido de sódio, soda cáustica ou hidróxido de potássio) (DONKIN, 2008).

O biodiesel é separado da glicerina por gravimetria (tanque de separação) ou por centrifugação. Devido ao excesso de álcool adicionado no processo, ocorre acúmulo de metanol junto à glicerina e o biodiesel produzidos, razão pela qual normalmente realiza-se um processo de recuperação do metanol por meio da evaporação ou destilação, permitindo assim sua reutilização em novo processo de produção do biodiesel.

Após a remoção do excesso de álcool são adicionados à solução de glicerina ácidos para transformar os sabões em ácidos graxos livres e para neutralizar o excesso de bases catalisadoras. O produto resultante da purificação é a glicerina bruta, que contém de 80 a 88% de glicerol. A glicerina bruta pode ser submetida a outros processos de purificação (99% de glicerol) para o uso na indústria.

Segundo Thompson & He (2006), a produção de 50 L de biodiesel resultam em aproximadamente 5 kg de glicerina bruta com diferentes concentrações de glicerol, catalisadores, sais e metanol, o que pode ser um problema para o uso da glicerina bruta na alimentação animal.

Existe grande variação na composição da glicerina bruta, o que dificulta a padronização do seu valor nutricional e, conseqüentemente, seu uso na formulação de rações (OLIVEIRA et al., 2013). No entanto, no Brasil em maio de 2010 o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) liberou a glicerina para registro como ingrediente na alimentação animal, desde que contenha o mínimo de 80% de glicerol e máximos de 13% de umidade e 150 ppm de metanol.

A variação da composição da glicerina bruta pode ser atribuída, principalmente, às diferentes fontes de matéria prima utilizadas no processo de fabricação do biodiesel. Segundo a Agência Nacional do Petróleo (ANP, 2013), do total de matéria prima utilizada na produção nacional de biodiesel no ano de 2012, o óleo de soja continuou sendo a principal matéria-prima para a produção de biodiesel, equivalente a 77,4% do total, mesmo com a ligeira queda de 3% em relação a 2011. A segunda matéria-prima no *ranking* de produção das usinas foi a gordura animal (16,8% do total), após aumento de 27,7% em relação a 2011, seguida pelo óleo de algodão (4,3% do total), que registrou alta de 18,8% em comparação com o ano anterior.

No entanto, o uso de subprodutos de origem animal na alimentação de ruminantes está proibido no Brasil, como medida de prevenção à Encefalopatia Espongiforme Bovina, também denominada EEP, ou Mal da Vaca Louca (Portaria GM/MS n. 216, de 11 de julho de 1997). Assim, a glicerina produzida em usinas que utilizam como matéria prima a gordura animal não pode ser usada na alimentação de ruminantes, mas pode ser usada na formulação de rações para as demais categorias.

Thompson & He (2006) caracterizaram a glicerina bruta obtida de diferentes óleos vegetais e reportaram valor médio para os teores de glicerol, extrato etéreo (EE), proteína e cinzas de 76,2%; 7,8%; 0,05% e 2,73%, respectivamente, sendo as cinzas compostas de 11 ppm de Ca, 6,8 ppm Mg, 53 ppm P, e 1,2% de Na.

Em revisão sobre a adição de glicerol na dieta de vacas, Drackley (2008) destacou as diferenças na composição química da glicerina bruta. Em estudo realizado no sul do estado de Dakota (EUA), DeFrain et al. (2004) reportaram glicerina bruta com 11,5% de sódio. Na Alemanha pesquisas revelaram variação do teor de fósforo de 1,05 a 2,36% (SCHRÖDER &

SÜDEKUM, 1999).

Em estudo de caracterização da glicerina bruta como fonte de energia para ruminantes, Ítavo et al. (2011) observaram elevados teores de EE (10,80%) e de cinzas (4,0%), além de baixa concentração de glicerol (72,5%) e digestibilidade *in vitro* da matéria seca - DIVMS (76,6%) em amostras obtidas da indústria de biodiesel, quando comparadas à glicerina pura, que apresentou teores de EE, cinzas, glicerol e DIVMS de 0,0%; 0,10%; 98,5% e 91,8%, respectivamente. Os autores atribuíram a baixa DIVMS das glicerininas brutas ao excesso de EE nas amostras, o que, conseqüentemente, poderia interferir no consumo e na disponibilidade dos nutrientes, quando adicionadas às dietas para ruminantes.

Em nota publicada Oliveira et al. (2013) avaliaram a composição química da glicerina produzida por indústrias de biodiesel no Brasil. Os autores analisaram 41 amostras de 16 usinas brasileiras, as quais são responsáveis por 85,1% do biodiesel no país. Os autores não detectaram cromo, cádmio e chumbo em nenhuma das amostras estudadas, e pelos dados obtidos, os componentes com maior participação na glicerina foram o glicerol (74,4%), sódio ($20,8 \text{ g}^{\text{kg}^{-1}}$), água (9,7%) e EE (7,8%).

Oliveira et al. (2013) também relataram que apenas quatro usinas, responsáveis por 36,8% da produção, produzem glicerina que atendem os parâmetros estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para os teores de umidade e glicerol, e que apenas uma usina, responsável por 14,1% da produção, produz glicerina apta para uso na alimentação de ruminantes, por não utilizar sebo bovino como matéria prima para o biodiesel.

Segundo Drackley (2008), o teor de minerais da glicerina bruta pode ter efeito sobre o consumo de MS e precisa ser considerado na formulação da ração. Desta forma, deve-se fazer o balanceamento da dieta total quanto às exigências, visto que o excesso de sódio na dieta pode reduzir o consumo e o desempenho animal. Segundo o NRC (2001), o consumo de sódio por animal deve ser de 20 a 25 g/dia, o que perfaz, aproximadamente, 50 g de NaCl/cab/dia, considerando-se um percentual de 39% de sódio neste composto.

Outro aspecto merecedor de atenção na composição química da glicerina bruta refere-se ao seu teor de metanol. Segundo Drackley (2008), a glicerina com baixo teor de pureza analisada na Alemanha apresentou 26,7% de metanol (SCHRÖDER & SÜDEKUM, 1999) enquanto que a glicerina avaliada por DeFrain et al. (2004) apresentou 1,3%.

Farias et al. (2012) realizaram processo de aquecimento da glicerina bruta a 75°C, em fogão a gás por 30 minutos, antes da sua mistura no suplemento concentrado, visando eliminar os 16% de metano presentes na mesma, sendo o teor de metano reduzido para 0,33%. Estes autores avaliaram o uso da glicerina bruta em substituição ao milho moído do suplemento concentrado de novilhas manejadas em pasto de *Brachiaria Brizantha* cv. Marandu.

A ingestão de metanol pode causar toxicidade em animais, devido ao acúmulo no sangue, de ácido fórmico produzido no fígado. Isto ocorre a partir de reações de desidrogenação do metanol, pelas quais ele é transformado pela enzima álcool desidrogenase em acetato e formaldeído, e este em formato ou ácido fórmico. O formato inibe a enzima citocromo oxidase, componente da cadeia transportadora de elétrons, e envolvida na síntese de ATP. A citocromo oxidase é uma enzima vital no processo de geração de energia para o funcionamento celular, especialmente nos tecidos com alto metabolismo energético, como a retina e o cérebro. O ácido fórmico é excretado na urina, mas quando em excesso no sangue pode causar depressão do sistema nervoso central, acidose metabólica e lesão ocular (RESENDE et al., 2006).

Ruminantes provavelmente são mais tolerantes à ingestão de metanol. Numa situação de baixo consumo de metanol (<0,01 g/kg de PC), boa parte do mesmo poderá ser metabolizada pelos microrganismos ruminais, os quais transformam-no em ácido acético e formato. A maioria do formato produzido no rúmen é convertida à dióxido de carbono (CO₂)

e hidrogênio (H₂) e, posteriormente, a metano (RESENDE et al., 2006).

O metanol que não foi metabolizado pelos microrganismos ruminais é absorvido pela parede ruminal ou pela mucosa do intestino delgado e metabolizado no fígado por meio da enzima álcool desidrogenase, gerando ácido acético. Contudo, numa situação de alto consumo de metanol, o metabolismo no fígado passa a ser de importância fundamental. Estudos *in vitro* evidenciam que a presença de metanol pode suprimir a conversão do propionato à glicose em hepatócitos de carneiros (DEMIGNE et al., 1991). De acordo com Weiss et al. (2003), se esse fato ocorre *in vivo* importantes implicações resultariam para os ruminantes, notadamente vacas leiteiras, as quais apresentam alta tendência da gliconeogênese a partir do propionato, para atender à demanda para a síntese de lactose.

Conforme relatou Donkim (2008), a *Food and Drug Administration* (FDA, 2006) nos EUA regulamentou que a glicerina bruta com nível maior que 150 ppm de metanol deve ser considerada imprópria para utilização na alimentação animal.

3 Metabolismo do Glicerol

O glicerol é encontrado naturalmente na dieta de ruminantes, como componente estrutural dos triglicerídeos e fosfolípidios presentes, principalmente, nas sementes de oleaginosas e nas plantas forrageiras, respectivamente. Estes lipídios, ao serem hidrolisados no rúmen por ação das lipases microbianas, produzem ácidos graxos e glicerol.

Dentro do rúmen, o glicerol proveniente da hidrólise e/ou dietético, pode seguir duas rotas metabólicas: 1) absorção direta pelo epitélio da parede ruminal (RÉMOND et al., 1993; DONKIN, 2008; KREHBIEL, 2008) ou 2) transformação em ácidos graxos voláteis (AGV) pelas bactérias ruminais (JOHNS, 1953; GARTON et al., 1961; WRIGHT, 1969; CZERKAWSKI & BRECKENRIDGE, 1972). Krehbiel (2008) indicou que as bactérias *Selenomonas* são grandes fermentadoras de glicerol, onde os principais produtos gerados são o propionato, lactato, succinato e acetato.

No processo de fermentação realizado pelas bactérias ruminais o glicerol é primeiramente convertido à glicose via a fosforilação para glicerol-3-fosfato, o qual entra como intermediário na via glicolítica para a formação do piruvato. O piruvato, por sua vez, é rapidamente convertido a AGVs (DRACKLEY, 2000), principalmente, ácido propiônico (BERGNER et al., 1995).

Vários trabalhos foram feitos estudando o efeito do glicerol sobre o ambiente ruminal e seu metabolismo em ruminantes (LENG, 1970; KHALILI et al., 1997; KIJORA et al., 1998; KRISTENSEM & RAUM, 2007). Os resultados sempre apontam para aumento das concentrações ruminais de propionato e butirato em detrimento do acetato (DeFRAIN et al., 2004; LINKE et al., 2004; KASS et al., 2012; BOYD et al., 2013; HARZIA et al., 2013).

Rémond et al. (1993) observaram aumento das concentrações de propionato e butirato em detrimento da de acetato em estudo de fermentação *in vitro*, usando inóculo de vacas adaptadas ao consumo de glicerol. DeFrain et al. (2004) também observaram aumento da concentração do propionato em detrimento da de acetato em vacas alimentadas com 0,86 kg/dia de glicerina em substituição ao milho. Ferraro et al. (2009) em estudo da fermentação *in vitro* observaram que o glicerol reduziu a concentração do acetato e aumentou as de propionato e butirato. El-Nor et al. (2010) observaram redução do teor de acetato e aumento do de butirato no líquido ruminal de vacas consumindo até 108 g de glicerol/kg de matéria seca em substituição ao milho.

Após chegar ao fígado por meio da corrente sanguínea, tanto o glicerol como o propionato são transformados em glicose via gliconeogênese (LENG, 1970), o que faz do glicerol importante precursor desse nutriente energético.

O metabolismo do propionato produzido no rúmen inicia-se no ciclo do ácido cítrico, onde é convertido a succinil-CoA que, por meio de reações bioquímicas dá origem ao

oxaloacetato, que pode ser utilizado para formar glicose, via gliconeogênese (VALADARES FILHO & PINA, 2006). Inicialmente, o propionato através da enzima propionil-CoA sintetase é esterificado com a CoA formando propionil-CoA que, por sua vez, é carboxilado a D-metilmalonil-CoA pela enzima propionil-CoA-carboxilase. A D-metilmalonil-CoA é convertida pela metilmalonil-CoA-racemase à L-metilmalonil-CoA, que, por isomerização, dá origem ao succinil-CoA, em reação catalizada pela metilmalonil-CoA-isomerase (MAYES & BENDER, 2006).

A atividade da propionil-CoA sintetase no fígado (gliconeogênese) é alta em ruminantes e geralmente excede a da acetil-CoA sintetase. Como resultado, a maioria do propionato é removido do sangue portal pelo fígado e a concentração arterial de propionato é elevada somente se sua disponibilidade for aumentada. A atividade da propionil-CoA carboxilase, no fígado é sensível a períodos de restrição alimentar e mudanças na dieta, sendo aumentada naquelas ricas em grãos (VALADARES FILHO & PINA, 2006).

Diferentes estudos têm demonstrado que a maior parte do glicerol presente no rúmen é absorvida diretamente pelo epitélio ruminal (RÉMOND et al., 1993; DONKIN, 2008; KREHBIEL, 2008). Rémond et al. (1993) observaram taxa máxima de desaparecimento ruminal do glicerol, determinada em fermentadores, de 0,52 a 0,62 g/hora. A estimativa do desaparecimento de 200 g de glicerol indicou que mais de 85% do glicerol no rúmen desaparece em duas horas em vacas adaptadas ao seu consumo. Segundo Rémond et al. (1993), ocorre rápido desaparecimento do glicerol no rúmen após sua administração, sendo que o mesmo não foi detectado na digesta duodenal.

Segundo Donkin (2008), o glicerol desaparece rapidamente do rúmen, porém é difícil determinar a porção do glicerol presente no rúmen que foi fermentada ou absorvida diretamente pelo epitélio ruminal.

Krehbiel (2008) relatou que cerca de 13% do glicerol que chega ao rúmen desaparece por passagem com a digesta, 44% por fermentação e 43% por absorção pela parede ruminal. Rémond et al. (1993) relataram desaparecimento ruminal do glicerol após quatro horas, quando fornecidos nas quantidades de 240 g ou 480 g via fístula ruminal para vacas.

Segundo Donkin (2008), quando há aumento da demanda energética, como no caso de vacas em final de gestação e início de lactação, as absorções de glicerol e de propionato produzidos na fermentação ruminal são iguais, e que tanto a fermentação quanto a absorção ruminal do glicerol depende da quantidade inicial fornecida ao animal, o que pode contribuir para o aumento da concentração de glicerol na digesta duodenal, porém o autor não relatou a quantidade específica necessária para que isso ocorra.

O glicerol presente no duodeno também pode ser resultado do processo de hidrólise de fosfolipídeos bacterianos. Segundo Drackley (2000), 15% dos lipídeos que chegam ao duodeno consistem de fosfolipídeos bacterianos, os quais são hidrolizados pela protease fosfolipase A-2.

O glicerol absorvido diretamente pelo epitélio ruminal ou no intestino pode ser removido por tecidos contendo a enzima glicerolquinase, responsável pela fosforilação do glicerol a glicerol 3-fosfato. A glicerolquinase é encontrada no fígado e nos rins, mas também no cérebro, adipócitos e músculos esquelético e cardíaco.

O glicerol 3-fosfato é oxidado à diidroxiacetona-fosfato pela enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase, que posteriormente através da isomerização mediada pela fosfotriose isomerase é convertido à gliceraldeído 3-fosfato, o qual entra na via da gliconeogênese para formar glicose (MAYES & BENDER, 2006). A fosforilação do glicerol é passo inicial na síntese de glicose, triglicerídeos ou oxidação completa a CO₂.

Schröder & Südekum (1999) determinaram a energia líquida para lactação (EL_{lac}) do glicerol e chegaram aos valores de 9,7 MJ/kg, quando oferecido em dietas pobres em amido, e entre 8,0 e 8,5 MJ/kg quando incorporado a dietas ricas em amido. Para comparação, as EL_{lac}

do milho quebrado, moído e floculado são, segundo o NRC (2001), 8,0, 8,4 e 8,7 MJ/kg, respectivamente.

Tanto o glicerol como o propionato absorvidos são normalmente assumidos como sendo substratos gliconeogênicos em vacas leiteiras. Segundo Valadares Filho & Pina (2006), o propionato parece fornecer um mínimo de 50% e um máximo de 75% do requerimento de glicose, enquanto que os aminoácidos, glicerol e lactato são os precursores do restante da glicose exigida.

O 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 onde o potencial produtivo é limitado pela quantidade de energia disponível para o animal.

Existe a hipótese de que o uso de glicerol na dieta de ruminantes reduz a produção de metano no rúmen, isto porque ele é rapidamente fermentado a propionato no rúmen, e devido à relação inversa entre a produção de propionato e metano, o glicerol poderia reduzir a produção de metano no rúmen. No entanto, são poucos os trabalhos que estudaram esta hipótese, sendo necessária sua confirmação por meio de estudos *in vivo* de longa duração (LEE et al., 2011).

As proporções molares entre as concentrações dos principais AGVs no rúmen se mantêm notadamente estáveis, com valores geralmente próximos de 65:25:10 moles de acetato:propionato:butirato para rações à base de forragens; e de 50:40:10 para as rações ricas em concentrados.

O acetato é mais comumente sintetizado a partir da rota metabólica que envolve o composto intermediário formato, em que o piruvato liga-se à coenzima-A, resultando na formação de acetil-CoA e formato, como produtos intermediários. O acetil-CoA é então convertido a acetato, e a maioria do formato a CO₂ e H₂ (RESENDE et al., 2006).

O ácido acético está diretamente relacionado à produção de metano, pois sua produção no rúmen é a que gera mais substrato disponível, CO₂ e H₂, acarretando maior produção de metano. Segundo Pedreira & Primavesi (2006), a fermentação de 31 unidades de hexose geram 62 unidades de acetato mais 62 moléculas de CO₂ e 124 moléculas de H₂. Para que o H₂ seja eliminado é necessária sua reação com as moléculas de CO₂, o que gera o CH₄ (metano), reação a qual é realizada pelas *Archaea* metanogênicas. Dessa forma, estima-se que em dieta composta por alimentos volumosos ocorram perdas da ordem de 10% da energia bruta ingerida, variando de 6 a 18%.

A redução de CO₂ a metano no rúmen desempenha importante função, agindo na remoção contínua de H₂, resultante da fermentação da matéria orgânica. Dessa forma, a redução ou eliminação da metanogênese pode exigir o estabelecimento de outra rota para evitar o acúmulo de H₂ e o adequado funcionamento do rúmen. Normalmente, compostos que causam redução na produção de acetato e aumento na produção de propionato e, algumas vezes, butirato.

Favaro (2010) observaram produção de metano de 161,3 L/dia em bovinos adultos alimentados com dieta à base de silagem de milho e concentrado (relação volumoso:concentrado de 40:60) com níveis de substituição da glicerina bruta pelo milho do suplemento concentrado de 0, 5, 10, 15 e 20% (base MS). Os autores não avaliaram a produção dos AGVs, não sendo assim possível correlacionar a produção de metano com a de propionato no rúmen.

Lee et al. (2011) observaram que a fermentação *in vitro* do glicerol produziu alta proporção de propionato e baixa relação de acetato:propionato, com redução do metano. Com esses resultados os autores sugeriram que a adição do glicerol na dieta pode aumentar a eficiência do uso da energia pelos ruminantes.

Avila et al. (2011) em avaliação *in vitro* não observaram efeito da substituição do grão de cevada pela glicerina (0,70;140 e 210 g/kg base MS) sobre a produção de metano.

Terré et al. (2011) sugeriram o uso da glicerina na dieta de cordeiros em terminação. Esses autores avaliaram a inclusão da glicerina (0, 50, e 100g/kg) no concentrado de cordeiros alimentados com concentrado e palha de cevada *ad libitum* e não observaram efeito no consumo, na concentração de glicose sanguínea, e na composição de ácidos graxos do músculo *Longissimus dorsi*.

Segundo Pedreira & Primavesi (2006), o gás metano aumenta anualmente a uma taxa de 0,9% na atmosfera. As emissões globais desse gás, geradas a partir de processos entéricos, são estimadas em 80 milhões de toneladas por ano, correspondendo a 22% das emissões totais de metano.

4 Glicerina na Alimentação de Vacas em Lactação

Pesquisas referentes ao uso de glicerina por ruminantes se intensificaram a partir de 2000 e no Brasil ela já vem sendo incorporada aos concentrados destinados a vacas leiteiras (CARVALHO et al., 2011; DUQUE, 2012; FARIAS, et al., 2012). Os resultados são bastante promissores seja como substituto do milho no concentrado (DROUILLARD, 2008; DONKIN et al., 2009; CARVALHO et al., 2011; DUQUE, 2012; FARIAS, et al., 2012; KASS, et al., 2012; OMAZIC et al., 2013) ou como ingrediente adicional em dietas já balanceadas (SHRÖDER & SÜDEKUM, 1999; DeFRAIN et. al., 2004; LINKE, et al., 2004; BODARSKI et al., 2005; OSBORNE, et al., 2009; WANG, et al., 2009).

Drackley (2008) em revisão feita sobre o uso de glicerol em dietas para vacas leiteiras sugeriu que ele pode participar em até 10% da matéria seca da dieta sem prejuízos para o animal.

Alguns autores sugerem o uso da glicerina na dieta de vacas em período de transição, principalmente com o objetivo de prevenir problemas metabólicos, como a cetose. O uso da glicerina no tratamento da cetose foi primeiramente reportado em 1954, por Johnson (1954). O uso da glicerina na prevenção da cetose se baseia em sua característica gliconeogênica, ou seja, o glicerol como precursor da glicose. Isto porque no metabolismo ruminal do glicerol ocorre produção de propionato ou este é absorvido pelo epitélio ruminal, e ambos o propionato e o glicerol absorvidos no rúmen entram na via de gliconeogênese no fígado.

Dessa forma, acredita-se que o uso de glicerol forneceria maior aporte de glicose para o animal, com conseqüente redução da oxidação de ácidos graxos em períodos em que o consumo calórico é reduzido e as necessidades energéticas aumentadas (final da gestação e início da lactação) e, conseqüentemente, reduziria a incidência de cetose.

Schröder & Südekum (1999) avaliaram o fornecimento de 10% de glicerol para vacas em lactação, o que correspondeu efetivamente mais da metade do amido da dieta dos animais, e não observaram efeito do glicerol no consumo, digestibilidade ruminal e síntese de proteína microbiana.

DeFrain et al. (2004) avaliaram o uso do glicerol em substituição ao milho em dietas de vacas holandesas no período de transição. Os tratamentos avaliados pelos autores foram dieta controle com 0,86 kg/dia de milho, dieta com baixo glicerol com 0,43 kg/dia de milho mais 0,43 kg/dia de glicerol, e dieta com alto glicerol com 0,86 kg/dia de glicerol. O consumo de MS pelas vacas no final da gestação foi maior para os animais que não receberam glicerol (13,3 kg/dia) quando comparado aos que foram alimentados com as dietas com baixo e alto teor de glicerol (10,8 e 11,3 kg/dia, respectivamente), não sendo observada diferença no consumo de MS e na produção de leite para o grupo de vacas no período pós-parto. Os autores observaram aumento da concentração total de AGVs e da proporção de propionato com redução das de acetato no líquido ruminal das vacas alimentadas com glicerol. No entanto, foi observado aumento da concentração plasmática de glicose das vacas alimentadas com a dieta sem glicerol (66,0 mg/dL) em comparação das alimentadas com baixo e alto glicerol 963,1 e 58,4 mg/dL, respectivamente.

Bodarski et al. (2005) avaliaram o fornecimento de 300 e 500 mL/ dia de glicerina para vacas em lactação, no período de três semanas antes do parto até 70 dias após, e observaram aumento da concentração plasmática de glicose assim como da produção de leite e do teor de proteína do leite, e redução da concentração de ácidos graxos não esterificados (NEFA) no plasma.

Donkin et al. (2009) avaliaram a utilização de 0, 5, 10, e 15% de glicerina (99,5% de glicerol) em substituição isoenergética ao milho na dieta de vacas holandesas em lactação e não observaram efeito na composição do leite, no consumo de MS (23,8; 24,6; 24,8 e 24,0 kg/dia, respectivamente 0, 5, 10 e 15% de glicerol) e na produção de leite (36,3; 37,2; 37,9 e 36,2, respectivamente 0, 5, 10 e 15% de glicerol). De forma que os autores recomendaram o uso de até 15% do glicerol em substituição ao grão de milho na dieta de vacas em lactação.

Carvalho et al. (2011) estudaram o efeito da inclusão do glicerol na dieta de dois grupos de vacas holandêsas, um de vacas no final da gestação, o qual recebeu dietas com 11,5 % de glicerol (base da MS), e outro com vacas no início da lactação, o qual recebeu dietas com inclusão de 10,8 % de glicerol (base da MS). Os autores não observaram diferença no consumo de MS pelas vacas no período final da gestação (14,9 vs. 14,6 kg/dia, respectivamente, controle vs. glicerol), e pelas vacas no início da lactação (19,8 vs. 20,7 kg/dia, respectivamente, controle vs. Glicerol). A produção de leite (35,8 vs. 37,0 kg/dia, respectivamente, controle vs. glicerol), a composição do leite e o balanço energético não foram influenciados pela inclusão do glicerol. A concentração plasmática de glicose reduziu nas vacas alimentadas com glicerol no período final da gestação (59,1 vs. 53,4 mg/dL), não sendo observado efeito da adição do glicerol na concentração de NEFA para ambos os grupos, e para a glicose plasmática das vacas no início da lactação. Não foi observado efeito para a concentração de AGVs, porém foi observado aumento das concentrações de propionato e butirato em detrimento das de acetato para as vacas alimentadas com glicerol.

Duque (2012) avaliou a substituição parcial do fubá de milho do concentrado pela glicerina bruta, em cerca de 7% da MS da dieta de vacas em lactação, e não observou diferença para o consumo de MS, proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e nutrientes digestíveis totais (NDT). No entanto foi observada redução do consumo de amido e EE. Não foi observado efeito da glicerina na produção de leite, composição do leite, digestibilidade aparente dos nutrientes e concentração plasmática de glicose.

5 Ensilagem

O pasto constitui a base da alimentação dos ruminantes nos trópicos, pois esta é uma das formas mais econômicas de produção, pelo fato da forragem ser colhida diretamente pelo animal. Porém, devido às condições edafoclimáticas (precipitação, temperatura e fotoperíodo) que impõem limites ao crescimento das forrageiras, a qualidade e a quantidade dos volumosos ao longo do ano são variáveis.

No verão, as condições edafoclimáticas favorecem a síntese de biomassa, porém, a maior disponibilidade de água, luz e temperatura promove a conversão de fotoassimilados em tecidos estruturais reduzindo a digestibilidade da forragem. Já no inverno, essas condições tornam-se desfavoráveis ao crescimento da planta, levando à escassez de alimento, e tornando necessária a conservação da forragem excedente produzida no verão (MACHADO et al., 2011).

O uso de técnicas de conservação da forragem permite o armazenamento do excedente de forragem produzido no período favorável de crescimento das forrageiras. Assim, na época de baixa oferta de forragem tal volumoso pode ser fornecido para os animais, permitindo oferta ininterrupta de alimento ao longo do ano, evitando queda de produção dos animais.

As técnicas de conservação de forragem mais utilizadas no Brasil são a fenação, a qual consiste na desidratação natural ou artificial da planta, e a ensilagem na qual a forragem

úmida é conservada por meio do processo de fermentação na ausência de oxigênio (anaerobiose).

Os primeiros relatos sobre a ensilagem de forrageiras provêm do Egito e datam entre os anos 1500 a 1000 a.C. A prática de ensilagem no Brasil foi iniciada no final do século XIX. Em 1935, trabalhos com silagens de gramíneas tropicais começaram a ser realizados, no entanto, sua intensificação ocorreu somente na década de 70, principalmente com o capim-elefante (AMARAL et al., 2007).

A conservação de forragem sob a forma de silagem permite a alimentação exclusiva do rebanho ou como suplemento volumoso na época de escassez de alimentos; permite o manejo racional das pastagens como forma de armazenar o excesso de forragem produzida durante o período de maior crescimento das forrageiras e permite o armazenamento de grande quantidade de matéria seca (MS) em espaço reduzido (NOVAES et al., 2004).

Atualmente, a ensilagem é uma das principais formas de conservação de forragem utilizada pelos pecuaristas, em função da praticidade, eficiência e qualidade da forragem conservada. O processo de fermentação é dependente da interação entre fatores inerentes à planta, como conteúdo de MS, adequado teor de substrato fermentável na forma de açúcares, baixo poder tampão, e outros fatores de manejo como tamanho da partícula da forragem, densidade da massa ensilada, tipo de material utilizado na vedação e o desabastecimento do silo, que interferem no processo de fermentação e precisam ser considerados na ensilagem (McDONALD et al., 1991).

Os principais parâmetros da fermentação utilizados como indicadores da qualidade da silagem são o teor de MS, pH, concentração de ácidos orgânicos e proporção de nitrogênio amoniacal em relação ao nitrogênio total. Segundo McDonald et al. (1991), uma silagem de boa qualidade deve apresentar teor de MS de 30 a 40% e pH entre 3,8 e 4,0, pois o alto teor de umidade nas plantas usadas na produção de silagem interfere na variação do pH, o qual auxilia na preservação da silagem, em virtude da inibição da atividade das bactérias do gênero *Clostridium*. Os teores de nitrogênio amoniacal sugeridos para silagens de bom padrão fermentativo estão, no máximo, entre 11 e 12% do nitrogênio total. O nitrogênio amoniacal é associado à qualidade fermentativa da silagem, pois é proveniente da degradação da fração proteica pelos clostrídios. Com relação à concentração dos ácidos orgânicos, silagens com adequada fermentação apresentam valores de ácido láctico iguais ou superiores a 5,0% da MS, teor de ácido acético de 0,5 a 2,0% da MS e teor de ácido butírico de 0,0 a 0,1% da MS (McDONALD et al., 1991). No processo fermentativo dá-se maior importância aos maiores teores de ácido láctico, pois este é um ácido forte, sendo responsável pela redução do pH da silagem, o que possibilita boa conservação da massa ensilada, garantindo qualidade ao produto final. O ácido butírico é o principal ácido orgânico produzido pelas bactérias do gênero *Clostridium*, e o principal relacionado à deterioração da silagem e, conseqüentemente, redução do consumo e do desempenho animal, em silagens de baixa qualidade.

Diferentes forrageiras, tanto gramíneas quanto leguminosas, têm o potencial para serem conservadas na forma de silagem. Tradicionalmente, o milho e o sorgo são as principais gramíneas utilizadas na ensilagem, mas outras gramíneas tropicais como o capim-elefante (*Pennisetum purpureum Schum*), as do gênero *Panicum* (capins tanzânia, mombaça, etc.), *Brachiaria* e a cana-de-açúcar tem sido também utilizadas para este processo (NOVAES et al., 2004).

A silagem de milho planta inteira é considerada padrão, em virtude dos adequados teores de açúcares encontrados na planta, que levam à fermentação láctica, promovendo a conservação de um alimento de alto valor nutritivo, de fácil preparo e de grande aceitação pelos animais, com grande produção de massa verde e teor adequado de MS (OLIVEIRA et al., 2010). Valadares Filho et al. (2010) reportaram em revisão de literatura valor médio para o teor de MS e de carboidratos não fibrosos (CNF) da silagem de milho de $31,59 \pm 7,60$ (n =

285), e $33,02 \pm 4,33$ n= 53), respectivamente.

Aditivos são produtos comerciais ou não, que, aplicados à forrageira no momento da ensilagem podem reduzir perdas de nutrientes, estimular ou inibir fermentações, ou ainda interagir no valor nutritivo da planta originalmente ensilada (SCHMIDT et al., 2010).

Segundo McDonald et al. (1991), o objetivo principal do uso de aditivos na ensilagem é assegurar que a fermentação láctica seja predominante, resultando em silagem de boa qualidade. Sendo assim, esses autores classificaram os aditivos em cinco grupos de acordo com sua ação no processo de fermentação, sendo eles os estimuladores da fermentação; inibidores da fermentação; inibidores da deterioração aeróbia; nutrientes e os absorventes.

Os aditivos estimuladores da fermentação têm como objetivo o controle da fermentação por meio da estimulação da fermentação láctica, podendo ser inoculantes bacterianos (bactéria ácido láctica) ou fontes de carboidratos (sacarose, cereais, polpa cítrica e batatas). Os aditivos inibidores da fermentação possuem características que inibem o crescimento de microrganismos indesejáveis como, por exemplo, os ácidos fórmico, acético, láctico e benzoico. O grupo dos aditivos inibidores da deterioração tem como objetivo principal o controle da deterioração aeróbia; algumas substâncias que possuem essas características são o ácido propiônico, a amônia e as bactérias ácido lácticas. Os aditivos nutrientes são adicionados à silagem com o objetivo de melhorar seu valor nutricional, como a ureia, amônia, minerais e glicerina. Os aditivos absorventes são usados em silagens de forrageiras com alto teor de umidade com o objetivo de aumentar o teor de MS e reduzir as perdas de nutrientes por meio dos efluentes, como a polpa cítrica, palha de trigo, casca de soja, glicerina e entre outros.

O uso de coprodutos como aditivos na ensilagem tem-se destacado, pois estes são gerados no processamento de diferentes alimentos e produtos, e que em virtude do volume gerado, do seu valor nutricional e do seu baixo custo têm despertado o interesse para o seu uso como aditivo na ensilagem. No entanto, a produção de coprodutos possui características regionais, sendo gerados diversos coprodutos em diferentes regiões do Brasil, o que pode limitar o seu uso, devido principalmente à falta de padronização da sua composição. Assim, a recomendação do uso de coprodutos como aditivos deve considerar o seu custo e disponibilidade na região.

