

## GLICERINA CRUDA EN LA DIETA DE BOVINOS: EFECTO SOBRE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS SÉRICOS

### CRUDE GLYCERIN ON CATTLE DIETS: EFFECT ON SERIC BIOCHEMICAL PARAMETERS

CASTELLO BRANCO VAN CLEEF, ERIC HAYDT Dr<sup>1</sup>., BERTOCCO EZEQUIEL, JANE MARIA Dr<sup>1</sup>., VEY DA SILVA, DAVID ATTUY Dr<sup>2</sup>., D'AUREA, PASTORI Dr<sup>1</sup>., DE OLIVEIRA SCARPINO-VAN CLEEF, FLAVIA Dr<sup>1</sup>., PATIÑO PARDO, RENE MAURICIO Dr<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. <sup>3</sup>Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Sucre, Sincelejo, Colombia.

\*Correspondencia: [ericvandleef@gmail.com](mailto:ericvandleef@gmail.com)

Recibido: 20-03-2014; Aceptado: 3-06-2014

#### Resumen

El objetivo fue evaluar posibles alteraciones en los valores bioquímicos séricos de bovinos de engorde confinados, recibiendo elevadas concentraciones de glicerina cruda en la dieta. Treinta novillos Nelore fueron utilizados para las colectas de sangre, las cuales se realizaron cada 28 días. Los animales fueron confinados durante 103 días, alimentados con cinco dietas experimentales con 0; 7.5; 15; 22.5 y 30% de glicerina cruda en la materia seca, formuladas para obtener una relación entre forraje: concentrado de 30:70, en la que el ensilaje de maíz fue la fuente forrajera, y el concentrado compuesto por grano de maíz, cascarilla de soya, torta de girasol, glicerina cruda, carbonato de calcio, fosfato bicálcico y sal común. Se utilizó un diseño en bloques al azar, con cinco tratamientos y seis repeticiones, utilizando contrastes ortogonales para determinar los efectos lineal, cuadrático y cúbico de la adición de glicerina. Hubo un efecto lineal de la adición de glicerina sobre las concentraciones de creatina quinasa ( $P=0.02$ ), cuadrático sobre la de alanina amino transferasa ( $P=0.009$ ), cúbico sobre la de urea y creatinina ( $P=0.008$  e  $P=0.002$ , respectivamente). La adición de glicerina, considerando el tratamiento control, afectó significativamente ( $P<0.05$ ) las concentraciones de amino transferasa, alanina amino transferasa y creatinina dietas para bovinos tipo carne, con elevadas proporciones de glicerina, ocasionan alteraciones en los parámetros bioquímicos séricos de los animales.

**Palabras clave:** biodiesel, confinamientos, coproductos, sangre, rumiantes.

#### Abstract

The aim of this study was to evaluate the biochemical parameters cattle fed crude glycerin. Thirty Nelore steers were used for blood sampling each 28 days. The

animals were confined for 103 days, fed with five experimental diets containing 0, 7.5, 15, 22.5 and 30% crude glycerin on DM basis, formulated in a roughage: concentrate ratio of 30:70. Corn silage was used as roughage, and the concentrate was composed of corn grain, soybean hulls, sunflower meal, glycerin, limestone, dicalcium phosphate and salt. The experimental design was a randomized block with five treatments and six replicates. Orthogonal contrasts were used to determine the linear, quadratic and cubic effects of glycerin addition in diets and the effect of treatments with glycerin versus the control treatment. There was a linear effect of glycerin treatments versus control on concentrations of ALT e CK (P<0.001 and P=0.02, respectively), quadratic on ALT (P=0.009), cubic on urea and creatinine (P=0.008 and P=0.002, respectively) and glycerin treatments versus control on AST, ALT and creatinine (P<0.001, P<0.001 and P=0.02, respectively). Diets for beef cattle, with high levels of concentrate and crude glycerin, promote changes in serum biochemical parameters of the animals.

**Key words:** biodiesel, blood, coproducts, feedlot, ruminants.

## Introducción

A pesar de que la ganadería de carne brasilera se basa en el uso de pasturas, la práctica del confinamiento proporciona control de la época de sacrificio, independiente del clima, permite la comercialización de los animales en periodos más favorables, favorece el constante giro del capital invertido en la empresa ganadera, además de posibilitar valor agregado a la carne, por el mantenimiento de la calidad de la carne (NEUMAN *et al.*, 2007).

