

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

GLICERINA NA QUALIDADE DE SILAGENS DE CANA-DE-
AÇÚCAR E DE MILHO E NA PRODUÇÃO DE OÓCITOS E
DE EMBRIÕES *in vitro* DE BOVINOS

Autor: Marco Antonio Bensimon Gomes
Orientador: Prof. Dr. Gentil Vanini de Moraes

Tese apresentada, como parte das exigências
para obtenção do título de DOUTOR EM
ZOOTECNIA, no Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia da Universidade
Estadual de Maringá - área de concentração:
Produção Animal/Reprodução Animal.

MARINGÁ
Estado do Paraná
Fevereiro – 2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

G633g Gomes, Marco Antonio Bensimon
Glicerina na qualidade de silagens de cana-de-açúcar e de milho e na produção de Oócitos e de embriões *in vitro* de bovinos / Marco Antonio Bensimon Gomes. -- Maringá, 2013.
ii-xv, 73 f. : il., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Gentil Vanini de Moraes.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2013.

1. Glicerina de biodiesel. 2. Embrião *in vitro* - Bovino. 3. Oócitos - Bovino. 4. Reprodução animal. 5. Nutrição animal - Reprodução animal - Bovinocultura de leite. 6. Nutrição animal - Análise de alimentos. 7. Silagem - Cana-de-açúcar - Conservação e deterioração. 8. Silagem - Milho - Conservação e deterioração. 9. Silagem de milho - Composição química. 10. Silagem de cana-de-açúcar - Composição química I. Moraes, Gentil Vanini de, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

CDD 21.ed. 636.3

MN-0000802



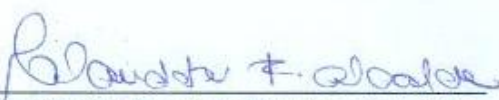
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**GLICERINA NA QUALIDADE DE SILAGENS DE CANA-
DE-AÇÚCAR E DE MILHO E NA PRODUÇÃO DE
OÓCITOS E DE EMBRIÕES *IN VITRO* EM BOVINOS**

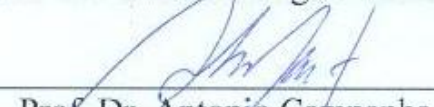
Autor: Marco Antonio Bensimon Gomes
Orientador: Prof. Dr. Gentil Vanini de Moraes

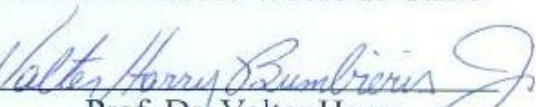
TITULAÇÃO: Doutor em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal


APROVADA em 27 de fevereiro de 2013.


Prof.^a Dr.^a Claudete Regina Alcalde


Prof. Dr. Marcos Weber do Canto


Prof. Dr. Antonio Campanha
Martinez


Prof. Dr. Valter Harry
Bumbieris Junior


Prof. Dr. Gentil Vanini de Moraes
(Orientador)

O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.

Fernando Pessoa

À
minha querida mãe, Maria Iza Martins Bensimon, que sempre acreditou e me incentivou
nos momentos em que cheguei a perder a fé em mim mesmo;

à
minha amada esposa, Rosi, pela compreensão, companheirismo e amor demonstrados
frente aos sacrifícios que passou para que eu terminasse este trabalho;

à
minha filha querida, Maria Claudia,
a razão mais forte da minha própria existência;

à
minha irmã querida, Claudia, pelo seu amor e
por coisas que jamais poderei retribuir;

ao
meu pai, Oswaldo Rodrigues Gomes, que certamente se orgulharia desta minha
conquista;

ao
meu querido tio e segundo pai, Roberto Pedrina, pelos valorosos conselhos, os quais
sigo até hoje e pela fé em mim depositada quando precisei.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por sustentar meu espírito e confortar meu coração.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, por ter possibilitado desenvolver este trabalho, proporcionando ensino público gratuito e de alta qualidade.

À Fundação Araucária, pelo financiamento necessário na condução deste estudo.

À Coodetec, pela doação de sementes de milho utilizadas neste ensaio.

Aos Professores Dr. Gentil Vanini de Moraes, Dr. Clóves Cabrera Jobim, Dr. Luiz Paulo Rigolon, Dr. Fabio Luiz Bim Cavalieri (Biotec-Cesumar), Dr. Geraldo Tadeu dos Santos, Dr^a. Tatiana Carlesso dos Santos, Dr. Antonio Ferriani Branco, Dr. Robson Marcelo Rossi e Dr. Carlos Antonio Lopes de Oliveira, pela ajuda na viabilização deste projeto.

Aos colegas, Marcos Rogério Oliveira, Tatiane Martins de Oliveira, Moacir Rogério de Souza, Tamara Thais Tres, Mabio Silvan José da Silva, Bruno Lala Silva, Ana Maria Krüger, Juliene De Geus Moro, pelo companheirismo e ajuda no andamento deste trabalho.

Aos alunos de graduação em Zootecnia, Douglas Bianchini e Pedro Luiz de Castro pela dedicação e força.

Aos funcionários da FEI (Fazenda Experimental de Iguatemi), Célio Aparecido Passolongo, Wilson Tonhato Marssola, e Vicente Mendes Faleiros.

Aos meus queridos amigos pelo apoio, companheirismo e ensinamentos.

BIOGRAFIA

MARCO ANTONIO BENSIMON GOMES, filho de Oswaldo Rodrigues Gomes e Maria Iza Martins Bensimon, nasceu no Rio de Janeiro, no dia 13 de dezembro de 1958.

Em julho de 1982, concluiu o curso de Zootecnia pela Faculdade de Zootecnia de Uberaba, em Uberaba MG. Em março de 2001, concluiu pós-graduação MBA em Marketing pela Escola de Pós-Graduação em Economia da Fundação Getúlio Vargas. Em março de 2007, iniciou o curso de Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia na Universidade Estadual de Maringá (UEM), e, em agosto de 2009, obteve o título de Mestre em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal. Ainda em 2009, iniciou o doutorado na mesma instituição e, em 27 de fevereiro de 2013, obteve o título de Doutor em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, subárea de Reprodução Animal. Na vida profissional atua em pesquisa e desenvolvimento de suplementos minerais, núcleos e premixes para bovinos, caprinos e ovinos. É consultor de boas práticas de fabricação para estabelecimentos fabricantes de alimentos para animais e, desde 2010, é professor universitário do curso de Agronegócios.

ÍNDICE

GLICERINA NA QUALIDADE DE SILAGENS DE CANA-DE-AÇÚCAR E DE MILHO E NA PRODUÇÃO DE OÓCITOS E DE EMBRIÕES *in vitro* DE BOVINOS

	Página
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
I. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1. Processo de produção, purificação e características da glicerina.....	2
1.2. Uso da glicerina em bovinos.....	3
1.3. Metabolismo do glicerol.....	4
1.4. Comportamento fermentativo do glicerol no rúmen.....	4
1.5. Glicerina adicionada às silagens.....	5
1.6. Período de transição e reprodução.....	6
1.7. O balanço energético negativo e a qualidade dos oócitos e embriões..	7
1.8. Glicerina como precursor de glicose.....	8
II. OBJETIVOS GERAIS.....	15
III. ESTABILIDADE AERÓBIA, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DEGRADABILIDADE RUMINAL DA CANA-DE-AÇÚCAR ENSILADA COM GLICERINA DE BIODIESEL.....	16
Resumo.....	16
Abstract.....	17
Introdução.....	18
Material e métodos.....	19
Resultados e discussão.....	22

Conclusões.....	30
Referências	31
IV. COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL E DEGRADABILIDADE RUMINAL DA SILAGEM DE MILHO (<i>Zea mays</i> L.) COM ADIÇÃO DE GLICERINA NA ENSILAGEM.....	34
Resumo.....	34
Abstract.....	35
Introdução.....	36
Material e métodos.....	38
Resultados e discussão.....	41
Conclusões.....	49
Referências	50
V. GLICERINA NA DIETA DE FÊMEAS HOLANDESAS E A INFLUÊNCIA NA QUALIDADE DE OÓCITOS E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES <i>in vitro</i>	53
Resumo.....	53
Abstract.....	54
Introdução.....	55
Material e métodos.....	56
Resultados e discussão.....	61
Conclusões.....	66
Referências	67
VI. CONCLUSOES GERAIS.....	70
VII. IMPLICAÇÕES.....	72

LISTA DE TABELAS

	Página
III. ESTABILIDADE AERÓBIA, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DEGRADABILIDADE RUMINAL DA CANA-DE-AÇÚCAR ENSILADA COM GLICERINA DE BIODIESEL	
TABELA 1. Estimativas Bayesianas médias para composição química da silagem de cana-de-açúcar contendo os níveis 0, 5, 10, 15 e 20% de glicerina.....	23
TABELA 2. Estimativas Bayesianas médias para digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (DIVMS) e digestibilidade <i>in vitro</i> da parede celular (DIVPC) da silagem de cana-de-açúcar com 0, 5, 10, 15 e 20% de glicerina.....	25
TABELA 3. Estimativas Bayesianas médias para os parâmetros do modelo e da degradabilidade efetiva da matéria seca (DE) para as taxas de passagem de 2, 5 e 8% por hora da silagem de cana-de-açúcar com 0, 5, 10, 15 e 20% de glicerina.....	26
IV. COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL E DEGRADABILIDADE RUMINAL DA SILAGEM DE MILHO (<i>Zea mays</i> L.) COM ADIÇÃO DE GLICERINA NA ENSILAGEM	
TABELA 1. Estimativas Bayesianas para médias e desvio-padrão de pH e temperatura da silagem de milho com e sem de glicerina, nos tempos 0, 24, 48, 72, 96 e 120h.....	41
TABELA 2. Estimativas Bayesianas para as médias da composição química da silagem de milho com 0, 5, 10, 15 e 20% de glicerina.....	44
TABELA 3. Estimativas Bayesianas das médias para a digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (DIVMS) e digestibilidade <i>in vitro</i> da parede celular (DIVPC) de silagens de milho com 0, 5, 10, 15 e 20% de glicerina.....	45

TABELA 4. Estimativas Bayesianas médias para os parâmetros do modelo da degradabilidade efetiva da matéria seca da silagem de milho ensilada com níveis de glicerina, com taxas de passagem de 2, 5 e 8%/hora.....	46
V. GLICERINA NA DIETA DE FÊMEAS HOLANDESAS E A INFLUÊNCIA NA QUALIDADE DE OÓCITOS E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES <i>in vitro</i>	
TABELA 1. Composição percentual e química dos concentrados experimentais.....	57
TABELA 2. Composição química da silagem de milho.....	58
TABELA 3. Número oócitos observados e estimativas Bayesianas para a média e desvio-padrão da produção de oócitos viáveis, não viáveis e totais, por aspiração e por animal alimentados com ou sem glicerina na silagem.....	62
TABELA 4. Médias das probabilidades de produção de oócitos e número de embriões <i>in vitro</i> por aspiração/fêmeas alimentadas com ou sem glicerina.....	63
TABELA 5. Estimativas Bayesianas para os parâmetros do modelo de efeitos aleatórios para a variação da glicose sanguínea em função dos tratamentos e do tempo.....	64

LISTA DE FIGURAS

	Página
<p>III. ESTABILIDADE AERÓBIA, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DEGRADABILIDADE RUMINAL DA CANA DE AÇÚCAR ENSILADA COM GLICERINA DE BIODIESEL</p>	
<p>Figura 1. Curvas de desaparecimento ruminal da matéria seca das silagens de cana-de-açúcar, para os níveis 0, 5, 10, 15 e 20% de glicerina, observadas nos tempos de incubação 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96h.....</p>	27
<p>Figura 2. Curvas de desaparecimento da fibra em detergente neutro (FDN) das silagens de cana-de-açúcar, para os níveis 0, 5, 10, 15 e 20% de glicerina, observadas nos tempos de incubação 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96h.....</p>	27
<p>Figura 3. Curvas de pH da silagem de cana-de-açúcar, para os níveis 0, 5, 10, 15 e 20% de glicerina, observados as 0, 24, 48, 72, 96 e 120h.....</p>	28
<p>Figura 4. Curvas de temperatura das silagens de cana-de-açúcar, com níveis 0, 5, 10, 15 e 20% de glicerina e curva da temperatura ambiente (TA) medidas após a abertura dos silos nos tempos 0, 24, 48, 72, 96 e 120h.....</p>	29
<p>IV. COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL E DEGRADABILIDADE RUMINAL DA SILAGEM DE MILHO (<i>Zea mays</i> L.) COM ADIÇÃO DE GLICERINA NA ENSILAGEM</p>	
<p>Figura 1. Curvas de temperatura das silagens de milho expostas ao ar, para os níveis 0, 5, 10, 15 e 20% de glicerina e curva da temperatura ambiente (TA), medidas as 0, 24, 48, 72, 96 e 120h.....</p>	42

Figura 2.	Curvas de pH da silagem de milho exposta ao ar, para os níveis 0, 5, 10, 15 e 20% de glicerina observados nos tempos 0, 24, 48, 72, 96 e 120h.....	43
Figura 3.	Curvas de desaparecimento da matéria seca da silagem de milho, para as os níveis 0, 5, 10, 15 e 20% de glicerina incubada nos tempos 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96h.....	47
Figura 4.	Curvas de desaparecimento da fibra em detergente neutro (FDN) das silagens de milho, para as os níveis 0, 5, 10, 15 e 20% de glicerina após a incubação nos tempos 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96h.....	48
Figura 5.	Curvas de desaparecimento da proteína bruta (PB) das silagens de milho, para as os níveis 0, 5, 10, 15 e 20% de glicerina, após a incubação nos tempos 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96h.....	48

V. GLICERINA NA DIETA DE FÊMEAS HOLANDESAS E A INFLUÊNCIA NA QUALIDADE DE OÓCITOS E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES *in vitro*

Figura 1.	Diagrama esquemático do protocolo de sincronização das ondas foliculares e a produção de embriões <i>in vitro</i> , em fêmeas holandesas. AF = aspiração folicular, MIV = maturação <i>in vitro</i> , FIV = fertilização <i>in vitro</i> , CIV = clivagem e produção de embriões.....	59
Figura 2.	Glicemia média (mg/dL) dos animais controles e consumindo 15% de glicerina avaliada em sete tempos de coleta e horários de alimentação.....	65

RESUMO

Objetivou-se estudar os efeitos da inclusão de glicerina de biodiesel de soja nas silagens de cana-de-açúcar e milho para avaliar a conservação, a composição química, a digestibilidade, a degradabilidade e também observar a influência da silagem de milho com a adição de 15% glicerina sobre a qualidade de oócitos e produção *in vitro* de embriões de fêmeas holandesas. A cana-de-açúcar e o milho foram ensilados com zero, 5, 10, 15 e 20% de glicerina em silos experimentais de PVC, abertos aos 68 dias para avaliar a estabilidade aeróbia, a temperatura e pH na silagem, nos tempos de 0, 24, 48, 72, 96 e 120h. Avaliou-se a composição química, a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e digestibilidade *in vitro* da parede celular (DIVPC) em incubadora artificial. Em três bovinos com fistula ruminal, avaliou-se a degradabilidade *in situ* da MS, o desaparecimento da fibra em detergente neutro (FDN) e da proteína bruta (PB) das silagens, com amostras incubadas 0, 2, 6, 12, 24, 48,72 e 96h. Nas silagens de cana-de-açúcar observaram-se aumentos ($P<0,05$) da matéria seca (MS), nutrientes digestíveis totais (NDT), matéria mineral (MM), carboidratos não fibrosos (CNF) e a redução de ($P<0,05$) FDN, PB, fibra em detergente ácido (FDA) e extrato etéreo (EE) à medida que a inclusão da glicerina foi maior. A DIVMS nas silagens de cana-de-açúcar com 15% (64,45%) e 20% de glicerina (68,70%) foram superiores as com zero (45,5%), 5% (53,03%) e 10% (56,04%). A DIVPC nos níveis de 10%(37,28%), 15%(37,11%) e 20%(41,52%) foram maiores em relação aos níveis zero (27,38%) e 5% (29,29%). Na degradabilidade efetiva da MS foram observados aumentos na porção solúvel (*a*), redução da fração insolúvel, potencialmente degradável (*b*) e aumento da constante de degradabilidade da fração (*c*) das silagens de cana-de-açúcar com 5, 10, 15 e 20% de glicerina ($P<0,05$) em relação às controles. Houve maior estabilidade aeróbia nas silagens de cana-de-açúcar com glicerina onde o pH e temperatura médios foram menores ao final de 120 horas nos níveis com 15% (pH 3,71 e 19,5°C) e 20% (pH 3,65 e 17°C) comparado ao controle (pH 6,00 e 26,6°C). Nas silagens de milho observaram-se aumentos ($P<0,05$) de MS, CNF, MM e a redução ($P<0,05$) de FDN, PB, FDA e EE à medida que a inclusão da glicerina foi maior. O teor de NDT estimado nas silagens com 5, 10, 15 e 20% de glicerina foram superiores ao controle, sendo de 2,13; 8,95; 10,33 e 13,13%, respectivamente. O pH e a temperatura médios das silagens de milho ao final de 120 horas com 10% (pH 3,9 e 20,7°C), 15% (pH 3,8 e 20,5°C) e 20% (pH 3,6 e 19,7°C) de glicerina se mantiveram inferiores aos níveis 0 (pH 4,7 e 21,7°C) e 5% (pH 4,2 e 22,6°C). A DIVMS nas silagens de milho com 10%(85,13%), 15% (86,95%) e 20% (89,18%) foram superiores que as com 0 (74,49%), 5%(79,89%) e de glicerina. A DIVPC das silagens de milho com 20% (46,72%) e 10% (40,19%) de glicerina foram superiores ($P<0,05$) as com 0 (26,65%), 5%(32,29%) e 15% (39,35%). A degradabilidade efetiva da MS nas taxas de passagem de 2, 5 e 8%/h na silagem com 20% de glicerina, 81,94; 76,20 e 68,99 respectivamente foram melhores em relação às

com zero (64,89; 54,98 e 51,21), 5% (71,31; 61,88 e 58,07), 10% (75,56; 67,98 e 64,76) e 15% (79,73; 72,54 e 69,69). Dez fêmeas com condição corporal entre 3,0 e 3,75 pontos na escala de 0 a 5 pontos, peso vivo de $555,90 \pm 87,54$ kg com $50,69 \pm 13,20$ meses de idade, sendo seis vacas em lactação, três vacas secas e uma novilha, que foram divididas aleatoriamente em: cinco controles e cinco recebendo 15% de glicerina na silagem. Sincronizaram-se as ondas foliculares e realizaram-se quatro aspirações foliculares com intervalos de 15 dias. Os oócitos foram classificados e transportados para o laboratório, iniciando os procedimentos de fecundação *in vitro*. Coletou-se sangue dos animais às 7, 9, 11, 13, 15, 17 e 19h para medir a glicemia. No grupo tratado com glicerina foram aspirados 132 oócitos com 105 viáveis e no controle foram aspirados 90 oócitos com 81 viáveis, sem haver diferença ($P > 0,05$) entre os viáveis e não viáveis. Não houve diferença na persistência dos embriões viáveis observados aos sete, oito e nove dias ($P > 0,05$). Aos sete dias, o grupo controle produziu 19 embriões e o grupo que recebeu glicerina na dieta produziu 27 embriões. Observou-se diferença ($P < 0,05$) nas probabilidades entre embriões não viáveis e oócitos aspirados com resultado desfavorável para o grupo controle (0,40) em relação aos tratados com glicerina (0,27). Não foram observadas diferenças na glicemia média ($P > 0,05$) pré e pós-prandial, nos animais tratados com glicerina (75,69 mg/dL) em relação aos controles (71,69 mg/dL), sendo que a média geral estimada em função do tempo foi de 71,68 mg/dL. Os resultados demonstram que a glicerina adicionada às silagens de milho e cana-de-açúcar melhorou a estabilidade aeróbia, aumentou a energia do material ensilado, a digestibilidade e a degradabilidade. A glicerina adicionada à silagem de milho da dieta de fêmeas holandesas gerou variações pontuais do nível da glicose sanguínea, nos animais, mas na análise média não houve diferença. Não houve influência da glicerina adicionada a dieta na produção e melhoria da qualidade dos oócitos e embriões ou na persistência da viabilidade dos embriões.

Palavras-chave: degradabilidade *in situ*, digestibilidade *in vitro*, estabilidade aeróbia, fertilização *in vitro*, glicerol

ABSTRACT

The study was carried out with the objective of studying the effects of adding glycerol from soybean biodiesel to sugarcane and corn silages to evaluate the conservation, chemical composition, digestibility, degradability and also to observe the influence of corn silage with the addition of 15% of glycerin on oocytes quality and in vitro embryos production of female Holstein. The sugarcane and corn silage were ensiled with 0, 5, 10, 15 and 20% of glycerin in experimental PVC silos. The silos were opened at 68 days to evaluate the aerobic stability, temperature and pH in the silage, at times of 0, 24, 48, 72, 96 and 120h. The chemical composition, in vitro digestibility of dry matter (IVDDM) and in vitro digestibility of the cell wall (IVDCW) were evaluated in an artificial incubator. Other aspects were evaluated in three cattle with ruminal fistula, such as the in situ disappearance of dry matter (DM), neutral detergent fiber (NDF) and crude protein (CP) of the silages which were incubated at 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72 and 96h. In sugarcane silages increases were observed ($P < 0.05$) for DM, total digestible nutrients (TDN), mineral matter (MM), non-fiber carbohydrates (NFC) and reductions for ($P < 0.05$) NDF, CP, acid detergent fiber (ADF) and ether extract (EE) as the inclusion of glycerin was higher. The IVDDM in silages of sugarcane with 15% (64.45%) and 20% of glycerin (68.70%) were higher than those with zero (45.5%), 5% (53.03%) and 10% (56.04%). The IVDCW in levels of 10% (37.28%), 15% (37.11%) and 20% (41.52%) were higher compared to the levels zero (27.38%) and 5% (29.29%). In the effective degradability of DM increases were observed in the soluble portion (a), a reduction in the insoluble fraction, potentially degradable (b) and an increase in the degradability constant fraction (c) of sugarcane silages with 5, 10, 15 and 20% of glycerin ($P < 0.05$) compared to controls. There was higher aerobic stability for the sugarcane silage with glycerin in which the pH and the average temperature were lower at the end of 120 hours at 15% (pH 3.71 and 19.5 ° C) and 20% (pH 3.65 and 17 ° C) levels compared to control (pH 6.00, 26.6 ° C). In corn silage increases were observed in ($P < 0.05$) DM, CNF, MM and reductions in ($P < 0.05$) NDF, CP, ADF and EE when the inclusion of glycerin was higher. The TDN content of silages with 5, 10, 15 and 20% of glycerin were superior to the control, being 2.13, 8.95, 10.33 and 13.13% respectively. The pH and average temperature of the corn silage at the end of 120 hours with 10% (pH 3.9 and 20.7 ° C), 15% (pH 3.8 and 20.5 ° C) and 20% (pH 3.6, and 19.7 ° C) of glycerin remained below the levels 0 (pH 4.7 and 21.7 ° C) and 5% (pH 4.2 and 22.6 ° C). The IVDDM in the corn silage with 10% (85.13%), 15% (86.95%) and 20% (89.18%) were higher than those with 0 (74.49%), and 5% (79.89%) of glycerin. The IVDCW of corn silage with 20% (46.72%) and 10% (40.19%) of glycerin were higher ($P < 0.05$) than the ones with 0 (26.65%), 5% (32.29%) and 15% (39.35%). The effective degradability of DM in the passage rates of 2, 5 and 8% / h in silage with 20% of glycerin (81.94, 76.20 and 68.99 respectively) were better when compared to

those with zero (64.89; 54.98 and 51.21), 5% (71.31, 61.88 and 58.07), 10% (75.56, 67.98 and 64.76) and 15% (79.73; 72.54 and 69.69). Ten females with body condition score between 3.0 and 3.75 points on a scale of 0 to 5 points, weighting 555.90 ± 87.54 kg at 50.69 ± 13.20 months of age were randomly divided into two groups: five animals in the control group and five receiving 15% of glycerin in the silage group, being six lactating cows, three dry cows and a heifer. Follicular waves were synchronized and four follicular aspirations were performed with intervals of 15 days. The oocytes were classified and transported to the laboratory, initiating the IVF procedures. Blood was collected from animals at 7, 9, 11, 13, 15, 17 and 19h to measure blood glucose. In the group treated with glycerin, 132 oocytes were aspirated with 105 viable ones while in control, 90 oocytes were aspirated with 81 viable ones and there were no differences ($P > 0.05$) between viable and non-viable oocytes. There was no difference in the persistence of viable embryos observed at seven, eight and nine days ($P > 0.05$). At seven days, the control group produced 19 embryos and the group that received dietary glycerin produced 27 embryos. Difference was observed ($P < 0.05$) in the probabilities between non-viable embryos and aspirated oocytes with unfavorable results for the control group (0.40) in relation to those treated with glycerin (0.27). No differences were observed in the mean of pre and post-prandial blood glucose ($P > 0.05$) in animals treated with glycerin (75.91 mg.dL^{-1}) compared to controls (71.69 mg.dL^{-1}), and the mean estimated as a function of time was 71.68 mg.dL^{-1} . The results demonstrate that the glycerin added to the corn and the sugarcane silage improved the aerobic stability, increased the energy, digestibility and degradability of the ensiled material. The glycerin added to corn silage in the diet of females Holstein generated punctual variations in the level of blood glucose in animals, but for the mean analysis there was no difference. There was no influence of the glycerin added to the diet in the production and improvement of oocytes and embryos quality or in the persistence of embryos viability.

Key words: aerobic stability, glycerol, in vitro digestibility, in situ degradability, in vitro fertilization

I - INTRODUÇÃO GERAL

A busca por alternativas energéticas sustentáveis que possam acompanhar o crescimento mundial tem incentivado o mercado de biocombustíveis (SOUSA et al., 2006). O Brasil lançou em 2004 o programa nacional de produção e uso do biodiesel, iniciando-se em 2008, quando entrou em vigor a mistura obrigatória de 2% de biodiesel ao óleo diesel (B2), em todo o território nacional. A evolução foi rápida e, no início de 2010, a inclusão aumentou para 5% (B5) antecipando em três anos a meta estabelecida pela Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. A produção prevista de biodiesel para 2012 é de 2,8 bilhões de litros, superando a Alemanha como maior produtor mundial de biodiesel (MME, 2012).

A principal matéria-prima utilizada na produção de biodiesel brasileiro é o óleo de soja (77,35%), mas também são utilizados a gordura bovina (16,11%), o óleo de algodão (3,66%) e outros materiais (1,88%) entre eles a gordura suína e óleo de fritura, as proporções de fontes de lipídios variam durante o ano sendo estes dados relativos ao mês de março de 2012 (ANP, 2012).

A glicerina é o principal subproduto gerado na produção de biodiesel, representando aproximadamente 10% (SHIN et al., 2012) e com o aumento da produção de biodiesel no Brasil, a glicerina produzida em 2010 foi de 258 milhões de litros, com expectativa de crescimento para 330 milhões de litros em 2013 (MME, 2012), sendo necessário dar destino a esta glicerina gerada. Além das aplicações já conhecidas nas indústrias química e farmacêutica, e também em virtude da queda de preços pela grande produção, vários estudos são realizados também para aplicação na alimentação animal (SHIN et al., 2012).