6 Uso da Glicerina como Aditivo na Ensilagem

O uso da glicerina como aditivo na ensilagem tem despertado o interesse de pesquisadores e estudiosos da área, de forma que já foram realizados trabalhos avaliando o seu uso na ensilagem da cana-de-açúcar (DIAS JÚNIOR et al., 2010; GOMES, 2013), da planta inteira do milho (OLIVEIRA et al., 2011; GOMES, 2013) e do capim-elefante (MENÊSES, 2012).

O glicerol é fundamental no metabolismo de microrganismos, onde atua como precursor de numerosos compostos e como regulador de vários mecanismos bioquímicos intracelulares (LAGES et al., 1999). Tal característica, segundo Gomes (2013) poderia contribuir também no processo de fermentação das silagens, além de facilitar a mistura, evitando operações trabalhosas no momento do trato dos animais.

Dias Júnior et al. (2010) avaliaram o uso da glicerina pura como aditivo na ensilagem da cana-de-açúcar em associação com inoculantes microbianos, na proporção glicerina:cana-de-açúcar de 1:9, e observaram que a glicerina reduziu o teor de FDN de 65,9% para 51,2%, e que a uso da glicerina em associação com o inóculo UFLA mostrou ser uma estratégia plausível para reduzir a perda de MS e de aumentar a densidade energética da silagem de cana.

Oliveira et al. (2011) avaliaram cinco níveis de adição de glicerina bruta (0, 3, 6, 9 e 12% na base do peso verde) como aditivo na ensilagem da planta inteira do milho, e

observaram que os níveis de inclusão aumentaram o teor de MS, de 32,9% para 35,4%, e reduziram o teor de FDN, de 57,2% para 49,1% , das silagens.

Meneses (2012) avaliaram o uso de quantidades crescentes de glicerol como aditivo na ensilagem do capim-elefante com idade de corte de 180 dias. O glicerol utilizado foi diluído em água (30% do volume total) antes de ser homogeneizado ao capim picado de forma a facilitar o manuseio e a mistura. O material foi ensilado em tambores plásticos de 210 litros (silos), compactado no interior do silo por pisoteio humano e vedado com lonas plásticas presas com ligas de borracha. Os tratamentos consistiram na ensilagem de 100 kg de capim sem glicerol; 98 kg de capim + 2,86 kg de glicerol; 96 kg de capim + 5,72 kg de glicerol; 94 kg de capim + 8,58 kg de glicerol e 92 kg de capim + 11,43 kg de glicerol. O autor observou aumento dos teores de MS, EE, CNF e NDT e redução dos teores de PB, FDN, celulose (CEL) e carboidratos totais (CHT) e do pH da silagem de capim-elefante em função do nível de adição de glicerol. Concluindo assim, que o glicerol participa do processo fermentativo das silagens, propiciando boa conservação da massa ensilada e melhora do valor nutritivo da silagem de capim-elefante ensilado em estágio de crescimento avançado.

Gomes (2013) estudou a inclusão de diferentes níveis de glicerina de biodiesel de soja (0, 5, 10, 15 e 20 %, base da massa verde) como aditivo na ensilagem de cana-de-açúcar e da planta inteira do milho. As forrageiras foram armazenadas em silos experimentais de PVC e abertos aos 68 dias. Foi observado aumento no teor de MS, NDT, matéria mineral (MM), CNF e redução do teor da FDN, PB, fibra em detergente ácido (FDA) e EE em função dos níveis de inclusão da glicerina. Com relação à silagem de milho, o autor observou aumento do teor de MS, MM, CNF e NDT, e redução do teor de FDN, PB, FDA e EE em função dos níveis de adição. Foi observada maior DIVMS para as silagens de cana-de-açúcar e de milho com adição de glicerina bruta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (BRASIL) – ANP. **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis 2013**. Rio de Janeiro: ANP, 2013. 231p.
- AMARAL, R.C.; BERNARDES, T.F.; SIQUEIRA, G.R. et al. Características fermentativas e químicas de silagens de capim-marandu produzidas com quatro pressões de compactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.532-539, 2007.
- AVILA, J.S.; CHAVES, A.V.; HERNANDEZ-CALVA, M. et al. Effects of replacing barley grain in feedlot diets with increasing levels of glycerol on *in vitro* fermentation and methane production. **Animal Feed Science and Technology**, v.166-167, n.23 p.265-268, 2011.
- BERGNER, H.; KIJORA, C.; CERESNAKOVA, Z. et al. *In vitro* studies on glycerol transformation by rumen microorganisms. **Archiv Für Tierernährung**, v.48, p.245-256, 1995.
- BODARSKI, R.; WERTELECKI, T.; BOMMER, F. et al. The changes of metabolic status and lactation performance in dairy cows under feeding TMR with glycerin (glycerol) supplement at periparturient period. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities**, v.8, p.1-9, 2005.
- BOYD, J.; BERNARD, J.K.; WEST, J.W. Effects of feeding different amounts of supplemental glycerol on ruminal environment and digestibility of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.96, p.470-476, 2013.
- CARVALHO, E.R.; SCHMELZ-ROBERTS, N.S.; WHITE, H.M. et al. Replacing corn with glycerol in diets for transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.94, n.2, p.908-916, 2011.
- CZERKAWSKI, J.W.; BRECKENRIDGE, G. Fermentation of various glycolytic intermediates and other compounds by rumen microorganisms, with particular reference to methane production. **British Journal Nutrition**, v.27, p.131-146, 1972.
- DeFRAIN, J.M.; HIPPEN, A.R.; KALSCHUR, K.F. et al. Feeding glycerol to transition dairy cows: effects on blood metabolites and lactation performance. **Journal of Dairy Science**, v.87, n.12, p.4195-4206, 2004.
- DEMIGNE, C.C.; YACOUB, C.M.; REMESY, C. Interactions between propionate and aminoacid metabolism in isolated sheep hepatocytes. **British Journal of Nutrition**, v.65, p.301, 1991.
- DIAS JÚNIOR, G.S.; LOPES, N.M.; PESSOA JUNIOR, G. et al. Fermentation profile, composition, and dry matter loss of sugarcane-glycerin silage inoculated with bacteria. In: XXVI WORLD BUIATRICS CONGRESS, 2010, Santiago – Chile. **Anais...** World Buiatrics Congress, [2010]. (CD-ROM).
- DONKIN, S.S. Glycerol from biodiesel production: the new corn for dairy cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, suplemento especial, p.280-286, 2008.
- DONKIN, S.S.; KOSER, S.L.; WHITE, H.M. et al. Feeding value of glycerol as a replacement for corn grain rations fed to lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.5111-5119, 2009.
- DRACKLEY, J.K. Lipid Metabolism. In: D'MELLO, J.P.F. (Ed.) **Farm Animal Metabolism and Nutrition**. Edinburg: The Scottish Agricultural College, 2000. 448p.

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

DROUILLARD, J.S. Glycerin as a feed for ruminants: using glycerin in high concentrate diets. **Journal of Dairy Science**, v.91 (E-Suppl. 1), p.392, 2008.

DUQUE, A.C.A. **Glicerina em substituição ao milho no concentrado de vacas Holandês x Gir em lactação**. 2012. 49f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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

FARIAS, M.S.; PRADO, I.N.; VALERO, M.V. et al. Níveis de glicerina para novilhas suplementadas em pastagens: desempenho, ingestão, eficiência alimentar e digestibilidade. **Semina. Ciências Agrárias**, v.33, p.1177-1188, 2012.

FAVARO, V.R. **Utilização de glicerina, subproduto do biodiesel, na alimentação de bovinos**. 2010. 59f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de ciências Agrárias e Veterinária – Unesp, Jaboticabal.

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

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA. **Code of federal regulations**, Title 21, v.6, 2006.1320 p.

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

GOMES, M.A.B. **Glicerina na qualidade de silagens de cana-de-açúcar e de milho e na produção de oócitos e de embriões *in vitro* de bovinos**. 2013. 90f. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

HARZIA H.; KILK, K.; ARIKO, T. et al. Crude glycerol as glycogenic precursor in feed; effects on milk coagulation properties and metabolic profiles of dairy cows. **Journal of Dairy Research**, v.80, p.190-196, 2013.

ÍTAVO, L.C.V.; SANTOS, M.C.; ÍTAVO, C.C.B.F. et al. Caracterização da glicerina resultante da produção do biodiesel: composição, digestibilidade *in vitro* e perfil de ácidos graxos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 48., 2011, Bélem. **Anais...** Sociedade brasileira de Zootecnia, [2011]. (CD-ROM).

JOHNS, A.T. Fermentation of glycerol in the rumen of sheep. **New Zealand Journal of Science and Technology**, v.32, p.262-269, 1953.

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

KASS, M.; ARIKO, T.; KAERT, T. et al. Effect of replacement of barley meal with crude glycerol on lactation performance of primiparous dairy cows fed grass silage-based diet. **Livestock Science**, v.150, p.240-247, 2012.

KHALILI, H.T.; VARVIKKO, V.T.; HISSA, K. et al. The effect of added glycerol or unprotected free fatty acids or a combination of the two on silage intake, milk production,

rumen fermentation and diet digestibility in cows given grass silage based diets. **Agricultural and Food Science in Finland**, v.6, p.349-362, 1997.

KIJORA, C.; BERGNER, H.; GOTZ, K.P. et al. Research note: investigation on the metabolism of glycerol in the rumen of bulls. **Archives of Animal Nutrition**, v.51, p.342-348, 1998.

KREHBIEL, C.R. Ruminal and physiological metabolism of glycerin. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.1, p.392, 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: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ENERGY AND PROTEIN METABOLISM AND NUTRITION, 2., 2007, Ortigues-Marty, **Proceedings...** Marty: EAAP Publication, Wageningen Academic Publishers, 2007. p.355-356.

LAGES, F.; SILVA, M.G.; LUCAS, C. Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. **Microbiology**, v.145, p.2577-2585, 1999.

LEE, SE-Y.; LEE, SANG-M.; CHO, YOUNG-B. et al. Glycerol as feed supplement for ruminants: *In vitro* fermentation characteristics and methane production. **Animal Feed Science and Technology**, v.166-167, n.23 p.269-270, 2011.

LENG, R.A. Glucose synthesis in ruminants. In: BRANDLY, C.A.; CORNELIUS, C.E. (Ed.) **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**. v.14. Academic Press: New York, 1970. p.241-242.

LINKE, P.L.; DeFRAIN, J.M.; HIPPEN, A.R. et al. Ruminal and plasma responses in dairy cows to drenching or feeding glycerol. **Journal of Dairy Science**, v.87 (Suppl.), p.343, 2004.

MACHADO, F.S.; RODRIGUEZ, N.M.; GONÇALES, L.C. et al. Consumo e digestibilidade aparente de silagens de sorgo em diferentes estádios de maturação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.6, p.1470-1478, 2011.

MAYES, P.A.; BENDER, D.A. Gliconeogênese e controle da glicose sanguínea. In: MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A. et al. (Ed.) **Haper: bioquímica ilustrada**. 26.ed. São Paulo: Atheneu, 2006. 692p.

McDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; HERON, S.J.E. **The biochemistry of silage**. 2.ed. Marlow: Chalcomb Publications, 1991. 340p.

MENÊSES, N.N. **Uso da glicerina bruta na ensilagem de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum.)**. 2012. 101f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal do Tocantins, Araguaína.

MORIN, P.; HAMAD, B.; SAPALY, G. et al. Transesterification of rapessed oil with ethanol. **Applied Catalysis A: General**, v.330, p.69-76, 2007.

NOVAES, L.P.; LOPES, F.C.F.; CARNEIRO, J.C. **Silagens: oportunidades e pontos críticos**. In: Comunicado Técnico 43. Juiz de Fora: Embrapa-CNPGL, 2004, p.1-10.

NRC – NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. Washington: National Research Council, 7. ed., 2001. 381p.

OLIVEIRA, J.S.; ANTONIASSI, R.; FREITAS, S.C. et al. Composição química da glicerina produzida por usinas de biodiesel no Brasil e potencial de uso na alimentação animal. **Ciência Rural**, v.43, n.3, p.509-412, 2013.

OLIVEIRA, J.S.; CARNEIRO, V.F.; LOPES, F.C.F. et al. Valor nutritivo, perfil de

fermentação e consumo de silagens de milho aditivadas com níveis crescentes de glicerina bruta. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 48., 2011, Belém. **Anais...** Belém: Sociedade Brasileira de Zootecnia, [2011]. (CD-ROM).

OLIVEIRA, L.B.; PIRES, A.J.V.; CARVALHO, G.G.P. et al. Perdas e valor nutritivo de silagens de milho, sorgo-sudão, sorgo forrageiro e girassol. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.1, p.61-67, 2010.

OMAZIC, A.W.; TRAVÉN, M.; BERTILSSON, J. et al. High and low purity glycerin supplementation to dairy cows in early lactation: effects on silage intake, milk production and metabolism. **Animal**, v.17; n.9, p.1479-1485, 2013.

OSBORNE, V.R.; ODONGO, N.E.; CANT, J.P. et al. Effects of supplementing glycerol and soybean oil in drinking water on feed and water intake, energy balance, and production performance of periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.698-707, 2009.

PEDREIRA, M.S.; PRIMAVESI, O. Impacto da produção animal sobre o ambiente. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Ed.) **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006. 583p.

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

RESENDE, K.T.; TEIXEIRA, I.A.M.A.; FERNANDES, M.H.M.R. Metabolismo de energia. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Ed.) **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006. 583p.

SCHMIDT, P.; ROSSI JUNIOR, P.; TOLEDO, L.M. et al. Perdas fermentativas e composição bromatológica da entrecasca de palmito pupunha ensilada com aditivos químicos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.2, p.262-267, 2010.

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

SIQUEIRA, K.B.; PINHO, M.C. ; MERCÊS, E.S. O que comanda o crescimento da produção de leite no Brasil?. In: SIQUEIRA, K.B.; CARNEIRO, A.V. (Ed.). **Panorama do Leite – Ano 6, n.65 (abr/2013)**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2013.

TERRÉ, M.; NUDDA, A.; CASADO, P. et al. The use of glycerin in rations for light lamb during the fattening period. **Animal Feed Science and Technology**, v.164, n.3-4, p.262-267, 2011.

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

VALADARES FILHO, S.C.; MACHADO, P.A.S.; CHIZZOTTI, M.L. et al. **Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos**. 3.ed., Viçosa: UFV/DZO, 2010. 502p.

VALADARES FILHO, S.C.; PINA, D.S. Fermentação ruminal. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Ed.) **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006. 583p.

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

WEISS, W.P.; CHAMBERLAIN, D.G.; HUNT, C.W. Feeding silages. In: *Silage Science and*

technology. BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. (Eds). **American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science of America**. Madison, Wisconsin, 2003. 469-504p.

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

CAPÍTULO I

GLICERINA BRUTA COMO ADITIVO NA ENSILAGEM DO MILHO

RESUMO

FRANÇA, Almira Biazon. **Glicerina bruta como aditivo na ensilagem do milho**. 2014. 105p Tese (Doutorado em Zootecnia). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Objetivou-se, com o presente estudo, avaliar o efeito da adição de níveis crescentes de glicerina bruta como aditivo na ensilagem do milho sobre o valor nutritivo, os parâmetros de qualidade da fermentação e a degradabilidade ruminal *in situ* da silagem. Foram avaliados quatro níveis de inclusão de glicerina bruta (0, 5, 10 e 15% de glicerina bruta, base da matéria natural - MN) como aditivo na ensilagem do milho. Para o estudo da avaliação do valor nutritivo e parâmetros de qualidade da fermentação das silagens foi utilizado o delineamento experimental em blocos casualizados, com quatro blocos (períodos de avaliação) e quatro tratamentos (0, 5, 10 e 15% de glicerina bruta, base da matéria natural – MN). No estudo da degradabilidade ruminal da matéria seca (MS) e fibra em detergente neutro (FDN) das silagens foi utilizado o delineamento em quadrado latino 4 x 4, com quatro tratamentos (0, 5, 10 e 15% de glicerina bruta, base da MS), quatro vacas em lactação fistuladas no rúmen e quatro períodos de avaliação. A glicerina bruta foi adicionada à forragem de planta inteira de milho picada por meio de misturador e armazenadas em quatro silos tipo trincheira (0,80 m x 0,60 m x 17 m) com capacidade para 10 toneladas cada. Foi observado efeito linear ($P < 0,05$) da adição da glicerina no teor de MS, com aumento de 66,14% nas silagens com 15% de adição de glicerina em relação à controle. Com relação aos teores de proteína bruta (PB), FDN e fibra em detergente ácido (FDA) foi observada redução linear ($P < 0,05$) para as silagens com 5, 10 e 15% em relação à controle, sendo a redução da FDN mais acentuada, de aproximadamente 24%. Consequentemente foi observado acréscimo ($P < 0,05$) dos teores de carboidratos não fibrosos (CNF), nutrientes digestíveis totais (NDT) e da digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS). A inclusão de glicerina bruta não afetou ($P > 0,05$) o pH das silagens que obteve valor médio de 3,89. Apesar de não ter ocorrido alterações no pH, a adição de glicerina bruta provocou redução linear ($P < 0,05$) nas concentrações de lactato, acetato e butirato. No entanto, não houve efeito ($P > 0,05$) na concentração de propionato, com teor médio de 0,051%. Não foi observada diferença ($P > 0,05$) para a taxa constante de degradação (c) da MS das silagens de milho aditivadas com níveis crescentes de glicerina bruta. No entanto, foi observada resposta linear positiva ($P < 0,05$) para a degradabilidade potencial (DP) da MS, com aumento de 10,27 % para as silagens com 15% de adição de glicerina bruta em relação à controle. A taxa constante de degradação (c) e a DP da FDN da silagem de milho não foram influenciadas ($P > 0,05$) pelos níveis de adição da glicerina bruta. Foi observado aumento ($P < 0,05$) da degradabilidade efetiva (DE) da MS e da FDN em função dos níveis de adição da glicerina bruta quando calculadas com as taxas de passagem estimadas de 5,06; 5,26; 5,28 e 5,49 %/h, respectivamente, silagem de milho com 0, 5, 10 e 15% de glicerina bruta.

Palavras-chave: Carboidratos. Degradabilidade. Matéria seca.

ABSTRACT

FRANÇA, Almira Biazon. **Crude glycerin as additive in corn silage**. 2014. 105p Thesis (Doctor Science in Animal Science). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

This study aimed to evaluate the effect of adding increasing levels of crude glycerin as an additive in corn silage on the nutritive value, quality parameters of fermentation and *in situ* degradability of silage. Four levels of inclusion of crude glycerin (0, 5, 10 e 15% crude glycerin, based nature matter – NM) as an additive in corn silage were evaluated. To study the evaluation of the nutritional value and quality parameters of silage fermentation experimental design was used in a randomized block design with four blocks (trial periods) and four treatments (0, 5, 10 and 15% crude glycerin base nature matter - MN). In the study of ruminal degradability of dry matter (DM) and neutral detergent fiber (NDF) of the silages were used in a 4 x 4 Latin square design, with four treatments (0, 5, 10 and 15% crude glycerin base NM), four fistulated lactating cows rumen and four periods. The crude glycerin was added to the forage whole corn plant chopped through mixer and stored in four silos trench type (0.80 m x 0.60 m x 17 m) with a capacity of 10 tons each. Linear effect ($P < 0.05$) the addition of glycerin in the dry matter (DM) was observed with an increase of 66.14% in silages with 15% adding glycerin. With respect to crude protein (CP), neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF) linear reduction ($P < 0.05$) of silages with 5, 10 and 15 % was observed compared to control, with the most pronounced reduction in NDF, approximately 24%. Consequently linear increase ($P < 0.05$) on the content of non-fiber carbohydrates (NFC), total digestible nutrients (TDN) and *in vitro* digestibility of dry matter (IVDDM) was observed. The inclusion of glycerin did not affect ($P > 0.05$) the pH of the silage which obtained a mean value of 3.89. Although not occurred changes in pH, addition of glycerin caused a linear decrease ($P < 0.05$) in the concentrations of lactate, acetate and butyrate. However, there was no effect ($P > 0.05$) in the concentrations of propionate with an average grade of 0.051%. No difference ($P > 0.05$) was observed for degradation rate constant (c) of the corn silage with increasing levels of crude glycerin. However, increased linearly ($P < 0.05$) for the potential degradability (PD) of MS, an increase of 10.27% for silage with 15% added glycerin compared to control. The degradation rate constant (c) and PD of NDF of corn silage were not affected ($P > 0.05$) by the addition of crude glycerin. Increase ($P < 0.05$) in effective degradability (ED) of DM and NDF according to the level of addition of crude glycerin was observed when calculated passage rates estimated 5.06; 5.26; 5.28 and 5.49 %/h, respectively, corn silage with 0, 5, 10 and 15% crude glycerin, were observed.

Keywords: Carbohydrates. Degradability. Dry matter.

1 INTRODUÇÃO

Embora nas regiões tropicais exista elevado número de espécies forrageiras com grande potencial para utilização na ensilagem e alimentação de ruminantes, a planta inteira do milho tem lugar de destaque, sendo referência na produção de silagem (CRUZ & PEREIRA FILHO, 2001).

A silagem da planta inteira de milho é considerada padrão, em virtude dos adequados teores de matéria seca (MS) e de açúcares na forragem no momento da ensilagem, que proporcionam rápida fermentação láctica, promovendo a conservação de alimento de elevado valor nutritivo e de grande aceitação pelos animais (OLIVEIRA et al., 2010).

No entanto, a utilização do grão de milho na alimentação humana e na produção de etanol tem levado à redução de sua oferta e a grandes oscilações no seu valor de mercado. Sendo importante ingrediente utilizado na dieta de ruminantes, o milho torna-se responsável por parte significativa do custo da alimentação de vacas em lactação, e assim, tem despontado grande interesse na busca por alimentos alternativos ao seu uso.

Desta forma, pode-se destacar a importância dos resíduos da agroindústria como fontes alternativas na alimentação de ruminantes, onde a glicerina poderá ser inserida neste contexto como uma nova fonte de energia na dieta.

Glicerina é o nome comercial de um líquido viscoso, incolor, inodoro, higroscópico e com sabor adocicado. O termo é muito utilizado na literatura como sinônimo de glicerol, apesar da glicerina ser composta por proporções variáveis de glicerol e outros compostos. Em função do desenvolvimento da tecnologia para produção do biodiesel e o elevado potencial agrícola do Brasil, grande quantidade de glicerina tem sido gerada, viabilizando assim seu uso na alimentação animal.

O uso de glicerina em substituição ao milho na ração concentrada de ruminantes tem tomado lugar de destaque nas pesquisas realizadas na área da nutrição animal (DeFRAIN et al., 2004), em virtude do seu maior aporte de glicose, via gliconeogênese, o que pode resultar em melhoria do aporte energético dos animais ou em maior produção de leite nos casos onde o potencial produtivo é limitado pela quantidade de energia disponível para o animal.

O uso da glicerina como aditivo na ensilagem tem despertado o interesse de pesquisadores e estudiosos da área, de forma que já foram realizados trabalhos avaliando o seu uso na ensilagem da cana-de-açúcar (DIAS JÚNIOR et al., 2010; GOMES, 2013), da planta inteira do milho (OLIVEIRA et al., 2011; GOMES, 2013) e do capim-elefante (MENÊSES, 2012).

O glicerol é fundamental no metabolismo de microrganismos, onde atua como precursor de numerosos compostos e como regulador de vários mecanismos bioquímicos intracelulares (LAGES et al., 1999). Tal característica, segundo Gomes (2013) poderia contribuir também no processo de fermentação das silagens, além de facilitar a mistura, evitando operações trabalhosas no momento do trato dos animais.

Diante do exposto, objetivou-se avaliar o efeito da adição de níveis crescentes de glicerina bruta como aditivo na ensilagem do milho sobre o valor nutritivo, os parâmetros de qualidade da fermentação e a degradabilidade ruminal *in situ* da silagem.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Campo Experimental José Henrique Brusqui (CEJHB), pertencente à Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Coronel Pacheco – MG.

Foram avaliados quatro níveis de inclusão de glicerina bruta (0, 5, 10 e 15% de glicerina bruta, base da matéria natural - MN) como aditivo na ensilagem da planta inteira do milho.

Para o estudo da avaliação do valor nutritivo e parâmetros de qualidade da fermentação das silagens foi utilizado o delineamento experimental em blocos casualizados, com quatro blocos (quatro períodos de avaliação de 12 dias cada) e quatro tratamentos (0, 5, 10 e 15% de glicerina bruta, base da MN).

No estudo da degradabilidade ruminal da matéria seca (MS) e fibra em detergente neutro (FDN) das silagens foi utilizado o delineamento em quadrado latino 4 x 4, com quatro tratamentos (0, 5, 10 e 15% de glicerina bruta, base da MN), quatro vacas em lactação fistuladas no rúmen e quatro períodos de avaliação. Cada fase do quadrado latino compreendeu 12 dias, sendo sete dias de adaptação dos animais às dietas experimentais, conforme recomendado por Oliveira et al. (2001), e cinco dias de coletas. Foram utilizadas quatro vacas múltíparas, Holandês x Gir, no terço médio da lactação, com produção média de 29 kg/dia de leite e peso corporal de, aproximadamente, 549 kg, e providas de cânula ruminal.

A forragem de milho utilizada para ensilagem foi colhida das lavouras do CEJHB, no período de fevereiro a março de 2011, sendo realizadas duas colheitas em épocas distintas em virtude das condições climáticas da região neste período do ano. A forrageira obtida na primeira colheita foi utilizada para o abastecimento dos silos dos tratamentos 0 e 5% de adição de glicerina bruta, e a obtida na segunda colheita para o abastecimento dos silos dos tratamentos 10 e 15% de glicerina bruta. O valor nutritivo da forragem de planta inteira de milho utilizada para o abastecimento dos silos está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Valor nutritivo da planta inteira de milho utilizada para ensilagem

Item	Forrageira	
	1º Colheita	2º Colheita
Matéria seca (%)	30,74	40,21
Matéria mineral (%MS)	6,04	5,93
Matéria orgânica (%MS)	93,96	94,07
Proteína bruta (%MS)	6,26	6,50
Fibra em detergente neutro (%MS)	70,25	69,95
Fibra em detergente ácido (%MS)	34,81	32,63
Lignina (%MS)	5,50	5,14
NIDN (%NT)	29,46	29,33
NIDA (%NT)	8,99	9,57
Carboidratos totais (% da MS)	85,96	84,24
Nutrientes digestíveis totais ¹ (%MS)	56,73	59,57
N-NH ₃ /NT (%)	2,98	2,63
DIVMS ² (%MS)	67,95	65,89

¹Weiss et al. (1992); ²Tilley & Terry (1963); NIDN = nitrogênio insolúvel em detergente neutro; NIDA = nitrogênio insolúvel em detergente ácido; N-NH₃/NT = nitrogênio amoniacal em porcentagem do nitrogênio total; DIVMS = digestibilidade *in vitro* da matéria seca

A glicerina bruta (Tabela 2) utilizada como aditivo foi fornecida pela fábrica de biodiesel da ADM[®] (Archer Daniels Midland Company Ltda., Rondonópolis, MT), e obtida a partir do óleo de soja, sendo misturada à forragem de planta inteira de milho picada no

momento da ensilagem por meio de vagão forrageiro misturador DATARANGER[®] (American Calan Inc., Northwood, NH, EUA), nos níveis de 0, 5, 10 e 15% (base da MN).

Tabela 2. Composição química, digestibilidade *in vitro* da matéria seca, densidade e pH da glicerina bruta utilizada no experimento

Item	Teor
Matéria seca (%)	76,59
Matéria mineral (%MS)	7,32
Matéria orgânica (%MS)	92,68
Proteína bruta (%MS)	0,00
Energia bruta ¹ (Cal/g)	3,46
Densidade	1,25
pH ²	5,65
Glicerol ² (%MS)	81,61
Metanol ² (%MS)	0,02
DIVMS ³ (%MS)	74,16

¹Silva e Queiroz (2002); ²Análise realizada pela empresa ADM[®]; ³Tilley & Terry (1963); DIVMS = digestibilidade *in vitro* da matéria seca

As quantidades adicionadas de glicerina bruta à forragem de planta inteira de milho no momento da ensilagem, bem como o valor nutritivo da planta inteira de milho após a adição da glicerina bruta, estão apresentadas nas Tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3. Quantidades adicionadas de glicerina bruta

Quantidade	Níveis de adição de glicerina bruta ¹ (% da MN)			
	0	5	10	15
Forrageira (kg de MV)	10.700	10.120	8.600	9.100
Forrageira (kg de MV/m ³)	1.300	1.241	1.054	1.115
Glicerina bruta (kg)	0	532	959	1.600
Total (kg)	10.700	10.650	9.590	10.700

¹0, 5, 10 e 15: respectivamente, níveis de adição de glicerina bruta na silagem de milho; MV = matéria verde

Tabela 4. Valor nutritivo da planta inteira de milho após a adição da glicerina bruta

Item	Níveis de adição de glicerina bruta ¹ (% da MN)			
	0	5	10	15
Matéria seca (%)	30,74	32,04	44,21	44,33
Matéria mineral (%MS)	6,04	5,24	5,59	5,86
Matéria orgânica (%MS)	93,96	94,76	94,41	94,14
Proteína bruta (%MS)	6,26	5,49	5,12	4,43
Fibra em detergente neutro (%MS)	70,25	63,72	57,32	54,71
Fibra em detergente ácido (%MS)	34,81	31,37	27,28	26,46
Lignina (%MS)	5,50	5,55	4,52	4,62
NIDN (%NT)	29,46	32,79	32,87	35,93
NIDA (%NT)	8,99	10,15	12,41	10,65
Carboidratos totais (%MS)	85,96	87,71	87,10	88,27
Glicerol (%MS)	0,12	6,69	12,99	22,15
Nutrientes digestíveis totais ² (%MS)	56,73	59,04	62,96	62,29
N-NH ₃ /NT (%)	2,98	3,85	3,85	5,08
DIVMS ³ (%MS)	67,95	72,27	74,70	77,31

¹0, 5, 10 e 15: respectivamente, níveis de adição de glicerina bruta na silagem de milho; ²Weiss et al. (1992); ³Tilley & Terry (1963); NIDN = nitrogênio insolúvel em detergente neutro; NIDA = nitrogênio insolúvel em detergente ácido; NT = nitrogênio total; N-NH₃/NT = nitrogênio amoniacal em porcentagem do nitrogênio total; DIVMS = digestibilidade *in vitro* da matéria seca

Para o armazenamento da forragem foram utilizados quatro silos tipo trincheira (0,80 m x 0,60 m x 17 m) com capacidade para 10 toneladas cada. Os silos foram abertos em julho de 2011, sendo as silagens utilizadas na alimentação de 12 vacas em lactação, sendo quatro vacas fistuladas no rúmen e oito intactas, por um período total de 48 dias (quatro períodos experimentais de 12 dias).

2.1 Valor Nutritivo e Parâmetros de Qualidade da Fermentação das Silagens

Amostras das silagens (400 g) de cada silo foram coletadas do 8º ao 12º dia de cada período experimental. Imediatamente após as coletas, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados e armazenadas a -18°C.

Ao final de cada período experimental, as amostras das silagens foram descongeladas em temperatura ambiente para a realização da amostra composta. Esta foi feita por meio da homogeneização de todas as amostras obtidas do mesmo silo no período, sendo retirados, aproximadamente, 400 g de silagem/silo/período, que foi subdividida em duas amostras de 200 g cada. A primeira amostra foi pré secada em estufa de ventilação forçada (60±50°C; 72 horas), posteriormente moída em moinho tipo *Willey* com peneira de porosidade de 1 mm e acondicionada em potes plásticos devidamente identificados para posteriores análises.

A segunda amostra (200 g) foi submetida à prensagem hidráulica e, após coagem e homogeneização do suco, o valor de pH foi determinado com medidor de pH digital (TEC 3MP, Tecnal Equipamentos para Laboratórios, Piracicaba/SP). Posteriormente, duas alíquotas de 10 mL de suco de silagem foram colocadas em frascos contendo oito gotas de H₂SO₄ 50% v/v (subamostra 1) e 2 mL de ácido metafosfórico a 25% (subamostra 2) e armazenadas -18°C.

Após o descongelamento em temperatura ambiente, a subamostra 1 foi analisada quanto à concentração de nitrogênio amoniacal mediante destilação com hidróxido de potássio (KOH) 2N, conforme técnica descrita por Preston (1995). Na subamostra 2 foram determinadas as concentrações dos ácidos láctico, acético, butírico e propiônico, segundo metodologia descrita por Wilson (1971), em que as amostras após serem descongeladas em temperatura ambiente foram centrifugadas a 11.000 g e filtradas em filtro de porosidade de 45 µm e acondicionadas em *vial* para injeção em cromatógrafo gasoso (Agilent Technologies modelo 6890N) e posterior cálculo das concentrações.

Foram realizadas análises químicas para determinação dos teores de MS a 105 °C, nitrogênio total, extrato etéreo (EE), matéria mineral (MM), fibra em detergente ácido (FDA), lignina (LIG) e celulose (CEL) de acordo com Silva & Queiroz (2002), do teor de FDN segundo Mertens (2002) e, glicerol (GLI) segundo Moreira et al., 2011. Foi realizada também a determinação da digestibilidade *in vitro* da MS (DIVMS) (TILLEY & TERRY, 1963).