Reducir la polución ambiental es un objetivo mundial. El problemas del efecto invernadero es un asunto de constante investigación y de noticia en todo el mundo. El uso de combustibles de origen fósil ha sido considerado uno de los principales responsables del problema. La Comunidad Europea, Estados Unidos, Argentina, entre otros países están impulsando la sustitución del petróleo por combustibles de fuentes renovables, incluyendo principalmente el biodiesel, ante su expresiva capacidad de reducción en la emisión de gases con efecto estufa.

El biodiesel es producido por la reacción del aceite vegetal con un alcohol de cadena corta (metanol o etanol). Como regla general, se puede afirmar que cada 90 m<sup>3</sup> de biodiesel se genera 10 kg de glicerina cruda (DASARI *et al.*, 2005). Debido a la creciente producción de biodiesel en el mundo, hay gran cantidad de glicerina excedente. Los productos generados en la cadena productiva del biodiesel deben ser foco de análisis más detallados, pues pueden ser un factor determinante para la viabilidad económica de la producción de ese combustible.

Entre los principales se puede citar la glicerina, sin embargo, existen pocos estudios sobre el aprovechamiento de la glicerina como elemento viable de la cadena productiva. Así, para la viabilidad económica del biodiesel, se debe encontrar un fin productivo para la glicerina excedente generada. Una alternativa es el uso de glicerina en la alimentación de animales (DONKIN *et al.*, 2007; PARSONS *et al.*, 2009; MACH *et al.*, 2009), sin embargo los residuos de metanol y otros contaminantes pueden ser un problema, generando alteraciones metabólicas en los animales acarreando perjuicios a los animales y a los productores. Los perfiles metabólicos son usados como procedimientos de monitoreo rutinario para el diagnóstico de trastornos metabólicos, deficiencias derivadas de la nutrición y como preventivo de trastornos subclínicos, además de investigar problemas de salud y de desempeño de los rebaños (DUFFIELD y LEBLANC, 2009). La composición bioquímica de la sangre refleja de manera confiable el equilibrio entre el ingreso, el egreso y la metabolización de los nutrientes del tejido animal. Este equilibrio se conoce como homeostasis, en donde complejos mecanismos metabólicos- hormonales están involucrados. Fallos en los procesos homeostáticos llevan a la reducción del desempeño zootécnico y dependiendo del grado de desequilibrio, hasta enfermedades de la producción (GONZÁLEZ, 2000).

Desequilibrios entre nutrientes pueden provocar enfermedades sub clínicas que son difíciles de percibir y limitan la producción de un modo persistente, provocando una disminución de la producción. Son las denominadas enfermedades de la producción. Varios investigadores han sugerido que la alimentación de bovinos con dietas con elevadas proporciones de grano y bajas de forraje está asociada con la incidencia de enfermedades metabólicas como la acidosis ruminal, laminitis (NOCEK, 1997) e hígado graso (AMETAJ *et al.*, 2005), además de otros trastornos como abscesos del hígado (NAGARAJA y LECHTENBERG, 2007) y desplazamiento del abomaso (ANDERSEN, 2003). Estas enfermedades causan trastornos metabólicos que pueden ser identificados a través de la patología clínica veterinaria, con el uso de exámenes de sangre a nivel de laboratorio, como hemograma y bioquímica sérica, además de exámenes físicos en los animales.

El rumen bovino constituye una simbiosis clásica entre el hospedero y la microbiota. Perturbaciones en el equilibrio del ecosistema ruminal pueden llevar al desarrollo de enfermedades en el hospedero. De hecho, hay una línea creciente de estudios con evidencia en humanos y animales que demuestran que las dietas ricas en carbohidratos disponibles provocan grandes modificaciones en la

composición de la microbiota del tracto digestivo (TAJIMA *et al.*, 2001; AMAR *et al.*, 2008; CANI y DELZENNE, 2009; KHAFIPOUR *et al.*, 2009) asociado a la mayor incidencia de enfermedades metabólicas (AMETAJ, 2005; AMAR *et al.*, 2008; CANI y DELZENNE, 2009).

El objetivo fue evaluar posibles alteraciones en los valores bioquímicos séricos de bovinos de engorde confinados, recibiendo elevadas concentraciones de glicerina cruda en la dieta.

### **Material y métodos**

El experimento fue conducido en el confinamiento perteneciente al Departamento de Zootecnia de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Veterinarias de la Universidad Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Jaboticabal (Unesp/FCAV) y los análisis químicos fueron realizados en el Laboratorio del Departamento de Clínica y Cirugía Veterinaria de la Unesp/FCAV, utilizando kits comerciales.