1.1. Processo de produção, purificação e características da glicerina.

O biodiesel é obtido por meio de transesterificação que consiste na reação de um óleo ou gordura com um álcool na presença de hidróxido de sódio ou de potássio formando ésteres metílicos de ácidos graxos e glicerina (ZHOU et al., 2008). Ao final da transesterificação, a glicerina e ésteres formam duas fases líquidas e separáveis por centrifugação, sendo a fase superior, menos densa, constituída por biodiesel e na fase inferior, a glicerina bruta composta por glicerol e aproximadamente 30% de impurezas (OOI et al., 2004). Segundo os mesmos autores, a glicerina bruta apresenta-se na forma de líquido viscoso pardo escuro, que contém quantidades variáveis de sabão, metanol, monoacilglicerol, diacilglicerol, oligômeros de glicerol, polímeros e água. A porcentagem de glicerol nessa mistura varia entre 65 e 70%. No primeiro processo de purificação na glicerina bruta faz-se a de acidulação com HCl, H₂SO₄, ou H₃PO₄ para que haja a separação de glicerol e ácidos graxos do sabão, resultando em um líquido de três fases, sendo que na fase inferior há a deposição de sais, a fase superior é constituída pelos ácidos graxos livres e na fase intermédia composta principalmente por glicerol e metanol. A glicerina é recuperada com concentrações superiores a 80% de glicerol e quantidades variáveis de água, corantes e metanol. Posteriormente, o glicerol com excesso de ácido é neutralizado com solução de NaOH e submetido a tratamento térmico (70°C) para recuperação de metanol (OOI et al., 2004).

A glicerina ou glicerol ou ainda 1,2,3-Propanotriol é um composto orgânico de função álcool, com três hidroxilas, em que a fórmula molecular é C₃H₈O₃ (IUPAC, 1997).

A glicerina em estado puro é um líquido incolor, inodoro, viscoso com gosto doce (MCGRAW-HILL, 2005). A glicerina é completamente solúvel em água e álcool, mas só é ligeiramente solúvel em muitos solventes comuns, como éter, acetato de etila e insolúvel em hidrocarbonetos (MCGRAW-HILL, 2005). A glicerina tem ponto de ebulição a 290°C na pressão atmosférica, densidade de 1,2613 g.cm⁻³ a 25°C (IUPAC, 1997).

O uso da glicerina na alimentação humana e indústria farmacêutica são condicionados ao grau de pureza de 99,9% de glicerol. A glicerina do biodiesel semipurificada tem entre 75 a 85% de glicerol e para atingir grau alimento, esta glicerina deve ser submetida à destilação, com custo elevado (TOOHEY et al., 2003).

1.2. Uso da glicerina em bovinos

A glicerina tem sido utilizada no tratamento de cetose, sendo relatada na década de 50 (JOHNSON et al. 1955). O glicerol e o propilenoglicol foram estudados no tratamento da cetose na década de 1970 (FISHER et al., 1971; 1973) e, mais recentemente, o glicerol foi avaliado como um auxiliar na prevenção de problemas metabólicos das vacas no período de transição (DONKIN; DOANE, 2007).

A alta disponibilidade da glicerina em virtude da crescente produção de biodiesel em todo o mundo reduziu os preços e possibilitou o seu uso em animais de produção.

Thompson e He (2006) analisaram a glicerina semipurificada, de vários óleos vegetais e de óleos vegetais usados e observaram que a glicerina de óleos de primeiro uso poderia ser aproveitada como alimento energético, misturada a um produto com alta proteína, em suplementos alimentares para animais.

Südekum (2008) relatou que a glicerina pode apresentar teores variáveis de glicerol, água, metanol e ácidos graxos, classificadas como de baixa pureza (50 a 70% de glicerol), média pureza ou semipurificada (80 a 90% de glicerol) e de alta pureza (acima de 99% de glicerol). De acordo com o mesmo autor, a glicerina de baixa pureza ou bruta possui 63,3% de glicerol e 26,7% de metanol, o de média pureza, 85,3% de glicerol e 0,04% de metanol e, tanto a glicerina bruta como a semipurificada ou a pura podem ser aproveitadas na alimentação animal. Os níveis de metanol na glicerina devem ser inferiores a 150 partes por milhão para seu uso em alimentação animal (FDA, 2006).

Südekum (2008), utilizando glicerina na dieta de ruminantes, verificou ser possível incluí-la como ingrediente em rações ou em concentrados peletizados. O mesmo autor salientou ainda que as glicerinas de diferentes purezas podem substituir carboidratos rapidamente fermentáveis em dietas de ruminantes em até 10% da matéria seca, sem influenciar negativamente o consumo de água, alimentos, a degradação ruminal ou a digestibilidade de nutrientes.

DeFrain et al. (2004) destacaram que a glicerina pode aliviar os sintomas de cetose quando administrada, via oral, e que a glicerina gera um substrato glicogênico, aliviando o complexo de cetose/fígado gorduroso, para melhorar a lactação.

Doppenberg e Van der Aar (2007) propuseram a substituição do propilenoglicol (1,2-propanodiol) por glicerina (1, 2,3-propanotriol) no período de transição de vacas de leiteiras e verificaram o aumento da lactose e da produção de leite. Schroeder e Südekum (1999) estimaram em 1,982 a 2,269 Mcal/kg de energia líquida para lactação

com valores de energia decrescentes para dietas com mais amido. Donkin e Doane (2007) concluíram haver mais estudos que avaliam a glicerina como precursor de glicose no período de transição do que sobre a sua inclusão como ingrediente nas rações, o que geram incertezas sobre valor da energia pelas variações de alimentos e interações com outros componentes da ração sendo necessária maior atenção a este respeito.

1.3. Metabolismo do glicerol

O glicerol é um componente dos triacilgliceróis que é a forma mais comum de armazenagem de gordura pelos animais e vegetais (POND et al. 2005); é um componente do metabolismo normal dos animais, sendo encontrado na circulação e nas células quando derivado de lipólise no tecido adiposo, hidrólise das lipoproteínas do sangue e da gordura dietética (LIN, 1977).

Vacas leiteiras em balanço energético negativo (BEN), em que a produção e absorção de propionato decrescem intensamente, o glicerol proveniente da lipólise exerce grande contribuição para a síntese de glicose (SAUER et al., 1973).

Glicerol consumido por monogástricos é absorvido por via paracelular por difusão passiva e, recentemente há evidências, *in situ*, de sistema de transporte sódio dependente Na [+] para o glicerol no intestino delgado de ratos (KATO et al., 2005).

Ao ser absorvido e entrar na corrente sanguínea, o glicerol é metabolizado a glicerol-3-fosfato por meio da enzima glicerol quinase e convertido a intermediários da glicólise como dihidroxiacetona fosfato e gliceraldeído-3-fosfato e dependendo do estado nutricional, pode-se destinar à gliconeogênese ou para a síntese de triglicerídeos e, nas mitocôndrias geram 22 ATP/mol de glicerol (BEST, 2006).

1.4. Comportamento fermentativo do glicerol no rúmen

O glicerol bruto e o semipurificado contêm elementos nutricionais como fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio e sódio, podendo ser utilizados como substrato por várias espécies de microrganismos para o seu crescimento durante processos fermentativos (THOMPSON; HE, 2006).

Glicerol é fermentado, produzindo ácidos graxos voláteis (AGV) no rúmen e os primeiros relatos indicaram que o glicerol foi quase inteiramente fermentado a propionato (JOHNS et al., 1953; GARTON et al., 1961). Outros relatos indicaram que ao ser fermentado, resultou no aumento dos ácidos acético e propiônico (WRIGHT,

1969) ou na produção dos ácidos propiônico e butírico (CZERKAWSKI; BRECKENRIDGE, 1972).

Na fermentação *in vitro*, usando fluido ruminal de vacas adaptadas ao glicerol, os resultados indicaram aumento da produção de propionato e butirato e redução de acetato (REMOND et al., 1993).

Bergner et al. (1995) adicionaram de 15 a 25%, de glicerol em fermentação *in vitro* e observaram que a maior parte do glicerol desapareceu dentro de 6h. As taxas máximas de desaparecimento de glicerol determinadas em fermentadores *in vitro* foram de 0,52 a 0,62 g/h (REMOND et al., 1993). Os resultados ainda são contraditórios, pois Kijora et al. (1998), ao fornecerem de 200 g de glicerol em bovinos rúmen adaptados, observaram desaparecimento superior a 85% após 2h.

Remond et al.(1993) sugeriram que além da fermentação que glicerol sofre no rúmen, produzindo ácidos graxos voláteis, uma porção do glicerol ingerido poderia ser absorvida diretamente pelo epitélio ruminal.

Krehbiel (2008) estimou que 44% do glicerol ingerido por ruminantes é fermentado, 43% é absorvido pelo epitélio ruminal e 13% passam ao intestino. O mesmo autor reportou que em experimentos *in vitro*, o glicerol foi fermentado principalmente por *Selenomonas* e os produtos da fermentação foram propionato, succinato, lactato e acetato. O destino do glicerol absorvido por meio do epitélio ruminal é o fígado onde a enzima glicerol quinase converte glicerol e ATP em glicerol-3-fosfato e ADP e, depois, a gliceraldeído 3-fosfato e, então, à gliconeogênese (KREHBIEL, 2008).

1.5. Glicerina adicionada a silagens

A pesquisa da utilização de glicerina de biodiesel como componente na alimentação animal tem avançado muito e não é uma prática nova (KASS et al.,2012). Donkin e Doane (2007) consideram o glicerol um ingrediente alimentar para vacas leiteiras, podendo ser incluído como ingrediente, sem quaisquer efeitos deletérios, podendo substituir o milho como alternativa para a formulação de dietas para vacas em lactação.

Uma estratégia a ser explorada é a ampliação do uso da glicerina como aditivo nas silagens de cana-de-açúcar, milho e sorgo e em gramíneas com baixo teor de carboidratos solúveis. A adição de glicerina no ato da ensilagem facilita a mistura, evitando operações trabalhosas no momento do trato aos animais. Contudo, como

constataram Krempser et al. (2011), ainda há poucos experimentos com a adição de glicerina de biodiesel em silagens de milho e de cana-de-açúcar (DIAS JUNIOR. et al., 2010).

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 poderia contribuir também no processo de fermentação das silagens. Pelo glicerol mostrar boas características energéticas e fermentativas pode ser um material promissor como aditivo para silagens (KASS et al.,2012).

Dias Junior et al. (2010), avaliando materiais ensilados, usaram a glicerina na silagem com o objetivo de compensar as perdas energéticas no processo de fermentação. Krempser et al. (2011), ao avaliarem silagem de milho com glicerina, relataram redução de unidades formadoras de colônias (UFC) de vários microrganismos e Oliveira et al. (2011) observaram que o glicerol aumentou a estabilidade aeróbia na silagem de milho com glicerina.

1.6. Período de transição e reprodução.

O período de transição em vacas leiteiras é definido como a fase entre as três semanas que antecedem ao parto e as três primeiras semanas de lactação (DRACKLEY, 1999). Neste período, diversas alterações são observadas no metabolismo das vacas leiteiras. O metabolismo do fígado, do tecido adiposo, do músculo esquelético e na secreção e ação de hormônios envolvidos no parto, na lactogênese e na manutenção da lactação (HEAD; GULAY, 2001).

Randel (1990), analisando vacas com déficit energético e proteico no pós-parto com inatividade ovariana, atribuiu este fato à supressão da liberação do hormônio luteinizante (LH) da adeno-hipófise. Stevenson et al. (2001) observaram que a maioria dos rebanhos leiteiros com 60 dias pós-parto apresenta menos de 20% de vacas anovulatórias. Vanzin (2000) concluiu que o anestro pós-parto, ocorre principalmente pela lactação, podendo ser agravado depois de um período de privação alimentar, especialmente durante o terço final de gestação e lactação.

O balanço energético negativo começa poucos dias antes do parto e se agrava no pós-parto, alcançando o ponto mais negativo cerca de duas semanas após o parto (BELL, 1995). Entre os efeitos da nutrição na reprodução, é provável que o BEN seja o fator mais importante relacionado à baixa função reprodutiva das vacas. O BEN

consiste na diferença entre a energia consumida e a gasta para produção e manutenção e as vacas passam por este período durante as últimas semanas da gestação e o início da lactação. A intensidade do BEN durante as primeiras três semanas de lactação é altamente correlacionada com o intervalo à primeira ovulação pós-parto (BUTLER, 2001) destacando que o desenvolvimento de uma onda folicular ocorre entre cinco e sete dias após o parto, independente do BEN.

A carência de glicose que ocorre no período de transição no organismo da vaca aumenta a mobilização dos triacilglicerídeos, causando desordens endócrinas, como baixa produção de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), insulina, menor frequência de pulsos de LH, baixa concentração de progesterona, o que compromete o desempenho reprodutivo do rebanho (FORMIGONI et al., 1996).

Baixa disponibilidade de energia durante o BEN suprime a secreção pulsátil de LH e reduz a resposta ovariana ao LH (BUTLER, 2001), impedindo a ocorrência de ovulação.

A produção folicular de estradiol necessária para desencadear a onda pré-ovulatória de LH e a ovulação parece depender da disponibilidade de insulina e de IGF-1 circulantes (BUTLER, 2003) que se encontram em baixa concentração em vacas em BEN. O IGF-1, e a insulina estimulam a proliferação das células foliculares e a esteroidogênese (WATHES et al., 2007).

Marr et al. (2002) relataram que as concentrações plasmáticas de ácido graxos não esterificados (AGNE), de β -hidroxibutirato e o acúmulo de triglicerídeos no fígado foram maiores nas vacas em que o primeiro folículo dominante pós-parto não ovulou, em comparação àquelas que apresentaram folículos ovulatórios. Os autores sugeriram que altas concentrações de AGNE e de β -hidroxibutirato no sangue podem inibir a produção folicular de estradiol e a ovulação e que, possivelmente, estes compostos agem no hipotálamo, diminuindo a frequência dos pulsos de LH e nos ovários, diminuindo a sensibilidade folicular à insulina e ao IGF-1. Vanholder et al. (2006) verificaram que a adição de β -hidroxibutirato ao meio de cultivo *in vitro* reduziu a produção de estradiol das células da granulosa.

1.7. O balanço energético negativo e a qualidade dos oócitos e embriões

Mudanças metabólicas observadas no início da lactação, em virtude do BEN, alteram a composição do fluido folicular, e podem comprometer a capacidade de

desenvolvimento dos oócitos, visto que estes são sujeitos a distúrbios no seu microambiente (LEROY et al., 2008).

Britt (1991) observou que a foliculogênese leva em torno de 60 a 80 dias e os folículos que iniciam o seu desenvolvimento durante o BEN são afetados negativamente, liberando oócitos de pior qualidade e, por isso, o primeiro e o segundo folículos ovulatórios após o parto começam seu desenvolvimento no período seco, quando as condições metabólicas são favoráveis. Já o terceiro, o quarto e o quinto folículos ovulatórios se desenvolvem durante o início da lactação, quando o BEN é mais intenso e, conseqüentemente, podem estar sujeitos às condições metabólicas adversas do pós-parto (BRITT, 1991).

Oócitos bovinos maturados em meio contendo concentrações de glicose e de β -hidroxitubirato similares às observadas no fluido folicular de vacas com cetose clínica apresentaram reduzida competência de desenvolvimento, como demonstrado pelas menores taxas de clivagem e de produção de blastocistos, destacando que a glicose é uma molécula indispensável para a síntese de DNA durante a maturação do ovócito (LEROY et al., 2006).

As adaptações do metabolismo de vacas leiteiras de alta produção foram associadas a alterações no desenvolvimento e na qualidade embrionária (LEROY et al., 2005). Estes autores observaram que a resposta superovulatória não diferiu entre vacas leiteiras de alta produção, vacas não lactantes e novilhas, mas o grau de desenvolvimento embrionário foi menor nas vacas lactantes, com a produção de mais mórulas e menos blastocistos. Embriões de coloração escura contêm 45% mais lipídeos que os de coloração pálida e são mais sensíveis ao estresse oxidativo, ao resfriamento e ao congelamento por prejudicar a função mitocondrial e reduzir os produtos resultantes da transcrição de genes, que são importantes para manter a qualidade e a viabilidade do embrião (ABE et al., 1999).

1.8. Glicerina como precursor de glicose

Ruminantes em balanço energético negativo, a produção e absorção de propionato decrescem intensamente pela baixa ingestão de alimentos e o glicerol exerce grande contribuição para a síntese de glicose (SAUER et al., 1973).

Südekum (2008) explorou a possibilidade de usar glicerina em dietas para ruminantes como precursor de glicose e se constituiu num alimento excelente, até mesmo quando incluídos em forma mais impura. O mesmo autor destacou que

glicerinas de purezas diferentes podem substituir os carboidratos rapidamente fermentáveis em dietas para ruminantes.

De acordo com DeFrain et al. (2004), a glicerina pode minimizar os sintomas do complexo de Cetose - fígado gorduroso, em vacas, no período de transição formando substrato gliconeogênico, a fim de melhorar o desempenho na lactação, sugerindo que ao ser adicionada na dieta eliminaria a necessidade de conter as vacas para ministrar “Drench” uma solução oral nutritiva composta de precursores de glicose e outros eletrólitos, objetivando minimizar problemas do periparto.

Nielsen e Ingvarlsen (2004) afirmaram que o glicerol pode ser absorvido pelo rúmen ou intestino delgado, sendo precursor de glicose nas vias gliconeogênicas do fígado. Kristensen e Raun (2007) mediram a absorção e o metabolismo do glicerol no fígado de vacas que receberam, por cânula ruminal, 925g/dia de glicerina, com 85% de glicerol. Estes últimos autores recuperaram, na veia porta, 10% do glicerol administrado, que foi absorvido pelo fígado e convertido em glicose e o glicerol não recuperado na veia porta, presumivelmente, foi convertido a propionato, no rúmen, contribuindo com a gliconeogênese. Bines e Hart (1984) revelaram que os aumentos das concentrações de propionato elevaram a insulina no sangue, favorecendo a síntese de proteína e gordura, reduzindo a lipólise nas vacas em balanço energético negativo.

Chung et al. (2007), fornecendo 250g/dia de glicerina seca para vacas no período de transição, observaram um estado de energia mais positivo quando comparadas às vacas controle. Segundo os mesmos autores, o efeito gliconeogênico do glicerol resultou em concentrações plasmáticas mais elevadas de glicose, concentrações mais baixas de plasma β -hidroxibutirato e de cetonas na urina, observado na segunda semana de lactação.

REFERÊNCIAS

- ABE, H.; YAMASHITA, S.; ITOH, T.; SATOH, T.; HOSHI, H. Ultrastructure of bovine embryos developed from *in vitro*-matured and fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. *Molecular Reproduction and Development*, Providence, v. 53, p. 325-335, 1999.
- ANP-Agência Nacional de Petróleo, Gás e Biocombustíveis. Superintendência de refino e processamento de gás natural (SRP). *Boletim Mensal de Biodiesel*. Brasília, jun.2012 Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=61095&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1342806717513>>. Acesso em: 26/06/2012.
- BELL, A. W. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 73, n. 10, p. 2804-2819, 1995.
- BEST, P. Increased biofuel production will grow supplies of by-products: Glycerine gives an energy option. *Feed International*, Los Gatos, v. 55, n. 12, p. 20-21, 2006.
- BERGNER, H.; KIJORA, C.; CERESNAKOVA, Z.; SZAKACS, J. *In vitro* studies on glycerol transformation by rumen microorganisms. *Archiv fur Tierernahrung*, Berlin, v. 48, p. 245-256, 1995.
- BINES, J. A.; HART, I. C. The response of plasma insulin and others hormones to intraruminal infusion of VFA mixtures in cattle. *Canadian Journal of Animal Science*, Ottawa, v. 64, p. 304, 1984.
- BRITT, J. H. Influence of nutrition and weight loss on reproduction and early embryonic death in cattle. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 17, 1991, St. Paul. *Proceedings ...* St. Paul: WCB, 1991. p. 143-149.
- BUTLER, W. R. Nutritional effects on resumption of ovarian cyclicity and conception rate in postpartum dairy cows. *Animal Science Occasional Publication*, Edinburgh, v. 1, p. 133-145, 2001.
- BUTLER, W. R. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livestock Production Science*, Philadelphia, v. 83, p. 211-218, 2003.
- CHUNG, Y. H.; RICO, D. E.; MARTINEZ C. M.; CASSIDY, T. W.; NOIROT, V.; AMES, A.; VARGA, G. A. Effects of feeding dry glycerin to early postpartum Holstein dairy cows on lactational performance and metabolic profiles. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 90, p. 5682-5691, 2007.

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

DEFRAIN, J. M.; HIPPEN, A. R.; KALSCHEUR, K. F.; JARDONS, P. W. Feeding glycerol to transition dairy cows: effects on blood metabolites and lactation performance. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 87, p. 4195-206, 2004.

DIAS JUNIOR, G. S.; LOPES, N. M.; PESSOA JUNIOR, G.; DE SOUZA SALVATI, G. G.; CARVALHO, B. F.; DA SILVA ÁVILA, C. L.; SCHWAN, R. F.; NOGUEIRA PEREIRA, R. A.; PEREIRA, M. N. Perfil fermentativo, composição e perda de matéria seca de silagem de cana-de-açúcar inoculada com bactérias e contendo glicerina. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 47., 2010, Salvador. *Anais...* Salvador : UFBA, 2010.

DONKIN, S.; DOANE, P. Glycerol as a feed ingredient for dairy cows. In: TRISTATE NUTRITION DAIRY NUTRITION CONFERENCE, 2007, Fort Wayne. *Proceedings...* Fort Wayne: Eastridge, M. L. 2007. p. 97-103.

DOPPENBERG, J.; VAN DER AAR, P. The nutritional value of biodiesel by-products. (Part 2: Glycerine). A high-energy liquid product, glycerine offers livestock producers the option of a cost effective, alternative feed Ingredient. *Feed Business Asia*, Hong Kong, p. 42-43, 2007.

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

FDA - Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations. Food and drug administration department of health and human services- subchapter E- animal drugs, feeds and related products, v. 21, p. 582-1320, 2006. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm>>. Acesso em : 20 de novembro de 2008.

FORMIGONI, A.; CORNIL, M. C.; PRANDI, A.; MORDENTI, A.; ROSSI, A.; PORTETELLE, D.; RENAVILLE, R. Effect of propylene glycol supplementation around parturition on milk, reproduction performance and some hormonal and metabolic characteristics in dairy cows. *Journal of Dairy Research*, Cambridge, v. 63, n. 1, p. 11-24, 1996.

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

FISHER, L. J.; ERFLE, J. D.; LODGE, G. A.; SAUER, F. D. Effects of propylene glycol or glycerol supplementation of the diet of dairy cows on feed intake, milk yield and composition, and incidence of ketosis. *Canadian Journal of Animal Science*, Ottawa, v. 53, p. 289-296, 1973.

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

HEAD, H. H.; GULAY, M. S. Recentes avanços na nutrição de vacas no período de transição. In: SINLEITE – SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE BOVINOCULTURA DE LEITE, 2., 2001, Lavras. *Anais...* Lavras: UFLA, 2001. p.121-137.

IUPAC- International Union of Pure and Applied Chemistry. *Compendium of chemical terminology*, 2.ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997.p. 1351.

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

JOHNSON, R. B. The treatment of ketosis with glycerol and propylene glycol. *Cornell Veterinarian*, Ithaca, v. 44, p. 6-21, 1955.

KASS, M.; OLT, A.; KALDMÄE, H.; KOKK, K.; SONGISEPP, E.; OTS, M. Effects of crude glycerol addition on silage fermentation. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE HÄMEENLINNA. 16., 2012, Hämeenlinna, *Proceedings...* Hämeenlinna: 2 - 4 July 2012, p. 394-395.

KATO, T.; HAYASHI, Y.; INOUE, K.; YUASA, H. Glycerol absorption by Na⁺-dependent carrier-mediated transport in the closed loop of the rat small intestine. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, Tokyo, v. 28, p. 553-555, 2005.

KIJORA, C.; BERGNER, H.; GOTZ, K. P.; BARTELT, J.; SZAKACS, J.; SOMMER, A. Research note: investigation on the metabolism of glycerol in the rumen of bulls. *Archiv fur Tierernahrung*, Berlin, v. 51, p. 341-348, 1998.

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

KREMPSE, P. M.; LOPES, R. P. X.; RIBEIRO, M. T.; LIMA, J. C. F.; OLIVEIRA, J. S.; CARNEIRO, J. C. Microbiological evaluation of aerobic stability of corn silage with increasing levels of glycerin. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION. 2., 2011, São Pedro, *Proceedings...* São Pedro: 2011.

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, Marty, *Proceedings...* Marty: EAAP Publication, Wageningen Academic Publishers, 2007. p. 355-356.

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

LEROY, J. L. M. R.; OPSOMER, G.; DE VliegHER, S.; VANHOLDER, T.; GOOSSENS, L.; GELDHOF, A.; BOLS, P. E. J.; DE KRUIF, A.; VAN SOOM, A. Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows. *Theriogenology*, Stoneham, v. 64, p. 2022-2036, 2005.

LEROY, J. L. M. R.; VANHOLDER, T.; OPSOMER, G.; Van SOOM, A.; DE KRUIF, A. The *in vitro* development of bovine oocytes after maturation in glucose and β -hydroxybutyrate concentrations associated with negative energy balance in dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*, Berlin, v. 41, p. 119-123, 2006.

LEROY, J. L. M. R.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; GOOVAERTS, I. G. F.; BOLS, P. E. J. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part I. *Reproduction in Domestic Animals*, Berlin, v. 43, p. 612-622, 2008.

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

MARR, A. L.; PIEPENBRINK, M. S.; OVERTON, T. R.; LUCY, M. C.; BUTLER, W. R. The somatotrophic axis and lipid metabolism in transition dairy cows in relation to timing of first postpartum ovulation. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 85, suppl. 1, p. 66, 2002. (Abstract).

MCGRAW-HILL. Glycerol. McGraw-Hill Encyclopedia of Science and Technology. The McGraw-Hill Companies, Inc. 2005. Disponível em :< <http://www.answers.com/topic/glycerol> > Acesso em: 19 de setembro de 2007.

MME. MINISTERIO DE MINAS E ENERGIA. Disponível em:< <http://www.mme.gov.br/programas/biodiesel/menu/biodiesel/pnpb.html> > Acesso em: julho de 2012.

NIELSEN, N. I.; INGVARTSEN K. L. Propylene glycol for dairy cows: A review of the metabolism of propylene glycol and its effects on physiological parameters, feed intake, milk production and risk of ketosis. *Animal Feed Science Technology*, Amsterdam, v. 115, p. 191-213, 2004.

OLIVEIRA, J. S.; LOPES, R. P. X.; RIBEIRO, M. T.; LIMA, J. C. F.; KREMPSE, P. M.; CARNEIRO, J. C. 2011. Temperature evaluation on aerobic stability of corn silage with increasing levels of glycerin. In: ZOPOLLATTO, M.; DANIEL, J. L. P.; NUSSIO, L. G.; NETO, A. S. (eds.). FORAGE QUALITY AND CONSERVATION. 2., 2011. São Pedro, *Proceedings...* São Pedro: 2011.