Os teores de nutrientes digestíveis totais (NDT) foram estimados conforme equação descrita por Weiss et al. (1992):

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

em que: FDNn = fibra em detergente neutro livre de nitrogênio; PB = proteína bruta; MM = cinzas; EE = extrato etéreo; NIDA = nitrogênio insolúvel em detergente ácido; LIG = lignina; e FDN = fibra em detergente neutro.

As características químicas como teor de MS, pH, porcentagem de nitrogênio amoniacal como proporção do nitrogênio total e conteúdos de ácido acético e de ácido butírico das silagens foram utilizadas como parâmetros de avaliação da eficiência do processo fermentativo para a conservação da forragem ensilada, conforme proposto por Tomich et al. (2003).

2.2 Degradabilidade Ruminal *In Situ* das Silagens

Para estudo da degradabilidade ruminal *in situ* da MS e da FDN das silagens aditivadas com níveis crescentes de inclusão de glicerina bruta no momento da ensilagem do milho, amostras de cada silagem foi coletada no início do primeiro período de avaliação, as mesmas foram pré secadas (55°C, 72 h), moídas (5 mm), acondicionadas em sacos de náilon (10 x 20 cm; porosidade 50 µ; 10 a 20 mg de amostra/cm² de área de saco) e incubadas, em cada período experimental, no rúmen de quatro vacas Holandês x Gir providas de cânula ruminal.

As vacas utilizadas no ensaio de degradabilidade ruminal foram alimentadas com silagem de milho contendo 5, 10 e 15% de glicerina bruta (base da MN), e suplemento concentrado à base de farelo de soja, fubá de milho e minerais, numa proporção volumoso:concentrado de 60:40. As mesmas foram confinadas em curral, localizado no CEJHB, do tipo *free stall*, com cochos individuais, para o fornecimento da mistura total da ração, equipados com portões eletrônicos do tipo *Calan gate* (American Calan Inc., Northwood, NH, EUA), e cochos coletivos para o fornecimento de água *ad libitum*.

Antes da incubação, todos os sacos foram mergulhados em água a temperatura ambiente por 30 min. Os sacos referentes ao tempo zero foram retirados e congelados. Os demais foram colocados no rúmen e retirados 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas após a incubação, sendo também congelados. Posteriormente, todos os sacos foram descongelados, lavados, pré-secados (55°C, 72 h), pesados, e os resíduos analisados para MS, FDN seguindo metodologias já citadas.

Os parâmetros de degradação ruminal *in situ* da MS e da FDN das silagens foram estimados pelo processo iterativo do algoritmo Marquardt, com auxílio do procedimento para modelos não lineares (PROC NLIN) do pacote estatístico SAS versão 9.0, e ajustados por vaca, segundo a equação proposta por Mehrez & Ørskov (1977).

As degradabilidades efetivas foram calculadas segundo Ørskov & McDonald (1979), utilizando-se taxas de passagem no rúmen estimadas pela equação proposta pelo NRC (2001):

$$Kp_s = 3,054 + (0,0614 * CMS \% PC)$$

Em que: CM%PV = consumo de MS em porcentual do peso corporal.

Os modelos de degradação ruminal da MS e da FDN foram também ajustados (PROC NLIN do pacote estatístico SAS versão 9.0) por tratamento, segundo a equação proposta por Mehrez & Ørskov (1977), utilizando-se, simultaneamente, as quatro repetições disponíveis (vacas).

2.3 Análises Estatísticas

Os resultados referentes ao valor nutritivo e aos parâmetros de qualidade da fermentação da silagem foram submetidos ao teste de normalidade de distribuição dos erros e, subsequentemente, à análise de variância ($\alpha = 0,05$). As médias foram estudadas por análises de regressão linear e quadrática, utilizando-se o teste “t” a 5% de probabilidade. Foi o utilizado o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2003), conforme o modelo estatístico:

$$Y_{ij} = \mu + N_i + P_j + e_{ij}$$

Em que:

Y_{ij} = variável estudada do tratamento i (0, 5, 10 e 15% de glicerina bruta na silagem de milho) no bloco j

μ = média geral

N_i = efeito da adição i (0, 5, 10 e 15% de glicerina bruta na silagem de milho)

P_j = efeito do bloco j

e_{ij} = erro aleatório associado a cada observação

Os resultados da degradação parcial foram estudados por análises de regressão linear e

quadrática ($\alpha = 0,05$) utilizando-se o teste “t” a 5% de probabilidade. Foi o utilizado o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2003), conforme o modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + N_i + P_j + A_k + e_{ijk}$$

Em que:

Y_{ijk} = variável estudada no animal k, do período j, do tratamento i (0, 5, 10 e 15% de glicerina bruta na silagem de milho)

μ = média geral

N_i = efeito da adição i (0, 5, 10 e 15% de glicerina bruta na silagem de milho)

P_j = efeito do período j

A_k = efeito do animal k

e_{ijk} = erro aleatório associado a cada observação

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Valor Nutritivo das Silagens

Foi observado efeito linear ($P < 0,05$) no teor de matéria seca (MS) das silagens com a inclusão da glicerina bruta, com aumento de 51,18% na silagem com 15% de glicerina bruta em relação à controle (Tabela 5). O aumento do teor de MS está relacionado ao teor de MS da glicerina bruta utilizada, de 76,59% (Tabela 2), teor este superior ao da forrageira ensilada. Aliado ao teor de MS da glicerina bruta outro fator que contribuiu para o aumento do teor de MS das silagens foi o teor de MS da forrageira utilizada nos tratamentos 10 e 15%; de 40,21%; contra 30,74% de MS observado para a forrageira utilizada nos tratamentos 0 e 5% (Tabela 1).

Tabela 5. Valor nutritivo das silagens de milho aditivadas com glicerina bruta

Variável	Níveis de adição de GB (%) ¹				Equação	r ²	CV (%)
	0	5	10	15			
MS (%)	27,04	29,71	39,67	40,88	$\hat{Y} = 26,60 + 1,03X$	0,91	1,86
MM (%MS)	6,76	5,73	6,22	6,45	$\hat{Y} = 6,30$	-	9,68
MO (%MS)	93,24	94,27	93,78	93,55	$\hat{Y} = 93,71$	-	0,65
PB (%MS)	6,51	6,35	5,80	5,38	$\hat{Y} = 6,60 - 0,079X$	0,96	3,18
FDN (%MS)	76,04	69,44	65,69	57,81	$\hat{Y} = 76,01 - 1,17X$	0,98	3,50
FDA (%MS)	38,39	34,85	27,67	26,92	$\hat{Y} = 38,20 - 0,83X$	0,92	7,02
LIG (%MS)	4,60	4,39	3,63	3,08	$\hat{Y} = 4,72 - 0,11X$	0,96	7,71
CEL (%MS)	31,59	29,11	25,11	22,22	$\hat{Y} = 31,82 - 0,64X$	0,99	5,13
GLI (%MS)	0,0	6,56	12,14	18,25	$\hat{Y} = 0,19 + 1,21X$	0,99	18,17
NIDN (%MS)	0,28	0,26	0,29	0,25	$\hat{Y} = 0,27$	-	8,36
NIDN (%NT)	25,35	23,14	28,08	25,26	$\hat{Y} = 25,46$	-	9,48
NIDA (%MS)	0,13	0,14	0,12	0,10	$\hat{Y} = 0,12$	-	14,87
NIDA (%NT)	11,83	12,05	11,59	10,76	$\hat{Y} = 11,56$	-	16,19
NDT ² (%MS)	56,44	62,42	66,85	69,95	$\hat{Y} = 57,17 + 0,90X$	0,98	2,79
DIVMS ³ (%)	64,40	69,57	72,43	76,45	$\hat{Y} = 64,86 + 0,78X$	0,98	3,90

¹0, 5, 10, 15: respectivamente, níveis de adição de glicerina bruta na silagem de milho (base matéria seca, %); ²Weiss et al. (1992); ³Tilley & Terry (1963); MS = matéria seca; MM = matéria mineral; MO = matéria orgânica; PB = proteína bruta; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; LIG = lignina; CEL = celulose; GLI = glicerol; NIDN = nitrogênio insolúvel em detergente neutro; NIDA = nitrogênio insolúvel em detergente ácido; NDT = nutrientes digestíveis totais; DIVMS = digestibilidade *in vitro* da matéria seca

O aumento do teor de MS das silagens pode ser considerado vantajoso, visto que, as silagens sem glicerina bruta apresentaram teor de MS abaixo da faixa recomendada por McDonald et al. (1991), de 30 a 40%, para uma silagem de boa qualidade.

O teor de MS das forrageiras é uma característica que pode comprometer a qualidade das silagens, pois forrageiras com baixos teores de MS não apresentam fermentação láctica adequada, o que favorece a produção de ácido butírico. Segundo McDonald et al. (1991), o alto teor de umidade nas plantas usadas na produção de silagem interfere na variação do pH preconizado para que o crescimento de bactérias do gênero *Clostridium* seja inibido. Por outro lado, silagens com teor de MS superior a 40% também podem apresentar baixa qualidade nutricional, pois são mais susceptíveis a danos por aquecimento e aparecimento de fungos, uma vez que a remoção de oxigênio é dificultada, por não permitir compactação adequada (OLIVEIRA et al., 2010).

Outros autores também observaram aumento do teor de MS da silagem de milho aditivada com glicerina, como Oliveira et al. (2011) que observaram teor de MS de 32,9; 33,4;

34,0; 35,7 e 35,4%, para a inclusão de 0, 3, 6, 9 e 12% de glicerina bruta (base da MN) como aditivo na ensilagem do milho. Gomes (2013) em estudo da inclusão de diferentes níveis de glicerina de biodiesel de soja (0, 5, 10, 15 e 20%, base da MN) como aditivo na ensilagem do milho também observou efeito da adição da glicerina bruta sobre o teor da MS, com valores de 31,59; 34,36; 36,84; 39,96; 42,78%, respectivamente 0, 5, 10, 15 e 20% de glicerina. Contudo, Valadares Filho et al. (2010) reportaram em revisão de literatura valor médio para o teor de MS da silagem de milho de $31,59 \pm 7,60$ (n = 285).

Foi observada redução linear ($P < 0,05$) no teor de proteína bruta (PB) das silagens em função do incremento da adição da glicerina bruta, em que cada 1% proveu redução de 0,079% no teor de PB. Normalmente as gliceras apresentam baixo conteúdo de nitrogênio, no caso da glicerina bruta utilizada no presente estudo não foi detectado nitrogênio (Tabela 2) por meio da análise de nitrogênio total realizada (SILVA & QUEIROZ, 2002), o que justifica a redução do teor de PB das silagens em função dos níveis de adição de glicerina bruta.

Valadares Filho et al. (2010) e Oliveira et al. (2011) relataram teor PB para a silagem de milho superiores aos observados no presente estudo, de $7,27 \pm 1,16$ (n = 283) e 8,3%, respectivamente, enquanto que Gomes (2013) relatou teor de PB para a silagem de milho sem adição de glicerina menor que a silagem de milho controle do presente estudo, de 6,15%.

Contudo, Oliveira et al. (2011) e Gomes (2013) também observaram redução do teor de PB nas silagens de milho em função da adição de níveis crescentes de glicerina bruta, com valores observados por Oliveira et al. (2011) de 8,3; 8,2; 7,6; 7,0 e 6,6, respectivamente, 0, 3, 6, 9, e 12% de glicerina, e por Gomes (2013) de 6,15; 5,39; 5,09; 4,51 e 4,30%, respectivamente, 0, 5, 10, 15 e 20% de glicerina bruta adicionada na silagem de milho.

Foi observado aumento linear ($P < 0,05$) para os teores de glicerol das silagens em função do aumento da quantidade de glicerina bruta adicionada, o que era esperado, no entanto, as silagens apresentaram teor de glicerol inferior (0,0; 6,56; 12,14 e 18,25%, respectivamente, 0, 5, 10 e 15% de glicerina bruta) ao da forrageira de planta inteira de milho após a adição da glicerina bruta (0,12; 6,69; 12,99 e 22,15% respectivamente, 0, 5, 10 e 15% de glicerina bruta), o que indica que ocorreu fermentação desse aditivo na ensilagem.

Oliveira et al. (2011) também observaram redução do teor de glicerol nas silagens de milho com adição de 0, 3, 6, 9 e 12% de glicerina bruta, com teores de glicerol nas silagens de 0,00; 0,085; 0,111; 0,184 e 0,189, respectivamente.

Não foi observado efeito ($P > 0,05$) no teor dos compostos nitrogenados complexados à fibra (NIDN e NIDA) das silagens, o que poderia interferir no consumo e no aproveitamento dos nutrientes. Valadares Filho et al. (2010) relataram teor de NIDN/N e NIDA/N para a silagem de milho de $19,52 \pm 5,05$ (n = 21) e $9,89 \pm 3,40$ (n = 20), respectivamente.

Oliveira et al. (2010) observaram teor de NIDN da silagem de milho de 13,9% do nitrogênio total, valor este menor que a média observada no presente trabalho de 24,58% do nitrogênio total, o que pode estar relacionado, em parte, ao menor teor de FDN da silagem de milho avaliada por estes autores, de 60,7%. Boa parte dos compostos nitrogenados dos volumosos encontra-se ligada à parede celular na forma de NIDN e NIDA. O NIDN é digestível, porém de lenta degradação no rúmen, enquanto o nitrogênio retido na forma de NIDA é praticamente indigestível e está geralmente associado à lignina e a outros compostos de difícil degradação (VAN SOEST, 1994).

Foi observada redução linear ($P < 0,05$) da fração fibrosa das silagens, em que cada 1% de glicerina bruta adicionada promoveu reduções de 1,1%, 0,83% e 0,11% nos teores de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina (LIG), respectivamente, sendo a redução da FDN mais acentuada que as demais. Tal redução pode ser atribuída à ausência de componentes fibrosos na glicerina bruta utilizada, e ao efeito diluidor da mesma no teor de FDN, FDA e LIG das silagens.

A redução da fração fibrosa das silagens em função da adição da glicerina bruta é

benéfica, pois as silagens com 0; 5 e 10% de glicerina bruta apresentaram teor alto de FDN acima de 60%, que pode ser considerado limitante para o consumo pelo efeito físico de enchimento ruminal (“fill”) (MERTENS, 1994). Valadares Filho et al. (2010) observaram teores de FDN, FDA e LIG para silagem de milho de $55,26 \pm 6,79$ (n = 207); $31,16 \pm 5,02$ (n = 161) e $4,74 \pm 1,43$ (n = 92), respectivamente.

Oliveira et al. (2011) e Gomes (2013) também observaram redução do teor de FDN e FDA das silagens de milho com a adição de níveis crescentes de glicerina bruta, com valores observados por Oliveira et al. (2011) para a FDN de 57,2; 53,2; 51,9; 51,0 e 49,1%, e para a FDA de 31,0; 27,2; 26,3; 26,2; 24,9%, respectivamente, 0, 3, 6, 9, e 12% de glicerina, e por Gomes (2013) para a FDN de 52,60; 47,7; 44,49; 38,5; 36,9%, e para a FDA de 30,32; 29,44; 23,32; 20,88; 19,19%, respectivamente, 0, 5, 10, 15 e 20% de glicerina bruta adicionada na silagem de milho. No entanto, ambos os autores observaram teor de FDN e FDA menores que aos do presente estudo.

Houve aumento linear ($P < 0,05$) para os teores de nutrientes digestíveis totais (NDT), em que a cada 1% de glicerina bruta promoveu aumento de 0,90% no teor de NDT das silagens, o que pode ser explicado pela redução dos teores de FDN e LIG das silagens em função dos níveis de adição. Valadares Filho et al. (2010) observaram teor de NDT para a silagem de milho de $63,13 \pm 3,46$ (n = 54).

Gomes (2013) também observou aumento do teor de NDT das silagens de milho aditivadas com níveis crescentes de glicerina, com valores de 76,54; 78,17; 83,39; 84,45 e 86,59%, respectivamente, 0, 3, 6, 9 e 12% de glicerina. No entanto, os valores observados por Gomes (2013) estão muito acima dos observados no presente estudo, o que pode estar relacionado ao teor de FDN e FDA das silagens avaliadas pelo autor terem sido menores aos observados no presente estudo.

Também foi observado aumento linear ($P < 0,05$) da digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) em função do aumento da quantidade de glicerina bruta adicionada, o que pode ser consequência da redução da fração fibrosa das silagens.

Embora o teor de FDN de 76,04% das silagens sem adição de glicerina bruta seja considerado alto, estas apresentaram elevado valor da DIVMS, de 64,40%, tendo em vista que, Valadares Filho et al. (2010) observaram valor da DIVMS para silagem de milho com teor de FDN de $55,26 \pm 6,79$ (n = 207) de $60,30 \pm 4,70$ (n = 11).

3.2 Parâmetros de Qualidade da Fermentação das Silagens

Apesar do aumento no teor de MS com a adição de glicerina bruta não foi observado efeito ($P > 0,05$) da glicerina bruta sobre o pH das silagens (Tabela 6), que apresentaram valor médio de 3,89, valor este dentro da faixa (3,8 - 4,0) considerada como ideal para a conservação da silagem (McDONALD et al., 1991), e semelhante ao observado por Oliveira et al. (2010), de 3,8; para silagem de milho com 29,2% de MS.

Oliveira et al. (2011) ao avaliarem o uso de níveis crescentes de glicerina bruta (0, 3, 6, 9 e 12%) como aditivo na silagem de milho observaram redução do pH, com valores de 3,42; 3,44; 3,39; 3,38; 3,33, respectivamente, valores estes menores aos observados no presente estudo.

Com relação à concentração dos ácidos orgânicos foi observado efeito linear negativo ($P < 0,05$) para as concentrações de lactato e acetato, em que a cada 1% de glicerina bruta adicionada no momento da ensilagem provocou redução de 0,29 e 0,25%, respectivamente. Indicando interação do glicerol no processo fermentativo dos microrganismos no silo.

Apesar da redução do lactato as silagens avaliadas neste estudo apresentaram concentrações superiores à 5,0%, considerada por McDONALD et al. (1991) como limite para uma adequada fermentação, e ao relatado por Valadares Filho et al. (2010) de $4,36 \pm 1,61$ (n = 24).

Oliveira et al. (2011) apesar de observarem redução do pH nas silagens de milho aditivadas com níveis crescentes de glicerina bruta, também observaram redução da concentração de lactato em função dos níveis de adição, com valores de 9,61; 7,84; 5,71; 6,59 e 7,62 % da MS, respectivamente, 0, 3, 6, 9 e 12% de glicerina bruta.

No processo fermentativo de uma silagem dá-se maior importância à concentração de ácido láctico, pois este é um ácido forte, sendo responsável pela redução do pH da silagem para a faixa de 3,8 a 4,0, o que possibilita a boa conservação da massa ensilada, garantindo qualidade ao produto final. As concentrações de ácido acético em uma silagem considerada como de boa qualidade devem estar em torno de 0,5 a 2,0% (McDONALD et al., 1991). Dessa forma, as silagens apresentaram concentração elevada de ácido acético, porém a adição de 15% reduziu a concentração de ácido acético para próximo ao do ideal.

Tabela 6. Parâmetros de qualidade da fermentação das silagens de milho aditivadas com glicerina bruta

Variável	Níveis de adição (%) ¹				Equação	r ²	CV (%)
	0	5	10	15			
pH	3,90	3,80	3,92	3,95	$\hat{Y} = 3,89$	-	2,10
Lactato(%MS)	10,72	9,18	8,54	6,02	$\hat{Y} = 10,83-0,29X$	0,94	10,54
Acetato (%MS)	5,92	4,77	2,92	2,38	$\hat{Y} = 5,87-0,25X$	0,96	11,51
Butirato (%MS)	0,020	0,023	0,013	0,015	$\hat{Y} = 0,022-0,0005X$	0,50	19,05
Propionato (%MS)	0,078	0,043	0,040	0,045	$\hat{Y} = 0,051$	-	58,81
N-NH ₃ /NT (%)	5,9	7,02	10,35	11,20	$\hat{Y} = 5,70+0,39X$	0,94	13,65

¹0, 5, 10, 15: respectivamente, níveis de adição de glicerina bruta na silagem de milho (base matéria seca, %); N-NH₃/NT = nitrogênio amoniacal em porcentagem do nitrogênio total

As concentrações de propionato não foram influenciados (P>0,05) pelos níveis de adição da glicerina bruta, no entanto, foi observada redução linear (P<0,05) nas concentrações de ácido butírico, estando os valores na faixa de 0,0 a 0,1% da MS, preconizada por McDonald et al. (1991) para silagem de boa qualidade.

O ácido butírico é o principal ácido orgânico produzido pelas bactérias do gênero *Clostridium*, e o principal relacionado à deterioração da silagem e, conseqüentemente, associado à redução do consumo e do desempenho animal. No entanto, apesar das silagens sem adição de glicerina bruta terem apresentado alta umidade, fato que favorece o desenvolvimento desses microrganismos, essas silagens apresentaram concentrações baixas de butirato.

Oliveira et al. (2011) não observaram efeito dos níveis crescentes de adição de glicerina bruta na silagem de milho sobre a concentração dos ácidos orgânicos acetato, propionato e butirato, com valores médios observados de 1,52; 0,32; 0,047 % da MS, respectivamente. As concentrações de acetato e propionato observados por Oliveira et al. (2011) foram menores aos observados no presente estudo, enquanto que a concentração de butirato foi maior.

Foi observado aumento linear (P>0,05) do teor de nitrogênio amoniacal em porcentagem do nitrogênio total (N-NH₃/NT), em que cada 1% de glicerina bruta adiciona promoveu aumento de 0,39% do N-NH₃/NT.

O teor de N-NH₃/NT observado nas silagens com 15% de adição de glicerina bruta estão na faixa considerada como limite, entre 11 e 12% de N-NH₃/NT para silagens com bom padrão fermentativo (McDONALD et al., 1991). O nitrogênio amoniacal é associado à qualidade fermentativa da silagem, pois é proveniente da degradação da fração proteica realizada pelas bactérias do gênero *Clostridium*.

Oliveira et al. (2011) não observaram efeito dos níveis de adição de glicerina bruta (0,

3, 6, 9, e 12%) na silagem de milho sobre o teor de N-NH₃/NT, com valor médio observado de 3,43%, valor este muito abaixo dos observados no presente estudo.

A redução do teor de glicerol na massa ensilada (Tabela 5) indica que ocorreu a fermentação deste aditivo no silo. Há relatos de utilização dos átomos de carbono do glicerol no metabolismo fermentativo de bacterianas do gênero *Enterobacter*, *Clostridium* e *Lactobacillus* (YAZDANI & GONZALEZ, 2007; SILVA et al., 2009).

No entanto, em virtude da redução das concentrações de lactato, acetato e butirato e a tendência de redução da concentração de propionato, aliados ao aumento do teor de N-NH₃/NT das silagens em função dos níveis crescentes de adição de glicerina bruta, não é possível considerar que o glicerol presente na massa ensilada tenha favorecido o desenvolvimento de um gênero de bactérias específico (*Enterobacter*, *Clostridium* e *Lactobacillus*), mas é possível inferir que a presença do glicerol tenha interferido no metabolismo dessas.

De modo geral, a silagem de milho é considerada padrão, em virtude dos adequados teores de MS e de açúcares encontrados na planta no momento do corte para ensilagem, que favorecem a fermentação láctica, promovendo a conservação de alimento de elevado valor nutritivo e de grande aceitação pelos animais (OLIVEIRA et al., 2010).

Ao avaliar a eficiência do processo fermentativo das silagens com adição de glicerina bruta, conforme a proposta de Tomich et al. (2003), foi observado que a silagem sem adição de glicerina bruta teve sua fermentação qualificada como boa e as demais (5; 10 e 15% de adição de glicerina bruta) como excelente. O que permite inferir que a adição da glicerina bruta na silagem de milho foi benéfica ao processo de fermentação, melhorando as características do material ensilado final (Tabela 7).

Tabela 7. Avaliação da eficiência do processo fermentativo¹

Variável	Níveis de adição de glicerina bruta (% da MN) ²			
	0	5	10	15
Matéria seca (%)	27,04	29,71	39,67	40,88
pH	3,90	3,80	3,92	3,95
Acetato (%MS)	5,92	4,77	2,92	2,38
Butirato (%MS)	0,020	0,023	0,013	0,015
N-NH ₃ /N-Total (%MS)	5,9	7,02	10,35	11,20
	Pontuação			
pH/MS	25	25	25	25
N-NH ₃ /NT	25	25	20	20
Butirato (%MS)	50	50	50	50
Acetato (%MS)	-15	-10	-5	0
Total	85	90	90	95
	Qualificação da fermentação			
	Boa	Excelente	Excelente	Excelente

¹Tomich et al. (2003); ²0, 5, 10, 15: respectivamente, níveis de adição de glicerina bruta na silagem de milho (base matéria seca, %); N-NH₃/NT = nitrogênio amoniacal em porcentagem do nitrogênio total

3.3 Degradabilidade Ruminal *In Situ* das Silagens

Não foi observada diferença (P>0,05) para a taxa constante de degradação (c) da MS das silagens de milho aditivadas com níveis crescentes de glicerina bruta. No entanto, foi observada resposta linear positiva (P<0,05) para a degradabilidade potencial (DP) da MS, com aumento de 10,27% para as silagens com 15% de adição de glicerina bruta em relação à controle (Tabela 8).

A DP considera uma situação teórica na qual os sistemas enzimáticos microbianos não

possuem limitação de tempo de ação (“tempo infinito”) (DETMANN, 2010), o que permite inferir que as silagens com adição de 15% de glicerina bruta teriam 81,40% da MS degradada, contra 73,82% da silagem controle, caso não houvesse limitação de tempo para a ação dos microrganismos.

Valadares Filho et al. (2010) reportaram valor da DP da MS da silagem de milho, considerando período de incubação de 72 h, superior ao observado para a silagem controle, de $76,69 \pm 2,08$ (n = 4).

Tabela 8. Degradabilidade ruminal *in situ* da matéria seca (MS) e fibra em detergente neutro (FDN) das silagens de milho aditivadas com glicerina bruta

Variável	Níveis de adição de GB (%) ¹				Equação	r ²	CV (%)
	0	5	10	15			
Parâmetros (MS)							
c	0,028	0,027	0,029	0,029	$\hat{Y} = 0,028$	-	23,76
DP (%)	73,82	81,35	77,35	81,40	$\hat{Y} = 75,67+0,375X$	0,44	4,19
DE (%)	32,59	42,10	41,10	48,16	$\hat{Y} = 33,52+1,28X-0,024X^2$	0,86	2,21
Parâmetros (FDN)							
c	0,022	0,023	0,021	0,022	$\hat{Y} = 0,022$	-	20,67
DP (%)	68,13	74,44	73,49	74,76	$\hat{Y} = 72,70$	-	7,16
DE (%)	14,76	21,52	23,38	30,09	$\hat{Y} = 15,26+0,957X$	0,96	10,53

¹0, 5, 10, 15: respectivamente, níveis de adição de glicerina bruta na silagem de milho (base matéria natural, %);

²c = taxa constante de degradação; DP = degradabilidade potencial; DE = degradabilidade efetiva

Foi observada resposta linear quadrática (P<0,05) para a degradabilidade efetiva (DE) da MS em função dos níveis de adição de glicerina bruta. A DE foi calculada a partir das taxas de passagens das silagens (Kp_s) estimadas conforme equação proposta pelo NRC (2001), de 5,06; 5,26; 5,28 e 5,49 %/h, respectivamente, silagem de milho com 0, 5, 10 e 15% de glicerina bruta. O aumento da DE da MS observado vem a somar com o resultado obtido para a DIVMS das silagens, o qual aumentou em função dos níveis de adição da glicerina bruta (Tabela 5).

No entanto, a DE da MS observada para as silagens de milho com adição de níveis crescentes de glicerina bruta foi inferior aos valores reportados por Valadares Filho et al. (2010) de $50,77 \pm 2,69$ (n = 4), e por Gomes (2013) em estudo da inclusão de diferentes níveis de glicerina de biodiesel de soja (0, 5, 10, 15 e 20%, base da MN) como aditivo na ensilagem do milho. Embora Gomes (2013) tenha reportado valores para a DE da silagem de milho superior aos observados no presente estudo, o autor também observou resposta positiva para a DE (5%/h) da MS das silagens de milho com 5, 10, 15 e 20% de glicerina em relação ao controle, com valores de 54,98; 61,88; 67,98; 72,54; 76,20 %, respectivamente.

A taxa constante de degradação (c) e a DP da FDN da silagem de milho não foram influenciadas (P>0,05) pelos níveis de adição da glicerina bruta, com valores médios observados de 0,022% e 72,70 %, respectivamente.

Apesar de não ter sido observado efeito da adição da glicerina bruta na DP da FDN das silagens de milho, o valor médio observado de 72,70% pode ser considerado alto quando comparado ao reportado por Valadares Filho et al. (2010) para a silagem de milho, de 56,67 (n = 1), considerando período de incubação de 72 h.

Foi observado aumento (P<0,05) da DE da FDN em função dos níveis de adição da glicerina bruta, quando calculada com as taxas de passagens estimadas de 5,06; 5,26; 5,28 e 5,49 %/h, respectivamente, silagem de milho com 0, 5, 10 e 15% de glicerina bruta. Em que cada 1% de glicerina bruta adicionada na silagem proporcionou aumento de 0,957 % da DE da FDN das silagens. Demonstrando que a adição da glicerina bruta na silagem de milho

melhorou o potencial de aproveitamento da FDN no trato gastrintestinal das vacas, e que conseqüentemente, exercerá efeitos positivos sobre o consumo e produção animal.

Valadares Filho et al. (2010) reportaram valor da DE da FDN para a taxa de passagem de 5 %/h de $21,32 \pm 4,96$ (n = 4), valor próximo ao observado para a silagem com 5% de adição de glicerina bruta.

A FDN é considerada a fonte energética de menor custo para os sistemas de produção de bovinos nos trópicos (DETMANN, 2010), ao mesmo tempo em que, sua taxa de degradação está diretamente relacionada ao efeito físico de enchimento do rúmen (MERTENS, 1994), e conseqüentemente à ingestão de alimentos pelos ruminantes. Assim, o aumento da ingestão de alimentos com maior DE da FDN disponibiliza maior quantidade de energia ao animal por quilo de alimento consumido. Desta forma torna interessante o uso da glicerina bruta como aditivo na ensilagem do milho utilizado na alimentação de vacas no período de transição, visto que, a maior disponibilidade de energia permitiria que a vaca, mesmo ingerindo baixas quantidades de MS, suprisse grande parte de suas demandas energéticas.

4 CONCLUSÕES

A adição de glicerina bruta como aditivo na ensilagem da planta inteira do milho promoveu aumento do teor de matéria seca, redução dos teores de proteína, fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido com conseqüente acréscimo dos teores de carboidratos não fibrosos, nutrientes digestíveis totais e da digestibilidade *in vitro* da matéria seca.

O pH das silagens não foi alterado em função dos níveis de adição da glicerina bruta, no entanto, foi observada redução da concentração dos ácidos orgânicos.

A adição da glicerina bruta aumentou a degradabilidade potencial da matéria seca e a degradabilidade efetiva da matéria seca e da fibra em detergente neutro das silagens.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CRUZ, J.C.; PEREIRA FILHO, I.A. Cultivares de milho para silagem. In: CRUZ, J.C.; PEREIRA FILHO, I.A.; RODRIGUES, J.A.S. et al. (Ed.) **Produção e utilização de silagem de milho e sorgo**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2001. 544p.
- DeFRAIN, J.M.; HIPPEN, A.R.; KALSCHER, K.F. et al. Feeding glycerol to transition dairy cows: effects on blood metabolites and lactation performance. **Journal of Dairy Science**, v.87, n.12, p.4195-4206, 2004.
- DETMANN, E. Fibra na nutrição de novilhas leiteiras. In: PEREIRA, E.S.; PIMENTEL, P.G.; QUEIROZ, A.C. et al. (Eds.) **Novilhas Leiteiras**. Fortaleza: Graphiti, 2010. 632p.
- DIAS JÚNIOR, G.S.; LOPES, N.M.; PESSOA JUNIOR, G. et al. Fermentation profile, composition, and dry matter loss of sugarcane-glycerin silage inoculated with bacteria. In: XXVI WORLD BUIATRICS CONGRESS, 2010, Santiago – Chile. **Anais...** World Buiatrics Congress, [2010]. (CD-ROM).
- FERREIRA, D.F. **Sistema de análise de variância SISVAR DEX/UFLA** ver 4.3 (Build 45). 1999 - 2003.
- GOMES, M.A.B. **Glicerina na qualidade de silagens de cana-de-açúcar e de milho e na produção de oócitos e de embriões *in vitro* de bovinos**. 2013. 90f. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- LAGES, F.; SILVA, M.G.; LUCAS, C. Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. **Microbiology**, v.145, p.2577–2585, 1999.
- MCDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; HERON, S.J.E. **The biochemistry of silage**. 2.ed. Marlow: Chalcomb Publications, 1991. 340p.
- MEHREZ, A.Z.; ØRSKOV, E.R. A study of the artificial fiber bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. **Journal of Agricultural Science**, v.88, p.645-650, 1977.
- MENÊSES, N.N. **Uso da glicerina bruta na ensilagem de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum.)**. 2012. 101f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal do Tocantins, Araguaína.
- MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of the AOAC International**, v.85, p.1217-1240, 2002.
- MERTENS, D.R. Regulation of forage intake. In: FAHEY JÚNIOR, G.C. (Ed.) **Forage quality, evaluation and utilization**. Madison: American Society of Agronomy, 1994. p.450-493.
- MOREIRA, E.A.; REIS, L.G.; ALEVATO, C.B. et al. Método de extração do glicerol livre por saponificação em alimentos para ruminantes. In: X CONGRESSO INTERNACIONAL DO LEITE, 2011, Maceió. **Anais...** Maceió: X Congresso Internacional do Leite. [2011]. (CD-ROM).
- NRC – NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. Washington: National Research Council, 7. ed., 2001. 381p.
- OLIVEIRA, A.S.; VALADARES, R.F.D.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Consumo, digestibilidade aparente, produção e composição do leite em vacas alimentadas com quatro níveis de compostos nitrogenados não protéicos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.4,

p.1358-1366, 2001.