Treinta novillos de la raza Nelore, con aproximadamente 18 meses de edad y  $277.7 \pm 23.8$  kg de peso vivo fueron distribuidos a cinco tratamientos según un diseño en bloques al azar. El periodo total de confinamiento fue de 103 días, siendo los primeros 21 días destinados a la adaptación de los animales a las condiciones experimentales. Las dietas experimentales (Tabla 1) fueron calculadas para atender las necesidades mínimas de nutrientes, según el NRC (1996). Las cinco dietas isoproteicas (12.2% de PB en la MS) e isoenergéticas (2.5 Mcal EM/kg de MS) presentaron una proporción de forraje:concentrado de 30:70. La fracción fibrosa fue representada por ensilaje de maíz, y el concentrado compuesto por grano de maíz, cascarilla de soya, torta de girasol, glicerina, carbonato de calcio, fosfato bicálcico y sal común. Las dietas experimentales fueron: GLI 0 – control, sin adición de glicerina; GLI 7.5 – 7.5% de glicerina en la materia seca de la dieta; GLI 15 – 15% de glicerina en la materia seca de la dieta; GLI 22.5% de glicerina en la materia seca de la dieta; GLI 30 – 30% de glicerina en la materia seca de la dieta.

El alimento era ofrecido dos veces al día, a las 08:00 y a las 17:00 horas. El concentrado y el ensilaje eran pesados separadamente y ofrecidos en cantidades iguales en cada hora de oferta. La oferta de los alimentos fue ajustada diariamente para que las sobras representaran alrededor del 10%.

Los animales fueron sometidos a colectas de sangre por punción en la vena coccígea, utilizando tubos Vacuotainer<sup>®</sup>, en el primer día del periodo experimental, después a las cuatro y ocho semanas desde la primera colecta, y en el día anterior al sacrificio de los animales, totalizando cuatro colectas en intervalos de aproximadamente 28 días, durante 103 días. Las muestras fueron analizadas en laboratorio, utilizando kits comerciales Labtest, calculando las concentraciones séricas de las enzimas aspartato amino transferasa (AST), alanina amino transferasa (ALT), fosfatasa alcalina (FAL), gama glutamil transferasa (GGT) y cretina quinasa (CK), además de urea, cretinina, proteínas totales, glucosa, triglicéridos, colesterol y minerales (sodio, calcio, potasio y magnesio).

Los datos fueron analizados según un diseño experimental en bloque al azar con seis repeticiones por tratamiento. El modelo estadístico incluyó los factores: bloque, tratamiento, bloque x tratamiento, colecta y colecta x tratamiento. Contrates ortogonales fueron aplicados para verificar los efectos lineal, cuadrático y cúbico de la inclusión de glicerina en las dietas, y el efecto de los tratamientos con glicerina *versus* el tratamiento control (sin glicerina), a través del programa estadístico SAS versión 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), con significancia de 5%.

**Tabla 1.** Proporción de ingredientes y estimativa de la composición bromatológica de las dietas en los tratamientos experimentales (% MS)

Ingredientes	Tratamientos				
	GLI 0 <sup>1</sup>	GLI 7.5 <sup>2</sup>	GLI 15 <sup>3</sup>	GLI 22.5 <sup>4</sup>	GLI 30 <sup>5</sup>
Ensilaje de maíz	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00
Maíz en grano	35.00	25.50	18.00	12.50	5.00
Cascarilla de soya	19.20	18.05	14.55	8.90	5.45
Torta de girasol	14.60	17.80	21.30	24.90	28.40
Glicerina	0.00	7.50	15.00	22.50	30.00
Sal común	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Piedra caliza	0.70	0.65	0.55	0.70	0.65
Fosfato bicálcico	0.00	0.10	0.10	0.00	0.00
	Composición Bromatológica				
PB (% MS)	12.20	12.21	12.22	12.20	12.21
EM (Mcal/kg)	2.53	2.52	2.52	2.53	2.52
EE (%)	2.90	2.58	2.31	2.09	1.81
FDN (%)	40.83	40.07	38,11	35.01	33.08
FDA (%)	25.41	25.56	24.71	22.89	22.06
HEM (%)	15.42	14.51	13.41	12.12	11.02
Ca (%)	0.56	0.56	0.55	0.57	0.55
P (%)	0.32	0.32	0.35	0.34	0.34

<sup>1</sup>Tratamiento control sin adición de glicerina; <sup>2</sup>Adición de 7.5% de glicerina en la MS da dieta; <sup>3</sup>Adición de 15% de glicerina en la MS de la dieta; <sup>4</sup>Adición de 22.5% de glicerina en la MS de la dieta; <sup>5</sup>Adición de 30% de glicerina en la MS de la dieta.