OOI, T. L.; YONG, K. C.; HAZIMAH, A. H.; DZULKEFLY, K.; WAN-YUNUS, W. M. Z.; Glycerol Residue - A Rich Source of Glycerol and Medium Chain Fatty Acids. *Journal of Oleo Science*, Utsunomiya, v. 53, p. 29-33, 2004.

POND, W. G., CHURCH, D. C., POND, K. R.; SCHOKNECHT, A. *Basic animal nutrition and feeding* .5. ed. Hoboken, USA: John Wiley & Sons Inc, 2005. 608 p.

RANDEL, R. D. Nutrition and postpartum rebreeding in cattle. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 68, p. 853-862, 1990.

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

SAUER, F. D.; ERFLE, J. D.; FISHER, L. J. Propylene glycol and glycerol as a feed additive for lactating dairy cows: An evaluation of blood metabolite parameters. *Canadian Journal of Animal Science*, Ottawa, v. 53, p. 265-271, 1973.

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

SCHRÖDER, A.; SÜDEKUM, K-H. Glycerol as a by-product of biodiesel production in diets for ruminants. In: INTERNATIONAL RAPESEED CONGRESS, 10., 1999, Canberra. *Proceedings...* Canberra: Regional Institute, 1999. paper 241. Disponível em: <http://www.regional.org.au/au/gc10/241.htm>. Acesso em: 05 de maio de 2008.

SOUSA, G. S.; PIRES, M. M.; ALVES, J. M. Análise da potencialidade da produção de biodiesel a partir de óleos vegetais e gorduras residuais. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UESC, 11., 2006, Santa Cruz. *Anais...* Santa Cruz: UESC, 2006. p. 477-478.

STEVENSON, J. S. Reproductive management of dairy cows in high milk-producing herds. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 84, p. 128-143, 2001.

SÜDEKUM, K-H. *Co-products from biodiesel production*. In: Garnsworthy, P.C.; Wiseman, J.(Ed.). *Recent advances in animal nutrition*. Nottingham: Nottingham University Press, 2008.p. 210-219.

TOOHEY, D. E.; JAYANATH, A.; CRASE, L. Pre-feasibility study into biodiesel opportunity. A study conducted for the Pratt Water Murrumbidgee Valley Water Efficiency Feasibility Project. Disponível em: <<http://www.napswq.gov.au/publications/prattwater/workingpapers/pubs/biodiesel.pdf>> Acesso em: 19 de setembro de 2007.

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

VANZIN, I. M. *Inseminação artificial e manejo reprodutivo de bovinos*. REPAV. Disponível em: <http://www.inseminacaoartificial.com.br>. Acesso em: 23 de março 2010.

VANHOLDER, T.; LEROY J. L. M. R.; VAN SOOM, A.; CORYN, M.; DE KRUIF, A.; OPSOMER, G. Effect of β -OH butyrate on bovine granulosa and theca cell function *in vitro*. *Reproduction in Domestic Animals*, Berlin, v. 41, p. 39-40, 2006.

WATHES, D. C.; ABAYASEKARA, D. R.; AITKEN, R. J. Minireview: polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biology of Reproduction*, Madison, v. 77, p. 190-201, 2007.

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

ZHOU, C. H.; BELTRAMINI, J. N.; FAN, Y. X.; LU, G. Q. Chemoselective catalytic conversion of glycerol as a biorenewable source to valuable commodity chemicals. *Chemical Society Reviews*, Cambridge, v. 37, p. 527- 549, 2008.

II - OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar a inclusão de glicerina semipurificada de biodiesel em silagens de milho e de cana-de-açúcar e medir a estabilidade aeróbia, para avaliar a composição química, a degradabilidade *in situ*, a digestibilidade *in vitro*. E, em sequência, estudar a influência da glicerina via silagem na qualidade de oócitos e na produção *in vitro* de embriões de fêmeas holandesas.

III - Estabilidade aeróbia, composição química e degradabilidade ruminal da cana-de-açúcar ensilada com glicerina de biodiesel

Resumo

Objetivou-se estudar a inclusão de glicerina semipurificada de biodiesel na silagem de cana-de-açúcar ensilada com 0, 5, 10, 15 e 20% de glicerina em silos experimentais de PVC. Na abertura avaliou-se a estabilidade aeróbia medindo-se a temperatura e pH da massa ensilada nos tempos 0, 24, 48, 72, 96 e 120h. Avaliou-se a composição química e estimou-se o teor de carboidratos não fibrosos (CNF) e nutrientes digestíveis totais (NDT). Em incubadora artificial avaliaram-se a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e a digestibilidade *in vitro* da parede celular (DIVPC) das silagens. Em três bovinos fistulados avaliou-se a degradabilidade *in situ* da matéria seca e a porcentagem de desaparecimento da fibra em detergente neutro em amostras incubadas em 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96h. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e as análises estatísticas foram realizadas por meio de Inferência Bayesiana. Observaram-se aumentos nos teores de matéria seca, NDT, matéria mineral, CNF e a redução de fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido, proteína bruta e extrato etéreo à medida que a inclusão da glicerina foi maior. Houve aumento na DIVMS ($P < 0,05$) nas silagens com 15 e 20% de glicerina em relação aos níveis com 0, 5 e 10%. A DIVPC nos níveis de 10, 15 e 20% de glicerina foi maior ($P < 0,05$) em relação aos outros tratamentos. Foram observados aumentos na porção prontamente degradável (*a*), redução da fração insolúvel, potencialmente degradável (*b*) e aumento da constante de degradabilidade da fração (*c*) das silagens com 5, 10, 15 e 20% de glicerina ($P < 0,05$) em relação ao controle. A glicerina melhorou a estabilidade aeróbia, mantendo o pH e temperatura baixos no período de observação nos níveis com 15 e 20% de glicerina em relação as silagens com 0, 5 e 10%. Esses resultados indicam a glicerina como um promissor aditivo para silagens de cana-de-açúcar, sendo capaz de enriquecer a densidade energética e melhorar a estabilidade aeróbia do material ensilado.

Palavras-chave: carboidratos não fibrosos, digestibilidade *in vitro*, energia, glicerol, pH da silagem, temperatura da massa ensilada

**Aerobic stability, chemical composition and ruminal degradability of sugarcane silage
with glycerin from biodiesel**

Abstract

The experiment was performed with the objective of studying the ensiled sugarcane silage with 0, 5, 10, 15 and 20% of glycerin in experimental PVC silos. The aerobic stability was assessed by measuring the pH and the temperature of the silage at 0, 24, 48, 72, 96 and 120h. The chemical composition, the levels of non-fiber carbohydrates (NFC) and the total digestible nutrients (TDN) were evaluated. The *in vitro* digestibility of dry matter (IVDDM) and the *in vitro* digestibility of the cell wall (IVDCW) in the silages were evaluated. In three fistulated cattle the *in situ* degradability of dry matter (DM) and the disappearance percentage of the neutral detergent fiber (NDF) in samples incubated at 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72 and 96h were analyzed. The experimental design was completely randomized and the statistical analyzes were done using Bayesian inference. Increases were observed in DM, TDN, mineral matter, NFC and reductions in NDF, acid detergent fiber, crude protein and ether extract as the inclusion of glycerin was higher. IVDDM increased ($P < 0.05$) in silage with 15 and 20% of glycerin in relation to those with 0, 5 and 10%. The IVDCW at 10, 15 and 20% levels of glycerin was higher ($P < 0.05$) compared to the other treatments. Increases were observed in the soluble portion (a) a reduction in the insoluble fraction (b), and an increase in the degradability fraction constant (c) of the silages with 5, 10, 15 and 20% of glycerin ($P < 0.05$) compared to the control. Glycerin improved aerobic stability while maintaining a low pH and temperature during the observation period at levels of 15 and 20% of glycerin against the silage with 0, 5 and 10%. These results indicate glycerin as a promising additive for sugarcane silage, being able to enhance the energy density and to improve the aerobic stability of the silage.

Key words: energy, glycerol, *in vitro* digestibility, non-fibrous carbohydrates silage pH, temperature of silage

Introdução

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum L.*) é uma alternativa de suplementação em períodos de escassez de pastagens por apresentar seu ponto ideal de corte no período seco do ano, que coincide com a época de menor produtividade das gramíneas tropicais. Além do baixo custo de produção e alta produção de massa por hectare, a sua utilização pode se estender por quatro a cinco anos, sem necessidade de renovação da área de plantio. A utilização da cana-de-açúcar na alimentação animal, fora do período de safra, sofre restrições pelo menor valor nutritivo em virtude do baixo teor de sacarose (MATSUOCA; HOFFMANN, 1993). A cana-de-açúcar também é utilizada em pequenas e grandes propriedades, ofertada em cortes diários. Porém, a melhor produção concentra-se no período seco, tornando a ensilagem da cana-de-açúcar uma alternativa interessante.

A cana-de-açúcar, como alimento para ruminantes, apresenta limitações de ordem nutricional, pelos baixos teores de proteína, minerais e ao alto teor de fibra de baixa degradação ruminal (LENG, 1988).

McDonald et al. (1991) reportaram que as perdas no processo de ensilagem podem atingir valores de 40% associadas às perdas com respiração residual, fermentação, produção de efluente no silo e deterioração aeróbia. Preston et al. (1976) verificaram redução de, aproximadamente, 30% no conteúdo total dos açúcares para a cana-de-açúcar ensilada em relação à cana-de-açúcar fresca, e teor alcoólico de 5,5% na MS da silagem. Foram relatadas perdas de matéria seca, aumento nos constituintes da parede celular como FDN, FDA e Lignina quando comparadas à cana-de-açúcar fresca (BERNARDES et al., 2002).

Após abertura do silo inicia-se uma fermentação que será mais intensa quanto melhor for a qualidade da silagem, em função dos maiores teores de carboidratos solúveis residuais e de ácido láctico (JOBIM; GONÇALVES, 2003). De acordo com os mesmos autores, quando a massa ensilada tem contato com oxigênio, facilita a ação de microrganismos deterioradores, reduzindo açúcares solúveis, ácidos orgânicos, conteúdo de energia, elevando o pH, reduzindo a digestibilidade e, conseqüentemente, as silagens deterioradas podem conduzir a perdas econômicas elevadas e baixo desempenho animal. Desta forma, na tentativa de melhorar a estabilidade aeróbia das silagens, tem sido estudadas estratégias como o uso de inoculantes contendo bactérias heterofermentativas. Pela fermentação alcoólica que ocorre na cana-de-açúcar ensilada, existe a necessidade de se fazer uso de aditivos que controlem a produção de etanol (NUSSIO et al., 2003).

A pesquisa da utilização de glicerina de biodiesel como componente na alimentação animal tem avançado e não é recente (KASS et al., 2012) e em vista da alta produção de biodiesel e de excedentes de glicerina, coproduto de alto conteúdo energético, sua

adição nas silagens de cana-de-açúcar, poderia compensar as perdas energéticas ocasionadas pelo processo da ensilagem, facilitando o trato aos animais (DIAS JUNIOR et al.; 2010).

Krempser et al.(2011), ao avaliarem silagem de milho com glicerina, relataram que houve redução de UFC (unidades formadoras de colônias) de vários microrganismos, e Oliveira et al. (2011) observaram que aumentou a estabilidade aeróbia na silagem de milho com glicerina. Também, KASS et al.(2012), trabalhando com silagem de gramíneas e glicerina bruta (76% de glicerol), observaram que houve redução de etanol e maior estabilidade aeróbia depois de abrir os silos.

Neste trabalho, objetivou-se avaliar os efeitos da inclusão de cinco níveis de glicerina semipurificada (0, 5, 10, 15 e 20%) em silagens de cana-de-açúcar e avaliar a composição química, a degradabilidade ruminal, a digestibilidade *in vitro* e a estabilidade aeróbia das silagens.

Material e métodos

O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental de Iguatemi - Universidade Estadual de Maringá (UEM), Paraná, localizada a 23°25' de latitude Sul, a 51°57' de longitude Oeste de Greenwich e 550 m de altitude e as análises químicas foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da UEM (LANA) entre maio de 2011 e maio de 2012.

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) utilizada foi a cultivar RB855536 plantada em fevereiro de 2010, sendo o plantio realizado manualmente, com seis colmos com três gemas por metro, distribuídos nos sulcos de plantio, com adubação segundo análises de solo. O corte foi realizado em 16 de maio de 2011, com ensiladeira, modelo JF 92Z10, regulada para tamanho médio de partícula de 10 mm. Após o corte, o material foi levado a um galpão coberto, cimentado e forrado com lona plástica, onde foi distribuído em cinco porções de 100 kg e, em seguida, foi adicionada a glicerina semipurificada de biodiesel na proporção de 0, 5, 10, 15 e 20 % (base na massa verde) e homogeneizada manualmente. O material foi ensilado em silos experimentais de PVC, com 20 cm de diâmetro por 40 cm de altura, com massa específica média de 600 kg/m³, e depois fechados com lona plástica de polipropileno e lacrados com fita adesiva. Foram feitas quatro repetições para cada nível de inclusão de glicerina, totalizando 20 silos experimentais.

A glicerina de média pureza, proveniente da produção de biodiesel de óleo de soja foi adquirida na empresa TCS-Meridional (Ponta Grossa - PR) e analisada pelo Instituto de Tecnologia do Paraná – Divisão de Biocombustíveis (Tecpar), Curitiba. A composição química da glicerina utilizada na silagem continha 82,54% de glicerol, 10,23% de água, 120ppm de metanol, 1,3% de sódio, 7,4% de cinzas e pH 5,8.

Aos 68 dias, os silos experimentais foram abertos e desprezados 15 cm da parte superior. De cada silo, coletou-se uma amostra de 1 kg, as quais foram secas em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72h e moídas em peneira com malha de 2 mm em moinho “Willey”, e armazenados em potes plásticos herméticos, identificados para análises posteriores.

As silagens de cana-de-açúcar restante nos silos ficaram expostas ao ar, cobertas com tecido tipo filó, onde se realizaram a leitura dos valores de potencial hidrogeniônico (pH) e da temperatura da massa ensilada (TME). As medições de pH e TME foram realizadas na abertura dos silos e depois a cada 24h nos tempos: 0, 24, 48, 72, 96 e 120h, para avaliar a estabilidade aeróbia do material. O pH foi medido com uso de peagâmetro digital de bancada a partir de extrato aquoso da silagem (CHERNEY; CHERNEY, 2003). A TME das silagens expostas ao ar foi medida com termômetro digital com sonda de penetração Gulterm 180® (Gulton, São Paulo), posicionado no centro geométrico da massa de forragem de cada silo experimental. A temperatura ambiente, tomada como referência foi registrada no mesmo momento das medições de pH e TME.

Nas amostras foram determinados os teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), matéria mineral (MM) AOAC (1990), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), (VAN SOEST et al.; 1991). Também se determinou a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), a digestibilidade *in vitro* da parede celular (DIVPC). A DIVPC foi calculada pela diferença entre a quantidade de FDN incubada e o resíduo que ficou após a determinação da FDN do material incubado.

Para as determinações da DIVMS e DIVPC foram pesados aproximadamente 0,25 g de amostra e colocados e selados em sacos (F57) previamente lavados com acetona e depois incubados a 39,5°C, utilizando incubadora *in vitro* TE-150 (Tecnal ®) de acordo com Goering e Van Soest (1970). O líquido inoculante foi obtido de bovino castrado da raça Holandesa, provido de cânula ruminal recebendo dieta à base de silagem de cana-de-açúcar.

O teor de nutrientes digestíveis totais (NDT) foi estimado pela equação $NDT (\%) = DIVMS + (1,25 * EE) - MM$, (VAN SOEST, 1994) e o de carboidratos não fibrosos (CNF) calculados pela equação $CNF = 100 - (PB + EE + FDN + MM)$, (MERTENS, 1997).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e as análises estatísticas das variáveis foram realizadas por meio de Inferência Bayesiana descrita em Rossi (2011). Foi considerado que a resposta (Y_i) segue distribuição normal, isto é, $Y_i \sim N(\mu_i, \sigma_i^2)$, $i = 1, 2, \dots, n_j$ para os j -ésimos tratamentos. Para cada μ_i e σ_i^2 foram consideradas *a priori* distribuições não informativas, respectivamente, $\mu_i \sim N(0, 10^6)$ e $\sigma_i^2 \sim \text{Gamma}(10^3, 10^3)$. Foram realizadas comparações múltiplas entre as distribuições *a posteriori* das médias e consideraram-se como diferentes, ao nível de 5% de significância, os tratamentos cujos intervalos de credibilidade para as diferenças médias não contemplam o valor 0. Para a regressão linear $Y_i = \beta_0 + \beta_1 \text{ Tratamento}$

+ ε_i , assumindo $\varepsilon_i \sim N(0, \sigma^2)$, foram utilizadas as mesmas especificações nas distribuições *a priori* para os parâmetros.

Para a degradabilidade ruminal da MS e a determinação da porcentagem do desaparecimento da FDN foram utilizados três bovinos, machos castrados, da raça Holandesa, providos de cânula ruminal e peso médio de 420 ± 30 kg. Os animais foram adaptados com silagem de cana-de-açúcar e concentrado por dez dias em dieta que apresentava relação volumoso/concentrado de 70:30 (VANZANT et al., 1998).

A degradabilidade ruminal da MS, das silagens e suas respectivas taxas de degradação foram estimadas pela técnica *in situ*, utilizando-se sacos de náilon medindo de 10 cm x 20 cm, com diâmetro de poros de 53 micra, conforme recomendado por Vanzant et al. (1998). Aproximadamente 6 g de amostras foram colocadas em cada saco, fechando-os e atando-os com elástico de borracha. Nos dias de incubação, os sacos foram presos, a uma barra cilíndrica de ferro inoxidável (600 g) suspensa por uma corrente de 60 cm presa a uma corda de náilon amarrada fora da fístula ruminal.

Os tempos de incubação foram de 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96h e os sacos de náilon foram colocados no rúmen de forma a atingir os tempos desejados, sendo retirados todos ao mesmo tempo.

Após serem retirados do rúmen os sacos de náilon foram imersos em água com gelo para cessar a fermentação microbiana. Em seguida, foram lavados em água corrente pelo tempo de 10 min., juntamente com os sacos de náilon referentes ao tempo 0 de incubação. Após esses procedimentos, todos os sacos de náilon foram colocados em estufa de circulação forçada de ar a 55°C por 72h e, posteriormente foram pesados para obtenção do peso do resíduo seco. Em sequência foi analisado o teor de FDN (VAN SOEST et al.; 1991) do resíduo seco e determinadas as porcentagens de desaparecimento da fibra em detergente neutro.

A degradabilidade da MS foi ajustada por regressão não linear, que prediz a degradabilidade potencial ($y = DP$) dos alimentos por meio do modelo proposto por Mehrez e Ørskov (1977), da seguinte forma:

$$\text{Equação (1): } y_{ijk} = a_{ik} + b_{ik} (1 - e^{-c_{ik}t_j})$$

i-animal : 1, 2, ... , N;

j-tempo : 1, 2, ... , J;

k-tratamento : 1, 2, ... , K;

y é a porcentagem do nutriente degradado após o tempo t (em horas);

a é o intercepto da curva ou a fração solúvel do material contido no saco de náilon;

b é a fração potencialmente degradável do material contido no saco de náilon após o tempo 0;

c é a taxa fracional constante de degradação da fração potencialmente degradável
b;

t é o tempo de incubação no rúmen, em horas.

Para estimar a degradabilidade efetiva (DE) foi usado o modelo de Ørskov e McDonald (1979):

$$\text{Equação (2): } DE = a + \frac{bc}{c + k^*},$$

em que k^* é a taxa de passagem de sólidos no rúmen, cujo valor foi fixado em 2, 5 e 8% por hora.

A modelagem segue a sugestão de um procedimento Bayesiano (ROSSI et al., 2010; ROSSI, 2011), em que foi considerado que as observações seguem distribuição Normal, isto é, $y_i \sim N(f(t_i); \sigma_e^2)$, em que $f(t_i)$ é a função não linear proposta em (1). Para os parâmetros a e b , foram consideradas *a priori* distribuições normais não informativas, isto é: $a, b \sim N(0, 10^6)$ e para c , uma distribuição Gamma também não informativa restrita no intervalo (0,1), isto é: $c \sim \text{Gama}(10^3, 10^3)I_{(0,1)}$. Para σ_e^2 foi assumida uma distribuição Gama, isto é, $\sigma_e^2 \sim \text{Gama}(10^3, 10^3)$. A obtenção das distribuições marginais *a posteriori* para os parâmetros, foi por meio do pacote *BRugs* do programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2012).

Para cada parâmetro, foram gerados 310.000 valores em um processo MCMC (*Monte Carlo Markov Chain*), considerando um período de descarte amostral de 10.000 valores iniciais, assim a amostra final, obtida em saltos a cada 30 valores, contém 10.000 valores gerados. A convergência das cadeias foi verificada por meio do pacote *coda* do programa R, pelo critério de Heidelberger e Welch (1983).

Para comparar os tratamentos, foram realizadas comparações múltiplas entre as distribuições *a posteriori* das médias dos parâmetros de interesse. Consideraram-se como diferentes, ao nível de 5% de significância, os tratamentos cujos intervalos de credibilidade para as diferenças médias não contemplam o valor zero.

Resultados e discussão

Os teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), extrato etéreo (EE), matéria mineral (MM), carboidratos não fibrosos (CNF) e de nutrientes digestíveis totais (NDT) foram influenciados ($P < 0,05$) pela adição de níveis de glicerina às silagens. Observa-se diferença ($P < 0,05$) no teor de MS das silagens de cana-de-açúcar controle e com 5% de glicerina em relação aos demais níveis (Tabela 1).

Comparando o incremento percentual de MS da silagem de cana-de-açúcar com 20% de glicerina em relação ao controle, constata-se aumento de 47% da MS e de 19,82% em relação à silagem com 15% de glicerina.

Tabela 1. Estimativas Bayesianas médias para composição química da silagem de cana-de-açúcar contendo os níveis 0, 5, 10, 15 e 20% de glicerina

Glicerina	Médias (%)							
	MS	PB	FDN	FDA	EE	MM	CNF*	NDT**
0	26,76a	4,02a	77,12a	49,91a	1,15a	3,26a	17,19a	43,73a
5%	28,23a	2,75b	65,64b	41,97b	1,05ab	4,11b	26,46b	50,22b
10%	31,59b	2,94ab	59,19c	36,90c	1,11ab	4,52bc	32,23bc	63,56bc
15%	33,00b	2,51b	55,40 cd	34,18c	1,01ab	5,14bc	35,95bc	60,58c
20%	39,54c	2,72b	50,06 d	30,03c	0,80b	5,44c	41,06c	63,62c

a, b, c, d, Médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes por meio de comparações Bayesianas ($P < 0,05$). *CNF estimado, calculado pela equação $CNF = 100 - (PB + EE + FDN + Cinzas)$, (MERTENS, 1997); **NDT estimado, calculado pela equação $NDT (\%) = DIVMS + (1,25 * EE) - MM$, (VAN SOEST, 1994); Regressões lineares (MS: $y = 25,76 + 0,61T$; $R^2 = 0,78$); (PB: $y = 3,55 + (-0,06)T$; $R^2 = 0,29ns$); (FDN: $y = 74,36 + (-1,29)T$; $R^2 = 0,84$); (FDA: $y = 48,11 + (-0,95)T$; $R^2 = 0,81$); (EE: $y = 1,17 + (-0,02)T$; $R^2 = 0,17NS$); (MM: $y = 3,41 + 0,11T$; $R^2 = 0,71$); (CNF: $y = 19,14 + 1,14T$; $R^2 = 0,87$) e (NDT: $y = 46,32 + 1,00T$; $R^2 = 0,23$).

Esta variação no conteúdo de MS das silagens pode ser explicada pela alta densidade ($1,2613 \text{ g.cm}^{-3}$) da glicerina, além de propriedades higroscópicas que permitem a ligação com as moléculas de água do material ensilado, aumentando a densidade da MS ensilada (IUPAC, 1997).

Houve redução dos valores médios de PB das silagens em relação à silagem controle, fato influenciado pela composição da glicerina, que não possui substâncias nitrogenadas, exercendo, portanto efeito diluidor.

Ávila et al. (2008), avaliando o teor proteico de silagens de cana-de-açúcar com e sem inoculante (*Lactobacillus buchneri*), observaram valores médios 2,58% de PB para silagens testemunha e de 2,56% de PB para as inoculadas, valores semelhantes aos obtidos neste trabalho (Tabela 1).

Os percentuais de FDN e de FDA nas silagens de cana-de-açúcar com glicerina se diminuiram ($P < 0,05$), quando comparados às silagens controle, resultado influenciado pelo tratamento. Comparando-se a silagem controle com silagem adicionada de 20% de glicerina, houve redução de 35% no teor de FDN. Coan et al. (2002), avaliando a composição química da silagem de cana-de-açúcar madura com 12 meses de rebrota, ensilada por 55 dias, relataram diminuição no teor de MS de 27,3 para 20,9%, aumento das concentrações de FDN de 42,1 para 54,95%, e de FDA de 34,9% para 43,8% da silagem em relação à cana-de-açúcar fresca.

As silagens de cana-de-açúcar com 20% de glicerina do presente estudo apresentaram melhor composição química, teor mais elevado de MS (47%), teores mais baixos

de FDA (39,8%) e FDN (35%), em comparação à silagem de cana-de-açúcar sem glicerina. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Dias Júnior et al.(2010) que observaram que a inclusão de glicerol foi efetiva em reduzir o teor de FDN e aumentar o teor de MS das silagens de cana-de-açúcar, demonstrando ser uma estratégia plausível para compensar a perda energética na ensilagem da cana-de-açúcar. Esta alteração na composição química da cana-de-açúcar pode significar aumento na qualidade, uma vez que, segundo Van Soest (1994), os valores dos constituintes da parede celular superiores a 55-60% na MS correlacionam-se negativamente com a ingestão e a digestibilidade da MS.

À medida que aumentou a inclusão de glicerina às silagens observou-se efeito de diluição com redução dos valores de EE ($P<0,05$) em relação ao controle pela baixa quantidade de lipídios da glicerina semipurificada (SCHRÖDER; SÜDEKUM, 1999). No processo de purificação na glicerina bruta, faz-se a separação de glicerol e a retirada de sais minerais, metanol e ácidos graxos. Na glicerina semipurificada ($\pm 80\%$ de glicerol), há pequenas quantidades de ácidos graxos não esterificados que ficam sobrenadantes quando o líquido está em repouso o que facilita a sua retirada juntamente com outras impurezas (OOI et al., 2004). Por outro lado, o menor teor de EE não limita a inclusão de glicerina na silagem para ruminantes, por não oferecer efeitos deletérios na fermentação ruminal ou ocasionar bio-hidrogenação pelos microrganismos do rúmen.