OLIVEIRA, J.S.; CARNEIRO, V.F.; LOPES, F.C.F. et al. Valor nutritivo, perfil de fermentação e consumo de silagens de milho aditivadas com níveis crescentes de glicerina bruta. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 48., 2011, Belém. **Anais...** Belém: Sociedade Brasileira de Zootecnia, [2011]. (CD-ROM).

OLIVEIRA, L.B.; PIRES, A.J.V.; CARVALHO, G.G.P. et al. Perdas e valor nutritivo de silagens de milho, sorgo-sudão, sorgo forrageiro e girassol. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.1, p.61-67, 2010.

ØRSKOV, E.R.; McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agricultural Science**, v.92, n.2, p.499-503, 1979.

PRESTON, T.R. Biological and chemical analytical methods. In: PRESTON, T.R. (Ed.) **Tropical animal feeding: a manual for research workers**. Rome: FAO, 1995. p.191-264.

SAS. 2000. Statistical Analysis System Institute Inc. SAS/STAT. **User's guide statistics**, versão 9.0, vol. I. SAS Institute, Inc. Cary NC.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3.ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2002. 235p.

SILVA, G.P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v.27, p.30-39, 2009.

TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage digestibility. **Journal of British Grassland Society**, v.18, p.104-11, 1963.

TOMICH, T.R.; PEREIRA, L.G.R.; GONÇALVES, L.C. et al. **Características químicas para avaliação do processo fermentativo de silagens: uma proposta para qualificação da fermentação**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2003. 20p.

TOMICH, T.R.; SAMPAIO, I.B.M. A new strategy for the determination of forage degradability with an *in situ* technique through the use of one fistulated ruminant. **Journal of Agricultural Science**, v.142, n.5, p.589-593, 2004.

VALADARES FILHO, S.C.; MACHADO, P.A.S.; CHIZZOTTI, M.L. et al. **Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos**. 3.ed., Viçosa: UFV/DZO, 2010. 502p.

VAN SOEST, P.J. **Nutrition ecology of the ruminant**. Ithaca: Comstock Publishing Associates, 1994. p.476.

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

WILSON, R.K. **A rapid accurate method for measuring volatile fatty acids lactic acid in silage**. Research Report. Dublin, Ireland: Agricultural Institute Dunsinea Research Center, 1971. 7p.

YAZDANI, S. S.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Current Opinion in Biotechnology**, v.18, p.213-219, 2007.

CAPÍTULO II

DESEMPENHO DE VACAS EM LACTAÇÃO ALIMENTADAS COM SILAGENS DE MILHO ADITIVADAS COM GLICERINA BRUTA

RESUMO

FRANÇA, Almira Biazon. **Desempenho de vacas em lactação alimentadas com silagens de milho aditivadas com glicerina bruta.** 2014. 105p Tese (Doutorado em Zootecnia). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Objetivou-se, com o presente estudo, avaliar o efeito da adição de diferentes níveis de glicerina bruta como aditivo na ensilagem do milho sobre o consumo voluntário, a digestibilidade aparente dos nutrientes, a produção fecal, a produção e composição do leite, os parâmetros ruminais, a produção de proteína microbiana (Pmic) e os componentes sanguíneos de vacas Holandês x Gir, e os indicadores internos matéria seca indigestível (MSi), fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) e fibra em detergente ácido indigestível (FDAi). Foram avaliados níveis crescentes de inclusão de glicerina bruta como aditivo na ensilagem do milho sobre o desempenho de vacas em lactação. As dietas foram compostas por silagem de milho contendo 0, 5, 10 e 15% de glicerina bruta (base da matéria natural - MN) adicionada no momento da ensilagem, e concentrado à base de farelo de soja, fubá de milho e minerais, numa proporção volumoso:concentrado de 60:40, e fornecidas na forma de mistura total. Foi observada resposta linear positiva ($P < 0,05$) para o consumo de glicerol, matéria seca (MS) e proteína bruta (PB) em resposta a adição de glicerina bruta na ensilagem do milho. Não foi observado efeito ($P > 0,05$) sobre o consumo de fibra em detergente neutro (FDN), no entanto, foi observada redução ($P < 0,05$) no consumo de fibra em detergente ácido (FDA). Foi observada resposta linear positiva ($P < 0,05$) para o consumo de energia digestível (ED), energia metabolizável (EM) e energia líquida para lactação (EL_{lac}) em função dos níveis de adição de glicerina bruta. Foi observada diferença ($P < 0,05$) entre os indicadores MSi, FDNi e FDAi utilizados. Foi observada resposta linear positiva ($P < 0,05$) para a digestibilidade aparente da MS, PB e carboidratos totais (CHT) em função dos níveis de adição da glicerina bruta. Não foi observado efeito ($P > 0,05$) dos níveis de adição da glicerina bruta na produção de leite corrigida (PLG) ou não (PL) para 3,5% de gordura. No entanto, foi observada redução ($P < 0,05$) da eficiência alimentar para a produção de leite. Com relação à quantidade de sólidos produzidos, foi observada resposta linear positiva ($P < 0,05$) para a quantidade de proteína do leite, com aumento de 11,54%. Com relação aos parâmetros ruminais não foi observado efeito ($P > 0,05$) sobre o pH ruminal, no entanto, foi observada resposta linear positiva ($P < 0,05$) para a concentração de N-NH₃ no líquido ruminal e da produção de Pmic. Foi observada redução ($P < 0,05$) das concentrações de acetato e aumento ($P < 0,05$) das concentrações de propionato no rúmen, de forma que a relação acetato:propionato reduziu com os níveis de inclusão. A adição de glicerina bruta influenciou positivamente ($P < 0,05$) as concentrações plasmáticas de glicose e ureia, enquanto que para as concentrações plasmáticas de ácidos graxos não esterificados (NEFA) foi observada resposta linear negativa.

Palavras-chave: Consumo. Coproduto. Glicose. Proteína.

ABSTRACT

FRANÇA, Almira Biazon. **Performance of lactating cows fed with corn silage with crude glycerin.** 2014. 105p Thesis (Doctor Science in Animal Science). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

This study aimed to evaluate the effect of adding different levels of crude glycerin as an additive for corn silage on feed intake, apparent digestibility of nutrients, fecal production, production and milk composition, ruminal parameters, microbial protein production and blood components of Holstein x Gir cows, evaluate internal markers indigestible dry matter (iMS), indigestible neutral detergent fiber (iNDF) and indigestible acid detergent fiber (iADF), and evaluate the effect of levels of glycerin on carbohydrate fractions, degradation rate of carbohydrate fractions, the ruminal fermentation *in vitro* and production of methane *in vitro* of corn silage and total mixed ration. Increasing levels of inclusion of crude glycerin as an additive in corn silage on performance of dray cows were evaluated. Diets were composed of corn silage with 0, 5, 10 and 15 % crude glycerin (based nature matter - NM) added at the time of silage and concentrate based on soybean meal, corn meal and minerals, a large proportion:concentrate ration of 60:40, and supplied as total mixture. Increased linearly ($P<0.05$) for intake of glycerol, dry matter (DM) and crude protein (CP) in response to addition of crude glycerin in corn silage were observed. No effect ($P>0.05$) was observed in intake of neutral detergent fiber (NDF), however, decreased ($P<0.05$) was observed in intake of acid detergent fiber (ADF). Increased ($P<0.05$) in intake of digestible energy (DE), metabolizable energy (ME) and net energy for lactation (NE_{lac}) according to the level of addition of crude glycerin were observed. Difference ($P<0.05$) between indicators indigestible dry matter (iDM), indigestible neutral detergent fiber (iNDF) and indigestible acid detergent fiber (iADF) used were observed. Increased ($P<0.05$) on apparent digestibility of DM, CP, and total carbohydrates (TC) as a function of addition levels of crude glycerin were observed. No effect ($P>0.05$) for the addition of glycerin in corrected milk (CM) or not (MP) to 3.5% of fat were observed. However, reduction ($P<0.05$) feed conversion efficiency for milk production was observed. Regarding the amount of solids produced, increased ($P<0.05$) was observed for the amount of milk protein, an increase of 11.54%. With respect to ruminal parameters no effect ($P>0.05$) in ruminal pH was observed, however, increased ($P<0.05$) on the concentration of N-NH₃ in rumen fluid and the production of microbial protein were observed. Reduction ($P<0.05$) concentrations of acetate and increase ($P<0.05$) concentrations of propionate in the rumen has been observed, so that the acetate:propionate ratio reduced with levels of inclusion. The addition of glycerin positively influenced ($P<0.05$) plasma concentrations of glucose and urea, while for the plasma concentrations of non-esterified fatty acids (NEFA) negative response was observed.

Keywords: By product. Glucose. Intake. Protein.

1 INTRODUÇÃO

Na busca pela competitividade e qualidade, cada vez mais o produtor de leite busca informações para a utilização de alimentos alternativos, que podem substituir aqueles tradicionalmente utilizados, na tentativa de reduzir os custos de produção.

O milho é responsável por uma parte significativa do custo da alimentação de vacas em lactação, em especial do suplemento concentrado. Assim, substituir parte do milho, fornecido às vacas, por glicerina bruta adicionada no momento da ensilagem poderá reduzir o custo da alimentação desses animais, além de proporcionar aumento da densidade energética da dieta sem que ocorra sobrecarga dietética de carboidratos de rápida fermentação ruminal.

Em função do desenvolvimento da tecnologia para produção do biodiesel, grande quantidade de glicerina tem sido gerada, já que para cada 100 litros de biodiesel são produzidos, aproximadamente, 10 litros de glicerina bruta como coproduto do processo de transesterificação (MORIN et al., 2007). Segundo a Agência Nacional do Petróleo (ANP, 2013), em 2012 foram gerados 274,7 mil m³ de glicerina como subproduto na produção de biodiesel, 0,5% a mais que em 2011. Este patamar de produção de glicerina é bastante superior à quantidade empregada atualmente nas principais aplicações comerciais, demandando a criação de novas aplicações para este produto. Neste sentido, o uso da glicerina como ingrediente na dieta de ruminantes desponta como importante alternativa.

Pesquisas referentes ao uso de glicerina por ruminantes se intensificaram a partir do ano 2000 e no Brasil ela já vem sendo incorporada aos concentrados destinados a vacas leiteiras. Os resultados são bastante promissores seja como substituto do milho no concentrado (DROUILLARD, 2008; DONKIN et al., 2009; CARVALHO et al., 2011; DUQUE, 2012; FARIAS, et al., 2012; KASS, et al., 2012; OMAZIC et al., 2013) ou como ingrediente adicional em dietas já balanceadas (SHRÖDER & SÜDEKUM, 1999; DeFRAIN et al., 2004; LINKE, et al., 2004; BODARSKI et al., 2005; OSBORNE, et al., 2009; WANG, et al., 2009b).

Contudo, a grande disponibilidade de glicerina para aplicação na alimentação animal despertou o interesse com o intuito de avaliar a viabilidade do seu uso como aditivo na ensilagem, de modo que trabalhos já foram realizados com o objetivo de avaliar o seu uso na ensilagem da cana-de-açúcar (DIAS JÚNIOR et al., 2010; GOMES, 2013), da planta inteira do milho (OLIVEIRA et al., 2011; GOMES, 2013) e do capim-elefante (MENÊSES, 2012). Porém, fazem-se necessários mais estudos, visando adequada recomendação do seu uso como aditivo na ensilagem.

De forma que, objetivou-se avaliar o efeito da adição de diferentes níveis de glicerina bruta como aditivo na ensilagem do milho sobre o consumo voluntário, a digestibilidade aparente dos nutrientes, a produção fecal, a produção e composição do leite, os parâmetros ruminais, a produção de proteína microbiana e os componentes sanguíneos de vacas Holandês x Gir, e os indicadores internos matéria seca indigestível (MSi), fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) e fibra em detergente ácido indigestível (FDAi).

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Campo Experimental José Henrique Brusqui (CEJHB), pertencente à Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Coronel Pacheco – MG, no período de julho a agosto de 2011.

Foram avaliados níveis crescentes de inclusão de glicerina bruta como aditivo na ensilagem do milho planta inteira (0, 5, 10 e 15%, base matéria natural – MN) sobre o desempenho de vacas em lactação.

Para o estudo do consumo e digestibilidade aparente dos nutrientes, produção e composição do leite e componentes sanguíneos, utilizou-se o delineamento Quadrado Latino 4 x 4, com três Quadrados Latinos contemporâneos, em que cada Quadrado Latino foi composto por quatro tratamentos (0, 5, 10 e 15% de glicerina bruta na ensilagem do milho, base da MN), quatro vacas em lactação e quatro períodos de avaliação. Cada fase dos quadrados latinos compreendeu 12 dias, sendo sete dias de adaptação dos animais às dietas experimentais, conforme recomendado por Oliveira et al. (2001), e cinco dias de coletas, de forma que todas as dietas foram fornecidas simultaneamente em cada período experimental. Foram utilizadas 12 vacas multíparas, Holandês x Gir, com em média com 61 dias de lactação, produção média de 26,2 kg/dia de leite e peso corporal de, aproximadamente, 506 kg. As vacas foram divididas em três grupos e alocadas nos quadrados latinos em função da produção de leite e dos dias em lactação, sendo um grupo formado por quatro vacas fistuladas no rúmen e os demais por vacas intactas.

Para a estimativa da produção fecal e estudo dos indicadores internos matéria seca indigestível (MSi), fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) e fibra em detergente ácido indigestível (FDAi) foi utilizado o delimito em blocos casualizados, com quatro blocos (quatro vacas fistuladas) e quatro tratamentos (0, 5, 10 e 15% de glicerina bruta, base da MN).

No estudo dos parâmetros ruminais foi utilizado o delineamento Quadrado Latino 4 x 4 com mediadas repetidas no tempo, o qual foi composto por quatro tratamentos (0, 5, 10 e 15% de glicerina bruta, base da MN), quatro vacas fistuladas no rúmen, quatro períodos de avaliação, e os tempos de coleta de líquido ruminal imediatamente antes (tempo zero) e 2; 4; 6; 8; 10; 12; 16 e 24 h após o fornecimento das dietas.

As vacas foram confinadas em curral do tipo *free stall*, com cochos individuais, para o fornecimento da mistura total da ração, equipados com portões eletrônicos do tipo *Calan gate* (American Calan Inc., Northwood, NH, EUA), e cochos coletivos para o fornecimento de água *ad libitum*. No início do experimento e ao final de cada fase do quadrado latino, durante três dias consecutivos, as vacas foram pesadas sempre após a ordenha da manhã e antes do trato diário.

O milho ensilado foi obtido das lavouras do CEJHB no período de fevereiro a março de 2011, sendo realizadas duas colheitas em épocas distintas em virtude das condições climáticas da região neste período do ano. A forrageira obtida na primeira colheita foi utilizada para o abastecimento dos silos dos tratamentos 0 e 5% de adição de glicerina bruta, e a obtida na segunda colheita para o abastecimento dos silos dos tratamentos 10 e 15% de glicerina bruta (Tabela 1).

A glicerina bruta (Tabela 2) utilizada como aditivo foi fornecida pela fábrica de biodiesel da ADM[®] (Archer Daniels Midland Company Ltda., Rondonópolis, MT), e obtida a partir do óleo de soja, sendo misturada à forragem de planta inteira de milho picada no momento da ensilagem por meio de vagão forrageiro misturador DATARANGER[®] (American Calan Inc., Northwood, NH, EUA), nos níveis de 0, 5, 10 e 15% (base da MN).

As quantidades adicionadas de glicerina bruta à forragem de planta inteira de milho no momento da ensilagem, bem como o valor nutritivo da planta inteira de milho após a adição da glicerina bruta, estão apresentadas nas Tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 1. Valor nutritivo da planta inteira de milho utilizada para ensilagem

Item	Forrageira	
	1º Colheita	2º Colheita
Matéria seca (%)	30,74	40,21
Matéria mineral (%MS)	6,04	5,93
Proteína bruta (%MS)	6,26	6,50
Fibra em detergente neutro (%MS)	70,25	69,95
Fibra em detergente ácido (%MS)	34,81	32,63
Lignina (%MS)	5,50	5,14
Carboidratos totais (%MS)	85,96	84,24
Glicerol (%MS)	0,12	0
Nutrientes digestíveis totais ¹ (%MS)	56,73	59,57
pH	4,48	4,47
N-NH ₃ /NT(%)	2,98	2,63
DIVMS ² (%MS)	67,95	65,89

¹Weiss et al. (1992); ²Tilley & Terry (1963); N-NH₃/NT = nitrogênio amoniacal em porcentagem do nitrogênio total; DIVMS = digestibilidade *in vitro* da matéria seca

Tabela 2. Composição química, digestibilidade *in vitro* da matéria seca, densidade e pH da glicerina bruta utilizada no experimento

Item	Teor
Matéria seca (%)	76,59
Matéria mineral (%MS)	7,32
Matéria orgânica (%MS)	92,68
Proteína bruta (%MS)	0,00
Energia bruta ¹ (Cal/g)	3,46
Densidade	1,25
pH ²	5,65
Glicerol ² (%MS)	81,61
Metanol ² (%MS)	0,02
DIVMS ³ (%MS)	74,16

¹Silva e Queiroz (2002); ²Análise realizada pela empresa ADM[®]; ³Tilley & Terry (1963); DIVMS = digestibilidade *in vitro* da matéria seca

Tabela 3. Quantidades adicionadas de glicerina bruta

Quantidade	Níveis de adição ¹ (% da MN)			
	0	5	10	15
Forrageira (kg de MV)	10.700	10.120	8.600	9.100
Forrageira (Kg de MV/m ³)	1.300	1.241	1.054	1.115
Glicerina bruta (kg)	0	532	959	1.600
Total (kg)	10.700	10.650	9.590	10.700

¹0, 5, 10, e 15: respectivamente, níveis de adição de glicerina bruta na silagem de milho; MV = matéria verde

Para o armazenamento da forragem foram utilizados quatro silos tipo trincheira (0,80 m x 0,60 m x 17 m) com capacidade para 10 toneladas cada. Os silos foram abertos em julho de 2011, e amostras das silagens foram coletadas semanalmente e analisadas quanto ao teor de matéria seca (MS). Essa informação foi usada para corrigir a quantidade de silagem a ser incluída nas dietas experimentais com o objetivo de garantir que a relação volumoso:concentrado (60:40) fosse a mesma para todos os tratamentos durante o experimento.

Tabela 4. Valor nutritivo da planta inteira de milho após a adição da glicerina bruta

Item	Níveis de adição ¹ (% da MN)			
	0	5	10	15
Matéria seca (%)	30,74	32,04	44,21	44,33
Matéria mineral (%MS)	6,04	5,24	5,59	5,86
Proteína bruta (%MS)	6,26	5,49	5,12	4,43
Fibra em detergente neutro (%MS)	70,25	63,72	57,32	54,71
Fibra em detergente ácido (%MS)	34,81	31,37	27,28	26,46
Lignina (%MS)	5,50	5,55	4,52	4,62
Carboidratos totais (%MS)	85,96	87,71	87,10	88,27
Glicerol (%MS)	0,12	6,69	12,99	22,15
Nutrientes digestíveis totais ² (%MS)	56,73	59,04	62,96	62,29
DIVMS ² (%MS)	67,95	72,27	74,70	77,31
N-NH ₃ /NT (%)	2,98	3,85	3,85	5,08
pH	4,48	4,27	4,43	4,41

¹0, 5, 10 e 15: respectivamente, níveis de adição de glicerina bruta na silagem de milho; ²Weiss et al. (1992);

³Tilley & Terry (1963); N-NH₃/NT = nitrogênio amoniacal em porcentagem do nitrogênio total; DIVMS = digestibilidade *in vitro* da matéria seca;

As dietas foram fornecidas como mistura total, uma vez ao dia, no início da manhã, sendo preparadas em vagão misturador semiautomatizado e computadorizado (DATARANGER[®], American Calan Inc., Northwood, NH), de modo a permitir em torno de 10% de sobras. As dietas foram compostas por silagem de milho contendo 0, 5, 10 e 15% de glicerina bruta (base da MN) adicionada no momento da ensilagem, e concentrado à base de farelo de soja, fubá de milho e minerais (Tabela 5).

Tabela 5. Participação dos ingredientes na ração total

Ingrediente	Nível de adição de glicerina bruta ¹ (% da MN)			
	0	5	10	15
Silagem de milho (%)	60	60	60	60
Fubá de milho (%)	25	24	23	22
Farelo de soja (%)	12	13	14	15
Ureia 36% N (%)	1	1	1	1
Milk Plus ^{®2} (%)	1	1	1	1
Calcário(%)	0,5	0,5	0,5	0,5
Sal (%)	0,5	0,5	0,5	0,5
Suplemento concentrado (%)	40	40	40	40
Total (%)	100	100	100	100

¹0, 5, 10 e 15: respectivamente, níveis de adição de glicerina bruta na silagem de milho; ²Ca máx – 270 g; Ca mín – 250 g; P mín – 50 g; S mín – 20 g; Na mín – 31 g; Zn mín – 2.000 mg; Cu mín – 1.000 mg; I mín – 100 mg; Co mín – 50 mg; Se mínimo – 20 mg; Mn mín – 1.000 mg; Vit A mín – 200.000 UI; Vit D3 mín – 40.000 UI; Vit E mín – 1000 UI; BHT mín – 100 mg; F máx – 500 mg

O equivalente em energia líquida adicionado à silagem na forma de glicerol foi retirado do concentrado na forma de milho moído. A proteína bruta retirada do concentrado com a redução do milho foi, quando necessário, reposta com ureia para que as dietas atendessem ao requisito de serem isoproteicas.

A composição química das silagens de milho utilizadas na mistura total das rações, dos ingredientes do suplemento concentrado, e das rações totais, estão apresentadas nas Tabelas 6, 7 e 8, respectivamente.

Tabela 6. Composição química das silagens de milho utilizadas na mistura total das rações

Nível de Adição ¹ (%)	Nutriente (% da MS)								
	MS	MM	PB	FDN	FDA	LIG	CHT ²	NDT ³	GLI
Período I									
0	24,5	6,3	6,9	73,7	37,6	5,2	84,1	57,2	0,0
5	27,2	6,0	6,7	66,7	34,0	4,7	82,8	62,5	5,0
10	37,7	6,4	6,3	67,2	21,6	4,6	82,0	63,2	10,8
15	40,0	6,9	5,5	57,1	26,7	3,9	79,4	70,5	19,3
Período II									
0	27,5	6,6	6,8	73,4	37,4	4,60	83,9	57,9	0,0
5	29,8	5,6	6,2	70,9	36,7	4,8	83,6	61,4	5,3
10	39,6	6,2	5,7	60,9	28,1	3,6	80,9	69,3	11,3
15	41,3	6,6	5,3	53,6	24,3	2,8	81,8	71,3	19,9
Período III									
0	28,4	8,1	6,1	77,7	38,9	4,5	83,9	54,4	0,0
5	31,2	5,7	6,3	67,6	33,4	4,6	83,2	63,4	6,1
10	40,8	5,9	5,7	63,3	29,7	3,3	81,9	68,7	13,9
15	41,6	5,8	5,2	57,8	27,3	3,1	83,3	69,4	16,2
Período IV									
0	27,7	6,0	6,2	79,4	39,6	4,1	86,3	56,2	0,0
5	30,8	5,6	6,3	72,5	35,3	3,5	84,5	62,3	9,8
10	40,6	6,3	5,6	71,3	31,3	3,1	81,8	66,3	12,7
15	40,6	6,5	5,5	62,7	29,4	2,6	82,1	68,7	17,6

¹0, 5, 10, 15: respectivamente, níveis inclusão de glicerina bruta na silagem de milho; ²Sniffen et al. (1992); ³Weiss et al. (1992); MS = matéria seca; MM = matéria mineral; PB = proteína bruta; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; LIG = lignina; CHT = carboidratos totais; NDT = nutrientes digestíveis totais; GLI = glicerol

Tabela 7. Composição química do fubá de milho e farelo de soja utilizados na mistura total da ração

Alimento	Nutriente (% da MS)								
	MS	MM	PB	FDN	FDA	LIG	CHT ¹	NDT ²	GLI
Fubá de milho	86,7	7,3	10,4	10,9	2,8	0,5	75,1	89,3	
Farelo de Soja	87,8	7,6	57,7	23,1	12,1	1,5	32,2	81,4	

¹Sniffen et al. (1992); ²Weiss et al. (1992); MS = matéria seca; MM = matéria mineral; PB = proteína bruta; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; LIG = lignina; CHT = carboidratos totais; NDT = nutrientes digestíveis totais; GLI = glicerol

Tabela 8. Composição da ração total 'Continua'

Nível de Adição ¹ (%)	Nutriente (% da matéria seca da dieta)								
	MS	MM	PB	FDN	FDA	LIG	CHT ¹	NDT ²	GLI
Período I									
0	36,4	6,8	15,9	57,9	25,9	3,2	73,9	65,6	0,0
5	41,6	7,0	15,9	52,8	22,5	5,8	73,6	63,1	4,2
10	50,1	7,3	17,4	49,9	20,6	2,9	71,6	68,6	8,4
15	52,86	7,97	17,56	45,1	18,1	2,2	69,8	71,9	16,9
Período II									
0	37,9	6,5	16,7	59,9	26,2	3,13	73,33	65,8	0,0
5	43,1	7,2	15,3	52,4	22,1	2,21	75,33	67,3	1,9
10	51,1	7,5	15,6	51,1	20,7	2,33	72,87	69,4	9,2
15	51,7	8,2	16,4	48,9	20,9	2,50	69,84	71,1	13,4

‘Tabela 8. Continuação’

Período III									
0	38,7	7,4	12,6	65,8	26,8	3,4	76,6	63,1	0,0
5	42,9	7,1	14,2	59,1	23,3	2,9	75,3	65,9	4,1
10	51,5	7,7	15,1	55,5	21,1	2,7	71,8	69,7	11,1
15	53,2	8,0	17,5	51,9	18,6	2,0	67,7	73,3	12,5
Período IV									
0	40,4	6,6	17,4	59,6	23,6	1,8	72,8	68,4	0,0
5	43,4	6,9	16,9	54,0	21,5	1,4	71,2	72,8	2,2
10	53,2	7,2	15,4	48,5	18,2	0,9	72,9	74,0	8,7
15	52,9	6,5	15,9	51,1	18,9	0,8	71,7	76,4	11,8

¹0, 5, 10 e 15: respectivamente, níveis de adição de glicerina bruta na silagem de milho; ¹Sniffen et al. (1992); ²Weiss et al. (1992); MS = matéria seca; MM = matéria mineral; PB = proteína bruta; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; LIG = lignina; CHT = carboidratos totais; NDT = nutrientes digestíveis totais; GLI = glicerol

2.1 Determinação do Consumo e Estimativa da Digestibilidade Aparente dos Nutrientes

O consumo individual dos nutrientes foi determinado pela diferença entre a quantidade oferecida do alimento e as respectivas sobras entre o 8º e 12º dia de cada fase do quadrado latino. Neste período amostras diárias dos alimentos fornecidos e das sobras de cada vaca foram coletadas e congeladas a -18°C. Ao final de cada período experimental as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente para a realização da amostra composta por vaca/período. Imediatamente após esse procedimento, as amostras foram pré-secas em estufa de ventilação forçada (55°C; 72 horas) e moídas em moinho de facas tipo *Willey* com peneira de porosidade de 1 mm, e acondicionadas em potes plásticos devidamente identificados para posteriores análises.

Para a determinação da digestibilidade aparente dos nutrientes foi utilizado o método indireto, por meio da utilização de três indicadores internos: matéria seca indigestível (MSi), fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) e fibra em detergente ácido indigestível (FDAi).

Amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal de todos os animais, duas vezes ao dia (06:00 e 13:00 h), do 8º ao 12º dia de cada período, em sacos plásticos devidamente identificados, e congeladas a -18°C. Ao final de cada período experimental as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente para a realização da amostra composta por vaca/período. Imediatamente após esse procedimento, as amostras de fezes foram pré-secas em estufa de ventilação forçada (55°C; 72 horas) e moídas em moinho de facas tipo *Willey* com peneira de porosidade de 1 mm, e acondicionadas em potes plásticos devidamente identificados para posteriores análises.

A MSi, FDNi e FDAi foram determinadas após incubação ruminal *in situ* das amostras de silagens (16 amostras), suplementos concentrados (16 amostras), sobras (48 amostras) e fezes (48 amostras). Cada amostra foi acondicionada em triplicata em sacos F57 (ANKON® Technology, Macedon, NY, EUA), na proporção de 20 mg de MS/cm² cada, perfazendo total de 384 amostras incubadas. Os sacos F57 contendo as amostras foram acondicionados em dois sacos de náilon e incubados no rúmen por período de 264 horas (CASALI et al., 2008). Para a incubação foi utilizada uma vaca multípara, F1 Holandês x Gir, não lactante, provida de cânula ruminal, a qual permaneceu confinada em curral com cochos individuais para o fornecimento de alimento e água, onde recebeu dieta à base de silagem de milho e suplemento concentrado.

Após a incubação os sacos foram lavados e submetidos à secagem em estufa ventilada a 55°C, por 72 horas, e posteriormente, em estufa 105°C, por 45 minutos, para a determinação da MS. Em seguida, foram tratados com detergente neutro por 1 hora, em

equipamento analisador de fibra (ANKON[®] Technology, Macedon, NY, EUA), lavados com água quente e acetona, secos e pesados, conforme procedimento anterior, para quantificação da FDN não digerida. O procedimento descrito para quantificação dos teores de FDN foi novamente realizado, substituindo-se, contudo, o detergente neutro por detergente ácido (SILVA & QUEIROZ, 2002) a fim de estimar a massa de FDA não digerida.

A produção fecal (PF) foi calculada conforme equação a seguir:

$$PF = \text{indicador ingerido (g)/indicador nas fezes (\%)}$$

A digestibilidade aparente da matéria seca (DAMS) foi calculada a partir da produção fecal estimada com cada indicador interno (MSi, FDNi e FDAi), de acordo com a equação a seguir:

$$DA = (CMS - PF/CMS) * 100$$

Onde: CMS = consumo de matéria seca; PF = produção fecal.

Foram realizadas análises químicas para determinação dos teores de MS a 105 °C, nitrogênio total, extrato etéreo (EE), matéria mineral (MM), fibra em detergente ácido (FDA), lignina (LIG) e celulose (CEL) de acordo com Silva & Queiroz (2002), fibra em detergente neutro (FDN) segundo Mertens (2002) e, glicerol (GLI) segundo Moreira et al., 2011. Foi realizada também a determinação da digestibilidade *in vitro* da MS (DIVMS) (TILLEY & TERRY, 1963). O teor de carboidratos totais (CHT), carboidratos não fibrosos (CNF) as frações de carboidratos B2 e C foram determinados conforme descrito por Sniffen et al. (1992).

O teor de nutrientes digestíveis totais (NDT) dos alimentos e das rações foi estimado conforme equação descrita por Weiss et al. (1992):

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

em que: FDNn = fibra em detergente neutro livre de nitrogênio.

Para o consumo nutrientes digestíveis totais (NDT), energia digestível (ED), energia metabolizável (EM) e energia líquida para lactação (EL_{lac}) foram calculados o teor de NDT, ED, EM e EL_{lac} conforme equações propostas pelo NRC (2001):

$$NDT = CNFtd + PBtd + EEtd + FDNd - 7$$

em que: CNFtd = carboidratos não fibrosos total digestível; PBtd = proteína bruta total digestível; EEtd = extrato etéreo total digestível; FDNd = fibra em detergente neutro digestível.

$$ED = (CNFtd*0,042) + (FDNd*0,042) + (PBtd*0,056) + (0,094*(EE/2,25)) - 0,3$$

$$EM = 0,82 * ED$$

$$EL_{lac} = (0,703*EM) - 0,19 + (((0,097*EM)+0,19/97)*(EE-3))$$

Foi realizado o cálculo para a produção de proteína microbiana (Pmic) conforme proposto pelo NRC (2001):

$$Pmic = 0,13 \times CNDT$$

Foram estimadas as taxas de passagem ruminal da silagem (K_{p_s}) e do suplemento concentrado (K_{p_{sc}}) conforme equações propostas pelo NRC (2011):

$$K_{p_s} = 3,054 + (0,0614 * CMS \% PC)$$

$$K_{p_{sc}} = 2,904 + (1,375 * CMS \% PC) - (0,02 * \% SC)$$

Em que: CM%PV = consumo de MS em porcentual do peso corporal; %SC = porcentual de suplemento concentrado.

2.2 Produção e Composição do Leite

As vacas foram ordenhadas, mecanicamente, duas vezes ao dia (05:30 e 15:00 h). Em cada período de coleta, foram realizados registros das produções de leite nos mesmos cinco dias de mensuração do consumo de nutrientes. Nos primeiros três dias, consecutivos, deste período, amostras individuais do leite das ordenhas da manhã (2/3) e da tarde (1/3) foram

coletadas em frascos contendo bronopol como conservante, e encaminhadas para o Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora, MG), para determinação dos teores de proteína, gordura, extrato seco total e lactose.

A produção de leite corrigida para 3,5% de gordura foi calculada segundo a equação: $(0,432 + 0,1625 \times \% \text{ gordura}) \times \text{produção de leite}$ (SKLAN et al., 1992).