## Resultados y discusión

No se observó interacción ( $P>0.05$ ) entre los tratamientos y tiempos de colecta para ninguno de los parámetros sanguíneos evaluados. Se presentó un efecto lineal ( $P<0.05$ ) decreciente sobre las concentraciones séricas de ALT y CK debido a la inclusión de glicerina en la dieta; evidenciándose también el efecto ( $P<0.001$ ) de la inclusión de glicerina en relación al tratamiento control sobre las concentraciones séricas de AST y ALT. También fue evidenciado un efecto cuadrático ( $P=0.009$ ) de la adición de glicerina sobre las concentraciones séricas de ALT. No se presentó efecto significativo de la adición de glicerina en la dieta sobre las concentraciones séricas de GGT y FAL (Tabla 2). Fueron evidenciadas diferencias entre las colectas de sangre para las variables ALT ( $P=0.002$ ) y FAL ( $P=0.01$ ) como se aprecia en la Tabla 3.

**Tabla 2.** Concentraciones enzimáticas de AST, ALT, CK, AST, GGT y FAL (U/L) de bovinos tipo carne, en función de diferentes concentraciones de glicerina cruda en la dieta

Ítem	Glicerina cruda en la dieta (%)					Contraste, valor de P				EPM <sup>e</sup>
	0	7.5	15	22.5	30	L <sup>a</sup>	Q <sup>b</sup>	C <sup>c</sup>	0 x GI <sup>d</sup>	
ALT <sup>f</sup>	26.9	21.6	22.5	20.3	20.5	**	**	NS	**	1.22
CK <sup>g</sup>	440.4	381.8	355.9	417.7	220.4	*	NS	NS	NS	95.35
AST <sup>h</sup>	74.0	66.6	60.2	67.9	59.7	NS	NS	NS	**	5.75
GGT <sup>i</sup>	26.4	23.6	24.9	44.9	22.9	NS	NS	NS	NS	15.98
FAL <sup>j</sup>	260.1	230.1	259.2	198.7	219.9	NS	NS	NS	NS	43.44

<sup>a</sup>Lineal, <sup>b</sup>Cuadrático, <sup>c</sup>Cúbico, <sup>d</sup>Control *versus* los demás tratamientos, <sup>e</sup>Error estándar de la media, <sup>f</sup>Alanina aminotransferasa, <sup>g</sup>Creatina quinasa, <sup>h</sup>Aspartato aminotransferasa, <sup>i</sup>Gama glutamil transferasa, <sup>j</sup>Fosfatasa alcalina, \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , NS = No significativo.

Los valores encontrados para las enzimas AST y FAL difieren de los encontrados por OLIVEIRA *et al.* (2008) al trabajar con novillas ingiriendo 40% de pulpa cítrica en la materia seca de la dieta, que fueron de 14.65 a 24.1 U/L y 46.15 a 190.02 U/L, respectivamente. Sin embargo, la media observada en este trabajo para AST está por debajo del valor sugerido como normal por KANEKO *et al.* (2008), que es de 78 a 132 U/L y dentro de lo sugerido como normal, también por este autor, para la enzima FAL, que es de 0 a 488 U/L.

**Tabla 3.** Efecto de los días de colecta de sangre sobre los valores medios de ALT, CK, AST, GGT e FAL de bovinos tipo carne

Ítem	Colectas de sangre				Valor de P	EPM <sup>6</sup>
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>		
ALT <sup>1</sup>	20.41b	22.52a	23.22a	23.08a	**	0.40
CK <sup>2</sup>	433.12	334.55	373.05	304.01	NS	24.09
AST <sup>3</sup>	66.97	64.25	68.96	62.27	NS	1.50
GGT <sup>4</sup>	22.95	24.99	41.31	24.13	NS	3.79
FAL <sup>5</sup>	190.71b	213.39ab	273.64a	255ab	**	10.69

<sup>1</sup>Alanina aminotrasferase (U/L), <sup>2</sup>Creatina quinase (U/L), <sup>3</sup>Aspartato aminotrasferase (U/L), <sup>4</sup>Gama glutamil transferase (U/L), <sup>5</sup>fosfatase alcalina (U/L), <sup>6</sup>Error estándar de la media, \*P<0.05, \*\*P<0.01, NS=No significativo. Medias seguidas de letras distintas, difieren según la prueba de Tukey.

La enzima CK presentó valor medio de 363.2 U/L, superior a los sugerido por KANEKO *et al.* (2008), que es de 4.8 a 12.1 U/L. CK es un indicador sensible y específico de lesión muscular en animales domésticos. Elevaciones en las concentraciones de esta enzima están comúnmente asociadas a miopatías de esfuerzo (rabdomiolisis), siendo también observadas como manifestaciones musculoesqueléticas de molestia sistémica. Mientras que elevaciones de hasta 500 U/L son consideradas normales durante el ejercicio moderado (HODGSON, 1994), por lo tanto, los valores encontrados están dentro de los valores sugeridos durante el ejercicio moderado. Esos valores ocurrieron, probablemente, debido al estrés de los animales durante las colectas de sangre, ya que fueron manejados en tronco de contención.