Os valores de MM se elevaram ($P<0,05$) e foram influenciados pela inclusão da glicerina. Este resultado ocorreu pelo teor de cinzas (7,4%) e de sódio (1,3%) da glicerina utilizada neste experimento. O teor elevado de minerais da glicerina é proveniente dos resíduos do processo de transesterificação e purificação da glicerina de biodiesel com metilato de sódio, bases e ácidos. A glicerina semipurificada contém elementos minerais como fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, e sódio que podem ser utilizados como substrato pelos microrganismos do rúmen durante os processos fermentativos (THOMPSON; HE, 2006). O aumento no teor de MM em silagens de cana-de-açúcar é fator positivo, considerando que a cana-de-açúcar naturalmente é pobre em minerais.

O conteúdo de CNF se elevou com a inclusão de glicerina ($P<0,05$) havendo contribuição à qualidade do volumoso em carboidratos rapidamente fermentáveis (Tabela1). Observou-se aumento ($P<0,05$) na densidade energética das silagens de cana-de-açúcar nos níveis 5, 10, 15 e 20% de glicerina. O NDT estimado aumentou influenciado pela adição da glicerina à silagem, chegando a 20 pontos percentuais na silagem com 20% de glicerina em relação à silagem controle. Schroeder e Südekum (1999) estimaram em 1,982 a 2,269 Mcal/kg de energia líquida para lactação da glicerina de biodiesel. Por esse motivo, a glicerina contribuiu positivamente no aumento de energia do material ensilado.

A melhoria na composição química da silagem de cana-de-açúcar com adição de glicerina se deu pelo incremento de CNF, NDT e pela redução dos teores de FDN e de FDA,

resultados que possibilitam compensar perdas de qualidade nos processos de ensilagem e no fornecimento aos animais após a abertura, habilitando a glicerina como um aditivo capaz de enriquecer o material ensilado.

Tabela 2. Estimativas Bayesianas médias para digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e digestibilidade *in vitro* da parede celular (DIVPC) da silagem de cana-de-açúcar com 0, 5, 10, 15 e 20% de glicerina

Digestibilidade	Glicerina				
	0	5%	10%	15%	20%
DIVMS (%)	45,54a	53,03a	56,04ab	64,45bc	68,70c
DIVPC (%)	27,38a	29,29a	37,28b	37,11b	41,52b

a, b, c Médias seguidas de letras diferentes nas linhas são estatisticamente diferentes por meio de comparações Bayesianas ($P < 0,05$). Regressão linear: (DIVMS: $y = 48,27 + 1,13T$; $R^2 = 0,30NS$); (DIVPC: $y = 27,30 + 0,72T$; $R^2 = 0,62$).

A DIVMS para as silagens com 10, 15 e 20% de glicerina foi influenciada pelo tratamento ($P < 0,05$) não havendo diferença entre os níveis 10 e 15% ($P > 0,05$) nem entre as silagens controle e com 5% (Tabela 2).

A digestibilidade é utilizada como variável de qualidade, indicando a proporção do alimento que está apta a ser utilizada pelo animal (VAN SOEST, 1994). A diminuição do valor nutritivo da cana-de-açúcar ensilada foi relatada por Alcântara et al. (1989), que observavam redução na DIVMS de 66,4% para 55,3% quando comparada à cana-de-açúcar *in natura*. Neste estudo, observa-se aumento ($P < 0,05$) da DIVMS da silagem de cana-de-açúcar com 5, 10, 15 e 20% de glicerina em 16,6; 23,3; 41,5 e 50,8% quando comparada ao controle. Kitessa et al. (1999) observaram que a digestibilidade dos nutrientes está estreitamente relacionada ao conteúdo energético dos alimentos utilizados para ruminantes. Possivelmente, os resultados da DIVMS observados (Tabela 2) estão relacionados ao aumento do conteúdo de energia e melhoria da digestibilidade dos materiais ensilados.

A digestibilidade *in vitro* da parede celular aumentou ($P < 0,05$) com a inclusão de glicerina (Tabela 2), não havendo diferença entre os níveis com 10, 15 e 20%. Comparando a silagem controle e a silagem com 20% de glicerina, observou-se aumento de 51,64% da DIVPC, resultado positivo em se tratando de cana-de-açúcar que tradicionalmente apresenta baixos índices de digestibilidade. Trabalhos de pesquisa mostraram que há limitações de consumo de cana-de-açúcar, principalmente, pela baixa digestibilidade da FDN, reduzindo o consumo pelo enchimento do rúmen (MAGALHÃES, 2006), em consequência do acúmulo de fibra indigerível (RODRIGUEZ, 1995).

É provável que as novas proporções de nutrientes observadas neste estudo nas silagens de cana-de-açúcar com glicerina, como redução de FDN, FDA (Tabela 1) e aumento da

DIVPC (Tabela 2), poderiam proporcionar maior ingestão de matéria seca (IMS) e, possivelmente, maior aproveitamento por parte dos animais.

A porção prontamente degradável no rúmen (**a**) das silagens de cana-de-açúcar ($P<0,05$), bem como a fração insolúvel e potencialmente degradável (**b**), ($P<0,05$) foram influenciados pelos níveis de glicerina nas silagens (Tabela 3).

Tabela 3. Estimativas Bayesianas médias para os parâmetros do modelo e da degradabilidade efetiva da matéria seca (DE) para as taxas de passagem de 2, 5 e 8% por hora da silagem de cana-de-açúcar com 0, 5, 10, 15 e 20% de glicerina

Glicerina	Parâmetros						
	<i>a</i> (%)	<i>b</i> (%)	<i>c</i> (%/h)	DE k=2%	DE k=5%	DE k=8%	σ_e
0	17,04a	61,37a	1,24bc	40,96d	29,78e	25,75e	6,43
5%	34,01b	55,00a	1,23bc	55,37c	45,40d	41,79d	5,49
10%	51,43c	33,14bc	1,65c	66,88b	60,54c	57,95c	6,75
15%	54,96d	26,62bd	4,04a	72,08b	66,76b	64,09b	6,93
20%	60,22e	29,91de	2,75b	77,01a	71,20a	68,53a	8,26

a, b, c, d, e Médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes por meio de comparações Bayesianas ($P<0,05$). **a** = porção prontamente degradável no rúmen; **b** = fração insolúvel, mas potencialmente degradável; **c** = taxa constante de degradabilidade da fração *b*/h. DE= degradabilidade efetiva da matéria seca. **k**= é a taxa de passagem de sólidos no rúmen, cujo valor foi fixado em 2, 5 e 8% por hora. σ_e = desvio-padrão do erro.

Aroeira et al.(1996) reportaram que a degradabilidade efetiva (DE) de um alimento pode ser considerada como a energia digerida no rúmen e, portanto, a ingestão de alimentos com maior degradabilidade proporciona maior energia disponível aos microrganismos.

Os constituintes da fibra das forrageiras são de grande importância, porque compreendem a maior fração da matéria seca da planta e constituem a fração da planta menos digerida no trato digestivo e a mais lentamente digerida no rúmen (THIAGO; GILL, 1993). A situação típica para dietas à base de cana-de-açúcar, que tem sido encontrada em vários estudos, está relacionada à baixa taxa de passagem e ao alto tempo de retenção deste alimento e, em virtude disso, ao baixo consumo de MS (PRESTON; LENG, 1978; PRESTON, 1982; MAGALHÃES, 2006). Mesmo com a taxa de passagem mais alta a DE da MS a 2, 5 e 8%/h das silagens com 5, 10, 15 e 20% de glicerina mostraram melhores resultados em relação à silagem controle ($P<0,05$). Os dados (Tabela 3) mostram na silagem com 20% de glicerina maior percentual de porção prontamente degradável no rúmen (**a**), redução na fração insolúvel, mas potencialmente degradável (**b**), combinada com a melhor taxa constante de degradabilidade da fração **b**(**c**%/h). Os resultados aqui observados nas silagens de cana-de-açúcar com glicerina conferem perfil diferente a este volumoso, com maior degradabilidade e taxa de passagem, o que possivelmente proporcionaria maior ingestão de MS pela redução dos percentuais de FDA e FDN ocasionados pela adição da glicerina. Assim, pode-se dizer que a maior degradabilidade

dos nutrientes das silagens com glicerina indicam a maior capacidade de aproveitamento dos alimentos pelos animais em relação ao controle.

Na Figura 1 observa-se que o desaparecimento da matéria seca foi maior quanto maior foi o nível de glicerina adicionado.

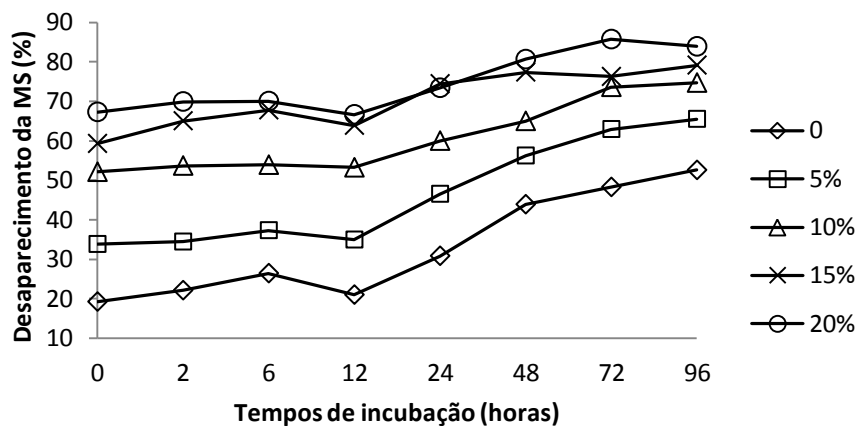


Figura 1. Curvas de desaparecimento ruminal da matéria seca das silagens de cana-de-açúcar, para os níveis 0, 5, 10, 15 e 20% de glicerina, observadas nos tempos de incubação 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96h.

Mesmo nas primeiras horas de incubação, o desaparecimento da MS foi alto, possivelmente pela alta solubilidade da glicerina no meio ruminal, destacando-se o nível com 20% de glicerina que atingiu maior desaparecimento frente aos outros níveis no tempo de 96h de incubação.

Na Figura 2 é mostrado que, nos períodos iniciais, as silagens de cana-de-açúcar com e sem glicerina apresentaram taxas de desaparecimento muito próximas, e que, a partir de 2h de incubação, as taxas de desaparecimento da FDN para as silagens com 10, 15 e 20% de glicerina permaneceram maiores em relação às com 0 e 5% ($P < 0,05$) até 96h de incubação.

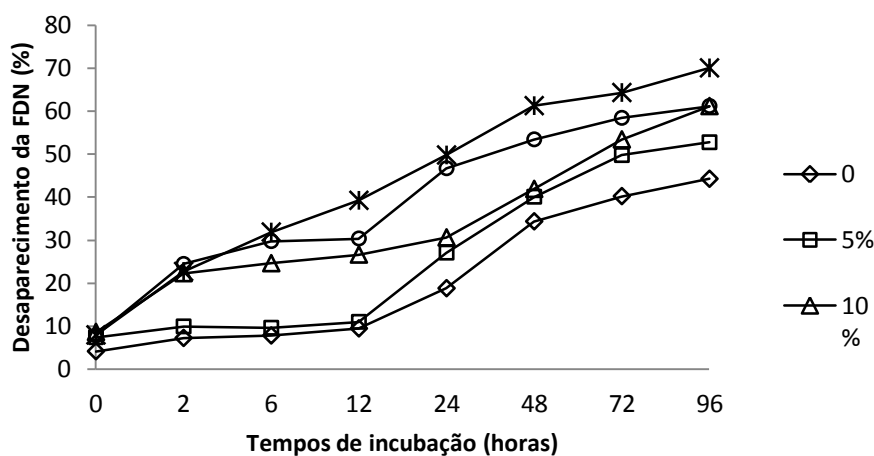


Figura 2. Curvas de desaparecimento da fibra em detergente neutro (FDN) das silagens de cana-de-açúcar, para os níveis 0, 5, 10, 15 e 20% de glicerina, observadas nos tempos de incubação 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96h.

Constata-se que, até 12h de incubação, as silagens controle e com 5% de glicerina apresentaram degradação semelhante e após 12h a silagem de cana-de-açúcar com 5% de glicerina mostrou maior desaparecimento que o controle até 96h de incubação.

Possivelmente, a glicerina contida nas silagens com 10, 15 e 20% proporcionou maior aporte de energia à microbiota do rúmen, potencializando a degradação da FDN. Essa diferença entre as silagens de cana-de-açúcar com e sem glicerina pode constituir-se em importante fator a influenciar o consumo animal, aumentando a taxa de passagem e a ingestão de matéria seca.

Na avaliação da estabilidade aeróbia das silagens, observa-se que após 24h, o pH da silagem controle mostrou elevação que se repetiu nas medições realizadas 48, 72, 96 e 120h, reação diferente à observada nas silagens com glicerina (Figura 3).

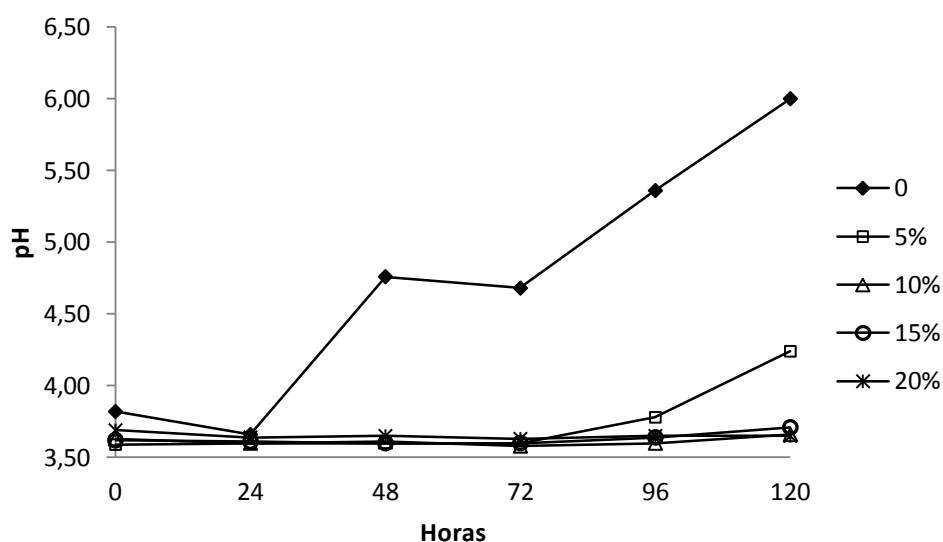


Figura 3. Curvas de pH da silagem de cana-de-açúcar, para os níveis 0, 5, 10, 15 e 20% de glicerina observados as 0, 24, 48, 72, 96 e 120h.

O comportamento da curva dos valores de pH mostra que no período de exposição ao ar, as silagens de cana-de-açúcar com 10, 15 e 20% de glicerina mantiveram o pH baixo por mais tempo ($P < 0,05$). O valor de pH se eleva após a abertura do silo, quando ácidos orgânicos que preservam a silagem são consumidos por microrganismos (PAHLOW et al., 2003).

O tratamento com 5% de glicerina manteve o pH baixo até a observação realizada às 96h de exposição ao ar, evidenciando maior estabilidade da silagem.

Jobim e Gonçalves (2003) alertaram para o efeito deletério da oxigenação da massa ensilada, uma vez que o oxigênio propicia a atuação de microrganismos deterioradores e a redução de açúcares solúveis e ácidos orgânicos, o que resulta em aumento de pH e redução na digestibilidade e no conteúdo de energia. Conseqüentemente, as silagens deterioradas podem conduzir a perdas econômicas elevadas e baixo desempenho animal. Os resultados de pH obtidos indicam que mesmo exposta ao ar a glicerina foi eficiente em preservar os ácidos

orgânicos presentes na silagem de cana-de-açúcar mantendo a acidez entre 3,5 e 4 por mais tempo .

Na Figura 4 observa-se a variação da temperatura da massa ensilada (TME) das silagens de cana-de-açúcar com 0, 5, 10, 15 e 20% de glicerina, medida nos tempos 0, 24, 48, 72, 96 e 120h após a abertura dos silos.

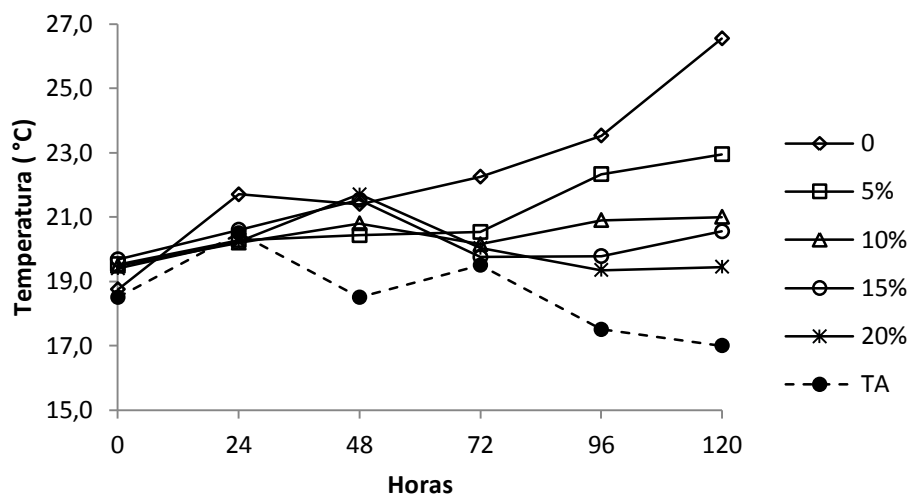


Figura 4. Curvas de temperatura das silagens de cana-de-açúcar, com níveis 0, 5, 10, 15 e 20% de glicerina e curva da temperatura ambiente (TA) medidas após a abertura dos silos nos tempos 0, 24, 48, 72, 96 e 120h.

Observa-se que houve aumento da temperatura da massa ensilada a partir da abertura dos silos em todas as silagens (Figura 4). A estabilidade aeróbia da silagem controle foi quebrada nas primeiras 24h confirmadas pela diferença da TME em relação à temperatura ambiente. A partir de 48h, houve quebra da estabilidade em todos os tratamentos com a maior diferença entre a TME e a temperatura ambiente. Observa-se também que as silagens com 15 e 20% de glicerina, a partir de 48h mostraram queda na TME, indicando que atividades microbiológicas ocorreram em menor intensidade. A menor estabilidade aeróbia foi observada na silagem controle, com grande elevação da TME logo após a exposição ao ar, variando no período observado de 18,75°C (0 hora) a 26,5°C (120h), para uma temperatura ambiente média de 18,5°C, indicando que no período ocorreu grande atividade microbiológica. O aumento da temperatura é resultado do balanço entre a taxa de calor produzida pela atividade microbiana e as perdas de calor por condução, radiação, evaporação e convecção, e está diretamente relacionado à oxidação da matéria seca, que provoca perdas na forma de dióxido de carbono (HILL; LEAVER, 2002).

Os principais microrganismos relacionados à deterioração da silagem exposta ao ar são os fungos, com destaque para as leveduras e as bactérias do gênero *Bacillus* (WOOLFORD, 1990).

Sendo assim, os resultados que constam nas Figuras 3 e 4 indicam que o nível de inclusão de glicerina na ensilagem da cana-de-açúcar influenciou na composição química das silagens, resultando em maior estabilidade aeróbia em relação à silagem controle. Houve necessidade de maior tempo de exposição ao ar para silagens com 10, 15 e 20% de glicerina para se registrar aumentos da TME e de elevação de pH nas 120h de observação. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Krempser et al. (2011), que ao adicionarem 15% de glicerina em base úmida na ensilagem do milho e observaram, no oitavo dia após a abertura, redução do número de unidades formadoras de colônia de bactérias ácido lácticas, leveduras e fungos, em comparação com a silagem de milho sem glicerina. De acordo com estes resultados, possivelmente, a glicerina foi capaz de reduzir a fermentação da silagem na fase aeróbia, após a abertura, por não ser substrato adequado para o desenvolvimento de microrganismos deterioradores.

Conclusões

Conclui-se que a glicerina se mostrou um aditivo eficiente para silagens de cana-de-açúcar, capaz de enriquecer a densidade energética, aumentar a degradabilidade ruminal e a digestibilidade da silagem, além de melhorar a estabilidade aeróbia do material ensilado.

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação – CEAE da Universidade Estadual de Maringá PR UEM, em 20/02/2009.

Referências

- ALCÂNTARA, E.; AGUILERA, A.; ELLIOTT, R.; SHIMADA, A. Fermentation and utilization by lambs of sugarcane harvest fresh and ensiled with and without NaOH: 4. Ruminant kinetics. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, v. 23, p. 323-331, 1989.
- AROEIRA, L. J. M.; LOPES, F. C. F.; DAYRELL, M. S. Degradabilidade de alguns alimentos no rúmen de vacas Holandês/Zebu. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 25, p. 1178-1186, 1996.
- ÁVILA, C. L. S.; PINTO, J. C.; SUGAWARA, M. S.; SILVA, M. S.; SCHWAN, R. F. Qualidade da silagem de cana-de-açúcar inoculada com uma cepa de *Lactobacillus buchneri*. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, Maringá, v. 30, n. 3, p. 255-261, 2008.
- AOAC-ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis*. 15. ed. Washington D.C. 1990. 1141 p.
- BERNARDES, T. F.; SILVEIRA, R. N.; COAN, R. M.; REIS, R. A. Características fermentativas e presença de levedura na cana-de-açúcar crua ou queimada ensilada com aditivo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., 2002, Recife. *Anais...* Recife: SBZ, 2002. CD ROM.
- CHERNEY, J. H.; CHERNEY, D. J. R. Assessing Silage Quality. In: *Silage Science and Technology*. BUXTON, D. R.; MUCK, R.; HARRISON, J. (eds.) ASA, CSSA, and SSSA, Madison, Wisconsin, 2003. p. 141-198.
- COAN, R.; SILVEIRA, R. N.; BERNARDES, T. F.; REIS, R. A.; MORENO, T. T. B.; MOREIRA, A. A. Composição química da cana-de-açúcar crua ou queimada ensilada com aditivo. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., 2002, Recife. *Anais...* Recife: SBZ, 2002. 1CD-ROM.
- DIAS JUNIOR, G. S.; LOPES, N. M.; PESSOA JUNIOR, G.; DE SOUZA SALVATI, G. G.; CARVALHO, B. F.; DA SILVA ÁVILA, C. L.; SCHWAN, R. F.; NOGUEIRA PEREIRA, R. A.; PEREIRA, M. N. Perfil fermentativo, composição e perda de matéria seca de silagem de cana-de-açúcar inoculada com bactérias e contendo glicerina. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 47., 2010 Salvador, *Anais...* Salvador :UFBA, 2010.
- GOERING, H-K.; VAN SOEST, P. J. *Forage fiber analyses (Apparatus, reagents, procedures, and some applications)*. Agriculture Handbook 379. United States Department of Agriculture. Washington, 20p. 1970.
- HEIDELBERGER, P.; WELCH, P. Simulation run length control in the presence of an initial transient. *Operations Research*, Baltimore, v. 31, p. 1109-1144, 1983.
- HILL, J.; LEAVER, J. D. Changes in chemical composition and nutritive value of urea treated whole crop wheat during exposure to air. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, v. 102, p. 181-195, 2002.
- IUPAC-The International Union of Pure and Applied Chemistry. *Compendium of Chemical terminology* 1997. Disponível em: <<http://www.iupac.org/publications/compendium/index.html>>. Acesso em 15 mar. 2007.

- JOBIM, C. C.; GONÇALVES, G. D. Microbiologia de forragens conservadas. In: REIS, R. A.; BERNARDES, T. F.; SIQUEIRA, G. R.; MOREIRA, A. L. (eds.). *Volumosos para produção de ruminantes: Valor alimentício de forragens*. Jaboticabal: FUNEP, 2003. p. 1-26.
- KASS, M.; OLT, A.; KALDMÄE, H.; KOKK, K.; SONGISEPP, E.; OTS, M. Effects of crude glycerol addition on silage fermentation. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE HÄMEENLINNA. 16., Hämeenlinna, *Proceedings...* Hämeenlinna: 2 - 4 July 2012, p. 394-395.
- KITTESSA, S.; FLINN, P. C.; IRISH, G. G. Comparison of methods used to predict the *in vivo* digestibility of feeds in ruminants. *Australian Journal of Agricultural Research*, Victoria, v. 50, n. 5, p. 825-841, 1999.
- KREMPSE, P. M.; LOPES, R. P. X.; RIBEIRO, M. T.; LIMA, J. C. F.; OLIVEIRA, J. S. ; CARNEIRO, J. C. Microbiological evaluation of aerobic stability of corn silage with increasing levels of glycerin. In: ZOPOLLATTO, M.; DANIEL, J.L.P.; NUSSIO, L.G.; NETO, A. S. (eds.). FORAGE QUALITY AND CONSERVATION. 2., 2011, São Pedro. *Proceedings...* São Pedro: 2011.
- LENG, R. A. Limitaciones metabólicas en la utilización de la caña de azúcar y sus derivados para el crecimiento y producción de leche en rumiantes. In: PRESTON, T. R.; ROSALRS, M. (Ed.). *Sistemas intensivos para la producción animal y de energía renovable con recursos tropicales*. Cali: CIPAV, 1988. p. 1-24.
- MAGALHÃES, A. L. R.; CAMPOS, J. M. S.; CABRAL, L. S.; MELLO, R.; FREITAS, J. A.; TORRES, R. A.; FILHO, S. C. V.; ASSIS, A. J. Cana-de-açúcar em substituição à silagem de milho em dietas para vacas em lactação: parâmetros digestivos e ruminais. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 35, p. 591-599, 2006.
- MATSUOKA, S.; HOFFMAN, H. P. Variedades de cana-de-açúcar para bovinos. In: SIMPOSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 5., 1993, Piracicaba. *Anais...* Piracicaba: FEALQ, 1993. p. 17-35.
- McDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. *The biochemistry of silage*. 2. ed. Marlow: Chalcomb Publishing, 1991. 340 p.
- MEHREZ, A. Z.; ØRSKOV, E. R. A study of the artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. *The Journal of Agricultural Science*, Cambridge, v. 88, p. 645-650. 1977.
- MERTENS, D. R. Creating a System for Meeting the Fiber Requirements of Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, Champaign, n. 80, p. 1463-1481, 1997.
- NUSSIO, L. G.; RIBEIRO, J. L.; PAZIANI, S. F.; NUSSIO, C. B. Fatores que interferem no consumo de forragens conservadas. In: VOLOMOSO NA PRODUÇÃO DE RUMINANTES: VALOR ALIMENTÍCIO DE FORRAGENS. Jaboticabal: Funep, 2003. p. 27-50.
- OLIVEIRA, J. S.; LOPES, R. P. X.; RIBEIRO, M. T.; LIMA, J. C. F.; KREMPSE, P. M.; CARNEIRO, J. C. 2011. Temperature evaluation on aerobic stability of corn silage with increasing levels of glycerin. In: ZOPOLLATTO, M.; DANIEL, J. L. P.; NUSSIO, L. G.; NETO, A. S. (eds.). FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 2., 2011, São Pedro. *Proceedings...* São Pedro: 2011.
- OOI, T. L.; YONG, K. C.; HAZIMAH, A. H.; DZULKEFLY, K.; WAN-YUNUS, W. M. Z.; Glycerol Residue - A Rich Source of Glycerol and Medium Chain Fatty Acids. *Journal of Oleo Science*, Utsunomiya, v. 53, p. 29-33, 2004.
- ØRSKOV, E. R.; McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubations measurements weighted according to the rate of passage. *Journal of Agricultural Science*, Cambridge, v. 92, n. 2, p. 499-503, 1979.