2.3 Parâmetros Ruminais

Amostras de líquido ruminal foram coletadas manualmente com o auxílio de um coletor composto por uma haste de PVC e um pote plástico acoplado em sua extremidade. As amostras foram coletadas das vacas fistuladas, no saco ventral do rúmen, imediatamente antes (tempo zero) e 2; 4; 6; 8; 10; 12; 16 e 24 h após o fornecimento das dietas. Após a coleta, coagem e homogeneização, foi determinado o valor de pH, com medidor de pH digital (TEC 3MP, Tecnal Equipamentos para Laboratórios, Piracicaba/SP). Posteriormente, duas alíquotas de 10 mL do líquido ruminal foram colocadas em frascos contendo oito gotas de H₂SO₄ 50% v/v (subamostra 1) e 2 mL de ácido metafosfórico a 25% (subamostra 2) e congeladas. Após descongelamento em temperatura ambiente, a subamostra 1 foi analisada quanto à concentração de nitrogênio amoniacal mediante destilação com hidróxido de potássio (KOH) 2N, conforme técnica descrita por Preston (1995).

Na subamostra 2 foram determinadas as concentrações dos ácidos acético, butírico e propiônico, segundo metodologia descrita por Wilson (1971), em que as amostras após serem descongeladas em temperatura ambiente foram centrifugadas a 11.000 x g e filtradas em filtro de porosidade de 45 µm e acondicionadas em *vials* para injeção em cromatógrafo gasoso (Agilent Technologies modelo 6890N) e posterior cálculo das concentrações. A relação molar acetato:propionato (Ac/Pr) foi determinada pela razão entre as concentrações molares de ácidos acético e propiônico no líquido ruminal.

2.4 Componentes Sanguíneos

Foram coletadas amostras de sangue no 11º dia de cada período experimental de todas as vacas, aproximadamente 4 horas após a alimentação, por punção da veia caudal, em tubos *vacuntainers* com gel separador e acelerador de coagulação. O sangue foi imediatamente centrifugado a 5.000 rpm por 15 minutos para obtenção do plasma, e armazenado à -18°C para posterior determinação da concentração de ureia, segundo método enzimático-colorimétrico - urease (*kit* Ureia CE ref. 27 da LabTest® Diagnóstico SA, Lagoa Santa, MG).

No último dia de cada fase do quadrado latino, antes do fornecimento das dietas foram realizadas coletas individuais de sangue na veia caudal, utilizando *vacuntainers* com Na-EDTA. O sangue coletado foi centrifugado a 1.500 rpm por 10 minutos e o plasma sobrenadante dividido em três alíquotas de 1 mL, armazenadas em tubos de microcentrífuga, congelados a -18°C, para posterior determinação das concentrações de glicose pelo método enzimático da glicose oxidase (*kit* Glicose PAP ref. 84 da LabTest® Diagnóstico SA, Lagoa Santa, MG), e ácidos graxos não esterificados (NEFA) pelo método colorimétrico (*kit* NEFA – Non Esterified Fatty Acids Cat. No. FA 115 30 t da RANDOX® Laboratories Ltd, United Kingdom).

2.5 Análises Estatísticas

Os resultados referentes ao consumo, produção de proteína microbiana, taxas de passagem, estimativa da digestibilidade aparente dos nutrientes por meio da FDNi, produção e composição do leite e componentes sanguíneos foram submetidos ao teste de normalidade de distribuição dos erros e, subsequentemente, à análise de variância ($\alpha = 0,05$). As médias foram estudadas por meio de análises de regressão linear e quadrática, utilizando-se o teste “t” a 5% de probabilidade. Foi utilizado o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2003),

conforme o modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + N_i + P_j + A_k + e_{ijk}$$

Em que:

Y_{ijk} = variável estudada no indivíduo k , do período j , alimentado com silagem de milho aditivada i (0, 5, 10 e 15% de glicerina bruta)

μ = média geral

N_i = efeito da adição i (0, 5, 10 e 15% de glicerina bruta na silagem de milho)

P_j = efeito do período j

A_k = efeito do animal k

e_{ijk} = erro aleatório associado a cada observação

Os resultados referentes à estimativa da produção fecal e da digestibilidade aparente dos nutrientes por meio dos indicadores MS_i , FDN_i , FDA_i foram submetidos ao teste de normalidade de distribuição dos erros e , subsequentemente, à análise descritiva e análise de variância ($\alpha = 0,05$). As médias foram comparadas pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. Foi utilizado o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2003), conforme o modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + N_i + P_j + e_{ij}$$

Em que:

Y_{ijk} = variável estudada do indicador i , no bloco j , para os níveis crescentes de adição de glicerina bruta (0, 5, 10 e 15%) na ensilagem do milho.

μ = média geral

N_i = efeito do indicador i (MS_i , FDN_i e FDA_i)

P_j = efeito do bloco j

e_{ij} = erro aleatório associado a cada observação

Os resultados referentes aos parâmetros ruminais foram analisados como medidas repetidas no tempo, submetidos ao teste de normalidade de distribuição dos erros e , subsequentemente, à análise de variância ($\alpha = 0,05$). As médias foram estudadas por meio de análises de regressão linear e quadrática, utilizando-se o teste “ t ” a 5% de probabilidade. Foi utilizado o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2003), conforme o modelo estatístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + N_i + P_j + A_k + e_{ijk} + T_l + (T_l * N_i) + e_{ijkl}$$

Em que:

Y_{ijkl} = variável estudada no indivíduo k , do período j , alimentado com silagem aditivada com i por cento de glicerina bruta (0, 5, 10 e 15%), coletada no tempo l após a alimentação

μ = média geral

N_i = efeito da adição i (0, 5, 10 e 15%, base da MN) de glicerina bruta na silagem de milho

P_j = efeito do período j

A_k = efeito do animal k

E_{ijk} = erro aleatório da parcela

T_l = efeito dos tempos após a alimentação l (0, 2; 4; 6; 8; 10; 12; 16 e 24 h)

$T_l * N_i$ = interação entre os tempos l e da adição i de glicerina bruta

e_{ijkl} = erro aleatório da subparcela

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Consumo e Digestibilidade Aparente dos Nutrientes

Foi observado efeito ($P < 0,05$) da adição da glicerina bruta na silagem de milho sobre o consumo de glicerol (GLI), matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), fibra em detergente ácido (FDA), carboidratos totais (CHT), carboidratos não fibrosos (CNF), nutrientes digestíveis totais (NDT), energia digestível (ED), energia metabolizável (EM), e energia líquida para lactação (EL_{lac}) (Tabela 9).

Tabela 9. Consumo de nutrientes por vacas em lactação

Nutriente	Níveis de adição (% da MN) ¹				Equação	r ²	CV (%)
	0	5	10	15			
GLI (kg/dia)	0,00	0,62	1,93	2,84	$\hat{Y} = -0,13 + 0,196X$	0,98	22,49
MS (kg/dia)	17,16	19,97	20,72	20,84	$\hat{Y} = 17,90 + 0,24X$	0,78	10,20
MS (%PC)	3,44	3,87	4,05	4,16	$\hat{Y} = 3,53 + 0,047X$	0,91	9,83
MO (kg/dia)	15,98	18,56	19,19	19,23	$\hat{Y} = 16,69 + 0,21X$	0,76	10,08
PB (kg/dia)	2,66	3,11	3,30	3,52	$\hat{Y} = 2,74 + 0,05X$	0,95	13,42
FDN (kg/dia)	10,47	10,92	10,60	10,27	$\hat{Y} = 10,56$	-	8,97
FDN (%PC)	2,10	2,11	2,07	2,05	$\hat{Y} = 2,08$	-	9,27
FDA (kg/dia)	4,41	4,46	4,17	3,99	$\hat{Y} = 4,49 - 0,031X$	0,84	8,94
CHT (kg/dia)	12,74	14,74	14,97	14,51	$\hat{Y} = 12,79 + 0,48X - 0,03X^2$	0,98	9,86
CNF (kg/dia)	2,78	4,44	5,00	4,91	$\hat{Y} = 2,80 + 0,40X - 0,08X^2$	0,99	13,88
NDT (kg/dia)	9,97	12,08	12,08	13,17	$\hat{Y} = 10,38 + 0,19X$	0,86	11,47
ED (Mcal/kgMS)	0,44	0,54	0,54	0,59	$\hat{Y} = 0,458 + 0,009X$	0,87	11,68
EM (Mcal/kgMS)	0,36	0,44	0,44	0,48	$\hat{Y} = 0,38 + 0,007X$	0,86	11,79
EL (Mcal/kgMS)	0,22	0,27	0,27	0,30	$\hat{Y} = 0,23 + 0,0048X$	0,88	12,09

¹0, 5, 10, 15: respectivamente, níveis inclusão de glicerina bruta na silagem de milho; GLI = glicerol; MS = matéria seca; MO = matéria orgânica; PB = proteína bruta; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; CHT = carboidratos totais; CNF = carboidratos não fibrosos; NDT = nutrientes digestíveis totais; ED = energia digestível; EM = energia metabolizável; EL = energia líquida para lactação

Foi observada resposta linear positiva ($P < 0,05$) para o consumo de glicerol, com consumo médio de 2,84 kg/dia, o que correspondeu a 13,7% de glicerol na mistura total da ração, para as vacas alimentadas com silagem de milho com 15% de adição de glicerina bruta.

Duque (2012) reportou consumo de glicerol (%MS) de 1,113 kg/dia por vacas Holandês x Gir, em lactação, alimentadas com dietas a base de silagem de milho e suplemento concentrado com 7% de adição de glicerina bruta (ADM[®]) em substituição ao fubá de milho, na proporção volumoso:concentrado de 60:40

Ao estimar o consumo de glicerol com nível de adição de glicerina bruta de 7% na silagem de milho por meio da equação de regressão obtida para esta variável no presente estudo, obtemos consumo de 1,242 kg/dia, valor este muito próximo ao observado por Duque (2012).

Foi observado efeito linear ($P < 0,05$) no consumo de MS, com aumento de 21,45% para as dietas com adição de 15% de glicerina bruta na silagem em relação à controle, o que sugere que o glicerol pode melhorar a palatabilidade dos alimentos quando adicionado a estes, principalmente devido às suas propriedades, tais como ser um líquido viscoso e de sabor adocicado (DONKIN & DOANE, 2007).

A glicerina utilizada no presente estudo não era pura, o que poderia levar a efeitos adversos sobre o consumo devido aos seus componentes, principalmente pelo seu teor de minerais de 7,32% (THOMPSON & HE, 2006). No entanto, foi possível verificar que a pureza da glicerina utilizada não foi um fator limitante do consumo, o que também foi observado por outros autores.

Fisher et al. (1971) observaram que dietas fornecidas na forma de mistura total contendo glicerol (472 g/dia) causaram efeito estimulante do apetite. Segundo Drouillard (2008), a inclusão do glicerol na ração pode aumentar o consumo, principalmente por evitar a seleção de ingredientes pelo animal quando a dieta é fornecida na forma de mistura total.

Kass et al. (2012) observaram que a adição de 0, 52; 104 e 156 g/kg de MS de glicerol em substituição, isoenergética, ao farelo de trigo da ração concentrada de dietas a base de silagem de milho, também aumentou o consumo de MS de vacas holandesas no terço médio da lactação, com consumos registrados de 18,0; 18,5; 18,4; e 19,0 kg de MS/dia, respectivamente. Segundo os autores, níveis altos de inclusão de glicerol na dieta, de até 15% da MS, não apresentam efeitos sobre o consumo.

Outros autores também observaram efeito positivo da inclusão da glicerina na dieta sobre o consumo, como Bodarski et al. (2005) para vacas no início da lactação, Donkin et al. (2009) para vacas no terço médio da lactação e Carvalho et al. (2011) para vacas no período de transição.

Porém Boyd et al. (2013), observaram redução no consumo de MS de vacas holandesas, no início da lactação, alimentadas com dietas com adição de 0, 200 e 400 g/dia de glicerina no suplemento concentrado em substituição ao milho, com valores médios para o consumo de MS de 24,3; 23,1 e 13,4 kg/dia, respectivamente.

A adição da glicerina bruta levou ao aumento ($P < 0,05$) de 32,33% no consumo de PB das dietas com adição de 15% de glicerina bruta em relação à controle, o que foi ocasionado pelo aumento do consumo de MS. O consumo de PB observado para as vacas alimentadas com silagem de milho com adição de glicerina bruta foi maior que ao recomendado pelo NRC (2001), de 2,6 kg/dia, para vacas em lactação com peso corporal de 500 kg e produção média de 24 kg de leite/dia. Segundo Pereira et al. (2005), o teor de PB na dieta de 13-14% na base da MS pode ser considerado como nível ótimo para a produção de leite no terço médio e final da lactação.

Boyd et al. (2013) não observaram efeito no consumo de PB por vacas holandesas, no início da lactação, alimentadas com dietas com parte do milho do suplemento concentrado substituído pela glicerina bruta (0, 200 e 400 g/dia). Estes autores observaram consumo de PB de 3,5; 3,1 e 3,1 kg/dia, para as dietas com 0, 200 e 400 g/dia de glicerina, respectivamente, as quais apresentaram teor de PB de 17,2; 16,6 e 16,7%, respectivamente.

O consumo elevado de PB observado no presente estudo pode levar à maior produção de $N-NH_3$ no rúmen e, conseqüentemente, maior gasto de energia para conversão da amônia a ureia no fígado, aumentando as perdas de compostos nitrogenados e assim reduzir a eficiência energética das dietas.

Não foi observado efeito ($P > 0,05$) dos níveis de adição de glicerina bruta sobre o consumo de FDN, embora tenha sido observada redução do teor desse nutriente, de 60,83% para 49,26% (Tabela 6), nas dietas com adição de glicerina bruta. No entanto, foi observada redução ($P < 0,05$) no consumo de FDA, em que cada 1% de adição da glicerina bruta promoveu redução de 0,031 kg no consumo de FDA.

O teor de FDN dos alimentos acima de 60% é considerado o principal fator limitante do consumo devido ao efeito físico de enchimento ruminal proporcionado pela fibra (MERTENS, 1994). De forma que, pode-se afirmar que aliado ao efeito palatilizante do glicerol (DONKIN & DOANE, 2007) outro fator que contribuiu para o aumento do consumo de MS foi à redução do teor de FDN das dietas com os níveis de adição de glicerina bruta.

Contudo, foi observado aumento ($P > 0,05$) da taxa de passagem ruminal da silagem (Kp_s) e do suplemento concentrado (Kp_{sc}), obtidas por meio da equação proposta pelo NRC (2001), em que cada 1% de adição de glicerina bruta promoveu o aumento de 0,0286 %/h e 0,0642 %/h na Kp_s e Kp_{sc} , respectivamente (Tabela 10). Desta forma, pode-se inferir que a redução do teor de FDN das dietas, em função dos níveis de adição da glicerina bruta à

silagem, proporcionaram menor tempo de permanência dos alimentos no rúmen, com consequente aumento da ingestão de MS pelas vacas.

Tabela 10. Taxa de passagem ruminal da silagem de milho aditivada com níveis crescentes de glicerina bruta (K_{ps}) e do suplemento concentrado (K_{psc})

Item	Níveis de adição (% da MN) ¹				Equação	r^2	CV (%)
	0	5	10	15			
K_{ps} (%/h)	5,17	5,43	5,54	5,61	$\hat{Y} = 5,22 + 0,0286X$	0,91	5,44
K_{psc} (%/h)	7,63	8,21	8,47	8,62	$\hat{Y} = 7,75 + 0,0642X$	0,91	6,35

¹0, 5, 10, 15: respectivamente, níveis inclusão de glicerina bruta na silagem de milho

O consumo de carboidratos totais (CHT) e carboidratos não fibrosos (CNF) apresentou resposta quadrática ($P < 0,05$) à adição da glicerina bruta, sendo o ponto de máxima ingestão de CHT e CNF obtidos quando adicionado 9,35 e 9,22% de GB à silagem, respectivamente.

Foi observado efeito ($P < 0,05$) dos níveis de adição de glicerina bruta no consumo de NDT, com aumento de 32,10% para as dietas com adição 15% de glicerina bruta na silagem em relação à controle, o que pode ser atribuído ao aumento do NDT das dietas com os níveis de inclusão da glicerina bruta (Tabela 6).

Foi observada resposta linear positiva ($P < 0,05$) para o consumo de ED, EM e EL_{lac} em função dos níveis de adição de glicerina bruta, com aumento de 34,10; 33,33 e 36,36%, respectivamente, para as dietas com adição de 15% de glicerina bruta em relação à controle, sendo o aumento no consumo de EL_{lac} mais pronunciado do que os demais, indicando que a utilização da glicerina bruta alterou a quantidade de energia disponível da dieta para a produção de leite.

O aumento do consumo de energia em função dos níveis de adição da glicerina bruta na silagem de milho demonstra o potencial energético da glicerina bruta em substituir o milho na dieta de vacas em lactação sem que ocorra sobrecarga de carboidratos de rápida fermentação no rúmen, o que poderia ocasionar distúrbios metabólicos como a acidose ruminal.

No entanto, Osborne et al. (2009) não observaram diferença no consumo de energia ao avaliarem a suplementação energética de vacas holandesas em lactação alimentadas com dietas a base de silagem de milho e ração concentrada, com glicerina pura (99,7% de glicerol) e óleo de soja, fornecidos na água nas quantidades de 20 g/L e 10 g/L, respectivamente.

Foi observada diferença ($P < 0,05$) entre os indicadores MSi, FDNi e FDAi utilizados na estimativa da produção fecal e digestibilidade aparente da MS, MO, PB, FDN, FDA e CHT (Tabela 11).

Tabela 11. Indicadores externos MSi, FDNi e FDAi utilizados na estimativa da produção fecal e digestibilidade aparente dos nutrientes

Item	Indicador			EP	CV (%)
	MSi	FDNi	FDAi		
Produção fecal (kg/dia)	7,24 ^a	6,42 ^b	6,88 ^{ab}	0,15	15,19
Digestibilidade aparente (%)					
Matéria seca	63,52 ^b	67,70 ^a	65,44 ^{ab}	0,68	7,21
Matéria orgânica	65,39 ^a	69,35 ^b	67,19 ^a	0,63	6,50
Proteína bruta	63,95 ^a	67,96 ^b	65,62 ^{ab}	0,85	8,89
Fibra em detergente neutro	57,55 ^b	62,49 ^a	59,92 ^b	0,73	8,39
Fibra em detergente ácido	46,29 ^c	52,53 ^a	49,29 ^b	0,84	11,84
Carboidratos totais	65,30 ^b	69,29 ^a	67,15 ^b	0,62	6,39

¹Médias na mesma linha seguidas pela mesma letra não diferem entre si ($P > 0,05$) pelo teste de Tukey; EP = erro padrão da média

Na estimativa da produção fecal a MSi foi o indicador que estimou maior valor quando comparado aos demais. Já para a estimativa da digestibilidade da MS, MO, PB, FDN, FDA e CHT o indicador FDNi foi o que estimou maiores valores. No entanto, quando não se tem a determinação da produção fecal realizada pela coleta total de fezes, não se tem um parâmetro para chegar ao indicador que possui maior acurácia na estimativa da produção fecal e digestibilidade.

De forma que, foi realizada a análise descritiva para as médias de produção fecal e digestibilidade aparente dos nutrientes para averiguar qual indicador foi mais preciso, conforme descrito na Tabela 12.

Tabela 12. Estatística descritiva para as médias de produção fecal e digestibilidade aparente dos nutrientes, estimadas pelos indicadores MSi, FDNi e FDAi

Item	Indicadores		
	MSi	FDNi	FDAi
	Produção fecal		
Número de observações	48	48	48
Média	7,24	6,42	6,88
Desvio padrão	1,48	1,30	1,52
Coeficiente de variação (%)	20,50	20,23	22,06
	CDMS		
Número de observações	48	48	48
Média	63,52	67,70	65,44
Desvio padrão	5,16	4,20	5,02
Coeficiente de variação (%)	8,12	6,20	7,68
	CDMO		
Número de observações	48	48	48
Média	65,39	69,35	67,19
Desvio padrão	4,87	3,95	4,80
Coeficiente de variação (%)	7,45	5,69	7,14
	CDPB		
Número de observações	48	48	48
Média	63,95	67,96	65,62
Desvio padrão	6,62	6,43	7,69
Coeficiente de variação (%)	10,35	9,46	11,71
	CDFDN		
Número de observações	48	48	48
Média	57,55	62,49	59,92
Desvio padrão	6,62	4,85	5,50
Coeficiente de variação (%)	11,50	7,76	9,18
	CDFDA		
Número de observações	48	48	48
Média	46,30	52,53	49,29
Desvio padrão	7,84	5,78	6,61
Coeficiente de variação (%)	16,95	11,00	13,40
	CDCHT		
Número de observações	48	48	48
Média	65,30	69,29	67,15
Desvio padrão	5,10	3,99	4,75
Coeficiente de variação (%)	7,81	4,01	7,08

Foi observada menor variação experimental, tanto na estimativa da produção fecal como da digestibilidade aparente dos nutrientes, para o indicador FDNi, visto os resultados estimados, para todas as variáveis analisadas a partir desse indicador, terem apresentado menor desvio padrão e coeficiente de variação. Desta forma, a FDNi foi eleita para a estimativa da digestibilidade aparente dos nutrientes das dietas com adição de níveis crescentes de glicerina bruta na ensilagem do milho (Tabela 13).

Alguns autores têm sugerido que a utilização da FDAi tem se mostrado melhor indicador na estimação da produção fecal e da digestibilidade aparente em bovinos do que a FDNi, pois o FDAi tem apresentado maior precisão das estimativas. Entretanto, convém ressaltar que algumas dessas conclusões foram estabelecidas apenas considerando-se a precisão do indicador e não a sua acurácia, pois muitos dos trabalhos de pesquisa realizados no Brasil, objetivando a avaliação de indicadores não têm realizado a coleta total de fezes, o que impossibilita conclusões definitivas.

Detmann et al. (2001) trabalhando com animais em sistema de pastejo observaram que a MSi e FDNi produziram resultados melhores que a FDAi. Ferreira et al. (2009) observaram o mesmo comportamento quando trabalharam com cana-de-açúcar como volumoso para novilhas, porém utilizando silagem de milho para vacas em lactação os autores encontraram melhores resultados para FDAi em relação à FDNi. Possíveis razões para essas variações podem estar relacionadas à constituição da fibra de cada volumoso e à seletividade da dieta pelos animais. Ressalta-se que o resíduo da sobra do cocho é rico em material indigestível, e este, precisa ser devidamente contabilizado.

Desta forma, ao utilizar a FDNi como indicador interno na estimativa da digestibilidade aparente dos nutrientes no presente estudo, foi observada resposta linear positiva ($P < 0,05$) para a digestibilidade aparente da MS, MO, PB e CHT, e redução ($P > 0,05$) na digestibilidade da fração fibrosa dos alimentos (FDN e FDA) em função dos níveis de adição da glicerina bruta, o que demonstra efeito da glicerina bruta sobre a disponibilidade dos nutrientes (Tabela 13).

Outros autores também não observaram efeito da glicerina na digestibilidade aparente dos nutrientes em vacas em lactação, como Boyd et al. (2013) ao avaliarem a inclusão de 0, 200 e 400 g/dia de glicerina em substituição ao milho na dietas de vacas no início da lactação, e Schröder & Südekum (1999) ao avaliarem a inclusão de 10% de glicerol na dieta de vacas em lactação.

Tabela 13. Digestibilidade aparente dos nutrientes da ração total

Variável	Níveis de adição (% da MN) ¹				Equação	r ²	CV (%)
	0	5	10	15			
DMS (%)	64,56	68,03	66,45	71,76	$\hat{Y} = 64,70 + 0,40X$	0,72	5,17
DMO (%)	66,90	69,69	67,88	72,92	$\hat{Y} = 66,91 + 0,33X$	0,63	4,82
DPB (%)	64,74	67,32	66,11	73,66	$\hat{Y} = 64,12 + 0,51X$	0,70	6,66
DFDN (%)	63,07	63,07	59,69	64,12	$\hat{Y} = 62,49$	-	6,94
DFDA (%)	51,81	52,64	50,60	55,08	$\hat{Y} = 52,53$	-	9,93
DCHT (%)	67,18	70,01	68,05	71,93	$\hat{Y} = 67,45 + 0,25X$	0,56	5,22

¹0, 5, 10, 15: respectivamente, níveis inclusão de glicerina bruta na silagem de milho; DMS = digestibilidade aparente da matéria seca; DMO = digestibilidade aparente da matéria orgânica; DPB = digestibilidade aparente da proteína bruta; DFDN = digestibilidade aparente da fibra em detergente neutro; DFDA = digestibilidade aparente da fibra em detergente ácido; DCHT = digestibilidade aparente dos carboidratos totais

3.2 Produção e Composição do Leite

O aumento do consumo de EL_{lac} ocasionado pela adição da glicerina bruta na silagem de milho não provocou efeito na produção de leite ou produção de leite corrigida para 3,5% de gordura. No entanto, foi observada redução ($P < 0,05$) da eficiência alimentar para a

produção de leite com os níveis de adição da glicerina bruta. O que sugere que o maior consumo de energia associado à adição da glicerina bruta promoveu maior direcionamento para o metabolismo de deposição de tecido corporal, e não para a síntese do leite na glândula mamária (Tabela 14).

Tabela 14. Produção e composição do leite em vacas alimentadas com silagens de milho aditivadas com glicerina bruta

Variável	Níveis de adição (% da MN) ¹				Equação	r ²	CV (%)
	0	5	10	15			
PL (kg/dia)	24,73	26,27	26,75	26,79	$\hat{Y} = 26,14$	-	9,96
Gordura (%)	3,68	3,44	3,35	3,35	$\hat{Y} = 3,45$	-	9,51
PLG (kg/dia)	25,40	25,95	26,18	26,16	$\hat{Y} = 25,92$	-	9,11
Ef (kgL/kgMS)	1,50	1,30	1,26	1,29	$\hat{Y} = 1,44 - 0,013X$	0,66	14,06
Proteína (%)	3,17	3,08	3,20	3,26	$\hat{Y} = 3,18$	-	4,19
Lactose (%)	4,54	4,59	4,54	4,62	$\hat{Y} = 4,57$	-	1,91
ES (%)	12,33	12,17	11,98	12,17	$\hat{Y} = 12,16$	-	4,25
Gordura (kg/dia)	0,91	0,90	0,90	0,90	$\hat{Y} = 0,90$	-	10,21
Proteína (kg/dia)	0,78	0,81	0,84	0,87	$\hat{Y} = 0,78 + 0,0062X$	0,98	8,53
Lactose (kg/dia)	1,12	1,21	1,22	1,24	$\hat{Y} = 1,20$	-	11,39
ES (kg/dia)	3,04	3,19	3,20	3,26	$\hat{Y} = 3,17$	-	9,59

¹0, 5, 10, 15: respectivamente, níveis inclusão de glicerina bruta na silagem de milho; PL = produção de leite; PLG = produção de leite corrigida para 3,5% de gordura; Ef = eficiência; ES = sólidos totais

Os teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais não foram influenciados ($P > 0,05$) pelos níveis de adição de glicerina bruta, com valores médios de 3,45; 3,18; 4,57 e 12,16%, respectivamente. Com relação à quantidade de sólidos produzidos, foi observado aumento ($P < 0,05$) da quantidade de proteína do leite produzida.

Osborne et al. (2009) avaliaram a suplementação energética de vacas holandesas em lactação, alimentadas com dietas a base de silagem de milho e ração concentrada, com glicerina pura (99,7% de glicerol) e óleo de soja, fornecidos na água nas quantidades de 20 g/L e 10 g/L, respectivamente, e também não observaram efeito na produção e composição do leite.

Carvalho et al. (2011) também não observaram efeito, da inclusão de 10,8% de glicerina pura (99,5% de glicerol) na ração concentrada de dietas a base de silagem de milho e feno de alfafa fornecidas na forma de mistura total, sobre a produção de leite de vacas holandesas no início da lactação, com produção média de 36,4 kg de leite por dia.

Duque (2012) ao avaliar a adição de 7% de glicerina bruta (ADM[®]) em substituição ao fubá de milho do concentrado, de dietas a base de silagem de milho e ração concentrada, na proporção volumoso concentrado de 60:40, na alimentação de vacas Holandês x Gir, não observou diferença para produção e composição do leite. Com valores médios para a produção de leite de 21,53 kg/ dia, teor de gordura de 4,12%, teor de proteína de 3,39%, teor de lactose de 4,50% e teor de sólidos totais de 13,0 %. No entanto, Duque (2012) observou redução da produção de leite corrigida para 4% com a adição da glicerina bruta de 23,16 kg/dia para 20,30 kg/dia.

Kass et al. (2012) observaram aumento no teor de proteína no leite, e redução da eficiência alimentar para a produção de leite, sem alteração na produção de vacas holandesas alimentadas com dietas, a base de silagem de milho, contendo 0, 52; 104 e 156 g/kg de MS de glicerol adicionado em substituição, isoenergética, ao farelo de trigo da ração concentrada.

Segundo Kass et al. (2012), o aumento no teor de proteína do leite pode estar relacionado ao uso do glicerol como fonte de energia pelos microrganismos ruminais para

síntese de proteína microbiana, o que levaria ao aumento das concentrações de N-NH₃ no rúmen e de ureia no sangue.

Contudo, esperar-se que o consumo de glicerina por vacas em lactação proporcione maior concentração de propionato no rúmen (DeFRain et al., 2004, LINKE et al., 2004, BOYD et al., 2012, KASS et al., 2012, HARZIA et al., 2013), o que contribui para o aumento da produção de glicose no fígado, via gliconeogênese, e conseqüentemente maior síntese de lactose na glândula mamária e maior produção de leite. DeFrain et al. (2004) sustentam a hipótese de que o uso do glicerol fornece maior aporte energético para o animal, com conseqüente aumento da produção de leite, de forma que Bodarski et al. (2005) observaram aumento da produção de leite, de 32,11 kg/dia para 36,14kg/dia, quando utilizaram 500 mL/dia de glicerol ou aproximadamente, 3,1% da MS, por período de três semanas antes do parto até 70 dias após parto na dieta de vacas.

No entanto, San Vito (2010) estudou a substituição de 0; 33,3; 66,6; e 100% (base da MS) do milho grão pela glicerina bruta, que corresponderam a 0, 7, 14, e 21% de inclusão de glicerina na dieta (composta por silagem de milho e ração concentrada, na proporção volumoso:concentrado 50:50) de vacas holandesas em lactação, e observaram redução da produção de leite e produção de leite corrigida para 3,5% a partir do nível de 66,7% de substituição do milho pela glicerina bruta, não observando efeito dos níveis de substituição na composição do leite.

3.3 Parâmetros Ruminiais

Não foi observado efeito ($P>0,05$) dos níveis de adição de glicerina bruta sobre o pH ruminal (Tabela 15). No entanto, foi observado efeito ($P<0,05$) dos tempos de coleta após a alimentação e interação tratamento e tempo de coleta (Tabela 16).

Tabela 15. Parâmetros ruminiais e produção de proteína microbiana em vacas alimentadas com silagens de milho aditivadas com níveis crescentes de glicerina bruta

Variável	Níveis de adição (%) ¹				Equação	r ²	CV (%)
	0	5	10	15			
pH	6,20	6,24	6,16	6,17	$\hat{Y} = 6,19$	-	10,25
N-NH ₃ (mg/dL)	15,90	16,12	17,06	17,36	$\hat{Y} = 15,81+0,107X$	0,94	12,96
AGV (μMOL/mL)	98,72	91,50	94,44	89,49	$\hat{Y} = 93,54$	-	29,51
Ac (μMOL/mL)	68,38	56,32	53,56	48,14	$\hat{Y} = 66,12-1,27X$	0,92	27,31
Pr (μMOL/mL)	18,64	22,02	26,39	27,62	$\hat{Y} = 18,97+0,63X$	0,96	51,14
Bu (μMOL/mL)	11,71	13,16	14,49	13,73	$\hat{Y} = 13,27$	-	46,76
Ac (%)	69,39	62,24	57,31	54,09	$\hat{Y} = 68,38-0,016X$	0,97	11,89
Pro (%)	18,81	23,63	27,35	30,35	$\hat{Y} = 19,28+0,767X$	0,99	28,15
But (%)	11,80	14,14	15,33	15,56	$\hat{Y} = 14,21$	-	48,21
Ac/Pro	3,73	2,72	2,21	1,86	$\hat{Y} = 3,55-0,122X$	0,94	30,66
Pmic (kg/dia)	1,30	1,57	1,57	1,71	$\hat{Y} = 1,34+0,25X$	0,86	11,44

¹0, 5, 10, 15: respectivamente, níveis inclusão de glicerina bruta na silagem de milho; AGV = ácidos graxos voláteis; Ac = acetato; Pr = propionato; Bu = butirato; Ac/Pr = relação acetato/propionato; Pmic = proteína microbiana

Foi observada variação do pH ruminal no período de 24 horas após a alimentação, conforme apresentado na Figura 1. Em que até 10 horas após a alimentação ocorreu queda do pH, com menor valor registrado de 5,79 para a silagem sem adição de glicerina bruta, permanecendo o pH abaixo de 6,0 por, aproximadamente, 5 horas em média, e em seguida ocorreu progressivo aumento até 24 horas, restabelecendo os valores observados no tempo 0, com valor máximo de 6,65 para a dieta com adição de 5% de glicerina bruta.