MINERVINO *et al.* (2009) observaron valores de la enzima GGT entre 2.5 y 39.1 U/L, antes y después de la realización de biopsia hepática, respectivamente, indicando que esta enzima es sensible a las alteraciones hepáticas estructurales. En el presente estudio, el valor medio encontrado estuvo por encima del rango sugerido como normal por KANEKO *et al.* (2008), que es de 6.1 a 17.4 U/L, sugiriendo que pudieron haber ocurrido algunas alteraciones hepáticas en los animales. Sin embargo, como los animales que recibieron la dieta control presentaron medias semejantes a los que recibieron dietas con adición de glicerina, esas alteraciones hepáticas no deben ser atribuidas a los tratamientos estudiados, pero puede sugerirse que tales alteraciones ocurrieron debido a la mayor actividad energética a que el hígado fue sometido por la elevada ingestión de concentrados en la dieta, lo que pudo haber alterado el metabolismo hepático.

En relación a las concentraciones de urea y creatinina, se observó un comportamiento cúbico ( $P=0.008$  y  $p=0.002$ ) de los tratamientos sobre las concentraciones séricas de urea y creatinina, respectivamente, y efecto del tratamiento control *versus* los tratamientos con inclusión de glicerina ( $P=0.02$ ) sobre las concentraciones de creatinina (Tabla 4). También se evidenciaron diferencias entre los días de colecta sobre los valores medios de creatinina ( $P=0.0008$ ) y proteínas totales ( $P<0.0001$ ), como presentado en la Tabla 5.

Usualmente, los valores de urea y creatinina son indicados para la evaluación de la función renal de los animales domésticos, ofreciendo subsidios para el diagnóstico y/o pronóstico de inúmeras nefropatías (KANEKO *et al.*, 2008). En rumiantes, los niveles de urea sanguínea son afectados por el nivel nutricional, siendo la urea un indicador sensible e inmediato de la ingestión de proteínas, al contrario de la albúmina, que es un indicador al largo plazo del estatus proteico (GONZÁLEZ y SCHEFFER, 2003). El equilibrio energía/proteína en la dieta del rumiante es fundamental para el buen aprovechamiento de la urea.

**Tabla 4.** Concentraciones séricas de urea, creatinina y proteínas totales de bovinos tipo carne en función de las concentraciones de glicerina cruda en la dieta

Variable	Glicerina cruda, (%)					Contraste, valor de P				EPM <sup>e</sup>
	0	7.5	15	22.5	30	L <sup>a</sup>	Q <sup>b</sup>	C <sup>c</sup>	0 x Gli <sup>d</sup>	
UREIA <sup>f</sup>	22.71	18.14	23.49	22.00	21.54	NS	NS	**	NS	1.71
CREA <sup>g</sup>	2.04	1.85	1.84	2.03	1.85	NS	NS	**	*	0.09
PT <sup>h</sup>	6.67	6.56	6.70	6.97	6.63	NS	NS	NS	NS	0.45

<sup>a</sup>Lineal, <sup>b</sup>Cuadrático, <sup>c</sup>Cúbico, <sup>d</sup>Control *versus* los demás tratamientos, <sup>e</sup>Error estándar de la media, <sup>f</sup>mmol/L, <sup>g</sup>Creatinina (mg/dL), <sup>h</sup>Proteínas Totales (g/dL), \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , NS = No significativo.

LAGE *et al.* (2010) demostraron que la inclusión de hasta 12% de glicerina en la dieta de rumiantes aumenta la digestibilidad de los carbohidratos no fibrosos y causa consecuentemente mayor producción de energía. Los animales que recibieron el tratamiento con 7.5% de glicerina cruda presentaron valores de concentración de urea menores que en los demás tratamientos, sugiriendo que este tratamiento podría haber proporcionado una mayor disponibilidad energética para el animal, sin embargo, el valor sérico medio de urea observado en el estudio haya sido superior al intervalo considerado como normal por KANEKO *et al.* (2008), que es de 7.14 a 10.7 mmol/L.