- PAHLOW, G.; MUCK, R. E.; DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; SPOELSTRA, S. F. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Eds.). *Silage science and technology*. Madison: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, 2003. p.31-94.
- PRESTON, T. R.; HINOJOSA, C.; MARTINEZ, L. Ensiling of sugar cane with ammonia molasses and mineral acids. *Tropical Animal Production*, Santo Domingo, v. 1, n. 2, p. 120-126, 1976.
- PRESTON, T. R.; LENG, R. A. La caña de azúcar como alimento para los bovinos. *Revista Mundial de Zootecnia*, Roma, n. 27, p.7-12, 1978
- PRESTON, T. R. Nutritional limitations associated with the feeding of tropical forages. *Journal of Animal Science*, Champaign, v.54, n. 4, p. 877-883, 1982.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM (2012). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Áustria. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em <<http://www.R-project.org>>.
- RODRIGUEZ, N. M. Pesquisas sobre dinâmica da fermentação ruminal e partição da digestão realizadas no Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária da UFMG. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE EXIGÊNCIAS NUTRICIONAIS DE RUMINANTES, 1995, Viçosa, *Anais...* Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1995. p. 355-388.
- ROSSI, R. M. *Introdução aos métodos Bayesianos na análise de dados zootécnicos com uso do WinBUGS e R*. Eduem, Maringá, 2011. 191p.
- ROSSI, R. M.; GUEDES, T. A.; MARTINS, E. N.; JOBIM, C. C. Bayesian analysis for comparison of nonlinear regression model parameters: an application to luminal degradability data. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 39, n. 2, p. 419-424, 2010.
- SCHRÖDER, A.; SÜDEKUM, K.-H. Glycerol as a by-product of biodiesel production in diets for ruminants. In: INTERNATIONAL RAPESEED CONGRESS, 10., 1999, Canberra. *Proceedings...* Canberra: Regional Institute, 1999. paper 241. Disponível em:<<http://www.regional.org.au/au/gcirc/1/241.htm>> Acesso em 05 maio 2008.
- THIAGO, L. R. L. S.; GILL, M. *Consumo voluntário: fatores relacionados com a degradação e passagem da forragem pelo rúmen*. Campo Grande: Embrapa-CNPQC, 1993. 65p.
- THOMPSON, J. C.; HE, B. B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. *Applied Engineering in Agriculture*, St. Joseph, v. 22, n. 2, p. 261-265, 2006.
- VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 74, p. 3583-3597, 1991.
- VAN SOEST, P. J. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2.ed. New York: Cornell University Press, 1994. 476p.
- VANZANT, E. S.; COCHRAN R. C.; TITGEMEYER E. C. Standardization of *in situ* techniques for ruminant feedstuff evaluation. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 76, p. 2717-2729, 1998.
- WOOLFORD, M. K. The detrimental effects of air on silage. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v. 68, p. 101-116, 1990.

IV - Composição nutricional e degradabilidade ruminal da silagem de milho (*Zea mays* L.) com adição de glicerina na ensilagem

Resumo

Objetivou-se estudar a silagem de milho com adição de 0, 5, 10, 15 e 20% de glicerina, ensilada em silos experimentais de PVC. Na abertura dos silos foi avaliada a estabilidade aeróbia por medidas de temperatura e pH da massa ensilada nos tempos 0, 24, 48, 72, 96 e 120h. Avaliou-se a composição química e estimou-se o teor de carboidratos não fibrosos (CNF) e nutrientes digestíveis totais (NDT). Em incubadora artificial avaliou-se a digestibilidades *in vitro* da matéria seca (DIVMS), a digestibilidades *in vitro* da parede celular (DIVPC). Em três bovinos fistulados avaliou-se a degradabilidade *in situ* da matéria seca, e a porcentagem de desaparecimento da proteína bruta e da fibra em detergente neutro em amostras em 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96h. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e as análises estatísticas foram realizadas por meio de Inferência Bayesiana. Observaram-se aumentos nos teores de MS, CNF, matéria mineral e a redução de fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido, proteína bruta e extrato etéreo à medida que a inclusão da glicerina foi maior. O teor de NDT estimado nas silagens com 5, 10, 15 e 20% de glicerina, foram superiores ao controle ($P<0,05$) variando de 2,13; 8,95; 10,33 e 13,13%, respectivamente. A temperatura e o pH da massa ensilada com 10, 15 e 20% de glicerina se mantiveram inferiores ($P<0,05$) aos com 0 e 5% de glicerina no período avaliado, sendo que a silagem com 20% de glicerina revelou maior estabilidade até 120h. A DIVMS e DIVPC nas silagens com 15 e 20% foram superiores ($P<0,05$) as com 0, 5 e 10% de glicerina. A degradabilidade efetiva da matéria seca nas taxas de passagem de 2, 5 e 8%/h foram melhores na silagem com 15 e 20% de glicerina ($P<0,05$). A glicerina demonstrou ser um aditivo capaz de enriquecer a densidade energética, melhorar a degradabilidade ruminal da MS e manter a estabilidade aeróbia nas silagens de milho.

Palavras-chave: digestibilidade da matéria seca, energia, estabilidade aeróbia, glicerol, pH, temperatura

Nutritional composition and ruminal degradability of corn silage (*Zea mays* L.) with addition of glycerol levels in silage

Abstract

The study was developed with the purpose of studying ensiled corn silage with 0, 5, 10, 15 and 20% of glycerin in experimental PVC silos. Aerobic stability was assessed by pH measurements and silage temperature (ST) at 0, 24, 48, 72, 96 and 120h. The chemical composition, non-fiber carbohydrates (NFC) and total digestible nutrients (TDN) were evaluated. The *in vitro* digestibility of dry matter (IVDDM) and the *in vitro* digestibility of the cell wall (IVDCW) were assessed. In three fistulated cattle, the *in situ* degradability of dry matter (DM), and the disappearance percentage of crude protein (CP) and neutral detergent fiber (NDF) in samples incubated at 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 hours were evaluated. The experimental design was completely randomized and statistical analyzes were done using Bayesian inference. Increases were observed in the MS, CNF, mineral matter and a reduction in the NDF, CP, acid detergent fiber, and ether extract as the inclusion of glycerin was higher. The silages TDN with 5, 10, 15 and 20% of glycerin were higher than the control ($P < 0.05$) with values ranging from 2.13, 8.95, 10.33 and 13.13%, respectively. The silage pH and ST with 10, 15 and 20% of glycerin remained lower ($P < 0.05$) in contrast with those with 0 to 5% of glycerin during the experiment period, and the silage with 20% of glycerin showed higher stability up to 120h. IVDDM and IVDCW in the silages with 15 and 20% of glycerin were higher ($P < 0.05$) than the ones with 0, 5 and 10%. The effective degradability of dry matter in the passage rates of 2, 5 and 8% / h were better in the silages with 15 and 20% of glycerin ($P < .05$). Glycerin proved to be an additive capable of enriching energy density, improve the degradability of DM and maintain aerobic stability in corn silage.

Key words: energy, glycerol, *in vitro* digestibility, non-fibrous carbohydrates, silage pH, silage temperature

Introdução

A conservação de forragens é uma eficiente estratégia utilizada pelas cadeias produtivas de bovinos de corte e leite, não só para atender as demandas dos bovinos em períodos de escassez na seca e inverno, mas também para melhorar a densidade energética das dietas, refletindo assim em melhorias na produtividade. A silagem de milho, mais difundida entre produtores de leite, está cada vez mais presente nas propriedades de gado de corte, utilizada para suplementação de todo o rebanho, inclusive, nas fases de cria, crescimento e de engorda.

O milho é uma das plantas mais utilizadas para ensilagem, por sua produtividade, adaptação a praticamente todos os climas e solos, ótimo teor de matéria seca e de carboidratos solúveis que conferem condições ideais para sua conservação sob a forma de silagem (ALMEIDA, 2000), produzindo alimento de qualidade e de boa aceitação pelos animais. A silagem de milho possui alto valor energético quando comparada a outros materiais sendo um volumoso estratégico para vacas de alta produção de leite.

Vacas leiteiras com produções elevadas de leite, no início da lactação, não são capazes de consumir energia suficiente levando-as à mobilização de reservas corporais na tentativa de suprir esse déficit. Porém, a mobilização de tecido adiposo em excesso, pode ocasionar desordens metabólicas, como cetose e fígado gorduroso (NRC, 2001).

Pela redução da IMS no período de transição, é necessária uma dieta com alta densidade energética e proteica, para atender às demandas desse período e reduzir o risco de distúrbios metabólicos (NRC, 2001), mesmo com o consumo de alimentos reduzido.

Para formular a dieta de alta densidade de energia, é necessário o uso de carboidratos rapidamente fermentáveis, proporcionando o aumento da formação do propionato, estimulando a produção da insulina, para reduzir a mobilização do tecido adiposo, minimizando os distúrbios metabólicos comuns durante esse período (GRUMMER, 1995). Entretanto, fornecimento de quantidades muito elevadas de concentrados para vacas em início de lactação pode acarretar problemas como redução no teor de gordura do leite, acidose, depressão na digestibilidade da fibra e queda do consumo de matéria seca (VAN SOEST, 1994).

Suplementos lipídicos têm sido usados em dietas para animais lactantes com os objetivos de aumentar a produção de leite e reduzir a mobilização corpórea de gordura. A maioria dos alimentos utilizados no arraçãoamento de ruminantes contém baixas proporções de lipídios, com valores que variam de 1 a 4% da MS (VAN SOEST, 1994).

Palmquist e Jenkins (1980) sugeriram que a inclusão dos lipídios em dietas para ruminantes seja limitada em até 5% da MS total, visto que os microrganismos ruminais não possuem mecanismos fisiológicos para digeri-los eficientemente. Um dos principais efeitos deletérios da inclusão de elevadas concentrações de lipídios é a redução na digestão ruminal da

fibra (WETTSTEIN et al., 2000). Para minimizar estes efeitos, tem-se sugerido o uso de gorduras ruminalmente inertes que podem incrementar a ingestão de energia sem afetar negativamente a digestibilidade ruminal da fibra dietética (NOCEK, 1995).

Uma boa alternativa à gordura e aos carboidratos rapidamente fermentáveis para aumentar a densidade energética da dieta de ruminantes pode ser a glicerina. Südekum (2008) sugeriu que o glicerol poderia substituir carboidratos rapidamente fermentáveis e que o sabor doce pode melhorar a ingestão de dietas com palatabilidade inferior contendo como, por exemplo, silagens extensivamente fermentadas. O mesmo autor estimou em aproximadamente 9,5 MJ/kg (2,27Mcal/kg) de energia líquida para lactação.

Abo El-Nor (2010), em ensaios de digestibilidade *in vitro*, substituindo milho por glicerol na dieta em 0, 36, 72 e 108 g / kg MS, não observou mudanças no pH dos fermentadores artificiais. Esta é mais uma característica importante da glicerina que a posiciona, possivelmente na classe de carboidratos rapidamente fermentáveis de alto conteúdo energético sem amido que não promove a queda de pH ruminal, comum à carboidratos ricos em amido .

A pesquisa da utilização de glicerina de biodiesel como componente na alimentação animal tem avançado muito, embora não seja uma prática nova. Em vista da alta produção de biodiesel e de excedentes de glicerina, coproduto de alto conteúdo energético, sua adição nas silagens de milho, poderia compensar as perdas energéticas ocasionadas pelo processo da ensilagem (DIAS JUNIOR et al., 2010).

Kass et al. (2012) e Krempser et al. (2011) observaram que há poucos experimentos relativos a silagens de milho com adição de glicerina de biodiesel. Mesmo com as ótimas características nutricionais do milho, a forma como é realizada a ensilagem pode alterar o seu valor nutritivo em função das perdas que ocorrem durante o processo fermentativo e na fase de utilização após a abertura do silo.

Na fase de utilização, o material ensilado fica exposto ao oxigênio o que propicia a atuação de microrganismos deterioradores, reduzindo açúcares solúveis e o ácido lático, o que resulta em aumento de pH, redução na digestibilidade e do conteúdo de energia (JOBIM; GONÇALVES, 2003). Krempser et al. (2011), ao avaliarem silagem de milho com glicerol relataram que houve redução de UFC (unidades formadoras de colônias) de vários microrganismos, e Oliveira et al. (2011) observaram que aumentou a estabilidade aeróbia na silagem de milho com adição de glicerina.

Estudos complementares sobre valor nutricional, estabilidade aeróbia, perdas de matéria seca, e perfil fermentativo de silagens com adição de glicerina de biodiesel são necessários para possibilitar sua melhor aplicação na alimentação de ruminantes. Neste trabalho, objetivou-se estudar os efeitos da inclusão de cinco níveis de glicerina semipurificada (0, 5, 10, 15 e 20%) na ensilagem de milho, avaliando a composição químico-bromatológica e a estabilidade aeróbia das silagens.

Material e métodos

O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental de Iguatemi- Universidade Estadual de Maringá (UEM), Paraná, localizada a 23°25' de latitude Sul, a 51°57' de longitude Oeste de Greenwich e 550 m de altitude e as análises químicas foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da UEM (LANA) entre outubro de 2011 e maio de 2012.

O milho, híbrido Coodetec -CD 250 RR, foi plantado, com densidade de 60 mil plantas/ha e com adubação segundo análises de solo.

O corte foi realizado com ensiladeira, modelo JF 92Z10, regulada para tamanho médio de partícula de 10 mm. Após o corte, em 16/03/2011, o material foi levado a um galpão coberto, cimentado e forrado com lona plástica, onde foi distribuído em cinco montes. Em seguida foi adicionada a glicerina semipurificada de biodiesel na proporção de 0, 5,10, 15 e 20 % (base na massa verde) e homogeneizada manualmente.

O material foi ensilado em silos experimentais de PVC com 20 cm de diâmetro por 40 cm de altura, compactados para massa específica de 600 kg/m³ e depois fechados com lona plástica de polipropileno e lacrados com fita adesiva.

Foram feitas quatro repetições para cada nível de inclusão de glicerina, totalizando 20 silos experimentais, que foram armazenados em galpão coberto por 68 dias.

A glicerina de média pureza, proveniente da produção de biodiesel de óleo de soja foi adquirida na empresa TCS-Meridional (Ponta Grossa PR) e analisada pelo Instituto de Tecnologia do Paraná – Divisão de Biocombustíveis (Tecpar), Curitiba. A composição química da glicerina utilizada na silagem continha: 82,54% de glicerol, 10,23% de água, 120ppm de metanol, 1,3% de sódio, 7,4% de cinzas e pH 5,8.

Após o período de 68 dias de armazenagem, os silos foram abertos e desprezados 15 cm da parte superior. De cada silo, coletou-se uma amostra de 1 kg, sendo secas em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72h e moídas em peneira com malha de 2 mm em moinho “Willey”, e armazenados em potes plásticos herméticos, identificados para análises posteriores.

As silagens de milho restante nos silos ficaram expostas ao ar, cobertas com tecido tipo filó, onde se realizaram a leitura dos valores de potencial hidrogeniônico (pH) e da temperatura da massa ensilada (TME). As medições de pH e TME foram realizadas na abertura dos silos e depois a cada 24h nos tempos: 0, 24, 48, 72, 96 e 120h, para avaliar a estabilidade aeróbia do material. O pH foi medido com uso de peagâmetro digital de bancada a partir de extrato aquoso da silagem (CHERNEY; CHERNEY, 2003). A TME das silagens expostas ao ar foi medida com termômetro digital com sonda de penetração Gulterm 180® (Gulston, São Paulo), posicionado no centro geométrico da massa de forragem de cada silo experimental. A

temperatura ambiente, tomada como referência foi registrada no mesmo momento das medições de pH e TME.

Nas amostras foram determinados os teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), matéria mineral (MM) AOAC (1990), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), (VAN SOEST et al.; 1991). Também se determinou a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), a digestibilidade *in vitro* da parede celular (DIVPC). A DIVPC foi calculada pela diferença entre a quantidade de FDN incubada e o resíduo que ficou após a determinação da FDN do material incubado.

Para as determinações da DIVMS e DIVPC foram pesados aproximadamente 0,25g de amostra e colocados e selados em sacos (F57) previamente lavados com acetona e depois incubados a 39,5°C, utilizando incubadora *in vitro* TE-150 (Tecnal ®) de acordo com Goering e Van Soest (1970). O líquido inoculante foi obtido de bovino castrado da raça Holandesa, provido de cânula ruminal recebendo dieta à base de silagem de milho.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e as análises estatísticas das variáveis foram realizadas por meio de Inferência Bayesiana descrita em Rossi (2011). Foi considerado que a resposta (Y_i) segue distribuição de Normal, isto é, $Y_i \sim N(\mu_i, \sigma_i^2)$, $i = 1, 2, \dots, n_j$ para os j -ésimos Tratamentos. Para cada μ_i e σ_i^2 foram consideradas *a priori* distribuições não informativas, respectivamente, $\mu_i \sim N(0, 10^6)$ e $\sigma_i^2 \sim \text{Gamma}(10^3, 10^3)$. Foram realizadas comparações múltiplas entre as distribuições *a posteriori* das médias. Considerando-se o nível de 5% de significância, os tratamentos cujos intervalos de credibilidade para as diferenças médias não contemplam o valor zero, não foram significativos. Para a regressão linear $Y_i = \beta_0 + \beta_1 \text{Tratamento} + \varepsilon_i$, assumindo $\varepsilon_i \sim N(0, \sigma^2)$, foram utilizadas as mesmas especificações nas distribuições *a priori* para os parâmetros.

A obtenção das distribuições marginais *a posteriori* para todos os parâmetros foi por meio do pacote BRugs do programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2012). Foram gerados 510.000 valores em um processo MCMC (*Monte Carlo Markov Chain*), e, considerando um período de descarte amostral de 10.000 valores iniciais. Assim, a amostra final retiradas em saltos de tamanho 10 contém 50.000 valores gerados. A convergência das cadeias foi verificada por meio do critério de Heidelberger e Welch (1983) no pacote *coda* do R.

A degradabilidade ruminal da MS, e determinação da porcentagem do desaparecimento da PB e FDN foram utilizados três bovinos, machos castrados, da raça Holandesa, providos de cânula ruminal e peso médio de 420 ± 30 kg. Os animais foram adaptados com silagem de cana-de-açúcar e concentrado por dez dias em dieta que apresentava relação volumoso/concentrado de 70:30 (VANZANT et al., 1998).

A degradabilidade ruminal da MS, das silagens e suas respectivas taxas de degradação foram estimadas pela técnica *in situ*, utilizando-se sacos de náilon medindo de 10 cm x 20 cm, com diâmetro de poros de 53 micra, conforme recomendado por Vanzant et al.

(1998). Aproximadamente 6 g de amostras foram colocadas em cada saco, fechando-os e atando-os com elástico de borracha. Nos dias de incubação, os sacos foram presos a uma barra cilíndrica de ferro inoxidável (600 g) suspensa por uma corrente de 60 cm presa a uma corda de náilon amarrada fora da fístula ruminal.

Os tempos de incubação foram de 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96h e os sacos de náilon foram colocados no rúmen de forma a atingir os tempos desejados, sendo retirados todos ao mesmo tempo. Após serem retirados do rúmen, os sacos de náilon foram imersos em água com gelo para cessar a fermentação microbiana. Em seguida, foram lavados em água corrente pelo tempo de 10 min., juntamente com os sacos de náilon referentes ao tempo 0 de incubação. Após esses procedimentos, todos os sacos de náilon foram colocados em estufa de circulação forçada de ar a 55°C por 72h e, posteriormente foram pesados para obtenção do peso do resíduo seco. Em sequência foi analisado o teor de FDN (VAN SOEST et al.; 1991) e de PB (AOAC, 1990) do resíduo seco e determinadas as porcentagens de desaparecimento da fibra em detergente neutro e da proteína bruta.

A degradabilidade da MS, da silagem de milho foi ajustada por regressão não linear, que prediz a degradabilidade potencial ($y = DP$) dos alimentos por meio do modelo proposto por Mehrez e Orskov (1977), da seguinte forma:

$$\text{Equação (1): } y_{ijk} = a_{ik} + b_{ik}(1 - e^{-c_{ik}t_j}),$$

i-animal : 1, 2, ... , N;

j-tempo : 1, 2, ... , J;

k-tratamento : 1, 2, ... , K;

y é a percentagem do nutriente degradado após o tempo t (em horas);

a é o intercepto da curva ou a fração solúvel do material contido no saco de náilon;

b é a fração potencialmente degradável do material contido no saco de náilon após o tempo 0;

c é a taxa fracional constante de degradação da fração potencialmente degradável b ;

t é o tempo de incubação no rúmen, em horas.

Para estimar a degradabilidade efetiva (DE) foi usado o modelo de Orskov e McDonald (1979):

$$\text{Equação (2): } DE = a + \frac{bc}{c + k^*},$$

em que k^* é a taxa de passagem de sólidos no rúmen, cujo valor foi fixado em 2, 5 e 8% por hora.

A modelagem segue procedimento Bayesiano (ROSSI et al., 2010; ROSSI, 2011), em que foi considerado que as observações seguem distribuição Normal, isto é, $y_i \sim N(f(t_i); \sigma_e^2)$, em que $f(t_i)$ é a função não linear proposta em (1).

Para os parâmetros a e b , foram consideradas *a priori* distribuições normais não informativas, isto é: $a, b \sim N(0, 10^6)$ e para c , uma distribuição Gamma também não informativa restrita no intervalo (0,1), isto é: $c \sim \text{Gama}(10^3, 10^3)I_{(0,1)}$.

Para σ_e^2 foi assumida uma distribuição Gama, isto é, $\sigma_e^2 \sim \text{Gama}(10^3, 10^3)$. A obtenção das distribuições marginais *a posteriori* para os parâmetros, foi por meio do pacote *BRugs* do programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2012).

Para cada parâmetro, foram gerados 310.000 valores em um processo MCMC (*Monte Carlo Markov Chain*), considerando um período de descarte amostral de 10.000 valores iniciais. Assim, a amostra final obtida em saltos a cada 30 valores, contém 10.000 valores gerados. A convergência das cadeias foi verificada por meio do pacote *coda* do programa R, pelo critério e de Heidelberger e Welch (1983).

Para comparar os tratamentos, foram realizadas comparações múltiplas entre as distribuições *a posteriori* das médias dos parâmetros de interesse. Consideraram-se como diferentes, ao nível de 5% de significância, os tratamentos cujos intervalos de credibilidade para as diferenças médias não contemplam o valor zero.

Resultados e discussão

Na abertura dos silos foram tomadas as temperaturas da massa ensilada (TME) e medido o pH e a temperatura ambiente nos tempos 0, 24, 48, 72, 96 e 120h para avaliar a estabilidade aeróbia das silagens de milho com e sem glicerina após a exposição ao ar, e, os resultados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Estimativas Bayesianas para médias e desvio-padrão de pH e temperatura da silagem de milho com e sem de glicerina, nos tempos 0, 24, 48, 72, 96 e 120h

Ítem	Glicerina				
	0	5%	10%	15%	20%
TME (°C)	21,72a (a)	21,52ac (a)	20,04bc (b)	20,05b (b)	19,74b (b)
(Desvio-padrão)	0,5103	0,6952	0,3137	0,2340	0,2552
pH	4,803a	3,990ab	3,810b	3,702b	3,582b
(Desvio-padrão)	0,4298	0,3016	0,1286	0,0946	0,0741

a, b, c Médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes por meio de comparações Bayesianas ($P < 0,05$). pH=potencial hidrogeniônico.

Na avaliação da estabilidade aeróbia das silagens constatou-se que as temperaturas médias das silagens com 10,15 e 20% de glicerina se mantiveram inferiores ($P<0,05$) aos níveis 0 e 5% de glicerina, destacando-se o nível com 20% de glicerina que se manteve estável no período avaliado (Figura1). A temperatura média da massa ensilada da silagem de milho controle foi 1,98°C mais elevada que temperatura média da silagem de milho com 20% de glicerina. Estes resultados indicam que, possivelmente, houve menor ação de microrganismos deterioradores comuns na fase de exposição ao ar (JOBIM; GONÇALVES, 2003) e, portanto menor produção de calor na massa ensilada. Os resultados estão de acordo com os obtidos por Oliveira et al. (2011) que, ao comparar níveis de 0, 5, 10 e 15% de glicerina nas silagens de milho, obtiveram melhor estabilidade aeróbia nos materiais com 15% de glicerina.

Na Figura 1 observa-se que houve aumento da temperatura das silagens de magnitude semelhante até 24h de exposição ao ar.

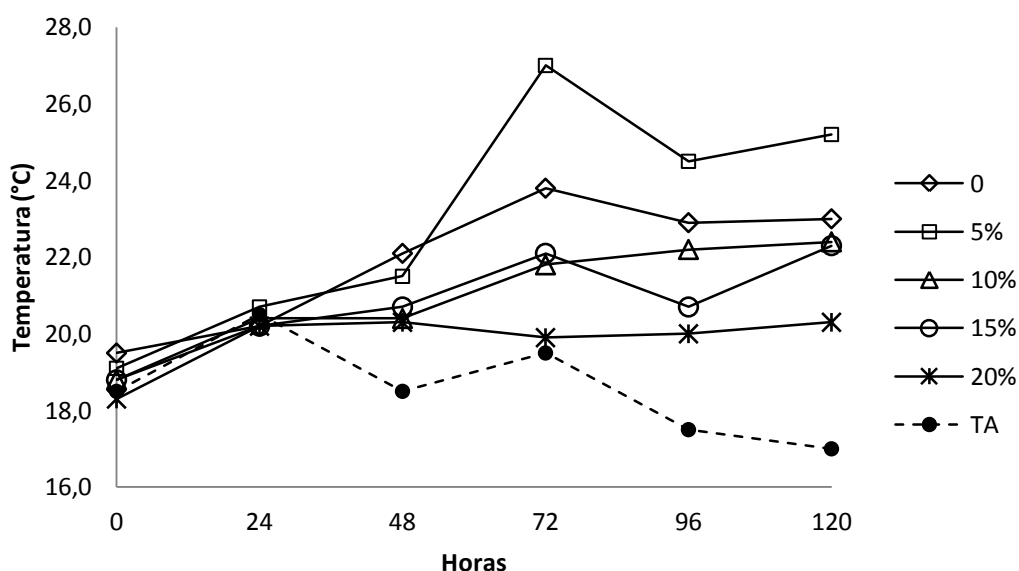


Figura 1. Curvas de temperatura das silagens de milho expostas ao ar, para os níveis 0, 5, 10, 15 e 20% de glicerina e curva da temperatura ambiente (TA) medidas 0, 24, 48, 72, 96 e 120h.

A partir desse ponto, as silagens controle e com adição de 5% de glicerina apresentaram maior taxa de aquecimento em relação às demais silagens. Já a silagem de milho com adição de 20% de glicerina manteve a temperatura estável no período observado de 120h.