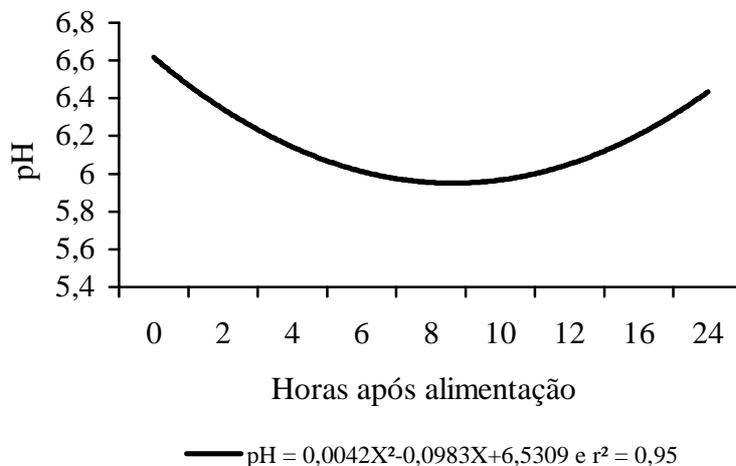


Figura 1. Variação do pH ruminal após a alimentação

De acordo com Veth et al. (2001), a digestibilidade da FDN é reduzida quando o pH ruminal permanece quatro horas com valor abaixo de 6,0, sendo observada redução na síntese microbiana quando o pH permanece 12 horas abaixo desse valor. No entanto, apesar do pH ruminal ter permanecido abaixo desse valor por período de, aproximadamente, 5 horas, em média, não foi observado efeito na digestibilidade da FDN (Tabela 13), de forma que pode-se inferir que a variação do pH observada foi adequada para atuação dos microrganismos ruminais.

Outros autores também não observaram efeito do uso da glicerina sobre o pH ruminal de vacas em lactação, como DeFraim et al. (2004), Kass et al. (2012) e Boyd et al. (2013). No entanto, outros estudos observaram redução do pH ruminal com a suplementação de glicerol (KIJORA et al., 1998; MACH et al., 2009; WANG et al., 2009a).

Segundo Kass et al. (2012), esses resultados contraditórios na literatura podem estar relacionados aos teores de carboidratos não fibrosos das dietas utilizadas nos diferentes trabalhos, de forma que poderia levar à redução do pH ruminal.

Foi observada resposta linear positiva ($P < 0,05$) para a concentração de N-NH_3 no líquido ruminal em função dos níveis de adição de glicerina bruta (Tabela 15), o que pode ser atribuído ao aumento do consumo de PB observado no presente estudo (Tabela 9). Também foi observado efeito ($P < 0,05$) dos tempos de coleta após a alimentação e interação tratamento e tempo de coleta para a concentração de N-NH_3 no líquido ruminal (Tabela 16). Os maiores valores para a concentração de N-NH_3 no líquido ruminal foram obtidos nos tempos iniciais, com expressiva redução até 24 horas após o fornecimento das dietas (Figura 2).

O aumento das concentrações de N-NH_3 foi acompanhando do aumento da produção de proteína microbiana (P_{mic}), a qual foi calculada conforme equação proposta pelo NRC (2001), de forma que, a cada 1% de glicerina bruta adicionada na silagem proporcionou aumento de 0,25 kg/dia na P_{mic} (Tabela 15).

A proteína microbiana representa, em média, 59% da proteína que chega ao intestino delgado (CLARK et al., 1992), tendo assim grande participação na síntese da proteína do leite (GENNADIJ et al. 2000). De forma que foi verificado aumento da quantidade de proteína do leite em função dos níveis de glicerina bruta estudados no presente estudo (Tabela 14).

Tabela 16. Parâmetros ruminiais de vacas alimentadas com silagens de milho aditivadas com glicerina bruta em função dos tempos de coleta após a alimentação

Níveis de adição (%) ¹	Tempos de coleta após alimentação (horas)								
	0	2	4	6	8	10	12	16	24
pH²									
0	6,60	6,33	6,19	6,17	6,06	5,79	5,90	6,20	6,56
5	6,61	6,38	6,21	6,17	6,06	5,92	6,05	6,08	6,65
10	6,57	6,24	6,04	6,15	5,93	6,04	5,96	5,99	6,55
15	6,61	6,31	6,05	6,14	5,91	5,91	6,08	6,03	6,48
N-NH₃ (mg/dL)³									
0	18,68	22,71	17,18	16,75	15,97	14,88	13,04	12,47	11,39
5	21,29	23,30	20,03	18,73	16,45	14,53	12,89	9,33	8,58
10	21,79	25,14	20,07	18,38	17,40	15,98	13,07	11,73	10,03
15	24,05	26,75	19,25	18,32	17,30	15,05	13,77	12,25	9,57
Acetato (μMOL/mL)⁴									
0	57,06	68,00	66,06	63,72	69,65	76,91	75,49	74,29	64,22
5	58,58	54,54	55,56	55,27	57,56	58,93	54,83	60,54	51,06
10	52,23	47,87	54,19	49,02	54,61	55,33	55,72	56,65	56,41
15	48,81	47,06	41,97	49,34	42,01	48,33	47,15	54,14	54,45
Propionato (μMOL/mL)⁵									
0	13,65	19,43	20,01	18,36	19,28	21,62	20,62	19,40	15,17
5	17,91	23,43	22,66	22,05	26,50	26,05	22,22	23,13	14,25
10	16,07	24,41	29,26	24,04	33,67	30,48	30,12	30,66	18,86
15	18,81	26,56	25,89	28,55	29,84	33,51	27,93	35,92	21,56
Butirato (μMOL/mL)⁶									
0	8,03	12,84	13,63	11,41	11,77	13,28	12,78	12,09	9,57
5	9,85	15,18	13,09	13,65	16,26	15,69	12,15	13,30	8,28
10	8,73	16,26	16,47	13,60	13,86	15,71	15,53	15,78	10,47
15	8,91	14,85	15,22	15,26	15,79	15,04	12,67	15,03	10,80
AGV (μMOL/mL)⁷									
0	78,73	100,27	99,69	93,49	100,69	112,00	108,89	105,77	88,95
5	86,34	93,15	91,31	90,98	100,32	100,68	90,20	96,96	73,59
10	77,03	8,53	99,92	86,65	106,14	101,53	101,36	103,09	85,74
15	76,54	88,47	83,08	93,15	87,64	96,87	87,75	105,09	86,80
Ac/Pr⁸									
0	4,21	3,51	3,30	3,52	3,63	3,57	3,68	3,85	4,28
5	3,36	3,53	2,64	2,57	2,45	3,33	2,49	2,70	3,61
10	3,33	2,05	1,92	2,10	1,71	1,89	1,91	1,95	3,09
15	2,67	1,82	1,69	1,74	1,45	1,47	1,72	1,59	2,58

¹0, 5, 10, 15: respectivamente, níveis inclusão de glicerina bruta na silagem de milho; ²pH_{0%} = 6,55-0,103T+0,0044T² e r² = 0,87 e CV (%) = 0,90; pH_{5%} = 6,58 - 0,102T+0,0044T² e r² = 0,97 e CV (%) = 0,90; pH_{10%} = 6,47 - 0,093T+0,0040T² e r² = 0,89 e CV (%) = 0,90; pH_{15%} = 6,51- 0,095T+0,0040T² e r² = 0,87 e CV (%) = 0,90; ³N-NH₃_{0%} = 19,61-0,41T e r² = 0,76 e CV (%) = 6,54; N-NH₃_{5%} = 22,14-0,660T e r² = 0,90 e CV (%) = 6,54; N-NH₃_{10%} = 22,63-0,611T e r² = 0,87 e CV (%) = 6,54; N-NH₃_{15%} = 23,54-0,68T e r² = 0,85 e CV (%) = 6,54; ⁴Ac_{0%} = 58,41 + 2,38T-0,088T² e r² = 0,76 e CV (%) = 7,98; Ac_{5%} = 56,32 e CV (%) = 7,98; Ac_{10%} = 50,84+0,298X e r² = 0,49 e CV (%) = 7,98; Ac_{15%} = 44,71+0,376X e r² = 0,41 e CV (%) = 7,98; ⁵Pr_{0%} = 15,62+0,89X-0,038X² e r² = 0,72 e CV (%) = 12,22; Pr_{5%} = 19,29+1,09X-0,054X² e r² = 0,82 e CV (%) = 12,22; Pr_{10%} = 18,43+2,21X-0,092X² e r² = 0,80 e CV (%) = 12,22; Pr_{15%} = 19,94+1,99X-0,078X² e r² = 0,76 e CV (%) = 12,22; ⁶Bu_{0%} = 11,71 e CV (%) = 16,42; Bu_{5%} = 13,16 e CV (%) = 16,42; Bu_{10%} = 14,49 CV (%) = 16,42; Bu_{15%} = 13,73 e CV (%) = 16,42; ⁷AGV_{0%} = 98,72 CV (%) = 8,97; AGV_{5%} = 91,50 e CV (%) = 8,97; AGV_{10%} = 94,44 e CV (%) = 8,97; AGV_{15%} = 89,48 CV (%) = 8,97; ⁸Ac/Pr_{0%} = 3,73 CV (%) = 10,56; Ac/Pr_{5%} = 2,72 e CV (%) = 10,56; Ac/Pr_{10%} = 2,21 e CV (%) = 10,56; Ac/Pr_{15%} = 1,86 e CV (%) = 10,56

Quando se tem um equilíbrio entre a quantidade de energia e N-NH₃ disponíveis no rúmen, há aumento da síntese de proteína microbiana. No entanto, quando a disponibilidade de N-NH₃ é superior à de energia, mesmo que a energia não seja limitante para crescimento dos microrganismos, a quantidade de N-NH₃ supera a capacidade de síntese de proteína microbiana, de forma que há um excesso de N-NH₃ no rúmen, o qual precisa ser convertido a ureia no fígado, aumentando assim a concentração de ureia no sangue.

A maior concentração de N-NH₃ nos tempos iniciais (Figura 2) pode estar relacionada às taxas de degradação da proteína dos alimentos utilizados, e também ao comportamento ingestivo dos animais. Embora não tenha sido realizada a avaliação do comportamento ingestivo foi possível observar que, ao amanhecer do dia, as vacas consumiam até o momento da ordenha da manhã o alimento que ainda estava presente no cocho, assim ao realizar a coleta no tempo zero hora (antes da ordenha da manhã) os animais ainda estavam em processo de ingestão de alimentos.

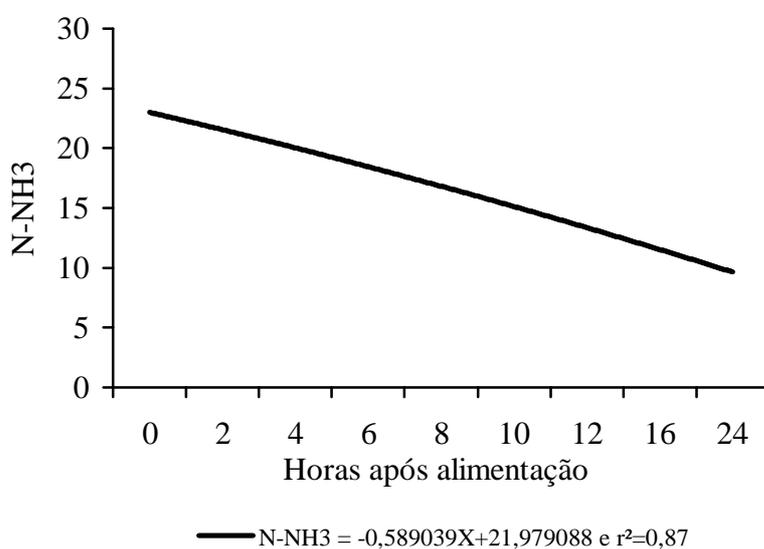


Figura 2. Variação das concentrações ruminais de N-NH₃ após a alimentação

Boyd et al. (2013) observaram redução da concentração do N-NH₃ ruminal de vacas holandesas em lactação com o uso de 0, 200 e 400 g/dia de glicerina bruta no suplemento concentrado em substituição ao milho. Enquanto que Kass et al. (2012) observaram aumento das concentrações de N-NH₃ ruminal de vacas holandesas alimentadas com dietas a base de silagem de milho contendo 0, 52; 104 e 156 g/kg de MS de glicerol adicionado em substituição, isoenergética, ao farelo de trigo da ração concentrada.

Não foi observado efeito ($P > 0,05$) da adição da glicerina bruta sobre a produção total de ácidos graxos voláteis (AGV) e concentração de butirato. No entanto, foi observada redução ($P < 0,05$) das concentrações de acetato e aumento ($P < 0,05$) das concentrações de propionato, de forma que a relação acetato:propionato foi reduzida com os níveis de inclusão de glicerina bruta na silagem de milho (Tabela 15).

Foi observado efeito ($P < 0,05$) do tempo de coleta após a alimentação e interação entre tratamento e tempo para a produção de AGV, propionato e acetato. Para a produção de butirato foi observado apenas efeito do tempo de coleta, não havendo interação tratamento e tempo (Tabela 16). A maior produção de AGV total e individual foi obtida entre 10 e 16 horas após a alimentação, conforme apresentado na Figura 3.

Em acordo com o presente estudo DeFrain et al. (2004) também observaram aumento da produção de AGV e da produção de propionato em detrimento da produção de acetato,

sem que houvesse efeito na produção de butirato, ao avaliarem o fornecimento de 0; 0,43 e 0,86 kg de glicerina na ração concentrada de vacas holandesas em período de transição.

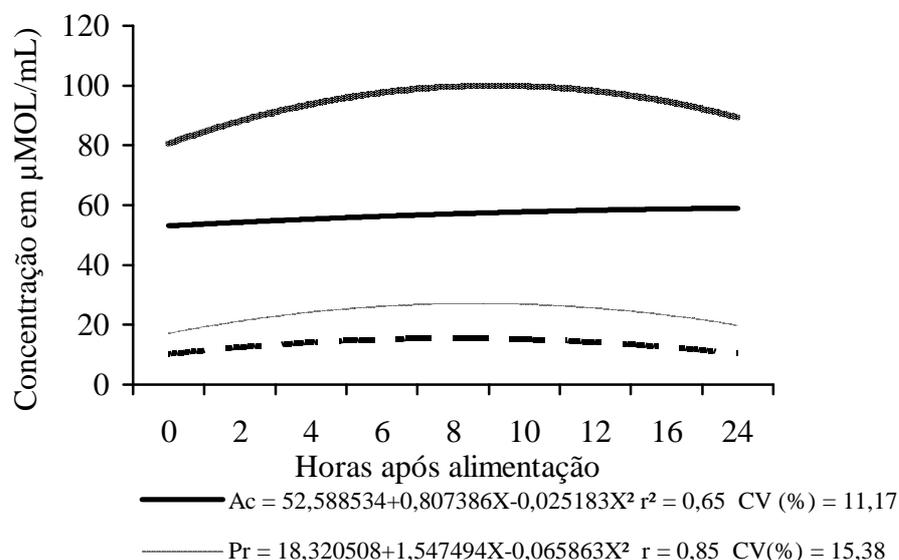


Figura 3. Variação das concentrações ruminais de AGV total, propionato, acetato e butirato após a alimentação.

No entanto, trabalhos foram realizados com o objetivo de avaliar o efeito do glicerol sobre o ambiente ruminal de vacas em lactação e os resultados sempre apontam para aumento dos níveis de propionato e butirato em detrimento daqueles de acetato. Como Boyd et al. (2012) que avaliaram o efeito do fornecimento de 0, 200 e 400 g de glicerina no suplemento concentrado em substituição ao milho para vacas holandesas, no início da lactação, Kass et al. (2012) que avaliaram a adição de 0, 1, 2 e 3 kg/dia de glicerina, na alimentação de vacas holandesas no terço médio da lactação, em substituição, isoenergética, ao farelo de trigo do suplemento concentrado de dietas a base de silagem de milho, as quais corresponderam a 0, 52; 104 e 156 g/kg de MS de glicerina; e Harzia et al. (2013) que avaliaram a inclusão de 1, 2 e 3 kg/dia de glicerina bruta (base da MS) em substituição ao farelo de trigo do suplemento concentrado, que corresponderam a 0, 52; 104 e 156 g/kg de MS de glicerol na dieta de vacas holandesas em lactação.

O propionato é considerado substrato gliconeogênico e, segundo Valadares Filho & Pina (2006), fornece no mínimo de 50% e no máximo de 75% do requerimento da glicose de vacas leiteiras, enquanto que os aminoácidos, glicerol e lactato são os precursores do restante da glicose exigida.

3.4 Componentes Sanguíneos

A adição de glicerina bruta influenciou positivamente ($P < 0,05$) as concentrações plasmáticas de glicose, enquanto que para as concentrações plasmáticas de ácidos graxos não esterificados (NEFA) foi observada resposta linear negativa ($P < 0,05$) em função dos níveis de glicerina bruta (Tabela 17).

O aumento das concentrações plasmáticas de glicose está relacionado ao aumento da produção de propionato no rúmen, também observado com os níveis de glicerina bruta (Tabela 15). Desta forma, a inclusão de glicerina bruta na silagem de milho levou ao maior consumo de glicerol (Tabela 9), o qual foi fermentado no rúmen e transformado em AGV, com aumento da produção de propionato. Por sua vez, a maior produção de propionato no

rúmen levou à maior produção de glicose no fígado via gliconeogênese.

Tabela 17. Concentração plasmática de glicose e ácidos graxos não esterificados (NEFA) em vacas leiteiras alimentadas com silagens de milho aditivadas com glicerina bruta

Variável	Níveis de adição (%) ¹				Equação	r ²	CV (%)
	0	5	10	15			
Glicose (mg/dL)	63,79	65,80	66,27	68,32	$\hat{Y} = 63,94 + 0,28X$	0,95	7,60
Ureia (mg/dL)	34,72	35,39	35,83	37,72	$\hat{Y} = 34,50 + 0,189X$	0,90	13,83
NEFA (mmol/L)	0,074 (0,258)	0,066 (0,252)	0,052 (1,219)	0,041 (1,192)	$\hat{Y} = 0,265 - 0,005X$	0,94	18,91

¹0, 5, 10, 15: respectivamente, níveis inclusão de glicerina bruta na silagem de milho; valores entre parênteses referem-se aos dados transformados (Transformação Raiz quadrada).

Em resposta ao aumento da concentração de glicose plasmática foi observada redução da oxidação de ácidos graxos no tecido adiposo, ou seja, ocorreu menor mobilização de energia do tecido adiposo para atender às demandas energéticas das vacas em lactação (DRACKLEY, 2000). O que comprova o potencial energético da glicerina bruta em substituir o milho na dieta de vacas em lactação, visto que, o consumo de energia também aumentou em função dos níveis de adição (Tabela 9).

No entanto, tal afirmação tem que ser avaliada com cautela, pois as vacas utilizadas no presente estudo iniciaram o experimento com, em média, 61 dias em lactação, ou seja, no pico de lactação, e terminaram com 108 semanas. De forma que, nesse período de avaliação, apesar das dietas avaliadas terem proporcionado maior aporte energético para as vacas, a exigência dessas também reduziu ao longo do período, devido ao estágio de lactação.

Desta forma, a maior disponibilidade de energia não foi direcionada para a produção de leite, e sim para a deposição de tecido corporal, visto que, foi observada redução ($P < 0,05$) da eficiência alimentar para a produção de leite com os níveis de adição da glicerina bruta (Tabela 14).

Outros autores também observaram aumento da concentração plasmática de glicose e redução das concentrações plasmáticas do NEFA, quando da utilização de níveis crescentes níveis de glicerina na dieta de vacas em lactação, como Bodarski et al. (2005) ao avaliar o fornecimento de 0, 300 e 500 mL/dia de glicerina para vacas no início da lactação, e Wang et al. (2009b) que avaliaram o uso de 0, 100, 200 e 300 g/dia de glicerina na dieta de vacas holandesas início da lactação.

Kass et al. (2012) ao fornecer 0, 1, 2 e 3 kg/dia de glicerina em substituição, isoenergética, ao farelo de trigo do suplemento concentrado, os quais corresponderam a 0, 52; 104 e 156 g/kg de MS de glicerol na dieta a base de silagem de milho de vacas em lactação, também observaram redução das concentrações plasmáticas de NEFA. No entanto, a concentração de glicose no plasma não foi alterada.

No entanto, DeFrain et al. (2004) ao avaliar o fornecimento de 0; 0,43 e 0,86 kg/dia de glicerina em substituição ao milho do suplemento concentrado, sobre as concentrações plasmáticas de glicose em vacas no período de transição e Omazic et al. (2013) ao avaliarem o fornecimento de 0, e 0,5 kg/dia de glicerina pura ou bruta para vacas em lactação, ambos não observaram efeito nas concentrações plasmáticas de NEFA.

As diferenças nas concentrações de glicose e NEFA observadas na literatura podem estar relacionadas à quantidade de glicerol fornecida, forma de fornecimento, período de coleta de sangue e processamento das amostras.

As concentrações de ureia plasmática foram influenciadas ($P > 0,05$) pelos níveis de adição de glicerina bruta na silagem, o que era esperado devido ao aumento da concentração ruminal de N-NH₃ em função dos níveis de adição de glicerina bruta (Tabela 17).

O aumento da concentração de N-NH₃ acompanhado do aumento da concentração de ureia plasmática está relacionado ao aumento do consumo de PB observado no presente estudo, o qual foi maior que o recomendado pelo NRC (2001), de 2,6 kg/dia, para vacas em lactação com peso corporal de 500 kg e produção média de 24 kg de leite/dia. O aumento da concentração ruminal de N-NH₃ e de ureia plasmática não é desejável, devido ao gasto energético da conversão da amônia à ureia no fígado, o que reduz a eficiência energética das dietas.

Kass et al. (2012) também observaram aumento da concentração de ureia plasmática de vacas holandesas em lactação consumindo dietas com a adição de 0, 1, 2 e 3 kg de glicerina bruta. É importante também destacar que esses autores também observaram aumento da concentração ruminal de N-NH₃ em função da quantidade de glicerina bruta fornecida.

4 CONCLUSÕES

O uso da glicerina bruta como aditivo na ensilagem do milho aumentou o consumo de matéria seca, glicerol e proteína bruta, e a digestibilidade aparente da matéria seca, proteína bruta e carboidratos totais de vacas em lactação.

O maior consumo de glicerol proporcionou maior produção de propionato no rúmen e conseqüentemente maior concentração plasmática de glicose e redução da oxidação de ácidos graxos no tecido adiposo.

O aumento do consumo de proteína proporcionou aumento da produção de proteína microbiana e conseqüentemente, aumento da quantidade de proteína do leite, aumento da concentração ruminal de N-NH₃ e por conseguinte, aumento da concentração plasmática de ureia.

Foi observada menor variação experimental, tanto na estimativa da produção fecal como da digestibilidade aparente dos nutrientes para o indicador FDNi.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (BRASIL) – ANP. **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis 2013**. Rio de Janeiro: ANP, 2013. 231p.
- BODARSKI, R.; WERTELECKI, T.; BOMMER, F. et al. The changes of metabolic status and lactation performance in dairy cows under feeding TMR with glycerin (glycerol) supplement at periparturient period. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities**, v.8, p.1-9, 2005.
- BOYD, J.; BERNARD, J.K.; WEST, J.W. Effects of feeding different amounts of supplemental glycerol on ruminal environment and digestibility of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.96, p.470-476, 2013.
- CARVALHO, E.R.; SCHMELZ-ROBERTS, N.S.; WHITE, H.M. et al. Replacing corn with glycerol in diets for transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.94, n.2, p.908-916, 2011.
- CASALI, A.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Influência do tempo de incubação e do tamanho de partículas sobre os teores de compostos indigestíveis em alimentos e fezes bovinas obtidos por procedimentos *in situ*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.2, p.335-342, 2008.
- CLARK, J.H.; KLUSMEYER, T.H.; CAMERON, M.R. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. **Journal Dairy Science**, v.75, p.2304-2323, 1992.
- DeFRAIN, J.M.; HIPPEN, A.R.; KALSCHUR, K.F. et al. Feeding glycerol to transition dairy cows: effects on blood metabolites and lactation performance. **Journal of Dairy Science**, v.87, n.12, p.4195-4206, 2004.
- DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C.; PAULINO, M.F. et al. Cromo e indicadores internos na determinação do consumo de novilhos mestiços, suplementados, a pasto. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.5, p.1600-1609, 2001.
- DIAS JÚNIOR, G.S.; LOPES, N.M.; PESSOA JUNIOR, G. et al. Fermentation profile, composition, and dry matter loss of sugarcane-glycerin silage inoculated with bacteria. In: XXVI WORLD BUIATRICS CONGRESS, 2010, Santiago – Chile. **Anais...** World Buiatrics Congress, [2010]. (CD-ROM).
- DONKIN, S.S.; DOANE, P. **Glycerol as a Feed Ingredient in Dairy Rations**. In: Three-State Dairy Nutrition Conference. The Ohio State University, Michigan State University, Purdue University. Fort Wayne, p. 97-103. 2007.
- DONKIN, S.S.; KOSER, S.L.; WHITE, H.M. et al. Feeding value of glycerol as a replacement for corn grain in rations fed to lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.5111-5119, 2009.
- DRACKLEY, J.K. Lipid Metabolism. In: D’MELLO, J.P.F. (Ed.) **Farm Animal Metabolism and Nutrition**. Edinburg: The Scottish Agricultural College, 2000. 448p.
- DROUILLARD, J.S. Glycerin as a feed for ruminants: using glycerin in high concentrate diets. **Journal of Dairy Science**, v.91 (E-Suppl. 1), p.392, 2008.
- DUQUE, A.C.A. **Glicerina em substituição ao milho no concentrado de vacas Holandês x Gir em lactação**. 2012. 49f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de

Minas Gerais, Belo Horizonte.

FARIAS, M.S.; PRADO, I.N.; VALERO, M.V. et al. Níveis de glicerina para novilhas suplementadas em pastagens: desempenho, ingestão, eficiência alimentar e digestibilidade. **Semina. Ciências Agrárias**, v.33, p.1177-1188, 2012.

FERREIRA, D.F. **Sistema de análise de variância SISVAR DEX/UFLA** ver 4.3 (Build 45). 1999 - 2003.

FERREIRA, M.A.; VALADARES FILHO, S.C.; MARCONDES, M.I. et al. Avaliação de indicadores em estudos com ruminantes: digestibilidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.8, p.1568-1573, 2009.

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

GENNADIJ, C.; DANFAER, A.; CANT, J.P. Simulation analysis of substrate utilization in the mammary gland of lactating cows. **Journal of Dairy Research**, n.67, p171-188, 2000.

GOMES, M.A.B. **Glicerina na qualidade de silagens de cana-de-açúcar e de milho e na produção de oócitos e de embriões *in vitro* de bovinos**. 2013. 90f. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

HARZIA H.; KILK, K.; ARIKO, T. et al. Crude glycerol as glycogenic precursor in feed; effects on milk coagulation properties and metabolic profiles of dairy cows. **Journal of Dairy Research**, v.80, p.190-196, 2013.

KASS, M.; ARIKO, T.; KAERT, T. et al. Effect of replacement of barley meal with crude glycerol on lactation performance of primiparous dairy cows fed grass silage-based diet. **Livestock Science**, v.150, p.240-247, 2012.

KIJORA, C.; BERGNER, H.; GÖTZ, K.P. et al. Research note: investigation on the metabolism of glycerol in the rumen of bulls. **Archives of Animal Nutrition**, v.51, p.341-348, 1998.

LINKE, P.L.; DeFRAIN, J.M.; HIPPEN, A.R. et al. Ruminal and plasma responses in dairy cows to drenching or feeding glycerol. **Journal of Dairy Science**, v.87 (Suppl.), p.343, 2004.

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

MENÊSES, N.N. **Uso da glicerina bruta na ensilagem de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum.)**. 2012. 101f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal do Tocantins, Araguaína.

MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of the AOAC International**, v.85, p.1217-1240, 2002.

MERTENS, D.R. Regulation of forage intake. In: FAHEY JÚNIOR, G.C. (Ed.) **Forage quality, evaluation and utilization**. Madison: American Society of Agronomy, 1994. p.450-493.

MOREIRA, E.A.; REIS, L.G.; ALEVATO, C.B. et al. Método de extração do glicerol livre por saponificação em alimentos para ruminantes. In: X CONGRESSO INTERNACIONAL DO LEITE, 2011, Maceió. **Anais...** Maceió: X Congresso Internacional do Leite. [2011].

(CD-ROM).

MORIN, P.; HAMAD, B.; SAPALY, G. et al. Transesterification of rapessed oil with ethanol. **Applied Catalysis A: General**, v.330, p.69-76, 2007.

NRC – NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. Washington: National Research Council, 7. ed., 2001. 381p.

OLIVEIRA, A.S.; VALADARES, R.F.D.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Consumo, digestibilidade aparente, produção e composição do leite em vacas alimentadas com quatro níveis de compostos nitrogenados não protéicos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.4, p.1358-1366, 2001.

OLIVEIRA, J.S.; CARNEIRO, V.F.; LOPES, F.C.F. et al. Valor nutritivo, perfil de fermentação e consumo de silagens de milho aditivadas com níveis crescentes de glicerina bruta. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 48., 2011, Belém. **Anais...** Belém: Sociedade Brasileira de Zootecnia, [2011]. (CD-ROM).

OMAZIC, A.W.; TRAVÉN, M.; BERTILSSON, J. et al. High and low purity glycerin supplementation to dairy cows in early lactation: effects on silage intake, milk production and metabolism. **Animal**, v.17, n.9, p.1479-1485, 2013.

OSBORNE, V.R.; ODONGO, N.E.; CANT, J.P. et al. Effects of supplementing glycerol and soybean oil in drinking water on feed and water intake, energy balance, and production performance of periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.698-707, 2009.

PEREIRA, M.L.A.; VALADERES FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D. et al. Consumo, digestibilidade aparente total, produção e composição do leite em vacas no terço médio da lactação alimentadas com níveis crescentes de proteína bruta no concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.3, p.1040-1050, 2005.

PRESTON, T.R. Biological and chemical analytical methods. In: PRESTON, T.R. (Ed.) **Tropical animal feeding: a manual for research workers**. Rome: FAO, 1995. p.191-264.

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

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

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3.ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2002. 235p.

SKLAN, D.; ASHKENNAZI, R.; BRAUN, A. et al. Fatty acids, calcium soaps of fatty acids, and cottonseeds fed to high yielding cows. **Journal of Dairy Science**, v.75, n.9, p.2463-2472, 1992.

SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, J.D.; VAN SOEST, P.J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v.70, n.11, p.3562-3577, 1992.

THOMPSON, J.C.; HE, B.B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feeds tocks. **Applied Engineering in Agriculture**, v.22, p.261-265, 2006.

TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage digestibility. **Journal of Brith Grassland Society**, v.18, p.104-11, 1963.

VALADARES FILHO, S.C.; PINA, D.S. Fermentação ruminal. In: BERCHIELLI, T.T.;

- PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Ed.) **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006. 583p.
- VETH, M.J.; KOLVER, E.S. Diurnal variation in pH reduces digestion and synthesis of microbial protein when pasture is fermented in continuous culture. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.2066-2207, 2001.
- WANG, C.; LIU, Q.; HUO, W.J. et al. Effects of glycerol on rumen fermentation, urinary excretion of purine derivatives and feed digestibility in steers. **Livestock Science**, v.121, p.15-20, 2009a.
- WANG, C.; LIU, Q.; YANG, W.Z. et al. Effects of glycerol on lactation performance, energy balance and metabolites in early lactation Holstein dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v.151, p.12-20, 2009b.
- WEISS, W.P.; CONRAD, H.R.; PIERRE, N.R.S. A theoretically-based model for predicting total digestible nutrient values of forages and concentrates. **Animal Feed Science and Technology**, v.39, p.95-110, 1992.
- WILSON, R.K. **A rapid accurate method for measuring volatile fatty acids lactic acid in silage**. Research Report. Dublin, Ireland: Agricultural Institute Dunsinea Research Centre, 1971. 7p.