**Tabla 5.** Efecto de los días de colecta de sangre sobre las concentraciones séricas de urea, creatinina y proteínas totales de bovinos tipo carne

Ítem	Colecta de sangre				Valor de P	EPM <sup>4</sup>
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>		
UREIA <sup>1</sup>	23.09	21.68	20.84	1.71	NS	0.49
CREA <sup>2</sup>	1.88b	1.82b	1.94ab	0.09	**	0.02
PT <sup>3</sup>	7.07a	5.41b	7.31a	7.11a	**	0.12

<sup>1</sup>mmol/L, <sup>2</sup>Creatinina (mg/dL), <sup>3</sup>Proteínas Totales (g/dL), <sup>4</sup>Error estándar de la media, \*<0.05, \*\*<0.01, NS=No significativo. Médias seguidas de letras distintas, difieren según la prueba de Tukey.

La adición de glicerina en elevadas concentraciones, debe causar una disminución en la disponibilidad ruminal de almidón, derivada de la reducción del maíz sustituido por la glicerina en las dietas. Según WITTWER (2000) la reducción de la ingestión de energía actúa inversamente en la concentración de amonio en rumen. Esto ocurre debido a la disminución de la síntesis proteica, elevando la concentración de urea en sangre.

Debido a las colectas de sangre fueron realizadas con los animales en ayuno de 12 horas, la mayor parte del concentrado ya habría sido digerido y absorbido por parte del animal, restando en el rumen la fracción fibrosa, lo que pudo ocasionar un déficit energético temporario en el rumen. Con poca energía disponible, hay poca captación de amonio por parte de los microorganismos y consecuentemente una disminución en la formación de proteína microbiana, siendo así, el amoniaco se acumula en el rumen y se difunde para la sangre, aumentando la formación de urea por el hígado. Este hecho explica los elevados niveles de urea sérica encontrada en los animales.

La excreción de creatinina solo se realiza por vía renal, ya que esta no es reaprovechada por el organismo. Por lo tanto, los niveles séricos de creatinina reflejan la tasa de filtración renal, de manera que niveles altos de creatinina indican una deficiencia en la funcionalidad renal (GONZÁLEZ y SHEFFER, 2003). El valor sérico medio observado para la concentración de creatinina está dentro del rango sugerido como normal por KANEKO *et al.* (2008), que es de 1 a 2 mg/dL, sin embargo, los animales que recibieron glicerina en la dieta presentaron valores inferiores. Por lo tanto, se puede inferir que la adición de glicerina no interfirió negativamente sobre la funcionalidad renal, a pesar de la discreta disminución del metabolismo renal, evidenciado por la menor concentración sérica de creatinina en los individuos que recibieron glicerina.

No se presentó efecto de los tratamientos ( $P>0.05$ ) sobre las concentraciones séricas de proteínas totales. Las proteínas sanguíneas son sintetizadas principalmente por el hígado, siendo que la tasa de síntesis está directamente relacionada con el estado nutricional del animal, especialmente con los niveles de proteína y de vitamina A, y con la funcionalidad hepática (GONZÁLEZ y SHEFFER, 2003). Uno de los metabolitos utilizados para la evaluación del estatus nutricional proteico son las proteínas totales. La disminución de estas proteínas en la sangre está relacionada con deficiencia proteica en la alimentación, descartadas causas patológicas. El valor medio encontrado para las concentraciones séricas de proteínas totales (Tabla 4) fue ligeramente inferior a el intervalo sugerido como normal por KANEKO *et al.* (2008), que es entre 6.74 y 7.46 g/dL. Los animales no presentaron ninguna señal patológica y además las dietas experimentales contenían suficiente cantidad de proteína, por tanto, esa ligera alteración pudo ser ocasionada por la elevada ingestión de concentrado asociado a la adición de glicerina.

Considerando el metabolismo energético, no hubo efecto de los tratamientos sobre las concentraciones de los parámetros analizados en relación a las concentraciones séricas de glucosa, triglicéridos y colesterol (Tabla 6). Sin embargo, fue observada diferencia entre los días de colecta para esos tres parámetros (Tabla 7). Las concentraciones de glucosa y colesterol se ubicaron por encima del intervalo sugerido por KANEKO *et al.* (2008) y POGLIANI y BIEL (2007), que son de 45 a 75 mg/dL y 71.9 a 76.5 mg/dL, respectivamente para glucosa e de 80 a 120 mg/dL y 73.9 a 90.2 mg/dL, respectivamente para colesterol. Las concentraciones de triglicéridos están por encima del intervalo considerado como normal por POGLIANI y BIEL (2007), que está entre 16.3 y 34.8 mg/dL.