Os valores médios de pH também se mantiveram menores ($P>0,05$) nas silagens de milho com 10, 15 e 20% de glicerina, em relação ao controle, porém sem diferença em relação ao nível com 5% de glicerina. As silagens com 10, 15 e 20% mantiveram o pH mais baixo que o controle e 5% de glicerina, possivelmente pela menor atividade de microrganismos aeróbios que invariavelmente provocam a elevação do pH como resultado do consumo de ácido láctico. De acordo com McDonald et al. (1991), a degradação do ácido láctico provoca um aumento no pH da silagem que, por sua vez, provoca o crescimento de muitos outros organismos de deterioração.

O resultado é coerente com o observado na temperatura da massa ensilada que também apresentou menor variação (Figura 1). Este fato ocorreu possivelmente por ter havido menor ação das leveduras e menor uso do ácido láctico, mantendo o pH baixo no período avaliado. As leveduras são microrganismos anaeróbios facultativos e em condições aeróbicas, muitas espécies degradam o ácido láctico a gás carbônico (CO₂) e água (H₂O) (McDONALD et al, 1991). Os resultados deste trabalho estão de acordo com os obtidos por Krempser et al. (2011) que registraram menor número de unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias ácido lácticas, leveduras e fungos nas silagens de milho com 15% de glicerina em relação ao controle.

Na Figura 2 observa-se que as silagens controle e com adição de 5% de glicerina mostraram elevação de pH acentuada após 48h de exposição ao ar. A elevação do pH nos níveis com 10 e 15% de glicerol foi observada somente após 72h, sendo que a silagem com 20% de glicerina manteve o pH baixo até o sexto dia de observação.

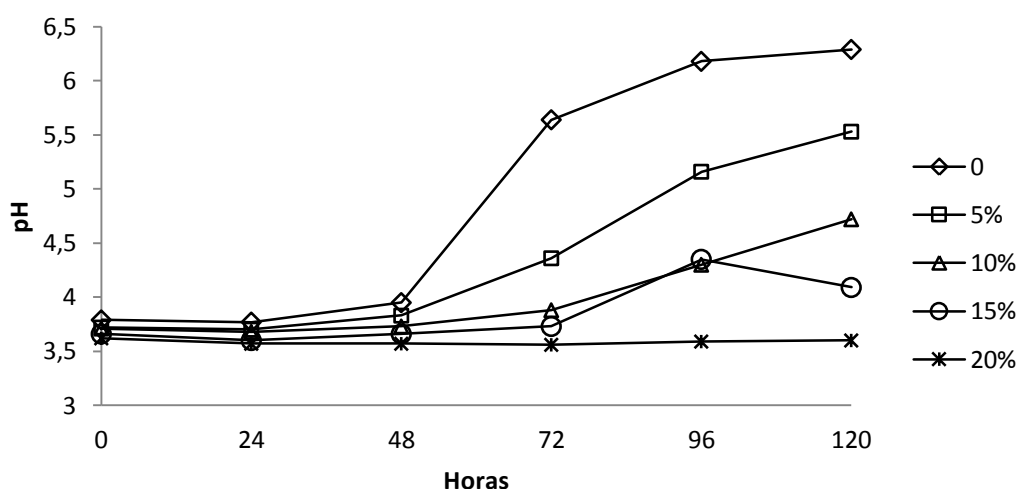


Figura 2. Curvas de pH da silagem de milho exposta ao ar, para os níveis 0, 5, 10, 15 e 20% de glicerina observados nos tempos 0, 24, 48, 72, 96 e 120h.

É possível inferir que as silagens com 10, 15 e 20% de glicerina, quando expostas ao ar, tiveram menores perdas de açúcares solúveis e de ácido láctico e, por consequência, menores alterações na digestibilidade e no conteúdo de energia.

Os resultados encontrados no presente estudo indicam que as silagens de milho com 10, 15 e 20% de glicerina foram eficientes em manter o pH mais ácido e a estabilidade aeróbia do material ensilado após a abertura. Esse comportamento, possivelmente, é pela glicerina não se constituir em um bom substrato para o desenvolvimento de leveduras, fungos e outros microrganismos deterioradores da silagem.

Na composição química da silagem de milho com vários níveis de glicerina (Tabela 2), observou-se que os teores de MS, CNF, NDT e de MM aumentaram com a adição

de níveis crescentes de glicerina. Por outro lado, os teores de PB, fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido e extrato etéreo decresceram.

Tabela 2. Estimativas Bayesianas para as médias da composição química da silagem de milho com 0, 5, 10, 15 e 20% de glicerina

Glicerina	Médias (%)							
	MS	PB	FDN	FDA	EE	MM	CNF*	NDT**
0	31,59c	6,15a	52,60a	30,32a	2,54a	3,13c	35,99a	76,54a
5%	34,36c	5,39a	47,74a	29,44a	1,99abc	4,21b	40,83a	78,17a
10%	36,84b	5,09a	44,49ab	23,32b	2,01b	4,26ab	44,21ac	83,39b
15%	39,96ab	4,51b	38,51bc	20,88c	1,71bc	4,63a	50,64bc	84,45b
20%	42,78a	4,30b	36,29c	19,19c	1,48c	4,43ab	53,54b	86,59c

a, b, c Médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes por meio de comparações Bayesianas ($P < 0,05$). Regressão linear (MS: $y = 31,52 + 0,56T$; $R^2=0,92$), (PB: $y = 5,68 - 0,07T$; $R^2=0,45$), (FDN: $y = 52,30 - 0,84T$; $R^2=0,70$), (FDA: $y = 30,79 - 0,62T$; $R^2=0,78$), (EE: $y = 2,43 - 0,48T$; $R^2=0,65$), (MM: $y = 3,52 + 0,06T$; $R^2=0,54$); (CNF: $y = 36,06 + 0,90T$; $R^2 = 0,74$) e (NDT: $y = 76,55 + 0,53T$; $R^2=0,65$). *CNF estimado, calculado pela equação $CNF=100-(PB+EE+FDN+MM)$, (MERTENS, 1997); **NDT estimado, calculado pela equação $NDT (\%) = DIVMS + (1,25 * EE) - MM$, de acordo com Van Soest (1994).

Registrou-se a variação do conteúdo de MS pela adição da glicerina que tem densidade de $1,2613 \text{ g.cm}^{-3}$ que com suas propriedades higroscópicas (IUPAC, 1997) fazem ligação com as moléculas de água do material ensilado, aumentando a densidade da silagem.

O teor de PB reduziu ($P < 0,05$) à medida que os níveis de glicerina foram se elevando (Tabela 2). Este fato foi ocasionado por um efeito diluidor nos teores de PB pela ausência de proteínas e de baixa ocorrência de compostos nitrogenados na glicerina. O mesmo efeito de diluição pode ser observado nos teores de FDN, FDA e EE, inferiores ao controle ($P < 0,05$) pela ausência de fibras e ao baixo teor de lipídios da glicerina semipurificada.

Os teores de MM se elevaram ($P < 0,05$) com a inclusão da glicerina, pelo teor de cinzas (7,4%) e de sódio (1,3%) da glicerina utilizada neste experimento. O teor de minerais da glicerina é proveniente dos resíduos do processo de transesterificação e purificação da glicerina de biodiesel com metilato de sódio e bases. A glicerina semipurificada contém elementos minerais, como fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, e sódio que podem ser utilizados como substrato, pelos microrganismos ruminais durante processos fermentativos (THOMPSON; HE, 2006).

O conteúdo de CNF variou de 13,39; 22,83; 40,64 a 48,66% para os níveis 5, 10, 15 e 20% de glicerina, respectivamente, em relação ao controle. Observa-se que à medida que a inclusão de glicerina foi maior houve enriquecimento do volumoso em carboidratos rapidamente fermentáveis, compensando de certa forma as perdas que ocorrem durante a ensilagem e na exposição ao oxigênio após a abertura do silo.

Nos presentes resultados observa-se que houve aumento ($P < 0,05$) na densidade energética das silagens de milho em que o NDT estimado variou de forma crescente (Tabela 2). Comparando-se a variação percentual dos teores de NDT estimado, dos silos controles aos com níveis de 5, 10, 15 e 20% de glicerina, as diferenças a mais de NDT foram de 2,13; 8,95; 10,33 e 13,13%, respectivamente.

Os incrementos de MS, CNF e NDT somados à redução de FDN e FDA por diluição podem ser considerados positivos porque dão a possibilidade de corrigir os valores nutricionais do material ensilado compensando possíveis perdas de qualidade nos processos de ensilagem, habilitando a glicerina como um importante aditivo capaz de enriquecer o material ensilado.

Os resultados de DIVMS para as silagens foram crescentes conforme a adição de glicerina e significativos ($P < 0,05$) para os níveis 10, 15 e 20% em relação ao controle e o nível com 5% de glicerina, porém o melhor resultado foi observado no material com 20% de glicerina. Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os níveis 10 e 15% nem entre as silagens controle e com 5% de glicerina (Tabela 3).

Tabela 3 - Estimativas Bayesianas das médias para a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e digestibilidade *in vitro* da parede celular (DIVPC) de silagens de milho com 0, 5, 10, 15 e 20% de glicerina

Digestibilidade	Médias (%)				
	0	5%	10%	15%	20%
DIVMS (%)	74,49c	79,89c	85,13b	86,95ab	89,18a
DIVPC (%)	26,65c	32,39bc	40,19ab	39,35b	46,72a

a, b, c Médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes por meio de comparações Bayesianas ($p < 5\%$). DIVMS= digestibilidade *in vitro* da matéria seca; DIVPC= digestibilidade *in vitro* da parede celular; Regressão linear (DIVMS: $y = 77,04 + 0,65T$; $R^2 = 0,75$); (DIVPC: $y = 27,63 + 0,94T$; $R^2 = 0,71$).

Lopes et al. (2010), avaliando a DIVMS de silagens de quatro híbridos de milho sem glicerina, obtiveram resultados entre 71,06 e 75,00% valores inferiores aos obtidos no presente trabalho nas silagens com 5, 10, 15 e 20% de glicerina (Tabela 3). Pode-se interpretar que resultados para DIVMS aumentaram pela inclusão da glicerina que tem digestibilidade e solubilidade altas, contudo não se pode afirmar que houve melhoria da digestibilidade das fibras ou do conteúdo celular do milho ensilado.

Quanto maior foi o nível de glicerina mais baixo se manteve o pH na massa ensilada (Tabela 1). Esse dado remete à possibilidade de ter havido hidrólise ácida da parede celular das silagens de milho com glicerina, influenciando assim, na resposta positiva das silagens com glicerina à DIVMS.

O aumento percentual da porção prontamente degradável no rúmen (a) foi significativo ($P < 0,05$) à medida que foi maior o nível de glicerina na silagem (Tabela 4).

Tabela 4 - Estimativas Bayesianas médias para os parâmetros do modelo da degradabilidade efetiva da matéria seca da silagem de milho ensilada com níveis de glicerina, com taxas de passagem de 2, 5 e 8%/hora

Glicerina	Parâmetros						σ_e
	<i>a</i> (%)	<i>b</i> (%)	<i>c</i> (%/h)	DE <i>k</i> =2%	DE <i>k</i> =5%	DE <i>k</i> =8%	
0	42,80e	49,44a	1,61a (d)	64,89d	54,98e	51,21b	2,93
5%	49,04d	44,14b	2,04b (c)	71,31c	61,88d	58,07b	2,43
10%	56,80c	34,69c	2,37c (b)	75,56b	67,98b	64,76b	2,05
15%	62,93b	35,97abc	1,71abc	79,73ba	72,54ba	69,69a	4,29
20%	66,13a	25,61d	3,24d (a)	81,94a	76,20ba	68,99a	1,62

a, b, c, d, e Letras distintas indicam diferenças significativas entre as médias dos tratamentos, por meio de comparações Bayesianas em nível de 95% de credibilidade. *a* = porção prontamente degradável no rúmen; *b* = fração insolúvel, mas potencialmente degradável; *c* = taxa constante de degradabilidade da fração b/h. DE= degradabilidade efetiva da matéria seca. *k*= é a taxa de passagem de sólidos no rúmen cujo valor foi fixado em 2, 5 e 8% por hora. σ_e = desvio-padrão do erro

Quando se compara a silagem controle com o nível 20%, observa-se aumento de 54,5% na porção prontamente degradável (*a*), possivelmente pela alta degradabilidade e solubilidade da glicerina. A fração insolúvel e potencialmente degradável (*b*) também se reduziu ($P<0,05$) na medida em que aumentou o nível de glicerina na silagem.

O aumento da porção prontamente degradável no rúmen e a redução da fração insolúvel conferem configuração importante à silagem com glicerina. AROEIRA (1996) reportou que a degradabilidade efetiva (DE) de um alimento pode ser considerada como a energia digerida no rúmen, portanto a ingestão de alimentos com maior degradabilidade da MS PB e fibra disponibilizou maior energia aos microrganismos. Sendo assim, possivelmente a silagem com glicerina é um alimento indicado para animais no período de transição que necessitam de alimentos energéticos e precursores de glicose, mas que por outro lado tem baixa IMS. A maior concentração energética permitiria que a vaca, mesmo ingerindo baixas quantidades de MS, suprisse melhor suas demandas energéticas.

A degradabilidade efetiva da MS a 2, 5 e 8%/h se mostraram maiores nas silagens de milho com glicerina na fração prontamente solúvel, que mesmo com alta taxa de passagem a degradabilidade foi maior que no controle ($P<0,05$) nos níveis com 15 e 20% de inclusão. Isto se deve, possivelmente, à maior presença de glicerina. Os dados mostram que neste experimento que a inclusão de 20% apresentou melhor degradabilidade efetiva da matéria seca a 2, 5 e 8%, melhor percentual de porção prontamente degradável no rúmen (*a*) e de redução fração insolúvel, mas potencialmente degradável (*b*) combinada com a melhor taxa constante de degradabilidade da fração *b*%/h.

Na Figura 3, observa-se que o desaparecimento da matéria seca foi maior quanto maior foi o nível de glicerina mesmo nas primeiras horas de incubação, destacando-se o nível com 20% de glicerina que atingiu maior desaparecimento frente aos outros níveis no tempo de 96h de incubação e o controle com menor desaparecimento entre os tratamentos.

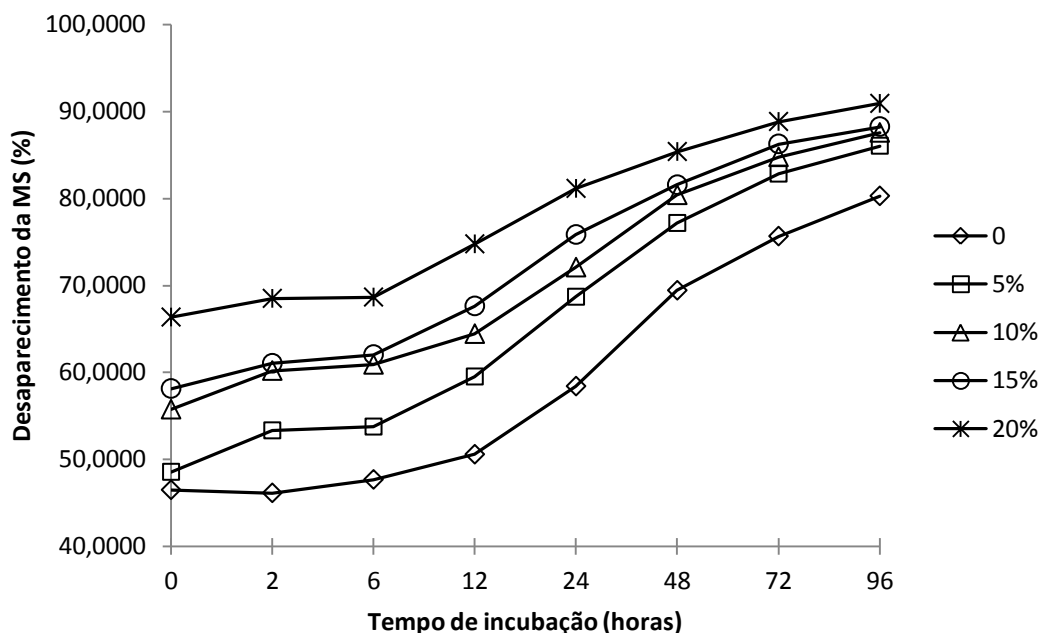


Figura 3. Curvas de desaparecimento da matéria seca da silagem de milho, para as os níveis 0, 5, 10, 15 e 20% de glicerina incubada nos tempos 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96h.

Possivelmente, a glicerina contida nas silagens com 5, 10, 15 e 20% de glicerina proporcionou maior solubilidade no meio ruminal. Essa diferença da taxa de desaparecimento entre as silagens de milho com e sem glicerina pode constituir-se em importante fator a influenciar o consumo animal, aumentando a taxa de passagem e o aproveitamento dos alimentos pelos animais como verificado neste ensaio.

A curva de desaparecimento da fração FDN (Figura 4) mostra que o comportamento das silagens de milho com glicerina foi diferente em relação à taxa de desaparecimento da silagem controle. As silagens de milho com adição de 10, 15 e 20% de glicerina apresentaram no tempo 0 desaparecimento da fração FDN acima do esperado, já que a tendência neste tempo é de valores próximos de 0, isto possivelmente está relacionado à granulometria da amostra. Até 6h de incubação a taxa de desaparecimento das silagens controle e com 5% de glicerina pouco diferiram entre si, mantendo-se menores que as demais até o tempo de 96h.

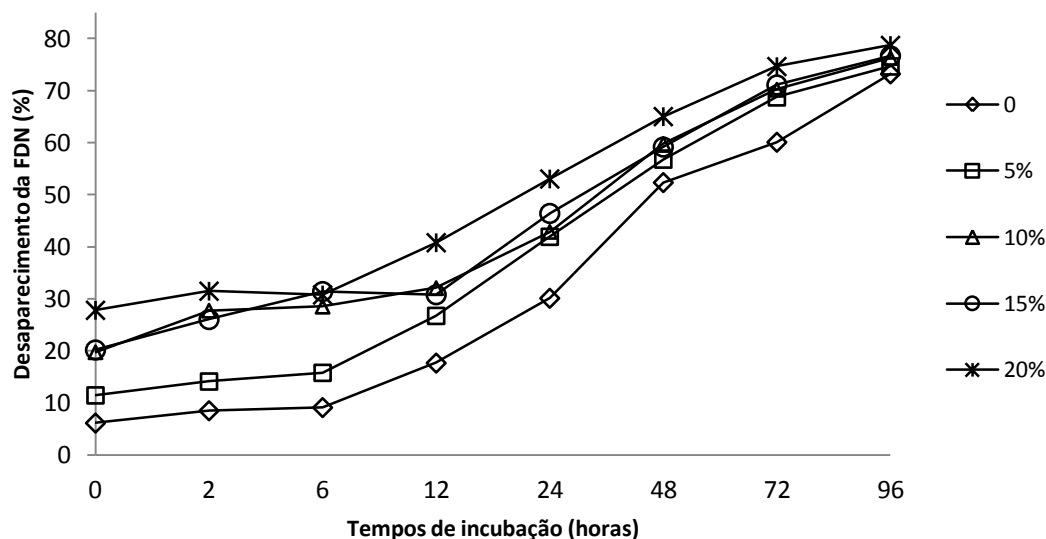


Figura 4. Curvas de desaparecimento da fibra em detergente neutro (FDN) das silagens de milho, para as os níveis 0, 5, 10, 15 e 20% de glicerina após a incubação nos tempos 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96h.

O desaparecimento da FDN da silagem com 20% de glicerina aumentou a partir de 6h de incubação e os níveis com 10 e 15 % aumentaram a partir de 12h de incubação, mantendo-se maiores que a silagens controle e com 5% de glicerina. Possivelmente, a glicerina contida nas silagens com 10, 15 e 20% de glicerina proporcionou maior aporte de energia à microbiota do rúmen potencializando a degradação da FDN. Essa diferença entre as silagens de milho com e sem glicerina pode constituir-se em importante fator a influenciar no aumento da ingestão de MS, resultado também observado na taxa de passagem (Tabela 4).

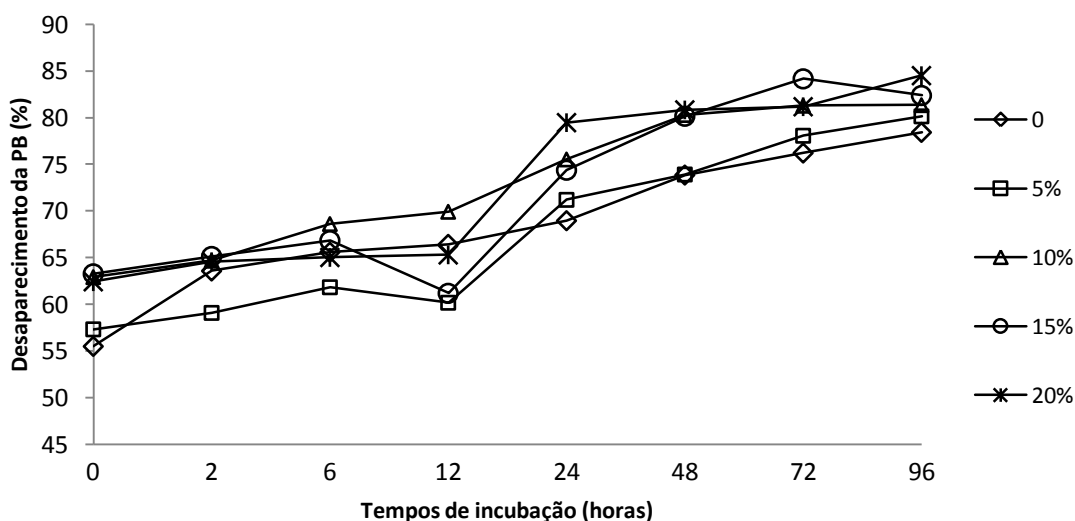


Figura 5. Curvas de desaparecimento da proteína bruta (PB) das silagens de milho, para as os níveis 0, 5, 10, 15 e 20% de glicerina, após a incubação nos tempos 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96h.

A curva de desaparecimento da fração PB (Figura 5) mostra grande dispersão até 12h de incubação. Todas as silagens de milho igualmente apresentaram, no tempo 0, alta taxa de desaparecimento, valores que deveriam também ser próximos de 0, o que pode estar relacionado à granulometria e ou resíduos de amido dos grãos. A alta taxa de desaparecimento (Figura 5) da PB das silagens poderia favorecer alta concentração de amônia no rúmen, principalmente para as silagens de milho com 10, 15 e 20% que tiveram aproximadamente 60% da PB desaparecida nas primeiras 2h.

O desaparecimento da PB não apresentou diferença ($P>0,05$) entre as silagens, havendo tendência para maior desaparecimento nos tratamentos com 15 e 20% de glicerina entre os tempos de incubação de 24 a 96h.

Conclusões

O uso de glicerina na silagem do milho melhorou a estabilidade aeróbia da massa ensilada nas silagens com adição de 10, 15 e 20% de glicerina. Observou-se melhoria na constituição química dos materiais ensilados com glicerina principalmente no aumento de CNF, NDT, DIVMS, DIVPC, degradabilidade da MS e o desaparecimento da PB e FDN que teria reflexos importantes na ingestão de MS. Os resultados indicam que a glicerina foi um aditivo capaz de enriquecer a silagem de milho e manter a estabilidade por mais tempo.

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação – CEAE da Universidade Estadual de Maringá PR UEM, em 20/02/2009.

Referências

- ABO EL-NOR S.; ABUGHAZALEH, A. A.; POTUA, R. B.; HASTINGS, D.; KHATTAB, M. S. A. Effects of differing levels of glycerol on rumen fermentation and bacteria. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, v. 162, p. 99–105, 2010.
- ALMEIDA, J. C. C. Avaliação das características agrônômicas e das silagens de milho e de sorgo cultivados em quatro densidades de semeadura. 2000. 82f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP Jaboticabal.
- AROEIRA, L. J. M.; LOPES, F. C. F.; DAYRELL, M. S. Degradabilidade de alguns alimentos no rúmen de vacas Holandês/Zebu. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 25, p. 1178-1186, 1996.
- AOAC-ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis*. 15.ed. Washington D.C. 1990. 1141 p.
- CHERNEY, J. H.; CHERNEY, D. J. R. Assessing Silage Quality. In: Buxton et al. *Silage Science and Technology*. Madison, Wisconsin, USA. 2003. p. 141-198.
- DIAS JUNIOR, G. S.; LOPES, N. M.; PESSOA JUNIOR, G.; DE SOUZA SALVATI, G. G.; CARVALHO, B. F.; DA SILVA ÁVILA, C. L.; SCHWAN, R. F.; NOGUEIRA PEREIRA, R. A.; PEREIRA, M. N. 2010 Perfil fermentativo, composição e perda de matéria seca de silagem de cana-de-açúcar inoculada com bactérias e contendo glicerina. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 47., 2010 Salvador, *Anais...* Salvador :UFBA, 2010.
- GOERING, H-K.; VAN SOEST, P. J. Forage fiber analyses (Apparatus, reagents, procedures, and some applications). *Agriculture Handbook 379*. United States Department of Agriculture, 1970. 20p.
- GRUMMER, R. R. Impact of changes in organic nutrients metabolism on feeding the transition cow. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 73, p. 2820-2833, 1995.
- HEIDELBERGER, P.; WELCH, P. Simulation run length control in the presence of an initial transient. *Operations Research*, Baltimore, v. 31, p. 1109-1144. 1983.
- IUPAC-The International Union of Pure and Applied Chemistry. Compendium of Chemical terminology 1997. Disponível: <<http://www.iupac.org/publications/compendium/index.html>> Acesso em 15 março 2007.
- JOBIM, C. C.; GONÇALVES, G. D. Microbiologia de forragens conservadas. In: REIS, R. A.; BERNARDES, T. F.; SIQUEIRA, G. R.; MOREIRA, A. L. (eds.). *Volumosos para produção de ruminantes: Valor alimentício de forragens*. Jaboticabal: FUNEP, 2003. p. 1-26.
- KASS, M.; OLT, A.; KALDMÄE, H.; KOKK, K.; SONGISEPP, E.; OTS, M. Effects of crude glycerol addition on silage fermentation. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE HÄMEENLINNA. 16., Hämeenlinna, *Proceedings...* Hämeenlinna: 2 - 4 July 2012, p. 394-395.
- KREMPSER, P. M.; LOPES, R. P. X.; RIBEIRO, M. T.; LIMA, J. C. F.; OLIVEIRA, J. S.; CARNEIRO, J. C. Microbiological evaluation of aerobic stability of corn silage with increasing levels of glycerin. In: ZOPOLLATTO, M.; DANIEL, J. L. P.; NUSSIO, L. G.; NETO, A. S. (eds.). *FORAGE QUALITY AND CONSERVATION*, 2., São Pedro, 2011, *Proceedings...* São Pedro: 2011.