CAPÍTULO III

FRAÇÕES DE CARBOIDRATOS E CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO *IN VITRO* DA SILAGEM DE MILHO E RAÇÃO TOTAL COM GLICERINA BRUTA

RESUMO

FRANÇA, Almira Biazon. **Frações de carboidratos e cinética da fermentação *in vitro* da silagem de milho e ração total com glicerina bruta.** 2014. 105p Tese (Doutorado em Zootecnia). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Objetivou-se com o presente estudo avaliar o efeito da adição de níveis crescentes de glicerina bruta como aditivo na ensilagem do milho sobre as frações de carboidratos, taxas de degradação das frações de carboidratos, os parâmetros da cinética de fermentação *in vitro* e sobre a produção de metano *in vitro* das silagens de milho e ração total. Foram avaliadas silagens de planta inteira de milho com adição de glicerina bruta e amostras de ração total fornecidas como mistura total na alimentação de vacas leiteiras (silagem de milho com glicerina bruta + ração concentrada), segundo o delineamento experimental de blocos casualizados, com quatro blocos (períodos de avaliação) e quatro tratamentos (0, 5, 10 e 15% de glicerina bruta). As taxas de digestão das frações de carboidratos não fibrosos e fibrosos (CNF e CF) das silagens e das rações fornecidas como mistura total foram estimadas utilizando-se a técnica de produção de gases, e os dados da cinética da produção cumulativa de gases ajustados empregando-se o modelo logístico bicompartimental. Foi observada redução ($P < 0,05$) do teor de carboidratos totais (CHT) e da fração B2 e aumento do teor de CNF das silagens e das rações em função dos níveis de adição de glicerina bruta. Aliado ao aumento do teor de CNF e redução das frações B2 e C de carboidratos das silagens foi observado aumento linear ($P < 0,05$) das taxas de degradação dos CNF e CF, e aumento ($P < 0,05$) do volume total de gás (VT) produzido e da digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) em função dos níveis de glicerina bruta adicionada a silagem de milho, no entanto, não foi observado efeito ($P > 0,05$) no tempo de latência (L). Ao avaliar a fermentação *in vitro* da ração observou-se aumento ($P < 0,05$) no volume da produção de gases dos CNF e da taxa de degradação dos CNF e CF, não sendo observado efeito ($P > 0,05$) para a produção de gases dos CF e no tempo de latência. Com relação aos parâmetros da fermentação *in vitro* da silagem de milho foi observada redução ($P < 0,05$) do pH nos tempos de incubação entre zero e seis horas e entre seis e 12 horas. No entanto, para a fermentação da ração total foi observado efeito ($P < 0,05$) da glicerina bruta no pH apenas nos tempos iniciais de incubação. Não foi observado efeito ($P < 0,05$) da adição da glicerina bruta na concentração de nitrogênio amoniacal ($N-NH_3$) na fermentação da silagem e da ração total. Foi observado efeito ($P > 0,05$) dos níveis de inclusão de glicerina bruta na silagem de milho sobre a concentração de acetato e sobre o total de ácidos graxos voláteis (AGV) produzidos no período de fermentação de zero a seis horas. No entanto, para a fermentação *in vitro* da ração total foi observado aumento ($P < 0,05$) da concentração de propionato sem que a concentração de acetato fosse alterada ($P > 0,05$). Em consequência do aumento da concentração de acetato na fermentação da silagem foi observado aumento ($P < 0,05$) tanto da produção como da proporção de metano (CH_4) com os níveis de adição da glicerina bruta. Porém na fermentação da ração total em função do aumento da concentração de propionato foi observada redução linear ($P < 0,05$) da produção de metano e redução linear ($P < 0,05$) da proporção de metano produzido somente no período inicial da fermentação.

Palavras-chave: Carboidratos. Coproduto. Metano. Propionato.

ABSTRACT

FRANÇA, Almira Biazon. **Carbohydrate fractions and kinetics of *in vitro* fermentation of corn silage and total mixed ration with crude glycerin.** 2014. 105p Thesis (Doctor Science in Animal Science). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

This study aimed to evaluate the effect of adding increasing levels of crude glycerin as an additive in corn silage on carbohydrate fractions, degradation rate of carbohydrate fractions, the ruminal fermentation *in vitro* and on methane production *in vitro* of corn silage and total mixed ration. Were evaluated corn silage with adding the crude glycerin more samples of total diets provided as total mixture on feed of dairy cows (corn silage + concentrate diet with glycerin), according to randomized complete block design with four blocks (trial periods) and four treatments (0, 5, 10 and 15 % crude glycerin). The degradation rate of fractions of non-fiber and fiber carbohydrates (NFC and FC) of silages and rations provided as total mixture were estimated using the technique of gas production, and the data of the kinetics of cumulative gas production adjusted using is the bicompartimental logistic model. Reduction ($P < 0.05$) content of total carbohydrates (TC) and B2 fraction and increased NFC content of silages and diets according to the level of addition of crude glycerin was observed. Along with increased NFC content and reducing fractions B2 and C carbohydrate of silages was observed linear increase ($P < 0.05$) rates of degradation of NFC and FC, and increased ($P < 0.05$) of the total gas volume (TGV) produced and *in vitro* digestibility of dry matter (IVDDM) according to the level of crude glycerin added to corn silage, however, no effect ($P > 0.05$) was observed in latency (L). However, to evaluate the *in vitro* fermentation of diets there was increased ($P < 0.05$) in the volume of gas production of NFC and degradation rate of NFC and FC, no effect ($P > 0.05$) for gas production of FC and the latency time was observed. With respect to parameters *in vitro* fermentation of corn silage, reduction ($P < 0.05$) was observed in the pH of the incubation times between zero and six hours and between six and 12 hours. However, for the fermentation of the total ration effect ($P < 0.05$) of crude glycerin in pH was observed only in the early days of incubation. No effect ($P < 0.05$) the addition of crude glycerin in the concentration of ammonia nitrogen (N-NH₃) in the fermentation of silage and total ration was observed. Effect ($P > 0.05$) levels of crude glycerin inclusion in corn silage on the concentration of acetate and the total volatile fatty acids (VFA) produced during the fermentation of zero to six hours was observed. However, for *in vitro* fermentation of the total ration increases ($P < 0.05$) propionate concentration without acetate concentration were affected ($P > 0.05$). As a result of the increased concentration of acetate in the fermentation of silage increased ($P < 0.05$) both the production and the proportion of methane (CH₄) in addition to the levels of crude glycerin was observed. But in the fermentation of the total ration due to the increased production of propionate linear decrease ($P < 0.05$) methane production and linear decrease ($P < 0.05$) the proportion of methane was observed only in the initial period of fermentation.

Keywords: By product. Carbohydrate. Methane. Propionate.

1 INTRODUÇÃO

A glicerina é um coproduto da produção do biodiesel obtido por meio do processo de transesterificação ou alcoólise, no qual triglicerídeos provenientes de óleos vegetais ou gordura animal reagem com álcool, gerando o biodiesel composto por uma mistura de ésteres, e a glicerina, rica em glicerol (MORIN et al., 2007). Estima-se que no ano de 2012 no Brasil foram gerados 274,7 mil m³ de glicerina como coproduto na produção de biodiesel, 0,5% a mais que em 2011 (ANP, 2013).

A maior oferta de glicerina no mercado em virtude do aumento da produção de biodiesel tem despertado o interesse para o seu uso na alimentação animal, principalmente com o objetivo de reduzir os custos de produção. De modo que trabalhos já foram realizados com o objetivo de avaliar o seu uso na ensilagem da cana-de-açúcar (DIAS JÚNIOR et al., 2010; GOMES, 2013), da planta inteira do milho (OLIVEIRA et al., 2011; GOMES, 2013) e do capim-elefante (MENÊSES, 2012). Porém, fazem-se necessários mais estudos, visando adequada recomendação do seu uso como aditivo na ensilagem.

Segundo a FAO a pecuária mundial contribui por ano com 18% da emissão dos gases do efeito estufa produzidos, o que é atribuído aos bovinos, bubalinos, ovinos, caprinos, equídeos, suínos e aves. Na agricultura, em particular o processo de fermentação entérica dos ruminantes (principalmente em bovinos e ovinos), produzem entre 21 e 25% do porcentual de metano emitido na atmosfera (LASCANO & CÁRDENAS, 2010), o qual possui potencial de aquecimento global 23 vezes maior que o dióxido de carbono (RAMASWANY et al., 2001; SOLOMON et al., 2007).

Grande parte das avaliações da fermentação *in vitro* indicam que o glicerol é rapidamente fermentado a propionato, no entanto, as avaliações das taxas de degradação e produção de ácidos graxos voláteis (AGV) são contraditórias.

Considerando a relação inversa entre a produção de propionato e metano, o glicerol possui potencial em reduzir a produção de metano no rúmen. No entanto, poucos trabalhos avaliaram esse efeito do glicerol em reduzir a produção de metano (LEE et al., 2011).

Assim, alimentos alternativos como a glicerina que têm sido estudados com vistas a melhorar o desempenho dos animais e aumentar as margens da atividade, passaram a ser investigados também quanto ao potencial para redução nas emissões de metano entérico (FRANCO et al., 2013). O metano produzido no rúmen não afeta a eficiência de utilização de energia pelos animais, mas também contribui significativamente para a poluição ambiental.

Diante do exposto, objetivou-se avaliar o efeito da adição de níveis crescentes de glicerina bruta como aditivo na ensilagem do milho sobre as frações de carboidratos, taxas de degradação das frações de carboidratos, os parâmetros da cinética de fermentação *in vitro* e sobre a produção de metano *in vitro* das silagens de milho e ração total.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Embrapa Gado de Leite, Localizada na cidade de Juíz de Fora – MG.

Foram avaliadas silagens de planta inteira de milho obtidas da adição de glicerina bruta (0, 5, 10 e 15%, base da matéria natural - MN) no momento da ensilagem, bem como amostras de ração total fornecidas como mistura total na alimentação de vacas leiteiras (silagem de milho com glicerina bruta + ração concentrada), segundo o delineamento experimental de blocos casualizados, com quatro blocos (quatro períodos de avaliação de 12 dias cada) e quatro tratamentos (0, 5, 10 e 15% de glicerina bruta, base da MN).

O milho ensilado foi obtido das lavouras do Campo Experimental José Henrique Brusqui (CEJHB), pertencente à Embrapa Gado de Leite, localizado no Município de Coronel Pacheco – MG, sendo realizadas duas colheitas em épocas distintas em virtude das condições climáticas da região neste período do ano. A forrageira obtida na primeira colheita foi utilizada para o abastecimento dos silos dos tratamentos 0 e 5% de adição de glicerina bruta, e a obtida na segunda colheita para o abastecimento dos silos dos tratamentos 10 e 15% de glicerina bruta.

O valor nutritivo das forrageiras (milho planta inteira) utilizadas para o abastecimento dos silos, sem adição da glicerina bruta, está descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Valor nutritivo da planta inteira de milho utilizada para ensilagem

Item	Forrageira	
	1º Colheita	2º Colheita
Matéria seca (%)	30,74	40,21
Matéria mineral (%MS)	6,04	5,93
Matéria orgânica (%MS)	93,96	94,07
Proteína bruta (%MS)	6,26	6,50
Fibra em detergente neutro (%MS)	70,25	69,95
Fibra em detergente ácido (%MS)	34,81	32,63
Lignina (%MS)	5,50	5,14
Glicerol (%MS)	0,12	0
Nutrientes digestíveis totais ¹ (%MS)	56,73	59,57
pH	4,48	4,47
N-NH ₃ /NT(%)	2,98	2,63
DIVMS ² (%MS)	67,95	65,89

¹Weiss et al. (1992); ²Tilley & Terry (1963); N-NH₃/NT = nitrogênio amoniacal em porcentagem do nitrogênio total; DIVMS = digestibilidade *in vitro* da matéria seca;

A glicerina bruta (Tabela 2) utilizada como aditivo foi fornecida pela fábrica de biodiesel da ADM[®] (Archer Daniels Midland Company Ltda., Rondonópolis, MT), e obtida a partir do óleo de soja, sendo misturada à forragem de planta inteira de milho picada no momento da ensilagem por meio de vagão forrageiro misturador DATARANGER[®] (American Calan Inc., Northwood, NH, EUA), nos níveis de 0, 5, 10 e 15% (base da MN).

As quantidades adicionadas de glicerina bruta à forragem de planta inteira de milho no momento da ensilagem, bem como a composição química das silagens utilizadas na mistura total das rações, estão apresentadas nas Tabelas 3 e 4, respectivamente.

Para o armazenamento da forragem foram utilizados quatro silos tipo trincheira (0,80 m x 0,60 m x 17 m) com capacidade para 10 toneladas cada. Os silos foram abertos em julho de 2011, sendo as silagens utilizadas na alimentação de 12 vacas em lactação por um período total de 48 dias (quatro períodos experimentais de 12 dias).

Tabela 2. Composição química, digestibilidade *in vitro* da matéria seca, densidade e pH da glicerina bruta utilizada no experimento

Item	Teor
Matéria seca (%)	76,59
Matéria mineral (%MS)	7,32
Matéria orgânica (%MS)	92,68
Proteína bruta (%MS)	0,00
Energia bruta ¹ (Cal/g)	3,46
Densidade	1,25
pH ²	5,65
Glicerol ² (%MS)	81,61
Metanol ² (%MS)	0,02
DIVMS ³ (%MS)	74,16

¹Silva e Queiroz (2002); ²Laudo ADM[®]; ³Tilley & Terry (1963); DIVMS = digestibilidade *in vitro* da matéria seca

Tabela 3. Quantidades adicionadas de glicerina bruta

Quantidade	Níveis de adição ¹ (% da MN)			
	0	5	10	15
FORAGEIRA (kg de MV)	10.700	10.120	8.600	9.100
FORAGEIRA (Kg de MV/m ³)	1.300	1.241	1.054	1.115
Glicerina bruta (kg)	0	532	959	1.600
Total (kg)	10.700	10.650	9.590	10.700

¹0, 5, 10, e 15: respectivamente, níveis de adição de glicerina bruta na silagem de milho; MV = matéria verde

Tabela 4. Composição química das silagens de milho utilizadas na mistura total das rações

Nível de Adição ¹ (%)	Nutriente (% da MS)								
	MS	MM	PB	FDN	FDA	LIG	CHT ²	NDT ³	GLI
Período I									
0	24,5	6,3	6,9	73,7	37,6	5,2	84,1	57,2	0,0
5	27,2	6,0	6,7	66,7	34,0	4,7	82,8	62,5	5,0
10	37,7	6,4	6,3	67,2	21,6	4,6	82,0	63,2	10,8
15	40,0	6,9	5,5	57,1	26,7	3,9	79,4	70,5	19,3
Período II									
0	27,5	6,6	6,8	73,4	37,4	4,60	83,9	57,9	0,0
5	29,8	5,6	6,2	70,9	36,7	4,8	83,6	61,4	5,3
10	39,6	6,2	5,7	60,9	28,1	3,6	80,9	69,3	11,3
15	41,3	6,6	5,3	53,6	24,3	2,8	81,8	71,3	19,9
Período III									
0	28,4	8,1	6,1	77,7	38,9	4,5	83,9	54,4	0,0
5	31,2	5,7	6,3	67,6	33,4	4,6	83,2	63,4	6,1
10	40,8	5,9	5,7	63,3	29,7	3,3	81,9	68,7	13,9
15	41,6	5,8	5,2	57,8	27,3	3,1	83,3	69,4	16,2
Período IV									
0	27,7	6,0	6,2	79,4	39,6	4,1	86,3	56,2	0,0
5	30,8	5,6	6,3	72,5	35,3	3,5	84,5	62,3	9,8
10	40,6	6,3	5,6	71,3	31,3	3,1	81,8	66,3	12,7
15	40,6	6,5	5,5	62,7	29,4	2,6	82,1	68,7	17,6

¹0, 5, 10, 15: respectivamente, níveis inclusão de glicerina bruta na silagem de milho; ²Sniffen et al. (1992); ³Weiss et al. (1992); MS = matéria seca; MM = matéria mineral; PB = proteína bruta; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; LIG = lignina; CHT = carboidratos totais; NDT = nutrientes digestíveis totais; GLI = glicerol

A dietas foram compostas por silagem de milho contendo 0, 5, 10 e 15% de glicerina bruta (base da MN) adicionada no momento da ensilagem, e concentrado à base de farelo de soja, fubá de milho e minerais, numa proporção volumoso:concentrado de 60:40, e fornecidas na forma de mistura total. A participação dos ingredientes na ração total, bem como a composição química dos ingredientes do suplemento concentrado e das rações totais estão apresentadas nas Tabelas 5, 6 e 7, respectivamente.

Tabela 5. Participação dos ingredientes na ração total

Ingrediente	Nível de adição ¹			
	0	5	10	15
Silagem de milho (%)	60	60	60	60
Fubá de milho (%)	25	24	23	22
Farelo de soja (%)	12	13	14	15
Ureia 36% N (%)	1	1	1	1
Milk Plus ^{®2} (%)	1	1	1	1
Calcário(%)	0,5	0,5	0,5	0,5
Sal (%)	0,5	0,5	0,5	0,5
Ração concentrada (%)	40	40	40	40
Total (%)	100	100	100	100

¹0, 5, 10, 15: respectivamente, níveis inclusão de glicerina bruta na silagem de milho; ²Ca máx – 270 g; Ca mín – 250 g; P mín – 50 g; S mín – 20 g; Na mín – 31 g; Zn mín – 2.000 mg; Cu mín – 1.000 mg; I mín – 100 mg; Co mín – 50 mg; Se mínimo – 20 mg; Mn mín – 1.000 mg; Vit A mín – 200.000 UI; Vit D3 mín – 40.000 UI; Vit E mín – 1000 UI; BHT mín – 100 mg; F máx – 500 mg

Amostras das silagens de cada silo e da ração total fornecida a cada vaca foram coletadas do 8º ao 12º dia de cada período experimental. Imediatamente após as coletas, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados e armazenadas a -18°C. Ao final de cada período experimental, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente para a realização da amostra composta.

A amostra composta da silagem foi realizada por meio da homogeneização de todas as amostras obtidas do mesmo silo em cada período, e a amostra composta da ração total realizada por meio da homogeneização das amostras obtidas de cada vaca em cada período. Imediatamente após esse procedimento, as amostras foram pré-secas em estufas de ventilação forçada (55°C; 72 horas) e moídas em moinho de facas tipo *Willey* com peneira de porosidade de 1 mm e acondicionadas em potes plásticos devidamente identificados para posteriores análises.

Tabela 6. Composição química do fubá de milho e farelo de soja utilizados na mistura total da ração

Alimento	Nutriente (% da MS)							
	MS	MM	PB	FDN	FDA	LIG	CHT ¹	NDT ²
Fubá de milho	86,7	7,3	10,4	10,9	2,8	0,5	75,1	89,3
Farelo de Soja	87,8	7,6	57,7	23,1	12,1	1,5	32,2	81,4

¹Sniffen et al. (1992); ²Weiss et al. (1992); MS = matéria seca; MM = matéria mineral; PB = proteína bruta; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; LIG = lignina; CHT = carboidratos totais; NDT = nutrientes digestíveis totais; GLI = glicerol

Foram realizadas análises químicas para determinação dos teores de MS a 105 °C, nitrogênio total, extrato etéreo (EE), matéria mineral (MM), fibra em detergente ácido (FDA), lignina (LIG) e celulose (CEL) de acordo com Silva & Queiroz (2002), fibra em detergente neutro (FDN) segundo Mertens (2002) e, glicerol (GLI) segundo Moreira et al., 2011. Foi

realizada também a determinação da digestibilidade *in vitro* da MS (DIVMS) (TILLEY & TERRY, 1963).

O teor de nutrientes digestíveis totais (NDT) das silagens e das rações foi estimado conforme equação descrita por Weiss et al. (1992):

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

em que: FDNn = fibra em detergente neutro livre de nitrogênio; PB = proteína bruta; MM = cinzas; NIDA = nitrogênio insolúvel em detergente ácido; EE = extrato etéreo, LIG = lignina; e FDN = fibra em detergente neutro.

Tabela 7. Composição química da ração total

Nível de Adição ¹ (%)	Nutriente (% da matéria seca da dieta)								
	MS	MM	PB	FDN	FDA	LIG	CHT ¹	NDT ²	GLI
Período I									
0	36,4	6,8	15,9	57,9	25,9	3,2	73,9	65,6	0,0
5	41,6	7,0	15,9	52,8	22,5	5,8	73,6	63,1	4,2
10	50,1	7,3	17,4	49,9	20,6	2,9	71,6	68,6	8,4
15	52,86	7,97	17,56	45,1	18,1	2,2	69,8	71,9	16,9
Período II									
0	37,9	6,5	16,7	59,9	26,2	3,13	73,33	65,8	0,0
5	43,1	7,2	15,3	52,4	22,1	2,21	75,33	67,3	1,9
10	51,1	7,5	15,6	51,1	20,7	2,33	72,87	69,4	9,2
15	51,7	8,2	16,4	48,9	20,9	2,50	69,84	71,1	13,4
Período III									
0	38,7	7,4	12,6	65,8	26,8	3,4	76,6	63,1	0,0
5	42,9	7,1	14,2	59,1	23,3	2,9	75,3	65,9	4,1
10	51,5	7,7	15,1	55,5	21,1	2,7	71,8	69,7	11,1
15	53,2	8,0	17,5	51,9	18,6	2,0	67,7	73,3	12,5
Período IV									
0	40,4	6,6	17,4	59,6	23,6	1,8	72,8	68,4	0,0
5	43,4	6,9	16,9	54,0	21,5	1,4	71,2	72,8	2,2
10	53,2	7,2	15,4	48,5	18,2	0,9	72,9	74,0	8,7
15	52,9	6,5	15,9	51,1	18,9	0,8	71,7	76,4	11,8

¹0, 5, 10, 15: respectivamente, níveis inclusão de glicerina bruta na silagem de milho; ²Sniffen et al. (1992); ³Weiss et al. (1992); MS = matéria seca; MM = matéria mineral; PB = proteína bruta; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; LIG = lignina; CHT = carboidratos totais; NDT = nutrientes digestíveis totais; GLI = glicerol

2.1 Determinação das Frações de Carboidratos

As frações que compõem os carboidratos totais (CHT) foram obtidas com a seguinte equação (SNIFFEN et al., 1992): $\text{CHT} = 100 - (\text{PB} + \text{EE} + \text{MM})$ em que PB corresponde à proteína bruta da amostra, EE ao extrato etéreo e MM às cinzas. A fração C, proteínas indigestíveis associadas à lignina, foi estimada pela equação: $\text{Fração C} = \text{FDN} \cdot 0,01 \cdot \text{LIG} \cdot 2,4$ em que FDN corresponde à fibra em detergente neutro e LIG corresponde à lignina da amostra. A fração B2 composta pela fração fibrosa potencialmente degradável estimada pela equação: $\text{Fração B2} = \text{FDNp} - \text{Fração C}$ em que FDNp corresponde à fibra em detergente neutro corrigida para proteínas. A fração A+B1 (carboidratos não fibrosos - CNF) composta por açúcares solúveis, amido e pectina foi estimada pela seguinte equação: $\text{A+B1} = \text{CHT} - (\text{Fração B2} + \text{Fração C})$.

2.2 Cinética de Fermentação *In Vitro*

2.2.1 Taxa de degradação das frações de carboidratos

As taxas de digestão das frações de carboidratos (CNF e CF) das silagens de milho com níveis crescentes de adição de glicerina bruta e das rações fornecidas como mistura total (silagem com glicerina bruta + suplemento concentrado) foram estimadas, utilizando-se a técnica *in vitro* de produção de gases, seguindo protocolo descrito por Pell & Schofield (1993) com modificações.

Aproximadamente, 300 mg de amostra (moída a 1 mm) das silagens e das misturas totais foram acondicionadas em duplicata em sacos F57 (ANKON[®] Technology, Macedon, NY, EUA). Os sacos F57 contendo as amostras foram acondicionados em frascos de vidro (50 mL), e 28,2 mL de meio de cultura tamponado (THEODOROU et al., 1994), sob fluxo de CO₂. Os frascos foram vedados com rolha de butil e, para evitar contaminação e/ou fermentação antes da adição do inóculo ruminal, os frascos foram mantidos em geladeira a 4°C. Cinco horas antes da inoculação com líquido ruminal, os mesmos foram colocados em sala climatizada a 39°C.

Como doadoras de inóculo ruminal foram utilizadas três vacas multíparas, F1 Holandês x Gir, no terço médio da lactação, com produção média de 29 kg/dia de leite e com peso corporal de, aproximadamente, 549 kg, providas de cânula ruminal. As vacas foram confinadas em curral, localizado no CEJHB, do tipo *free stall*, com cochos individuais, para o fornecimento da mistura total da ração, equipados com portões eletrônicos do tipo *Calan gate* (American Calan Inc., Northwood, NH, EUA), e cochos coletivos para o fornecimento de água *ad libitum*. As vacas foram alimentadas com dietas compostas por silagem de milho contendo 5, 10 e 15% de glicerina bruta (base da MN) e concentrado à base de farelo de soja, fubá de milho e minerais, numa proporção volumoso:concentrado de 60:40 (Tabela 6).

A coleta do líquido ruminal foi realizada manualmente, com o auxílio de um coletor composto por uma haste de PVC e um pote plástico acoplado em sua extremidade. O líquido ruminal foi coletado no saco ventral do rúmen das três vacas fistuladas, sendo imediatamente armazenados em garrafas térmicas pré-aquecidas com água a 39°C e, em seguida, transportados para o Laboratório de Microbiologia da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora/MG). No laboratório, os líquidos ruminais foram filtrados em dupla camada de gaze sob fluxo de CO₂ e homogeneizados de forma a obter uma única amostra.

Nos frascos contendo amostra e meio de cultura foram adicionados 3,2 mL de líquido ruminal. Posteriormente, os frascos foram vedados com rolha de butil sobre atmosfera de CO₂, lacrados com anilhas de alumínio e deixados em sala climatizada a 39°C sob mesa agitadora orbital, Nova Técnica[®], do tipo CT-145. A produção de gases foi mensurada nos tempos 2, 4, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 72, 96 horas após a incubação. A leitura do volume de gases foi realizada por meio de aparato de vaso comunicante, de acordo com Fedorah & Hrudney (1983).

Os dados da cinética da produção cumulativa de gases foram ajustados empregando-se o modelo logístico bicompartimental descrito por Schofield et al. (1994):

$$V(t) = Vf1 / (1 + \exp(2 \cdot 4 \cdot c1 \cdot (T - L))) + Vf2 / (1 + \exp(2 \cdot 4 \cdot c2 \cdot (T - L)))$$

Em que: V(t) é o volume acumulado no tempo t; Vf1, é o volume de gás produzido a partir da fração de rápida digestão (CNF); c1 (h⁻¹) é a taxa de degradação da fração de rápida digestão (CNF); L, a latência; e T, o tempo (h); Vf2, é o volume de gás produzido a partir da fração de lenta degradação (B2); c2 (h⁻¹) é a taxa de degradação da fração B2.

Ao final dos tempos 6, 12, 24, 48 e 96 h de incubação os frascos correspondentes ao tempo foram retirados da incubação, e os sacos F57 contendo o resíduo da incubação foram submetidos à secagem em estufa ventilada a 55°C, por 72 horas, e posteriormente, em estufa 105°C, por 45 minutos, para a determinação da MS de acordo com Silva & Queiroz (2002).

A digestibilidade *in vitro* da MS (DIVMS) foi calculada para os resíduos obtidos após

96 h de incubação por meio da seguinte equação:

$$\text{DIVMS} = 100 - ((\text{g de MS incubada})/(\text{g de MS resíduo})*100)$$

2.2.2 Parâmetros da fermentação *in vitro*

A proporção de metano (CH₄) no gás produzido pela fermentação das silagens com níveis crescentes de inclusão de glicerina bruta foi mensurada às seis e às 12 horas de incubação. Nesses tempos o gás foi coletado dos frascos de incubação com auxílio de uma seringa de vidro e imediatamente armazenados em Equitainer[®] (Hamilton Research[®]) devidamente identificado para posterior análise do teor de metano.

As análises de metano foram realizadas por cromatografia gasosa em equipamento Agilent Technologies 7820A GC system, o qual estava equipado com duas válvulas de seis vias, sendo uma utilizada para o sistema amostrador interligada a um loop de 0,5 mL, e a outra, como seletora, permitindo aos constituintes passarem ou não pela segunda coluna; com injetor tipo split-splitless utilizado no modo split a 50:1 a uma temperatura de 120 °C. O sistema de separação continha duas colunas: uma HP-Plot/Q 30 m x 0,530 mm x 40,0 μm; a outra HP-Molesieve 30 m x 0,530 mm x 25,0 μm, utilizando H₂ como gás de arraste a um fluxo de 7mL/min. O sistema de detecção foi constituído por: Detetor TCD – condições: 200°C aquecimento; 25 mL/min fluxo de referência; 3 mL/min fluxo de complementação (H₂); 10 mL/min coluna + complementação constante. Detetor FID – Condições: 300°C aquecimento; 10 mL/min fluxo H₂; 400 mL/min fluxo ar sintético; 20 mL/min fluxo complementação. Metanador a 375 °C aquecimento.

A temperatura do forno foi mantida a 50 °C por 4,5 minutos tempo necessário para a ebulição dos constituintes desejados. Após análise, iniciou-se uma rampa de aquecimento a 60°C/min. até 250°C, e após a corrida a temperatura e mantida a 250°C por 2 minutos. A calibração do cromatógrafo foi realizada com padrões de referência, certificados pela Linde[®] nas concentrações CH₄ : 5,05; 10,2; 14,7; 20,1.

Ao final dos tempos 6 e 12 horas de incubação, foi aferido o valor de pH do inóculo por meio de medidor de pH digital (TEC 3MP, Tecnal Equipamentos para Laboratórios, Piracicaba/SP), e posteriormente, duas alíquotas de 10 mL do inóculo foram colocadas em frascos contendo oito gotas de H₂SO₄ 50% v/v (subamostra 1) e 2 mL de ácido metafosfórico a 25% (subamostra 2) e congeladas. Após descongelamento em temperatura ambiente, a subamostra 1 foi analisada quanto à concentração de nitrogênio amoniacal mediante destilação com hidróxido de potássio (KOH) 2N, conforme técnica descrita por Preston (1995).

Na subamostra 2 foram determinadas as concentrações dos ácidos acético, butírico e propiônico, segundo metodologia descrita por Wilson (1971), em que as amostras após serem descongeladas em temperatura ambiente foram centrifugadas a 11000G e filtradas em filtro de porosidade de 45 μm e acondicionadas em vial para injeção em cromatógrafo gasoso (Agilent Technologies modelo 6890N) e posterior cálculo das concentrações.

2.3 Análises Estatísticas

Para verificar a necessidade de transformação dos dados foi realizada análise de distribuição da normalidade dos resíduos (Shapiro-Wilk; P<0,10). Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias estudadas por meio de análise de regressão, utilizando-se o teste t (α=0,05). Foi utilizado o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2003), conforme o modelo estatístico:

$$Y_{ij} = \mu + N_i + P_j + e_{ij}$$

Em que:

Y_{ij} = variável estudada do tratamento i (0, 5, 10 e 15% de glicerina bruta na silagem de milho) no bloco j

μ = média geral

N_i = efeito da adição i (0, 5, 10 e 15% de glicerina bruta na silagem de milho)

P_j = efeito do bloco j

e_{ij} = erro aleatório associado a cada observação

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação das Frações de Carboidratos

O teor de carboidratos totais das silagens apresentou resposta linear negativa ($P < 0,05$) em função do incremento nos níveis de adição de glicerina bruta na ensilagem do milho, em que cada 1% de glicerina bruta adicionada promoveu redução de 0,21% no teor de CHT (Tabela 8). Valadares Filho et al. (2010) reportaram em revisão da literatura valor médio para o teor de CHT de $84,77 \pm 1,94$ ($n = 71$), valor este próximo aos observados no presente estudo.

Tabela 8. Teores de carboidratos totais e frações de carboidratos das silagens de milho aditivadas com glicerina bruta

Variável	Níveis de adição (%) ¹				Equação	r ²	CV (%)
	0	5	10	15			
CHT (%MS)	84,55	83,53	81,66	81,64	$\hat{Y} = 84,43 - 0,21X$	0,90	1,22
Frações de carboidratos (%MS)							
CNF	10,26	15,72	17,79	25,37	$\hat{Y} = 10,17 + 0,95X$	0,95	14,56
Fração B2	65,92	60,53	58,16	52,02	$\hat{Y} = 65,77 - 0,88X$	0,97	3,17
Fração C	8,37	7,29	5,72	4,26	$\hat{Y} = 8,49 - 0,28X$	0,99	10,0
Frações de carboidratos (%CHT)							
CNF	12,14	18,83	21,80	31,10	$\hat{Y} = 11,99 + 1,19X$	0,96	14,29
Fração B2	77,95	72,44	71,21	63,71	$\hat{Y} = 77,93 - 0,88X$	0,93	3,38
Fração C	9,91	8,73	7,00	5,23	$\hat{Y} = 10,08 - 0,32X$	0,99	9,96

¹0, 5, 10, 15: respectivamente, níveis de adição de glicerina bruta na silagem de milho (base matéria seca, %); CHT = carboidrato total; CNF = carboidratos não fibrosos

O teor de carboidratos não fibrosos (CNF) da silagem sofreu aumento linear ($P < 0,05$) com a adição de glicerina bruta na ensilagem do milho, em que a cada 1% de glicerina bruta adicionada na silagem promoveu aumento de 1,19% no teor de CNF (%CHT). Os CNF são compostos por açúcares solúveis, amido e pectina, os quais são os principais compostos utilizados no processo de fermentação anaeróbia pelas bactérias ácido-láticas na ensilagem, assim favorecendo o aumento do teor de ácido lático e queda do pH da silagem.

Em consequência do incremento da fração de CNF foi observada redução linear ($P < 0,05$) das frações B2 e C das silagens em função dos níveis de adição da glicerina bruta, em que cada 1% de glicerina bruta adicionada promoveu redução de 0,88 e 0,32% nas frações B2 e C (%CHT), respectivamente. Valadares Filho et al. (2010) reportaram valor médio para a fração B2 (%CHT) da silagem de milho inferior ao observado no presente estudo, de $56,70 \pm 6,32$ ($n = 7$), e valor médio para a fração C (%CHT) superior, de $18,28 \pm 6,44$ ($n = 7$).

Com relação às frações de carboidratos das rações foi observado efeito ($P < 0,05$) da glicerina bruta no teor de carboidratos totais (CHT), carboidratos não fibrosos (CNF) e na fração B2 de carboidratos em função da adição de glicerina bruta na ensilagem do milho (Tabela 9). Em que, o teor de CHT das rações sofreu redução linear ($P < 0,05$) de 5,95% com os níveis de adição de glicerina bruta.

Foi observado aumento ($P > 0,05$) do teor de CNF (%CHT) nas rações em função da adição da glicerina bruta, em que a cada 1% de glicerina bruta adicionada promoveu o aumento de 0,779% no teor de CNF (%CHT). O aumento do teor de CNF indica maior disponibilidade de carboidratos de rápida fermentação como fonte de energia para os microrganismos ruminais, favorecendo o crescimento dos microrganismos que fermentam os CNF.