**Tabla 6.** Concentraciones séricas de glucosa, triglicéridos y colesterol en bovinos tipo carne en función de las concentraciones de glicerina cruda en la dieta

Ítem	Glicerina cruda (%)					Contraste, valor de P				EPM <sup>e</sup>
	0	7.5	15	22.5	30	L <sup>a</sup>	Q <sup>b</sup>	C <sup>c</sup>	0 x Gli <sup>d</sup>	
GLI <sup>f</sup>	96.20	93.51	92.34	97.07	99.96	NS	NS	NS	NS	8.34
TRIG <sup>g</sup>	17.18	15.26	17.52	17.35	18.56	NS	NS	NS	NS	2.33
COL <sup>h</sup>	128.89	131.74	146.96	109.63	101.33	NS	NS	NS	NS	23.22

<sup>a</sup>Lineal, <sup>b</sup>Cuadrático, <sup>c</sup>Cúbico, <sup>d</sup>Control *versus* los demás tratamientos, <sup>e</sup>Error estándar de la media, <sup>f</sup>Glicose (mg/dL), <sup>g</sup>Triglicerideos (mg/dL), <sup>h</sup>Colesterol (mg/dL), \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , NS = No significativo.

En los rumiantes las cantidades de glucosa que entran a la corriente sanguínea provenientes del tracto gastrointestinal son bajas, siendo el hígado responsable por su síntesis por medio de moléculas precursoras de la vía gluconeogénica. De esta manera, 50% de los requerimientos de glucosa provienen del propionato, 25% de los aminoácidos glucogénicos y 15% del ácido láctico. Otro importante precursor energético es el glicerol (GONZÁLEZ y SILVA, 2006).

**Tabla 7.** Efecto de los días de colecta de sangre sobre las concentraciones séricas de glucosa, triglicéridos y colesterol en bovinos tipo carne

Ítem	Colecta de sangre				Valor de P	EPM <sup>4</sup>
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>		
GLIC <sup>1</sup>	101.55ab	84.26c	106.25a	91.13bc	**	2.01
TRIG <sup>2</sup>	18.32a	17.21ab	19.20a	13.68b	**	0.53
COL <sup>3</sup>	90.23c	110.11bc	161.02a	135.12ab	*	5.69

<sup>1</sup>Glucose (mg/dL), <sup>2</sup>Triglicerideos (mg/dL), <sup>3</sup>Colesterol (mg/dL), <sup>4</sup>Error estándar de la media, \*<0,05, \*\*<0,01, NS = No significativo. Medias seguidas de letras distintas, difieren según la prueba de Tukey.

Los mecanismos que controlan los niveles de glucosa envuelven el control endocrino de la glucosa por las hormonas insulina y glucagón sobre el glucógeno y de los glucocorticoides sobre la gluconeogénesis. La concentración de glucosa puede aumentar el estrés crónico. La diabetes mellitus, más frecuente en monogástricos, se caracteriza por un cuadro de hiperglicemia y glucosuria (GONZÁLEZ y SILVA, 2006). La hiperglicemia encontrada pudo haber sido ocasionada por las alteraciones generadas en la microbiota ruminal por las dietas, culminando en mayor producción de propionato y, consecuentemente, mayor producción de glucosa en el hígado. Sin embargo, la adición de glicerina parece no ser motivo de la hiperglicemia, ya que los animales que recibieron la dieta control también evidenciaron hiperglicemia.

La ingestión de dietas con alto nivel de concentrado (más de 70%), propicia un aumento de la producción energética debido a las alteraciones en la fermentación ruminal y consecuentemente mayor producción de ácidos grasos, inicialmente depositados en el tejido adiposo. Cuando se incluye en exceso, se presenta un incremento en las concentraciones séricas de triglicéridos por encima de los valores de referencia, lo que puede llevar a la ocurrencia de patologías como la lipidosis hepática.

El colesterol presente en los animales puede ser de origen exógeno, originario de los alimentos, o endógeno, sintetizado por el organismo, a partir del acetyl-CoA, en hígado, gónadas, intestino, glándula adrenal y piel. Como el colesterol es eliminado en la forma de ácidos grasos biliares, el aumento de su concentración en plasma puede estar asociado con la obstrucción biliar extra-hepática, fibrosis hepática e hiperplasia de los ductos biliares. Además de ser excretado en la bilis, el colesterol puede ser eliminado en la orina, en la forma de hormonas esteroideas. De acuerdo con GONZÁLEZ y SILVA (2006) los niveles de colesterol pueden dar una indicación indirecta de la actividad tiroidea, ya que los estrógenos, formados a partir del colesterol, afectan la relación de las funciones de la hipófisis, tiroides y glándula adrenal. Por lo tanto, como no se evidenciaron modificaciones en las concentraciones de colesterol sérico, se puede concluir que no se presentaron alteraciones hepáticas y/o tiroideas suficientes para tales alteraciones.