- LOPES, F. C. F.; DORNELAS, R. A. C.; PORTUGAL, J. A. B.; CARNEIRO, J. C.; VERNEQUE, R. S.; SILVA, E.; OLIVEIRA, J.; ARCURI, P. B.; DUQUE, A. C. A. Digestibilidade da matéria seca de silagens de milho e de suplementos concentrados determinada por procedimentos *in vitro*. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 62, p. 1167-1173, 2010.
- MCDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. *The Biochemistry of Silage*. 2. ed. Marlow: Bucks, UK: Chalcombe Publications. 1991, 340p.
- MEHREZ, A. Z.; ØRSKOV, E. R. A study of the artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. *Journal of Agricultural Science*, Cambridge, v. 88, p. 645-650, 1977.
- MERTENS, D. R. Creating a System for Meeting the Fiber Requirements of Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, Champaign, n. 80, p. 1463-1481, 1997.
- NRC-NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Washington, EUA. *Nutrient requirements of dairy cattle*. 7. ed. Washington: National Academy Press, 2001. 381 p.
- NOCEK, J. E. Nutritional considerations for the transition cow. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS, 57., 1995, Rochester. *Proceedings...* Rochester: Cornell University, 1995. p. 121- 137.
- OLIVEIRA, J. S.; LOPES, R. P. X.; RIBEIRO, M. T.; LIMA, J. C. F.; KREMPSE, P. M.; CARNEIRO, J. C. 2011. Temperature evaluation on aerobic stability of corn silage with increasing levels of glycerin. In: ZOPOLLATTO, M.; DANIEL, J. L. P.; NUSSIO, L. G.; NETO, A. S. (eds.). FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 2., 2011, São Pedro. *Proceedings...* São Pedro: 2011.
- ØRSKOV, E. R.; MCDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to the rate of passage. *Journal of Agricultural Science*, Cambridge, v. 92, p. 499-503, 1979.
- PALMQUIST, D. L.; JENKINS, T. C. Fat in lactation rations: review. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 63, p. 1-14, 1980.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: *A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. 2012. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: novembro 2012.
- ROSSI, R. M.; GUEDES, T. A.; MARTINS, E. N.; JOBIM, C. C. Bayesian analysis for comparison of nonlinear regression model parameters: an application to ruminal degradability data. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 39, n. 2, p. 419-424, 2010.
- ROSSI, R. M. Introdução aos métodos Bayesianos na análise de dados zootécnicos com uso do WinBUGS e R. Eduem, Maringá, 2011. 191p.
- SÜDEKUM, K-H. Co-products from biodiesel production. In: GARNSWORTHY, P.C.; WISEMAN, J. (Ed.). *Recent advances in animal nutrition*. Nottingham: Nottingham University Press, 2008. p. 210-219.
- THOMPSON, J. C.; HE, B. B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. *Applied Engineering in Agriculture*, St. Joseph, v. 22, n. 2, p. 261-265, 2006.
- VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 74, p. 3583-3597, 1991.
- VAN SOEST, J. P. Nutritional ecology of ruminant. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.

VANZANT, E. S.; COCHRAN, R. C.; TITGEMEYER, E. C. Standardization of *in situ* techniques for ruminant feedstuff evaluation. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 76, p. 2717-2729. 1998.

WETTSTEIN H. R.; MACHMÜLLER A.; KREUZER M. Effect of raw and modified canola lecithin's compared to canola oil, canola seed and soy lecithin on ruminal fermentation measured with rumen simulation technique. *Animal Feed Science Technology*, Amsterdam v. 85, p. 53-169, 2000.

V - Glicerina na dieta de fêmeas holandesas e a influência na qualidade de oócitos e produção de embriões *in vitro*

Resumo

Objetivou-se estudar a qualidade de oócitos e produção *in vitro* de embriões de fêmeas da raça Holandesa, alimentadas com e sem glicerina adicionada à dieta. Utilizaram-se dez fêmeas com escore de condição corporal entre 3,0 e 3,75 pontos, peso vivo de $555,90 \pm 87,54$ kg com $50,69 \pm 13,20$ meses de idade, sendo seis vacas em lactação, três vacas secas e uma novilha, que foram divididas aleatoriamente em cinco controles e cinco recebendo 15% de glicerina na silagem de milho. Sincronizaram-se as ondas foliculares e realizaram-se quatro aspirações foliculares com intervalos de 15 dias. Os oócitos foram classificados e transportados para o laboratório, iniciando os procedimentos de fecundação *in vitro*. Coletou-se sangue dos animais às 7, 9, 11, 13, 15, 17 e 19h para analisar a glicose.

No grupo tratado com glicerina foram aspirados 132 oócitos com 105 viáveis e no controle foram aspirados 90 oócitos com 81 viáveis, sem haver diferença ($P > 0,05$) entre os viáveis e não viáveis. Não houve diferença na persistência dos embriões viáveis observados aos sete, oito e nove dias ($P > 0,05$). Aos sete dias, o grupo controle produziu 19 embriões e o grupo que recebeu glicerina na dieta produziu 27 embriões. Observou-se diferença ($P < 0,05$) nas probabilidades entre embriões não viáveis e oócitos aspirados com resultado negativo para o grupo controle (0,40) em relação aos tratados com glicerina (0,27). Não foram observadas diferenças na glicemia pré e pós-prandial ($P > 0,05$) nos animais tratados com glicerina (75,91 mg/dL) em relação aos controles (71,69 mg/dL), mas houve aumentos pontuais do grupo com 15% de glicerina em relação ao controle. Conclui-se que a glicerina gerou aumentos pontuais da glicose sérica, mas não influenciou na produção e melhoria da qualidade dos oócitos e embriões ou na persistência da viabilidade dos embriões.

Palavras-chave: fertilização *in vitro*, glicerol, glicemia, gliconeogênese, viabilidade de embriões

Glycerin in diet of Holstein females and influence on quality of oocytes and *in vitro* embryos production

Abstract

This study was carried out with the objective of studying the quality of oocytes and *in vitro* embryos production of females Holstein fed with and without glycerin added to corn silage. 10 females were used with body condition score between 3.0 and 3.75 points, weighting 555.90 ± 87.54 kg and at 50.69 ± 13.20 months of age, being 6 lactating cows, 3 dry cows and a heifer, which were randomly divided into two groups: five animals in a control group and five receiving 15% of glycerin in the silage. The follicular waves were synchronized and 4 follicular aspirations were performed at intervals of 15 days. The oocytes were classified and transported to the laboratory, initiating the *in vitro* fertilization procedures. Blood was collected from animals at 7, 9, 11, 13, 15, 17 and 19 hours to analyze glucose. In the group treated with glycerin 132 oocytes were aspirated with 105 viable ones and in the control 90 oocytes were aspirated with 81 viable oocytes without differences ($P > 0.05$) between treatments. No difference was observed in the persistence of viable embryos at 7, 8 and 9 days ($P > 0.05$). At seven days, the control group produced 19 embryos and the group that received 15% of glycerin in the corn silage produced 27 embryos. A difference in the probabilities was observed ($P < 0.05$) between non-viable embryos and aspirated oocytes with negative results for the control group (0.40) compared to those treated with corn silage and 15% of glycerin (0.27). No differences were observed in pre- and postprandial glucose ($P > 0.05$) in animals treated with glycerin (75.91 mg.dL^{-1}) compared to control (71.69 mg.dL^{-1}), but there were punctual increases in the group with 15% of glycerin compared to control. It is concluded that glycerin generated punctual increases of serum glucose, but did not influence the production and improvement of oocytes and embryos quality or in the persistence of embryos viability.

Key words: glycerol, glucose, gluconeogenic, *in vitro* fertilization, viability of embryos

Introdução

A biotecnologia reprodutiva é utilizada para aumentar a difusão de animais com alto valor zootécnico e o sucesso de tecnologias como a fertilização *in vitro* depende da qualidade dos oócitos obtidos (BOLAND et al., 1991).

A raça Holandesa evoluiu geneticamente nos últimos 50 anos, nos EUA e Canadá, o que estabeleceu superioridade na produção de leite em relação a outras raças, servindo de base para o melhoramento genético em todo o mundo (HANSEN; HEINS, 2007). Por outro lado, a eficiência reprodutiva, em vacas leiteiras de alta produção, vem se reduzindo nas últimas décadas e está associada ao aumento da produção de leite (LUCY, 2001; WASHBURN et al., 2002).

Vacas leiteiras de alta produção apresentam alterações no metabolismo do fígado, do tecido adiposo, do músculo esquelético e na secreção e ação de muitos hormônios envolvidos no parto, na lactogênese e na manutenção da lactação (HEAD; GULAY, 2001). O período de transição inicia três semanas anteriores ao parto se estendendo até as três semanas posteriores ao parto, havendo redução de consumo alimentar e geração de balanço energético negativo (BEN) (DRACKLEY, 1999).

As alterações metabólicas causadas pelo BEN estão relacionadas à fertilidade das vacas leiteiras, por sua influência no desenvolvimento folicular e na primeira ovulação pós-parto (BUTLER, 2001), na concentração sanguínea de progesterona (BRITT, 1991), na qualidade dos oócitos (BRITT, 1991;) e dos embriões (LEROY et al., 2005). As mudanças endócrinas e metabólicas foliculares podem comprometer a capacidade de desenvolvimento dos oócitos, visto que estes são altamente sujeitos a qualquer distúrbio no seu microambiente (LEROY et al., 2008).

A foliculogênese leva em torno de 60 a 80 dias e os folículos que iniciam o seu desenvolvimento durante o BEN são afetados e produzem oócitos de qualidade inferior (BRITT, 1991). O primeiro e o segundo folículos ovulatórios que ocorrem após o parto começam seu desenvolvimento no período seco, quando as condições metabólicas são favoráveis (ALVES et al., 2009). O terceiro, o quarto e o quinto folículos ovulatórios se desenvolvem durante o início da lactação, quando o BEN é mais intenso, ficando sujeitos às condições metabólicas adversas do pós-parto (LEROY et al., 2006).

A competência de desenvolvimento do ovócito é intimamente relacionada à fase de crescimento e à saúde do folículo (SUTON et al., 2003). A administração de precursores gliconeogênicos no pós-parto, é estratégia para aumentar a concentração de glicose sanguínea, estimulando maior resposta de insulina e redução da mobilização de ácidos graxos do tecido adiposo, minimizando desordens metabólicas (BERTICS et al., 1992).

Chung et al. (2007) forneceram 250 g/dia de glicerina seca para vacas no período de transição e observaram um estado de energia mais positivo quando comparadas às vacas controle. Segundo os autores, o efeito gliconeogênico da glicerina resultou em concentrações plasmáticas mais elevadas de glicose, concentrações mais baixas de plasma β -hidroxibutirato, e de cetonas na urina, o que foi observado na segunda semana de lactação.

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar, em fêmeas da raça Holandesa, a influência da glicerina adicionada à silagem de milho na qualidade de oócitos e na produção de embriões *in vitro*.

Material e métodos

O experimento foi realizado no Setor de Bovinocultura de Leite da Fazenda Experimental da Universidade Estadual de Maringá, região Noroeste do Paraná, localizada a 23°25' de latitude Sul, a 51°57' de longitude Oeste de Greenwich e 550 m de altitude. As análises químico-bromatológicas da silagem de milho foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá (LANA). Os procedimentos com oócitos e embriões foram realizados no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (BIOTEC) do Centro Universitário de Maringá (CESUMAR), de abril a junho de 2012.

Foram selecionadas dez fêmeas da raça Holandesa não gestantes, com condição corporal entre 3,0 e 3,75 pontos, classificadas pela escala de 1 a 5 pontos com variação de 0,25 pontos, sendo 1 para a vaca extremamente magra e 5 para a vaca extremamente gorda (EDMONSON et al., 1989) com peso vivo de 555,90±87,54 kg e 50,69±13,20 meses de idade, sendo seis vacas em lactação, três vacas secas e uma novilha. Os animais foram divididos aleatoriamente, em grupos com cinco fêmeas controles sendo três vacas em lactação entre 70 e 140 dias, e duas vacas secas e, cinco fêmeas recebendo 15% de glicerina adicionada à silagem de milho, sendo três vacas em lactação entre 70 e 140 dias, uma vaca seca e uma novilha. Os concentrados utilizados foram balanceados (NRC, 2001) para vacas em lactação, vacas secas e novilhas (Tabela 1).

Antes de iniciar o experimento, os animais foram pesados e submetidos à adaptação da dieta com e sem glicerina por 12 dias. Os animais ficaram alojados em um piquete com aproximadamente 1,2 ha, roçado semanalmente com trator e roçadeira hidráulica Baldan® para manter a baixa disponibilidade de massa de forragem. Iniciou-se a adaptação com silagem de milho e concentrados, e após a estabilização do consumo, iniciou-se a adaptação com 5% de glicerina na silagem até chegar a 15%. A glicerina foi misturada à silagem e ao concentrado manualmente, baseado na matéria natural. O fornecimento de silagem foi feito individualmente em cochos tipo canzil uma vez ao dia, pela manhã (7h40min) e os concentrados foram

fornecidos duas vezes ao dia, sendo a metade após a primeira ordenha (7h40min) e a outra metade após a segunda ordenha (17h).

Na Tabela 1 está discriminada a composição dos concentrados utilizados pelo Setor de Bovinocultura de Leite da Fazenda Experimental para vacas secas e novilhas e para as vacas em lactação.

Tabela 1. Composição percentual e química dos concentrados experimentais

Itens	Vacas secas e novilhas	Vacas em lactação
Composição percentual (%MN):		
Milho moído	60	50
Farelo de soja	12	35
Farelo de trigo	25	10
Bicarbonato de sódio	0,5	-
Núcleo ¹	-	5
Núcleo ²	2,5	-
Composição química (% MS):		
MS	90,1	89,5
PB	14,0	21,6
NDT	83,0	83,3
EE	1,16	1,24
FDN	2,95	5,8
FDA	4,70	4,9
Ca	0,085	0,155
P	0,325	0,326

¹ Lactobovi- níveis de garantia por kg : Cálcio 170 g, Fósforo 51g, Enxofre 20 g, Magnésio 33 g, Potássio 28 g, Sódio 93 g, Ferro 2.000 mg, Manganês 1350 mg, Zinco 1.700 mg, Cobre 400 mg, Cobalto 30 mg, Iodo 40 mg, Selênio 15 mg, Cromo 10 mg, Flúor 510 mg, Vitamina A 135.000 UI, Vitamina D₃ 68.000 UI, Vitamina E 450 UI. ² Bovipasto- níveis de garantia por kg : Cálcio 240 g, Fósforo 115 g, Enxofre 38 g, Magnésio 29 g, Manganês 3045 mg, Zinco 7.200 mg, Cobre 1.828 mg, Cobalto 133 mg, Iodo 118 mg, Selênio 40 mg, Cromo 29 mg, Flúor 1.152 mg. Matéria seca (MS); Proteína bruta (PB); Fibra em detergente neutro (FDN); Fibra em detergente ácido (FDA); Extrato etéreo (EE); Nutrientes digestíveis totais (NDT); Cálcio (Ca) e Fósforo (P).

O manejo alimentar das fêmeas em relação ao consumo de concentrados foi feito de acordo com o período e produção de leite entre 70 e 140 dias, consumindo 1,0 kg de concentrado/3 kg de leite produzido, as vacas secas 2,5 kg de concentrado/dia e as novilhas 2,0 kg/dia.

Foram determinados os teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), matéria mineral (MM) (AOAC, 1990), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), obtida de acordo com Van Soest et al. (1991). Os teores de nutrientes digestíveis totais (NDT) foram estimados pela equação $NDT (\%) = DIVMS + (1,25 * EE) - MM$ (VAN SOEST, 1994).

Para determinação da digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) foram pesados aproximadamente 0,25 g de amostra de silagem de milho colocados em sacos (F57) previamente lavados com acetona e depois incubados a 39,5°C, utilizando incubadora *in vitro*

TE-150 (Tecnal ®) de acordo com Goering e Van Soest (1970). O líquido inoculante foi obtido de bovino castrado da raça Holandesa, provido de cânula ruminal recebendo dieta à base de silagem de milho.

Tabela 2. Composição química da silagem de milho

Itens	(%)
Matéria Seca ¹	31,59
Proteína Bruta	5,73
Fibra em Detergente Neutro	52,60
Fibra em Detergente Ácido	30,33
Extrato Etéreo	2,54
Matéria Mineral	3,12
Digestibilidade <i>in vitro</i> da Matéria Seca	61,39
Nutrientes Digestíveis Totais ²	61,95

¹Matéria seca da massa ensilada; ²NDT (%) = DIVMS + (1,25 * EE) - MM (VAN SOEST, 1994).

A glicerina semipurificada utilizada no experimento foi proveniente da produção de biodiesel de óleo de soja, adquirida na empresa TCS-Meridional (Ponta Grossa PR) e analisada pelo Instituto de Tecnologia do Paraná – Divisão de Biocombustíveis (Tecpar), Curitiba. A composição química da glicerina utilizada continha: 82,54% de glicerol, 10,23% de água, 120ppm de metanol, 1,3% de sódio, 7,4% de cinzas e pH 5,8.

A sincronização das ondas foliculares das fêmeas foi realizada (Figura 1) com progestágeno por meio de implante de silicone contendo três mg de norgestomet (Crestar® MSD Saúde Animal), introduzido entre a pele e a cartilagem da orelha e, simultaneamente foram aplicados 2 mg de Benzoato de Estradiol (Bioestrogen® BIOGENESIS BAGO), por via intramuscular.

As aspirações foliculares foram realizadas 6,5 dias após o início do protocolo de sincronização das ondas foliculares. Os implantes auriculares foram retirados imediatamente após o procedimento de aspiração. Foram realizadas quatro sincronizações e quatro aspirações foliculares, visando avaliar os oócitos e a produção *in vitro* de embriões.

As aspirações foliculares foram realizadas utilizando aparelho de Ultrassom Mindray® P/B - DP 2200 VET, equipado com transdutor setorial intravaginal de 5/7,5 MHz e dispositivo-guia com agulha WTA 18G para punção folicular, conectado à bomba de vácuo WTA®, com pressão de 40 a 50 mmHg.

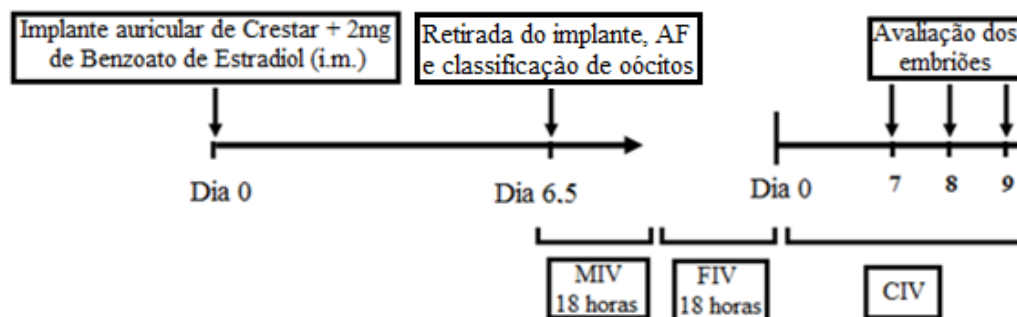


Figura 1. Diagrama esquemático do protocolo de sincronização das ondas foliculares e a produção de embriões *in vitro*, em fêmeas holandesas. AF = Aspiração folicular, MIV = maturação *in vitro*, FIV = Fertilização *in vitro*, CIV = clivagem e produção de embriões.

Foram aspirados os folículos que apresentavam diâmetro a partir de 3 mm (PERRY, 2007). Para inibir os movimentos peristálticos retais e o desconforto ao animal foi feita uma anestesia epidural sacrococcígea, utilizando-se 4 a 5 mL de lidocaína a 2% (Anestésico Pearson[®]). Em seguida, o transdutor foi inserido até o fundo vaginal e, com o auxílio da manipulação transretal, os ovários foram posicionados para obter uma boa visualização dos folículos na tela do ultrassom. Os folículos a serem aspirados foram posicionados no percurso da linha de punção indicada na tela do ultrassom e quando se aproximou a agulha do folículo a ser aspirado, foi acionada a bomba de vácuo e o oócito aspirado, procedimento repetido em todos os folículos a partir de 3 mm e em cada ovário. O meio contido no tubo Falcon[®] de 50 mL para receber os oócitos e lavagem da agulha foi composto: solução de: 2,0% de soro fetal bovino (Nutricell[®]), 98,0% de DMPBS- FLUSH (solução salina fosfatada tamponada modificada de Dulbecco) (Nutricell[®]) e 5 UI/mL de heparina sódica (Liquemine[®]), para evitar a coagulação sanguínea no interior do sistema de aspiração.

O material aspirado foi transferido para o filtro de colheita de embriões (EmCom[®]) e lavado com a mesma solução utilizada na aspiração a 38,5°C. O sedimento restante no filtro foi observado em placas de Petri de 35 x 15 mm por meio de Lupa de base diascópica binocular Zoom Nikon, Modelo 645 (Nikon[®]) e efetuada a procura em 40X, e a contagem e classificação da qualidade dos oócitos em 70 aumentos.

Os oócitos obtidos foram avaliados (GONÇALVES et al., 2008), observando a morfologia, o número de camadas de células do *cumulus* e o aspecto do citoplasma e classificados em oócitos em viáveis e não viáveis.

Os oócitos foram lavados em solução comercial de MIV-T (Nutricell) e, em seguida, foram transportados, em crio tubos (Corning[®]), para o Laboratório Biotec, em transportador de oócitos WTA[®], em temperatura de 38,5°C, em meio de maturação Biomate (MIV-T Nutricell[®]).

No laboratório, os oócitos foram lavados três vezes em meio de lavagem TCM-199, constituído de sais de Earles, glutamina e NaHCO_3 , suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 22 $\mu\text{g/mL}$ piruvato, 50 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina, 0,5 μg de FSH/mL, 50 μg de LH/mL e 1 μg de estradiol/mL, mantidos em estufa, a 38,5°C, 5% de CO_2 em ar com máxima umidade, durante 18h. Durante esse período, os complexos *cumulus oócitos* (CCOs) permaneceram em microgotas de 100 μL de meio de maturação coberto por óleo mineral. Os oócitos maturados foram lavados três vezes em 100 μL de meio TALP-FIV suplementado com 10 $\mu\text{g/mL}$ de heparina, 22 $\mu\text{L/mL}$ de piruvato, 50 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina, albumina sérica bovina-BSA (sem ácidos graxos), solução de PHE (2 μM de penicilina, 1 μM de hipotaurina e 0,25 μM de epinefrina). Na fecundação *in vitro* (FIV) foram utilizadas cinco doses de sêmen de touro Holandês (7H6257 Wadetex), descongelado em banho-maria a 35°C.

Para seleção dos espermatozoides móveis e remoção de diluídores e plasma seminal, foi realizada centrifugação em gradiente Percoll 45% e 90% num tubo cônico de 15 mL a 1200 rotações por minuto (120 g), durante 20 min em Centrífuga Excelsa® II modelo 206 BL, marca Fanen. Após a centrifugação, retirou-se o pellet de sêmen no fundo do tubo cônico e transferiu-se para outro tubo cônico contendo 10 mL de HEPES-TALP para a lavagem do pellet em centrífuga a 1200 rpm por 9 min. Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante e adicionaram-se 2 mL HEPES-TALP no tubo contendo o pellet. Em seguida, misturou-se com a pipeta de 100 μL retirando-se uma gota para observar a motilidade e após, determinar a concentração espermática.

Foi utilizada a concentração de 2×10^6 espermatozoides/mL e estes foram transferidos para microgotas juntamente com COCs, onde permaneceram por 18h, a 38,5°C, em atmosfera com 5% de CO_2 , 5% de O_2 , 90% de N_2 com umidade saturada.

Decorrido o tempo de fertilização, as estruturas foram mantidas *in vitro* no meio SOF com 10% de soro fetal bovino, com monocamada de células da granulosa. O cultivo foi realizado por 18h pós-fertilização, em incubadora, com atmosfera gasosa contendo 5% de CO_2 , em ar com máxima umidade. A avaliação dos embriões foi feita nos dias 7, 8 e 9, sendo classificados em mórula, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido ou blastocisto eclodido (OLIVEIRA FILHO, 1999), conforme Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões.

Colheram-se sete amostras de sangue, com agulhas de 40 x 12 mm da veia jugular, de todos os animais do experimento para dosagem de glicose. As amostras foram colhidas às 7, 9, 11, 13, 15, 17 e 19h, para avaliar a variação de glicose nos períodos pré-prandial e pós-prandial. A glicose sanguínea foi analisada, imediatamente com Sistema Accu-Chek Active®, de leitura digital por meio de uma gota de sangue.

A análise estatística dos parâmetros sanguíneos foi realizada por meio de Inferência Bayesiana descrita em Rossi (2011). Foi considerado que (Y_i) a glicose (mg/dL)

segue distribuição de Normal, isto é, $Y_i \sim N(f(\mu_i), \sigma_{ei}^2)$, $i = 1, 2, \dots, n$, tal que $\mu_i = \beta_0 + \beta_1 \text{Tratamento} + \beta_2 \text{Tempo} + \varepsilon_i$; $\varepsilon_i \sim N(0, \sigma_{ei}^2)$. Para β_k , $k = 0, 1, 2$, e σ_e^2 , foram consideradas *a priori* distribuições não informativas, respectivamente, $\beta_k \sim N(0, 10^6)$ e $\sigma_e^2 \sim \text{Gamma}(10^3, 10^3)$. Consideraram-se significativos para o modelo, em nível de 5% os parâmetros, cujos intervalos de credibilidade (ICr) não contemplam o valor 0.

A obtenção das distribuições marginais *a posteriori* para todos os parâmetros foi por meio do pacote BRugs do programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2012). Foram gerados 110.000 valores em um processo MCMC (*Monte Carlo Markov Chain*) e, considerando um período de descarte amostral de 10.000 valores iniciais. Assim, a amostra final retirada em saltos de tamanho 10 contém 10.000 valores gerados. A convergência das cadeias foi verificada por meio do critério de Heidelberger e Welch (1983), no pacote *coda* do R.

A análise estatística da qualidade de oócitos de cada coleta foi realizada por meio de Inferência Bayesiana descrita em Rossi (2011). Foi considerada uma estrutura hierárquica tal que a resposta (número de oócitos viáveis /ou não viáveis; $Y_i|N$) segue distribuição Binomial com parâmetros N e p , em que N (total de oócitos) segue uma Poisson com parâmetro μ , isto é, $Y_i|N \sim \text{Bin}(N, p)$ e $N_i \sim \text{Poisson}(\mu)$ $i = 1, 2, \dots, n$. Foram consideradas *a priori* distribuições: Beta para p e, Gama para μ , isto é, $p \sim \text{Beta}(1, 1)$ e $\mu \sim \text{Gama}(10^3, 10^3)$. Foram realizadas comparações entre as distribuições *a posteriori* das médias (μ para o número de oócitos viáveis /ou não viáveis e, Np para o total de oócitos) dos grupos controle e com glicerina. Consideraram-se como diferentes, em nível de 5%, nos grupos cujos intervalos de credibilidade para as diferenças médias não contemplaram o valor 0.

Para realização das análises estatísticas da produção *in vitro* de embriões utilizou-se o PROC GENMOD do SAS, testando o efeito do tratamento nas probabilidades de oócitos viáveis e embriões viáveis aos sete dias, considerando uma distribuição binomial e a função de ligação logit. Para o teste dos efeitos dos tratamentos na média do número de embriões aos sete, oito e nove dias utilizou-se PROC GENMOD do SAS, utilizando uma distribuição Poisson e a função de ligação log.