Tabela 9. Teores de carboidratos totais e frações de carboidratos das rações fornecidas como mistura total

Variável	Níveis de adição (%) ¹				Equação	r ²	CV (%)
	0	5	10	15			
CHT (%MS)	74,17	73,83	72,28	69,76	$\hat{Y} = 74,72 - 0,295X$	0,90	2,41
Frações de carboidratos (%MS)							
CNF	16,26	22,35	24,04	23,71	$\hat{Y} = 16,38 + 0,144 - 0,064X$	0,99	8,76
Fração B2	53,67	47,44	45,46	43,85	$\hat{Y} = 52,32 - 0,629X$	0,89	3,34
Fração C	4,24	4,04	2,78	2,20	$\hat{Y} = 3,31$	-	31,29
Frações de carboidratos (%CHT)							
CNF	21,96	30,27	33,25	33,96	$\hat{Y} = 24,01 + 0,779X$	0,84	7,74
Fração B2	72,34	64,29	62,90	62,88	$\hat{Y} = 70,07 - 0,595X$	0,72	3,36
Fração C	5,71	5,45	3,85	3,27	$\hat{Y} = 4,54$	-	30,97

¹0, 5, 10, 15: respectivamente, níveis de adição de glicerina bruta na silagem de milho (base matéria seca, %); CHT = carboidrato total; CNF = carboidratos não fibrosos

A fração B2 de carboidratos das rações (%CHT), que é composta pelos carboidratos potencialmente degradáveis no rúmen, sofreu redução linear ($P < 0,05$) de 13,08% com a adição da glicerina bruta no momento da ensilagem do milho. Isto pode ser atribuída à redução do teor de FDN das rações com a adição da glicerina bruta (Tabela 7). No entanto, a fração C (%CHT) das rações não foi influenciada ($P > 0,05$) pela adição da glicerina bruta, embora tenha sido observada redução de 42% no teor da fração C (%CHT) para as dietas com silagem de milho aditivada com 15% de glicerina bruta em relação à controle.

O aumento do teor de CNF e conseqüente redução das frações B2 e C de carboidratos das rações pode proporcionar maior consumo de nutrientes, visto serem estas frações consideradas limitantes para o consumo devido ao efeito físico de enchimento ruminal (“fill”) (MERTENS, 1994).

3.2 Cinética de Fermentação *In Vitro*

3.2.1 Taxa de degradação das frações de carboidratos

Aliado ao aumento do teor de CNF e redução das frações B2 e C de carboidratos das silagens foi observado aumento linear ($P < 0,05$) das taxas de degradação dos CNF e carboidratos fibrosos (CF) em função dos níveis de glicerina bruta adicionada no momento da ensilagem do milho (Tabela 10). O aumento das taxas de degradação de ambas as frações demonstra que os níveis de adição de glicerina bruta na ensilagem de milho favoreceram o desenvolvimento dos microrganismos ruminais que utilizam tanto os CNF quanto CF.

Tabela 10. Cinética de fermentação *in vitro* das silagens de milho aditivadas com glicerina bruta

Variável	Níveis de adição (%) ¹				Equação	r ²	CV (%)
	0	5	10	15			
K _d CNF	0,0728	0,0760	0,0807	0,0828	$\hat{Y} = 0,0729 + 6,9 \cdot 10^{-4}X$	0,98	4,0
K _d CF	0,0161	0,0174	0,0185	0,0198	$\hat{Y} = 0,0162 + 2,4 \cdot 10^{-4}X$	0,99	3,7
VT	221,3	239,5	244,1	253,0	$\hat{Y} = 224,5 + 1,9972X$	0,93	1,1
L	2,28	1,99	2,76	3,19	$\hat{Y} = 2,55$	-	13,61
DIVMS	63,40	69,52	71,72	77,01	$\hat{Y} = 63,96 + 0,8605X$	0,97	3,1
TMD	78,04	72,64	69,43	66,04	$\hat{Y} = 77,42 - 0,7842X$	0,98	3,0

¹0, 5, 10, 15: respectivamente, níveis de adição de glicerina bruta na silagem de milho (base matéria seca, %); K_dCNF = taxa de degradação dos carboidratos não fibrosos; K_dCF = taxa de degradação dos carboidratos fibrosos; VT = volume total de gás em mL/g de MS; L = latência em horas; DIVMS = digestibilidade *in vitro* da matéria seca; TMD = tempo médio de digestão em horas

Em virtude do aumento das taxas de degradação foi também observado aumento ($P < 0,05$) do volume total de gás (VT) produzido e da digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) das silagens de milho em função dos níveis de inclusão de glicerina bruta (Tabela 10). Tal fato demonstra que a inclusão de glicerina bruta aumentou a fermentação dos carboidratos e, conseqüentemente, a produção de gases decorrente da fermentação, e em resposta a esse aumento foi observada redução linear ($P < 0,05$) do tempo médio de digestão (TMD) (Tabela 10). De forma que, presume-se que o alimento permanecerá menor tempo no rúmen, reduzindo o efeito físico de enchimento e, conseqüentemente, acarretará em aumento do consumo de matéria seca.

De forma a embasar melhor tal inferência foi realizada a estimativa da taxa de passagem da silagem no rúmen, conforme equação proposta pelo NRC (2001), sendo observado aumento ($P < 0,05$) da taxa de passagem da silagem em função dos níveis de adição da glicerina bruta, com valores médios de 5,17; 5,43; 5,54 e 5,61%/h, respectivamente para 0, 5, 10 e 15% de adição de glicerina bruta no momento da ensilagem.

No entanto, não foi observado efeito ($P > 0,05$) no tempo de latência (L) da fermentação das silagens de milho aditivadas com glicerina bruta, com tempo médio de L observado de 2,55 h (Tabela 10).

Rémond et al. (1993) e Lee et al. (2011) destacaram em seus trabalhos que a adaptação microbiana pode alterar a cinética de fermentação, em particular na taxa de produção de gás e na sua fase de latência, além de relatarem que a fermentação do glicerol pode ser alterada também pela presença de outros ingredientes da ração.

No entanto, também não foi observado efeito ($P > 0,05$) no tempo de latência da fermentação *in vitro* da ração total, com tempo médio observado de 3 h (Tabela 11).

Tabela 11. Cinética de fermentação *in vitro* das rações fornecidas como mistura total

Variável	Níveis de adição (%) ¹				Equação	r ²	CV (%)
	0	5	10	15			
VfCNF	111,38	116,58	124,95	135,50	$\hat{Y} = 109,9475 + 0,1627X^2$	0,98	4,33
K _d CNF	0,0658	0,0742	0,0801	0,0822	*	0,98	2,97
VfCF	149,33	159,18	152,83	151,03	$\hat{Y} = 153,09$	-	3,33
K _d CF	0,0184	0,0196	0,0198	0,0193	**	0,99	3,26
L	3,20	2,70	2,96	3,14	$\hat{Y} = 3,00$	-	7,95

¹0, 5, 10, 15: respectivamente, níveis de adição de glicerina bruta na silagem de milho (base matéria seca, %); * $\hat{Y} = 0,0657 + 2,05 \cdot 10^{-3}X - 6,3 \cdot 10^{-5}X^2$; ** $\hat{Y} = 0,014 + 0,32 \cdot 10^{-4}X - 1,8 \cdot 10^{-5}X^2$; VfCNF = volume de produção de gases dos carboidratos não fibrosos; K_dCNF = taxa de degradação dos carboidratos não fibrosos; VfCF = volume de produção de gases dos carboidratos fibrosos; K_dCF = taxa de degradação dos carboidratos fibrosos; L = latência em horas

Diferentes trabalhos na literatura apontam o tempo de latência da fermentação *in vitro* de dietas contendo glicerol maior que aos observados no presente trabalho (RÉMOND et al., 1993; FERRARO et al., 2009; LEE et al., 2011). No entanto, esses autores também observaram que ao incubar glicerol em adição com outro alimento sempre ocorre redução do tempo de latência, quando comparado à fermentação do glicerol sozinho, o que sugere efeitos associativos entre ingredientes da ração culminando por alterar a cinética de fermentação do glicerol.

Lee et al. (2011) ao avaliar a fermentação *in vitro* do glicerol, do feno de alfafa e do grão de milho com e sem adição de glicerol (0,5 g) observaram que o tempo de latência foi reduzido quando houve mistura do glicerol com outro alimento (4,2 h e 4,8 h, respectivamente, para alfafa mais glicerol e milho mais glicerol) quando comparado ao observado na fermentação do glicerol, de 7,9 horas. Ferraro et al. (2009) observaram que a

fermentação do glicerol *in vitro* apresentou longo tempo de latência, em média de 11,54 h, e lenta taxa de degradação. Isto contrasta com os resultados de Rémond et al. (1993) que relataram fermentação *in vitro* com tempo de latência, entre 4 e 6 h.

Contudo, ao avaliar a fermentação *in vitro* da ração total observou-se aumento ($P < 0,05$) no volume da produção de gases dos CNF e da taxa de degradação dos CNF e CF, não sendo observado efeito ($P > 0,05$) para a produção de gases dos CF (Tabela 11).

O aumento da taxa de degradação dos CNF e CF indicam efeito associativo do glicerol e dos demais componentes da ração total na fermentação *in vitro*, de forma que, possibilitaram maior utilização dos componentes fibrosos e não fibrosos dos alimentos pelos microrganismos ruminais. O que, se reproduzido no ambiente ruminal de vacas em lactação, pode proporcionar maior aporte de energia aos microrganismos ruminais, e por conseguinte maior síntese de proteína microbiana, com conseqüente aumento da disponibilidade de proteína para os animais.

3.2.2 Parâmetros da fermentação *in vitro*

Com relação aos parâmetros da fermentação *in vitro* da silagem de milho aditivada com glicerina bruta foi observada redução ($P < 0,05$) do pH nos tempos de incubação entre zero e seis horas e entre seis e 12 horas (Tabela 12).

Tabela 12. Parâmetros da fermentação *in vitro* das silagens de milho aditivadas com glicerina bruta

Variável	Níveis de adição (%) ¹				Equação	r ²	CV (%)
	0	5	10	15			
0-6 horas							
pH	6,81	6,75	6,76	6,73	$\hat{Y} = 6,79 - 0,0043X$	0,76	0,47
N-NH ₃ (mg/dL)	17,41	18,03	18,20	18,28	$\hat{Y} = 17,98$	-	4,06
AGV (μMOL/mL)	5,09	7,29	7,38	7,45	$\hat{Y} = 5,73 + 0,143X$	0,66	14,22
Ac (μMOL/mL)	2,09	3,34	3,42	3,43	$\hat{Y} = 2,50 + 0,082X$	0,65	17,91
Pr (μMOL/mL)	2,24	3,11	3,11	3,17	$\hat{Y} = 2,91$	-	16,56
Bu (μMOL/mL)	0,76	0,83	0,85	0,85	$\hat{Y} = 0,82$	-	25,49
Ac/Pr	0,95	1,07	1,11	1,13	$\hat{Y} = 1,07$	-	22,64
6-12 horas							
pH	6,78	6,70	6,68	6,62	$\hat{Y} = 6,77 - 0,0098X$	0,96	0,38
N-NH ₃ (mg/dL)	17,33	16,80	16,80	15,84	$\hat{Y} = 16,70$	-	10,30
AGV (μMOL/mL)	6,03	7,09	7,50	7,55	$\hat{Y} = 7,04$	-	12,66
Ac (μMOL/mL)	2,57	3,59	3,80	3,82	$\hat{Y} = 2,85 + 0,080X$	0,75	16,81
Pr (μMOL/mL)	2,58	2,60	2,79	2,81	$\hat{Y} = 2,69$	-	19,09
Bu (μMOL/mL)	0,89	0,91	0,92	0,92	$\hat{Y} = 0,91$	-	15,35
Ac/Pr	1,00	1,37	1,44	1,39	$\hat{Y} = 1,30$	-	22,57

¹0, 5, 10, 15: respectivamente, níveis de adição de glicerina bruta na silagem de milho (base matéria seca, %); N-NH₃/N_{total} = nitrogênio amoniacal em porcentagem do nitrogênio total; AGV = ácido graxos voláteis; Ac = acetato; Pr = propionato; Bu = butirato

No entanto, para a fermentação da ração total foi observado efeito ($P < 0,05$) da glicerina bruta no pH apenas nos tempos iniciais de incubação, em que a adição da glicerina bruta promoveu queda no valor de pH em função dos níveis de adição. De forma geral, foi observada queda no pH nos tempos iniciais de fermentação com progressivo aumento até 12 horas de incubação (Tabela 13). Tal variação no pH em função do tempo de fermentação está relacionado ao aumento da taxa de degradação dos CNF, os quais tendem a abaixar o pH.

Segundo Smith et al. (1972), variações de pH entre 6,0 e 6,8 proporcionam a máxima atividade de microrganismos celulolíticos. Sendo assim, os níveis de glicerina bruta alteraram

o pH, deixando-o dentro da faixa considerada ótima para degradação da fibra. Fato que pode ser embasado com o aumento das taxas de degradação dos CF observado com os níveis de adição da glicerina bruta (Tabelas 10 e 11).

Tabela 13. Parâmetros da fermentação *in vitro* das rações fornecidas como mistura total

Variável	Níveis de adição (%) ¹				Equação	r ²	CV (%)
	0	5	10	15			
0-6 horas							
pH	6,24	6,18	6,08	6,07	$\hat{Y} = 6,23-0,012X$	0,93	0,77
N-NH ₃ (mg/dL)	17,59	16,36	16,98	15,84	$\hat{Y} = 16,69$	-	14,28
AGV (μMOL/mL)	12,32	14,53	15,03	16,60	$\hat{Y} = 12,62+0,267X$	0,95	4,70
Ac (μMOL/mL)	6,39	6,34	6,27	6,27	$\hat{Y} = 7,24$	-	7,24
Pr (μMOL/mL)	3,28	5,74	6,33	7,97	$\hat{Y} = 3,63+0,293X$	0,95	6,52
Bu (μMOL/mL)	2,22	2,46	2,43	2,37	$\hat{Y} = 2,48$	-	9,68
Ac/Pr	1,95	1,11	1,00	0,79	$\hat{Y} = 1,749-0,0719X$	0,83	7,39
6-12 horas							
pH	6,63	6,53	6,53	6,52	$\hat{Y} = 6,55$	-	1,19
N-NH ₃ (mg/dL)	18,38	17,33	17,33	17,41	$\hat{Y} = 17,61$	-	7,21
AGV (μMOL/mL)	13,12	12,40	13,15	13,01	$\hat{Y} = 5,87$	-	5,87
Ac (μMOL/mL)	6,33	6,17	5,94	5,45	$\hat{Y} = 5,97$	-	9,48
Pr (μMOL/mL)	3,60	4,13	4,71	5,16	$\hat{Y} = 3,61+0,1054X$	0,99	13,75
Bu (μMOL/mL)	3,19	3,11	2,50	2,41	$\hat{Y} = 3,25-0,0593X$	0,89	7,98
Ac/Pr	1,87	1,49	1,28	1,06	$\hat{Y} = 1,82-0,0526X$	0,98	21,00

¹0, 5, 10, 15: respectivamente, níveis de adição de glicerina bruta na silagem de milho (base matéria seca, %); N-NH₃/N_{total} = nitrogênio amoniacal em porcentagem do nitrogênio total; AGV = ácido graxos voláteis; Ac = acetato; Pr = propionato; Bu = butirato

Não foi observado efeito (P<0,05) da adição da glicerina bruta na concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) na fermentação da silagem (Tabela 12) e da ração total (Tabela 13), tanto no período de incubação de zero a seis horas quanto de seis a 12 horas. No entanto, é possível observar que as concentrações de N-NH₃ no período de seis a 12 horas de incubação da silagem (Tabela 12) e da ração total (Tabela 13), foram menores para a silagem e maior para a ração. Segundo Carvalho et al. (1997), a redução da concentração do N-NH₃ pode ser justificada pelo aumento na disponibilidade de energia ruminal, que possibilita maior utilização da amônia para o crescimento microbiano e redução das perdas de amônia, devido à sincronização na utilização de carboidratos e proteínas.

Lee et al. (2011) ao avaliarem a adição de glicerina bruta observaram que, após 24 horas de incubação *in vitro*, a dieta contendo milho e glicerol apresentou menor concentração de N-NH₃, de 38,4 mg/100 mL, quando comparado ao glicerol (39,8 mg/100 mL).

Foi observado efeito (P>0,05) dos níveis de inclusão de glicerina bruta na silagem de milho sobre a concentração de acetato das silagens nos períodos de fermentação de zero a seis horas e seis a 12 horas, e sobre o total de ácidos graxos voláteis (AGV) produzidos no período de fermentação de zero a seis horas (Tabela 12), o que pode está relacionado ao aumento da taxa de degradação dos CF (Tabela 10).

O resultado obtido no presente experimento não está de acordo com os observados na literatura para a fermentação *in vitro* do glicerol, em que diferentes autores (RÉMOND et al., 1993; DeFRAIN et al., 2004; FERRARO et al.; 2009; EL-NOR et al., 2010; LEE et al., 2011) observaram que a fermentação do glicerol leva à maior produção de propionato em detrimento do acetato. Tal diferença pode ser atribuída aos períodos de fermentação avaliados, zero a seis horas e seis e 12 horas, visto que, os dados da literatura relatam avaliações por um período de

24 horas de fermentação.

No entanto, para a fermentação *in vitro* da ração total foi observado aumento ($P < 0,05$) da produção de propionato sem que a produção de acetato fosse alterada ($P > 0,05$) pela adição da glicerina bruta, em ambos os períodos de fermentação, demonstrando assim efeito associativo entre os componentes da ração total (Tabela 13).

A maior produção de propionato na fermentação *in vitro* da ração total indica o potencial da glicerina bruta em ser utilizada como ingrediente energético da dieta de vacas em lactação, visto que, a maior produção de propionato pode levar ao aumento da concentração de glicose plasmática e redução da produção de metano, aumentando assim a eficiência energética das dietas.

Rémond et al. (1993) observaram aumento da concentração de propionato e butirato em detrimento da de acetato em avaliação da fermentação *in vitro* do glicerol usando líquido ruminal de vacas adaptadas ao consumo de glicerol. DeFrain et al. (2004) também observaram aumento da concentração do propionato em detrimento do acetato em vacas alimentadas com 0,86 kg/dia de glicerina em substituição ao milho. Ferraro et al. (2009) em estudo da fermentação *in vitro* observaram que o glicerol reduziu a concentração do acetato e aumentou a produção do propionato e butirato. El-Nor et al. (2010) observaram redução do acetato e aumento da concentração de butirato no líquido ruminal de vacas consumindo até 108 g de glicerol/kg de matéria seca em substituição ao milho. Lee et al. (2011) também observaram que a fermentação do glicerol favoreceu a concentração do propionato sobre a de acetato com menor relação acetato:propionato, sem alterar a concentração do butirato e AGV totais.

A proporção acetato:propionato não foi alterada ($P = 0,2578$) na fermentação da silagem pelos níveis de inclusão de glicerina bruta (Tabela 12). No entanto, é possível observar tendência para menor proporção acetato:propionato para as silagens sem adição de glicerina bruta ocorrendo inversão dessa proporção com os níveis de inclusão. Aliado à maior proporção acetato:propionato é possível também observar maior concentração de acetato no período de zero a seis em relação ao período seis a 12 horas.

Porém, na fermentação da ração total foi observada redução linear ($P < 0,05$) da relação acetato:propionato em função da adição da glicerina bruta em ambos os períodos de fermentação, o que está relacionado ao aumento da produção de propionato (Tabela 13).

Em consequência do aumento da concentração de acetato foi observado aumento ($P < 0,05$) tanto da produção como da proporção de metano (CH_4) na fermentação da silagem com os níveis de adição da glicerina bruta (Tabela 14).

Tabela 14. Produção e proporção de metano (CH_4) *in vitro* das silagens de milho aditivadas com glicerina bruta

Variável	Níveis de adição (%) ¹				Equação	r ²	CV (%)
	0	5	10	15			
CH_4 (mL g ⁻¹ MS)							
0-6 horas	1,38	2,76	2,78	3,42	$\hat{Y} = 1,66 + 0,123G$	0,85	30,89
6-12 horas	2,18	4,30	4,83	5,30	$\hat{Y} = 2,67 + 0,80G$	0,86	8,30
Total	3,57	7,06	7,61	8,72	$\hat{Y} = 4,34 + 0,320$	0,86	10,74
CH_4 (mL L ⁻¹ de gás)							
0-6 horas	0,41	0,81	0,84	1,074	$\hat{Y} = 0,478 + 0,040G$	0,90	29,00
6-12 horas	0,64	1,25	1,41	1,54	$\hat{Y} = 0,78 + 0,058G$	0,86	8,32
Total	1,05	2,06	2,25	2,62	$\hat{Y} = 1,257 + 0,098X$	0,89	10,13

¹0, 5, 10, 15: respectivamente, níveis de adição de glicerina bruta na silagem de milho (base matéria seca, %)

Verificou-se que entre seis e 12 horas de incubação foi produzido em média 61,56% do metano total. A baixa produção de metano nos tempos iniciais (0-6 horas) decorre do fato

deste período englobar a fase de latência, ou seja, não há metanogênese até que estejam saturados os locais disponíveis para fixação microbiana e estas sintetizem suas estruturas e enzimas (FRANCO et al., 2013).

O aumento da produção de metano observado no período de seis a 12 horas pode estar relacionado ao aumento da taxa de degradação dos CF das silagens com os níveis de glicerina bruta (Tabela 9). Getachew et al. (2005) e Franco et al. (2013) também observaram aumento na produção de metano à medida que aumenta o tempo de incubação para diversos tipos de dietas, e sugerem que a fração lentamente digestível da dieta (ou seja, fibras estruturais) está associada à maior produção de metano.

Na fermentação da ração total em função do aumento da produção de propionato foi observada redução linear ($P < 0,05$) da produção de metano em ambos os períodos de fermentação e redução linear ($P < 0,05$) da proporção de metano produzido somente no período inicial da fermentação, com maior produção de metano também observada no tempo de fermentação de seis a 12 horas (Tabela 15).

Tabela 15. Produção e proporção de metano (CH₄) *in vitro* das rações fornecidas como mistura total

Variável	Níveis de adição (%) ¹				Equação	r ²	CV (%)
	0	5	10	15			
CH ₄ (mL/g MS)							
0-6 horas	4,71	3,85	3,56	2,65	$\hat{Y} = 4,658 - 0,129X$	0,97	20,08
6-12 horas	5,22	5,16	4,73	3,26	$\hat{Y} = 5,54 - 0,126X$	0,79	13,28
Total	9,93	0,01	8,29	5,92	$\hat{Y} = 10,199 - 0,255X$	0,92	11,10
CH ₄ (mL/L de gás)							
0-6 horas	1,35	1,14	1,04	0,66	$\hat{Y} = 1,37 - 0,0436X$	0,94	15,99
6-12 horas	1,22	1,18	1,08	0,97	$\hat{Y} = 1,11$	-	50,22
Total	2,57	2,31	2,12	1,63	$\hat{Y} = 2,15$	-	25,05

¹0, 5, 10, 15: respectivamente, níveis de adição de glicerina bruta na silagem de milho (base matéria seca, %)

A redução da produção de metano *in vitro* da ração total em função dos níveis de adição da glicerina bruta na silagem demonstra o potencial desse coproduto do biodiesel em ser utilizado de forma estratégica na alimentação de vacas leiteiras com o objetivo de reduzir a produção de metano e, conseqüentemente, aumentar a eficiência energética das rações.

Os ruminantes utilizam de 2 a 12% da energia bruta da dieta para a produção de metano, dependendo da qualidade e da quantidade dos alimentos consumidos (JOHNSON & JONHSON, 1995). Aproximadamente, 87% do metano entérico é produzido no rúmen, sendo o restantes produzido pelo processo de fermentação no intestino grosso (LOCKYER & JARVIS, 1995, LASSEY et al., 1997).

Segundo Lascano & Cárdenas (2010), o metano produzido por uma vaca (250-500 L/dia) não só afeta a eficiência da utilização da energia pelo animal, mas também contribui significativamente para a poluição ambiental. De forma que se torna essencial buscar alternativas para reduzir as emissões de metano pelos bovinos e, com isso contribuir para redução da emissão dos gases do efeito estufa e, ao mesmo tempo, melhorar a eficiência energética das rações, o que deve se traduzir em aumento do lucro para os produtores.

Lee et al. (2011) ao avaliarem a fermentação *in vitro* do glicerol, bem como da alfafa e do milho com e sem adição do glicerol, observaram que os tratamentos com glicerol apresentaram menor produção de metano até 12 horas de incubação. No entanto, após 12 horas de incubação a produção de metano das dietas com glicerol aumentou rapidamente e, às 24 horas não houve diferença entre os tratamentos. Segundo Lee et al. (2011), a menor produção de metano inicial dos tratamento com glicerol está relacionada à adaptação

microbiana, visto que, na incubação do glicerol foi observada maior produção de metano em períodos mais longos de incubação, indicando que os microrganismos ruminais podem fermentar com sucesso o glicerol e produzir metano após a adaptação.

4 CONCLUSÕES

A utilização da glicerina bruta como aditivo na ensilagem do milho aumentou *in vitro* a disponibilidade de carboidratos de rápida digestão e potencialmente degradável.

A silagem de milho aditivada com níveis crescentes de glicerina bruta em associação ao suplemento concentrado, na forma de mistura total, ocasionou o aumento da produção de propionato e redução da produção de metano *in vitro*.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (BRASIL) – ANP. **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis 2013**. Rio de Janeiro: ANP, 2013. 231p.

CARVALHO, A.U.; VALADARES FILHO, S.C.; COELHO DA SILVA, J.F. et al. Níveis de concentrados em dietas de zebuínos. 4. Concentrações ruminais de amônia e pH, taxa de passagem de digesta ruminal e degradação *in situ* dos alimentos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.26, n.5, p.1016-1024, 1997.

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

DIAS JÚNIOR, G.S.; LOPES, N.M.; PESSOA JUNIOR, G. et al. Fermentation profile, composition, and dry matter loss of sugarcane-glycerin silage inoculated with bacteria. In: XXVI WORLD BUIATRICS CONGRESS, 2010, Santiago – Chile. **Anais...** World Buiatrics Congress, [2010]. (CD-ROM).

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

FEDORAH, P.M.; HRUDEY, S.E. A simple apparatus for measuring gas production by methanogenic cultures in serum bottles. **Environmental Technology Letters**, v.4, p.425-432, 1983.

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

FERREIRA, D. F. **Sistema de análise de variância SISVAR DEX/UFLA** ver 4.3 (Build 45). 1999 - 2003.

FRANCO, A.L.C.; MIZUBUTI, I.Y.; AZEVÊDO, J.A.G. et al. Fermentação ruminal e produção de metano *in vitro* de dietas contendo torta de algodão. **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, n.4, p.1995-1966, 2013.

GETACHEW, G.; ROBINSON, P.H.; DEPETERS, E.J. et al. Methane production from commercial dairy rations estimated using an *in vitro* gas technique. **Animal Feed Science and Technology**, v.123-124, n.1, p.391-403, 2005.

GOMES, M.A.B. **Glicerina na qualidade de silagens de cana-de-açúcar e de milho e na produção de oócitos e de embriões *in vitro* de bovinos**. 2013. 90f. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

JOHNSON, K.A.; JOHNSON, D.E. Methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, v.73 p.2483-2492, 1995.

LASCANO, C.E.; CÁRDENAS, E. Alternatives for methane emission mitigation in livestock systems. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.175-182, 2010 (supl. especial).

LASSEY, K.R.; MARCUS, J.; ULYATT, J. et al. Methane emissions measured directly from grazing livestock in New Zealand. **Atmospheric Environment**, v.31, p.2905-2914, 1997.

LEE, SE-Y.; LEE, SANG-M.; CHO, YOUNG-B. et al. Glycerol as feed supplement for ruminants: *In vitro* fermentation characteristics and methane production. **Animal Feed**

Science and Technology, v.166-167, n.23 p.269-270, 2011.

LOCKYER, D.R.; JARVIS, S.C. The measurement of methane losses from grazing animals. **Environmental Pollution**, v.9, p.383- 390, 1995.

MENÊSES, N.N. **Uso da glicerina bruta na ensilagem de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum.)**. 2012. 101f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal do Tocantins, Araguaína.

MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of the AOAC International**, v.85, p.1217-1240, 2002.

MERTENS, D.R. Regulation of forage intake. In: FAHEY JÚNIOR, G.C. (Ed.) **Forage quality, evaluation and utilization**. Madison: American Society of Agronomy, 1994. p.450-493.

MOREIRA, E.A.; REIS, L.G.; ALEVATO, C.B. et al. Método de extração do glicerol livre por saponificação em alimentos para ruminantes. In: X CONGRESSO INTERNACIONAL DO LEITE, 2011, Maceió. **Anais...** Maceió: X Congresso Internacional do Leite. [2011]. (CD-ROM).

MORIN, P.; HAMAD, B.; SAPALY, G. et al. Transesterification of rapessed oil with ethanol. **Applied Catalysis A: General**, v.330, p.69-76, 2007.

NRC – NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. Washington: National Research Council, 7. ed., 2001. 381p.

OLIVEIRA, J.S.; CARNEIRO, V.F.; LOPES, F.C.F. et al. Valor nutritivo, perfil de fermentação e consumo de silagens de milho aditivadas com níveis crescentes de glicerina bruta. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 48., 2011, Belém. **Anais...** Belém: Sociedade Brasileira de Zootecnia, [2011]. (CD-ROM).

PELL, A.N.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. **Journal Dairy Science**, v.76, n.9, p.1063-1073, 1993.

PRESTON, T.R. Biological and chemical analytical methods. In: PRESTON, T.R. (Ed.) **Tropical animal feeding: a manual for research workers**. Rome: FAO, 1995. p.191-264.

RAMASWANY, V.; BOUCHER, O.; HAIGH, J. et al. Report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge: Cambridge University Press, 2001. p.349-416.

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

SCHOFIELD, P.; PITT, R.E.; PELL, A.N. Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. **Journal of Animal Science**, v.72, n.11, p.2980-2991, 1994.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3.ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2002. 235p.

SMITH, L.W.; GOERING, M.K.; GORDON, C.H. Relationship of forage compositions with rates of cell wall digestion and indigestibility of cell walls. **Journal of Dairy Science**, v.55, n.8, p.1140-1148, 1972.

SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, J.D.; VAN SOEST, P.J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v.70, n.11, p.3562-3577, 1992.

SOLOMON, S.; QIN, D.; MANNING, M. et al. **Report of the intergovernmental panel on**

climate change. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.

THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S. et al. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feed. **Animal Feed Science Technology**, v.48, n.1, p.185-197, 1994.

TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage digestibility. **Journal of British Grassland Society**, v.18, p.104-11, 1963.

VALADARES FILHO, S.C.; MACHADO, P.A.S.; CHIZZOTTI, M.L. et al. **Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos.** 3.ed., Viçosa: UFV/DZO, 2010. 502p.

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

WILSON, R.K. **A rapid accurate method for measuring volatile fatty acids lactic acid in silage.** Research Report. Dublin, Ireland: Agricultural Institute Dunsinea Research Centre, 1971. 7p.

CONCLUSÕES GERAIS

A utilização da glicerina bruta como aditivo na ensilagem do milho proporcionou incremento no valor nutritivo, adequada fermentação da massa ensilada e aumento da degradabilidade da matéria seca e da fibra em detergente neutro das silagens.

O aumento do teor de matéria seca das silagens proporcionado pela adição da glicerina bruta viabiliza o seu uso como aditivo em silagens de forrageiras com alto teor de umidade, com o objetivo de aumentar o teor de matéria seca e reduzir as perdas de nutrientes por meio de efluentes.

O consumo de silagem de milho com adição de glicerina bruta por vacas em lactação aumentou o consumo de glicerol, o que proporcionou maior produção de propionato no rúmen e consequentemente maior concentração plasmática de glicose e redução da oxidação de ácidos graxos no tecido adiposo, o que comprova o potencial energético da glicerina bruta em substituir o milho na dieta de vacas em lactação. No entanto, a maior disponibilidade de energia não foi direcionada para a produção de leite, e sim para a deposição de tecido corporal, visto que, foi observada redução da eficiência alimentar para a produção de leite com os níveis de adição da glicerina bruta, o que pode estar relacionado ao estágio de lactação das vacas utilizadas no presente estudo.

No entanto, o maior aporte energético para as vacas em lactação proporcionado pela adição da glicerina bruta na silagem pode ter sua eficiência reduzida em virtude do gasto energético da conversão da amônia à ureia no fígado, visto que, a adição de glicerina bruta na silagem levou ao aumento do consumo de proteína, o qual ocasionou aumento da concentração ruminal de N-NH₃ e consequentemente, aumento da concentração plasmática de ureia.

O indicador interno FDN_i, dentre os avaliados, foi o que apresentou menor variação experimental, tanto na estimativa da produção fecal como da digestibilidade aparente dos nutrientes em vacas em lactação alimentadas com silagem de milho com níveis crescentes de adição de glicerina bruta, visto os resultados estimados, para todas as variáveis analisadas a partir desse indicador terem apresentado menor desvio padrão e coeficiente de variação.

Na avaliação *in vitro* da silagem de milho aditivada com níveis crescentes de glicerina bruta em associação ao suplemento concentrado, na forma de mistura total, a glicerina bruta apresentou potencial em aumentar a produção de propionato e de reduzir a produção de metano, o que demonstra o potencial desse coproduto do biodiesel em ser utilizado de forma estratégica na alimentação de vacas leiteiras com o objetivo de reduzir a produção de metano entérico.