Resultados e Discussão

Nas quatro aspirações foliculares (AF) feitas nas fêmeas foram recuperados 90 oócitos no grupo controle e 132 oócitos nas fêmeas tratadas com glicerina que após a maturação *in vitro* (MIV), resultaram em 81 oócitos viáveis para as controles (perdas de 10%) e 105 para as tratadas com glicerina (perdas de 20,45%).

Embora o número total de oócitos do grupo tratado com 15% de glicerina tenha sido 46% superior ao grupo controle, não houve efeito dos tratamentos ($P > 0,05$) na produção total de oócitos (Tabela 3). Foi observada diferença entre os grupos ($P < 0,05$) no número de

oócitos não viáveis na quarta aspiração folicular em que o número de não viáveis foi superior ao controle no grupo tratado com glicerina que apresentou 13 oócitos não viáveis.

Tabela 3. Número oócitos observados e estimativas Bayesianas para a média e desvio-padrão da produção de oócitos viáveis, não viáveis e totais, por aspiração e por animal alimentados com ou sem glicerina na silagem

AF	Classific. de Oócitos	Grupo				p
		Controle		Glicerina (15%)		
		Observado	Estimativa	Observado	Estimativa	
1 ^a	Viáveis	16	3,21 (0,819)	27	5,39 (0,102)	0,923
	Não viáveis	0	3,19 (0,800)	1	2,81 (0,756)	0,642
	Total	16	6,39 (1,137)	28	8,40 (1,298)	0,886
2 ^a	Viáveis	23	4,60 (0,967)	31	6,20 (1,109)	0,870
	Não viáveis	7	2,80 (0,761)	3	4,19 (0,904)	0,884
	Total	30	8,80 (1,336)	34	10,99 (1,484)	0,869
3 ^a	Viáveis	17	3,41 (0,835)	25	4,99 (0,989)	0,893
	Não viáveis	2	1,60 (0,578)	10	1,80 (0,602)	0,592
	Total	19	5,40 (1,040)	35	8,60 (1,318)	0,972
4 ^a	Viáveis	25	5,00 (1,003)	22	4,39 (0,931)	0,667
	Não viáveis	0	4,38a (0,930)	13	1,40b (0,539)	0,003
	Total	25	9,38 (1,371)	35	8,41 (1,303)	0,697
total	Viáveis	81	16,20 (1,807)	105	20,99 (2,048)	0,961
	Não viáveis	9	11,98 (1,540)	27	10,21 (1,444)	0,801
	Total	90	28,18 (2,378)	132	31,20 (2,505)	0,814

a, b, Médias seguidas de letras diferentes são na linha, estatisticamente diferentes por meio de comparações Bayesianas ($P < 0,05$). AF= aspiração folicular.

A quantidade média de oócitos por fêmea por aspiração para controles e com 15% de glicerina foi de 4,5 e 6,6, respectivamente, números inferiores aos resultados encontrados em outros estudos com fêmeas da raça Holandesa observados por Bordignon et al. (1997) que encontraram a média de 9,9 oócitos/fêmea/coleta em dietas sem glicerina, porém, foram superiores aos encontrados por Lopes et al. (2006), trabalhando com vacas holandesas e Dinamarquesas Vermelhas e Hasler et al. (1995), com vacas holandesas, que observaram 2,8 e 4,1 oócitos/fêmea/coleta, respectivamente. Portanto, ao compararmos estes resultados, podemos observar que a glicerina adicionada à silagem de milho não influenciou ($P > 0,05$) de forma negativa na produção de oócitos neste estudo.

Britt (1991) observou que a foliculogênese leva em torno de 60 a 80 dias e os folículos que iniciam o seu desenvolvimento durante o BEN são afetados negativamente liberando oócitos de pior qualidade e sendo assim o primeiro e o segundo folículos ovulatórios, após o parto, começam seu desenvolvimento no período seco, quando as condições metabólicas são favoráveis. O mesmo autor reportou que o terceiro, o quarto e o quinto folículos ovulatórios se desenvolvem durante o início da lactação, quando o BEN é mais intenso e, conseqüentemente, podem estar sujeitos às condições metabólicas adversas do pós-parto.

Com exceção da novilha utilizada neste estudo, os dias em aberto das seis vacas em lactação (entre 70 e 140 dias) e também das três vacas secas (mais de 300 dias) possivelmente, foram influenciados pela intensidade do BEN por ocasião do parto (BRITT, 1991) e também pela ocorrência de cetose e hipoglicemia no início da lactação, comprometendo a qualidade dos oócitos, (LEROY et al., 2008).

Sutton et al. (2003) verificaram que nas células do *cumulus*, a glicose é primariamente convertida através da via glicolítica em piruvato e lactato, que são os substratos preferenciais dos oócitos para a produção de ATP.

O número de oócitos viáveis é importante na fertilização *in vitro* e apesar de não haver diferença ($P>0,05$) entre as quantidades de oócitos viáveis, a glicerina apresenta como efeito benéfico o fato de não prejudicado os oócitos o que permite sua utilização em fêmeas doadoras na produção de oócitos.

A glicerina foi adicionada a silagem de milho, neste estudo, com a finalidade de aumentar o suprimento de glicose na hipótese de melhorar a qualidade e a quantidade de oócitos e, por consequência, a qualidade dos embriões. Contudo, não houve efeito da dieta com e sem glicerina ($P>0,05$) sobre a probabilidade de produção de embriões viáveis aos sete dias (E7) em relação aos oócitos aspirados e nem entre E7 sobre oócitos viáveis (Tabela 4), mas foi observada maior probabilidade ($P<0,05$) de geração embriões não viáveis nos animais sem glicerina na dieta em relação aos oócitos aspirados de animais que receberam dieta com glicerina.

Das aspirações do grupo controle 90 oócitos resultaram em 19 embriões viáveis aos sete dias e no grupo que consumiu glicerina geraram 132 oócitos e 27 embriões viáveis aos sete dias, valores que estão de acordo com as produções *in vitro*.

Tabela 4. Médias das probabilidades de produção de oócitos e número de embriões *in vitro* por aspiração/fêmeas alimentadas com ou sem glicerina

Glic. (%)	Oócitos			Probabilidades			Embriões viáveis		
	oa	onv	ov	E7/oa	Env7/oa	E7/ov	E7	E8/E7	E9/E7
0	90a	9a	81a	0,55a	0,40a	0,22a	0,95(19)a	0,75 (15)a	0,75 (15)a
15	132a	27a	105a	0,58a	0,27b	0,29a	1,50 (27)a	1,10 (18)a	0,99 (18)a

a,b Médias seguidas de letras diferentes na coluna são estatisticamente diferentes ($P<0,05$). Env7= embriões não viáveis no dia 7; E7= embriões viáveis com 7 dias, média por animal; E8= embriões viáveis com 8 dias, média por animal; E9= embriões viáveis com 9 dias, média por animal; oa= total de oócitos aspirados; ov= oócitos viáveis; onv= oócitos não viáveis; entre parênteses= número total de embriões; Glic.=glicerina.

Pode-se observar que não houve diferença ($P>0,05$) entre os grupos na probabilidade de produção de embriões viáveis aos sete dias, mas os embriões do grupo tratado com 15% de glicerina foram numericamente maiores que os controles (27/19) com 42,1% a mais de embriões. Não foram observadas diferenças ($P>0,05$) na probabilidade de produção de

embriões viáveis aos sete dias, aos oito dias e aos nove dias em relação ao dia 7 nos animais com dieta sem e com glicerina.

Nas observações feitas entre os dias sete e nove verificaram-se perdas no grupo tratado com glicerina que reduziu de 27 para 18 embriões (33,3%) e nos controles redução de 19 para 15 estruturas (21,05%) no mesmo período (Tabela 4). Poder-se-ia inferir que os embriões viáveis no dia 9 teriam maiores chances de levar a termo uma gestação, ao serem transferidos para receptoras. Sartori et al. (2002) e Leroy et al. (2005) demonstraram que os embriões produzidos nas vacas em lactação possuem qualidade inferior aos produzidos em vacas não lactantes, novilhas ou vacas de corte.

A glicerina administrada via silagem de milho não promoveu efeitos negativos na produção *in vitro* de embriões, mas não foi eficiente em melhorar a viabilidade de embriões produzidos das fêmeas holandesas deste experimento.

Não foi observada diferença na média ($P>0,05$) dos níveis de glicose do sangue coletado as 7h, 9h, 11h, 13h, 15h, 17h e 19h influenciados pelo uso de 15% de glicerina na silagem de milho em relação aos animais controles (Tabela5).

Tabela 5. Estimativas Bayesianas para os parâmetros do modelo de efeitos aleatórios para a variação da glicose sanguínea em função dos tratamentos e do tempo

Estimativas	Parâmetros				
	β_0	β_1	σ_a^2	σ_b^2	σ_e^2
Média	71,68	4,31	5,85	3,17	2,99
Desvio-padrão	2,895	3,998	1,883	2,262	2,270
ICr(95%)	(68,97;77,57)	(-3,81;12,38) ^{ns}	(3,19;10,47)	(0,04;6,18)	(0,04;6,17)

Observa-se, neste estudo, (Tabela 5 e Figura 2) que tanto o grupo controle quanto o grupo alimentado com glicerina apresentavam níveis médios de glicose entre 71,69 e 75,91 mg/dL respectivamente, em um período de 12h.

Esses valores de concentração sanguínea de glicose situam-se dentro da faixa considerada fisiológica entre de 45 a 75 mg/dL⁻¹ (WITTWER et al., 1987; KANEKO et al., 1997).

Na Figura 2 observam-se as curvas da glicemia média dos animais tratados com e sem glicerina.

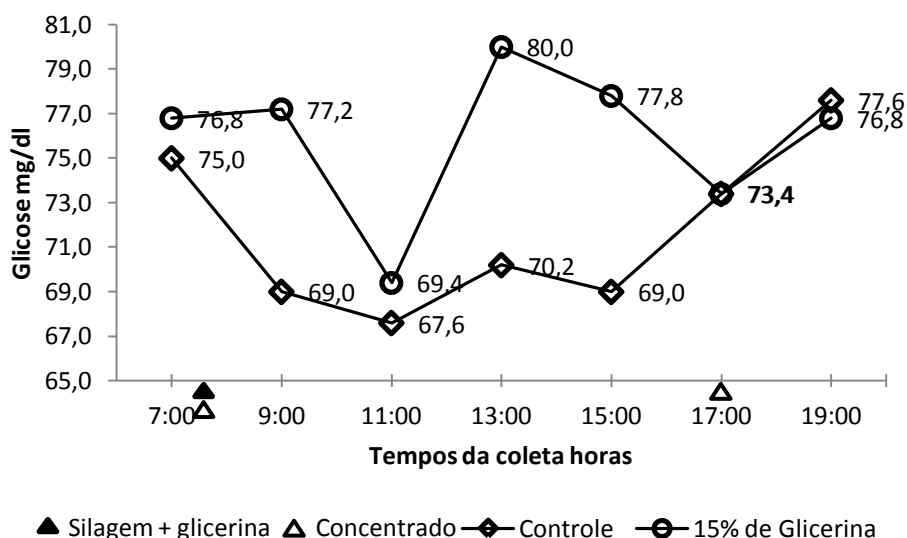


Figura 2- Glicemia média (mg/dL) dos animais controles e consumindo 15% de glicerina avaliada em sete tempos de coleta e horários de alimentação.

Os valores pontualmente mais elevados da glicose sanguínea verificados nos animais consumindo 15% de glicerina após a alimentação, comparados aos controles após poderiam ser justificados, em parte, pelas características da glicerina estudadas por Krehbiel (2008) que estimou que 44% do glicerol ingerido por ruminantes são fermentados a ácidos graxos de cadeia curta, 43% são absorvidos pelo epitélio ruminal e 13% passam ao intestino. O mesmo autor observou que o destino do glicerol absorvido através do epitélio ruminal ou intestinos é o fígado onde é transformado em glicose.

Possivelmente, o glicerol absorvido via epitélio ruminal disponibilizou mais rapidamente substrato gliconeogênico ao fígado que gerou picos de glicose nos animais alimentados com glicerina após a alimentação, fato não observado nos animais controle.

Entretanto, como foi observado na Figura 2, a glicemia média ficou em níveis fisiológicos e não pareceu ser o fator limitante na produção de oócitos e embriões.

Thompson et al. (1996) reportaram que os embriões bovinos, do estágio inicial de desenvolvimento tem capacidade limitada de usar glicose, dependendo da oxidação de nutrientes como o piruvato no fornecimento de energia.

O uso de glicose pelo embrião necessita de transportadores de glicose GLUT (glucose transporter), que variam conforme o estágio de desenvolvimento dos embriões (PANTALEON et al., 1997).

Assim, parece que as necessidades de glicose dos oócitos e embriões mudam conforme a evolução e maturação dessas estruturas e são facilitadas por diferentes transportadores de glicose que atuam especificamente em cada fase de desenvolvimento. Portanto, possivelmente um alto suprimento de glicose poderia não ser vantajoso para oócitos e embriões já que a necessidade deste nutriente varia de acordo com o seu desenvolvimento.

Por outro lado, a baixa disponibilidade de energia e carência de glicose que ocorre no período de transição durante o BEN suprime a secreção pulsátil de LH e reduz a resposta ovariana ao LH (BUTLER, 2001), impedindo a ocorrência de ovulação.

Possivelmente, a glicose não é um substrato importante em grandes quantidades para os oócitos e embriões, mas é fundamental para abrandar as desordens endócrinas, como baixa produção de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), insulina, frequência de pulsos de LH, baixa concentração de progesterona, o que compromete o desempenho reprodutivo do rebanho (FORMIGONI et al., 1996).

Conclusões

Conclui-se que não houve efeito sobre a média de glicose sanguínea, mas houve aumentos pontuais na glicemia nos animais tratados com 15% de glicerina de biodiesel em relação aos controles. Nas fêmeas holandesas utilizadas neste ensaio, o incremento da glicose sérica não influenciou na produção e melhoria da qualidade dos oócitos aspirados, na maturação *in vitro*, na qualidade e produção de embriões ou na probabilidade de persistência da viabilidade dos embriões.

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação – CEAE da Universidade Estadual de Maringá PR UEM, em 20/02/2009.

Referências

- ALVES, N. G.; PEREIRA, M. N.; COELHO, R. M. Nutrição e reprodução em vacas leiteiras. *Revista Brasileira de Reprodução Animal Supl*, Belo Horizonte, v. 6, p. 118-124, 2009.
- AOAC-ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis*. 15.ed. Washington D.C. 1990. 1141 p.
- BERTICS, S. J.; GRUMMER, R. R.; VALINO, C. C.; STODARD, E. E. Effect of prepartum matter intake on liver triglyceride concentration and early lactation. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 75, n. 7, p. 1914-1922, 1992.
- BOLAND, M. P.; GOULDING, D.; ROCHE, J. F. Alternatives gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology*, Stoneham v. 35, p. 5-17, 1991.
- BORDIGNON, V.; MORIN, N.; DUROCHER, J.; BOUSQUET, D.; SMITH, L. C. GnRH improves the recovery rate and the *in vitro* developmental competence of oocytes obtained by transvaginal follicular aspiration from superstimulated heifers. *Theriogenology*, Stoneham, v. 48, p. 291-298, 1997.
- BRITT, J. H. Influence of nutrition and weight loss on reproduction and early embryonic death in cattle. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 17., 1991, St. Paul. *Proceedings ...* St. Paul: WCB, 1991, p. 143-149.
- BUTLER, W. R. Nutritional effects on resumption of ovarian cyclicity and conception rate in postpartum dairy cows. *Animal Science Occasional Publications*, Edinburgh, v. 26, p. 133-145, 2001.
- CHUNG, Y. H.; RICO, D. E.; MARTINEZ, C. M.; CASSIDY, T. W.; NOIROT, V.; AMES, A.; VARGA, G. A. Effects of feeding dry glycerin to early postpartum Holstein dairy cows on lactational performance and metabolic profiles. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 90, p. 5682-5691, 2007.
- DRACKLEY, J. K. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier. *Journal of Dairy Science*, Savoy, v. 82, p. 2259-2273, 1999.
- EDMONSON, A. J.; LEAN, I. J.; WEAVER, L. D.; FARVER, T.; WEBSTER, G. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, Savoy, v. 72, p. 68-78, 1989.
- FORMIGONI, A.; CORNIL, M. C.; PRANDI, A.; MORDENTI, A.; ROSSI, A.; PORTETELLE, D.; RENAUVILLE, R. Effect of propylene glycol supplementation around parturition on milk, reproduction performance and some hormonal and metabolic characteristics in dairy cows. *Journal of Dairy Research*, Cambridge, v. 63, n. 1, p. 11-24, 1996.
- GOERING, H-K.; VAN SOEST, P. J. *Forage fiber analyses (Apparatus, reagents, procedures, and some applications)*. Agriculture Handbook 379. United States Department of Agriculture. Washington, 20p. 1970.
- GONÇALVES, P. B. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; MEZZALIRA, A.; MONTAGNER, M. M.; VISINTIN, J. A.; COSTA, L. B. F. IN:GONÇALVES, P. B. D., FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 2. ed. São Paulo: Editora Roca Ltda. 2008, p. 261-291.

- HANSEN, L.; HEINS, B. Estratégias de cruzamento de gado leiteiro para melhorar o desempenho econômico. In: CARVALHO, M. P.; SANTOS, M. V. (Eds.). SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO INTENSIVA DE LEITE, 8., 2007, Uberlândia. *Anais...*, Uberlândia: 2007. p. 304.
- HASLER, J. F.; HENDERSON, W. B.; HURTGEN, P. J.; JIN, Z. Q.; McCAULEY, A. D.; MOWER, S. A.; NEELY, B.; SHUEY, L. S.; STOKES, J. E.; TRIMMER, S. A. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, Stoneham, v. 43, p. 141-152, 1995.
- HEAD, H. H.; GULAY, M. S. Recentes avanços na nutrição de vacas no período de transição. In: SINLEITE – SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE BOVINOCULTURA DE LEITE, 2., 2001, Lavras. *Anais...* Lavras: UFLA, 2001. p. 121-137.
- HEIDELBERGER, P.; WELCH, P. Simulation run length control in the presence of an initial transient. *Operations Research*, Baltimore, v. 31, p. 1109-1144, 1983.
- KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 932 p.
- KREHBIEL, C. R. Ruminant and physiological metabolism of glycerin. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 86, p. 392, 2008.
- LEROY, J. L. M. R.; OPSOMER, G.; DE VliegHER, S.; VANHOLDER, T.; GOOSSENS, L.; GELDHOF, A.; BOLS, P. E.; DE KRUIF, A.; VAN SOOM, A. Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows. *Theriogenology*, Stoneham, v. 64, p. 2022-2036, 2005.
- LEROY, J. L. M. R.; VANHOLDER, T.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; DE KRUIF, A. The *in vitro* development of bovine oocytes after maturation in glucose and β -hydroxybutyrate concentrations associated with negative energy balance in dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*, Berlin, v. 43, p. 612-622, 2008.
- LEROY, J. L. M. R.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; GOOVAERTS, I. G. F.; BOLS P. E. J. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part. I. *Reproduction in Domestic Animals*, Berlin, v. 43, p. 612-622, 2008.
- LOPES, A. S.; MARTINUSSEN, T.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Effect of days post-partum, breed and ovum pick-up scheme on bovine oocyte recovery and embryo development. *Reproduction in Domestic Animals*, Berlin, v. 41, p. 196-203, 2006.
- LUCY, M. C.; JIANG, H.; KOBAYASHI, Y. Changes in the somatotrophic axis associated with the initiation of lactation. *Journal of Dairy Science*, Savoy, v. 84, Suppl. E, p. 113-119, 2001.
- NRC-NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Nutrient requirements of dairy cattle*. 7.ed. Washington, DC: National Academy Press, 2001. 381p.
- OLIVEIRA FILHO, E. B. *Manual da sociedade internacional de transferência de embriões*. 3.ed. São Paulo: Sociedade Brasileira e Transferência de Embriões, p. 180, 1999. Traduzido de: STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL. Embryo Transfer Society. Illinois, 1999.
- PANTALEON, M.; HARVEY, M. B.; PASCOE, W. S.; JAMES, D. E.; KAYE, P. L. Glucose transporter GLUT3: ontogeny, targeting and role in the mouse blastocyst. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, Washington, v.94, p.3795-3800, 1997.
- PERRY, G. A. Effect of follicle size on fertility in cattle. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, Brookings, SD, v. 2, n. 14, p. 1-9, 2007
- R DEVELOPMENT CORE TEAM . R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Áustria. ISBN 3-900051-07-0. 2012. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 15 agosto 2012.

- ROSSI, R. M. *Introdução aos métodos Bayesianos na análise de dados zootécnicos com uso do WinBUGS e R*. Maringá: Eduem, 2011. 191p.
- SARTORI, R.; ROSA, G. J. M.; WILTBANK, M. C. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *Journal of Dairy Science*, Savoy, v. 85, p. 2813-2822, 2002.
- SUTTON, M. L.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Effects of *in vivo* and *in vitro* environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte development capacity. *Human Reproduction Update*, Oxford, v. 9, p. 35-48, 2003.
- THOMPSON, J. G. Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology*, Stoneham, v. 45, p. 27-40, 1996.
- VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, Savoy, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991.
- VAN SOEST, P.J. *Nutrition ecology of the ruminants*. Ithaca, New York: Cornell University Press, 1994.
- WASHBURN, S.P.; SILVIA, W.J.; BROWN, C.H.; McDANIEL, B.T.; McALLISTER, A.J. Trends in reproductive performance in Southeastern Holstein and Jersey DHI herds. *Journal of Dairy Science*, Savoy, v. 85, p. 244-251, 2002.
- WITWER, F.; BÖHMWALD, H.; CONTRERAS, P. A.; PHIL, M.; FILOZA, J. Análisis de los resultados de perfiles metabólicos obtenidos en rebaños lecheros en Chile. *Archivos de Medicina Veterinária*, Valdívia, v. 19, n. 2, p. 35-45, 1987.

VI - CONCLUSÕES GERAIS

O presente experimento foi dividido em três partes. No primeiro e segundo trabalhos foi avaliada a inclusão de 0, 5, 10, 15 e 20% de glicerina de biodiesel nas silagens de milho e cana-de-açúcar e os efeitos na composição química, estabilidade aeróbia, DIVMS, DIVPC, a degradabilidade *in situ* da MS, FDN e PB. No terceiro ensaio, utilizaram-se dez fêmeas holandesas em que se avaliaram os efeitos da adição de 15% glicerina adicionada à silagem de milho sobre a produção e qualidade de oócitos e a produção *in vitro* de embriões. No primeiro experimento com silagem de cana-de-açúcar e níveis de glicerina, observaram-se melhorias na composição química pelo incremento de CNF, NDT, MS e pela redução dos teores de FDN e de FDA, resultados que possibilitam compensar perdas de qualidade nos processos de ensilagem, e no fornecimento aos animais após a abertura. A DIVMS e DIVPC aumentaram linearmente e foram influenciados pela inclusão da glicerina. A glicerina adicionada à silagem de cana-de-açúcar melhorou a estabilidade aeróbia mantendo o pH e temperatura baixos por mais tempo. Esses resultados indicam a glicerina como um promissor aditivo para silagens de cana-de-açúcar, sendo capaz de enriquecer a densidade energética e melhorar a estabilidade aeróbia do material ensilado. No segundo experimento com silagem de milho e níveis de glicerina observaram-se aumentos nos teores de MS, CNF, MM, NDT e a redução da FDN, FDA, PB e EE à medida que a inclusão da glicerina foi maior. Na avaliação da estabilidade aeróbia, a temperatura e o pH das silagens com glicerina se mantiveram inferiores aos outros níveis no período avaliado. A DIVMS e DIVPC nas silagens glicerina foram superiores às demais. A degradabilidade efetiva da MS foi melhor nas silagens com glicerina. A glicerina demonstrou ser um aditivo promissor para silagens de milho, sendo capaz de enriquecer a densidade energética, melhorar a degradabilidade ruminal da MS e manter a estabilidade aeróbia do material ensilado. No terceiro experimento, não foram observadas diferenças no número de oócitos viáveis e não viáveis entre o grupo controle com glicerina. Não houve diferença

na persistência dos embriões viáveis observados aos sete, oito e nove dias, mas observou-se diferença nas probabilidades entre embriões não viáveis e oócitos aspirados com resultado negativo para o grupo controle em relação aos com glicerina. Não foram observadas diferenças na glicemia pré e pós-prandial, nos animais tratados com glicerina em relação aos controles, mas houve aumentos pontuais do grupo com glicerina em relação ao controle. Conclui-se que a glicerina gerou aumentos pontuais da glicose sérica, mas não influenciou na produção e melhoria da qualidade dos oócitos e embriões ou na persistência da viabilidade dos embriões.

VII - IMPLICAÇÕES

As gramíneas compõem a maior parte da dieta dos ruminantes no Brasil, sendo a principal fonte de energia para bovinos de leite e de corte e, por isso, o desempenho desses animais está fortemente ligado à qualidade dos volumosos. A cana-de-açúcar e o milho são as plantas mais utilizadas para ensilagem, por sua produtividade, adaptação a praticamente todos os climas e solos, e ótimos teores de matéria seca. Mesmo com boas características nutricionais, as silagens de cana-de-açúcar ou de milho, na fase de utilização, perdem qualidade em função da exposição ao ar favorecendo a ação de microrganismos que promovem o aquecimento, a fermentação alcoólica, aumento de pH pela degradação do ácido lático e carboidratos solúveis da silagem. Em consequência do processo fermentativo aeróbio, as silagens perdem valor nutritivo além de comprometer o consumo e a digestibilidade.

Nas silagens de cana-de-açúcar e milho com glicerina deste ensaio notou-se excelente estabilidade aeróbia, constatada pela manutenção do pH e temperatura baixos e estáveis por maior tempo. Estes resultados destacam a glicerina como um promissor aditivo capaz de melhorar a estabilidade aeróbia do material ensilado, contribuindo para a conservação das qualidades nutricionais da silagem. Observou-se também que a inclusão de glicerina às silagens aumentou o teor de MS, NDT, CNF e reduziu os teores de FDN e FDA no material ensilado além de aumentar a degradabilidade da MS, FDN e PB. A alta concentração de energia associada ao sabor adocicado, além da redução de FDN e FDA são atributos altamente indicados para aumentar a IMS que é normalmente baixa nas vacas de alta produção no período de transição. Apesar de ser altamente solúvel, rapidamente fermentável e ter ótimo conteúdo energético, a glicerina não possui amido e por esta razão não provoca redução de pH no rúmen, característica importante que a distingue na classe de carboidratos rapidamente fermentáveis ricos em amido e por isso também altamente acidificantes.

Esta configuração obtida nas silagens com glicerina se encaixa bem nas demandas alimentares das vacas leiteiras no período de transição. A silagem com glicerina pode ser ótima estratégia para aumentar a IMS e melhorar o nível de glicose sérica e estimular a produção de insulina reduzir as concentrações de β -hidroxibutirato no plasma, e de cetonas na urina provenientes da mobilização lipídica, minimizando desordens metabólicas. Por aumentar o *status* energético, as silagens com glicerina se fornecidas três semanas pré-parto até três semanas após o parto, possivelmente provocaria efeitos positivos sobre o quadro metabólico das vacas facilitando o retorno ao estro e a melhoria da qualidade de oócitos e embriões.