La inclusión de glicerina en la dieta no afectó ( $P>0.05$ ) las concentraciones séricas de los minerales (Tabla 8). Los minerales séricos están relacionados al metabolismo de los animales y actúan principalmente en el transporte activo de nutrientes, regulación del equilibrio ácido-base, control del equilibrio hídrico, regulación metabólica, trasmisión de impulsos nerviosos, entre otros mecanismos del metabolismo animal. Sin embargo, se presentaron diferencias entre los tiempos de colecta para los minerales estudiados (Tabla 9).

En el presente estudio, el valor medio de calcio se encontró ligeramente encima de los valores de referencia para la especie, como citado por KANEKO *et al.* (2008), que está entre 9.7 y 12.4 mg/dL. OLIVEIRA *et al.* (2005) al aplicar calcio sérico en bovinos mestizos alimentados con 40% de pulpa cítrica en la MS de la dieta, encontraron valores inferiores (7.2 a 9.64 mg/dL), al observado en este estudio, que fue de 13.9 mg/dL.

**Tabla 8.** Concentraciones séricas de minerales en bovinos tipo carne en función de las concentraciones de glicerina cruda en la dieta

Ítem	Glicerina cruda, (%)					Contraste, valor de P				EPM <sup>e</sup>
	0	7.5	15	22.5	30	L <sup>a</sup>	Q <sup>b</sup>	C <sup>c</sup>	0 x Gli <sup>d</sup>	
Ca <sup>f</sup>	13.45	14.05	15.10	13.65	13.90	NS	NS	NS	NS	0.21
Na <sup>g</sup>	160.43	156.65	151.52	155.72	151.65	NS	NS	NS	NS	0.06
K <sup>h</sup>	5.87	5.67	5.51	6.32	5.68	NS	NS	NS	NS	0.68
Mg <sup>i</sup>	2.40	2.30	2.20	2.40	2.20	NS	NS	NS	NS	0.04

<sup>a</sup>Lineal, <sup>b</sup>Cuadrático, <sup>c</sup>Cúbico, <sup>d</sup>Control *versus* los demás tratamientos, <sup>e</sup>Error estándar de la media, <sup>f</sup>Calcio (mg/dL), <sup>g</sup>Sodio (mmol/L), <sup>h</sup>Potasio (mmol/L), <sup>i</sup>Magnesio (mg/dL), \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , NS = No significativo.

Los riñones controlan la cantidad de sodio y de agua en el organismo, manteniendo la concentración de sodio dentro de límites estrechos, a pesar de las variaciones debido a la ingestión diaria. KANEKO *et al.* (2008) sugieren valores normales séricos ligeramente debajo (132 a 152 mmol/L) del encontrado en este estudio. Elevaciones en los niveles de sodio ocurren por el aumento en la ingestión, pérdida excesiva de agua y fluidos o por ingestión inadecuada de agua (GONZÁLEZ y SILVA, 2006). A pesar de que la glicerina contiene sodio en su composición, sumada a la inclusión de 0.5% de NaCl en la ración, los niveles de ingestión no fueron excesivos, pues se mostró ligeramente por encima de lo normal, lo que no provoca daños en la salud animal, ni perjuicios en el desempeño.

Se presentó hipocalcemia, comparándose el valor sérico de potasio encontrado con el rango sugerido como normal por KANEKO *et al.* (2008), que es de 10 a 45 mmol/L. La hipocalcemia está generalmente asociada a la hipocloremia (MORAIS, 2010) y puede ocurrir en los casos de intususcepción de intestino y desplazamiento de abomaso (SILVA *et al.*, 2010; FREITAS *et al.*, 2010; MARQUES *et al.*, 2001), entre otras patologías que pueden ocurrir debido a la alta ingestión de granos en la dieta. Sin embargo, las dietas estudiadas causaron alteración en los niveles séricos de sodio, calcio y potasio, pero no suficientes para desencadenar síndromes metabólicos graves, porque podrían causar perjuicios a la salud y desempeño animal.

**Tabla 9.** Efecto de los días de colecta de sangre sobre las concentraciones séricas de calcio, sodio, potasio e magnesio en bovinos tipo carne

<sup>1</sup> Calcio	Ítem	Colecta de sangre				Valor de P	EPM <sup>5</sup>
		1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>		
	Ca <sup>1</sup>	2.66b	2.72b	2.74ab	3.12a	*	0.05
	Na <sup>2</sup>	1.70a	1.73a	1.14b	1.15b	**	0.03
	K <sup>3</sup>	5.21a	5.33a	3.96b	3.67b	**	0.16
	Mg <sup>4</sup>	0.42bc	0.39c	0.48ab	0.54a	**	0.01

(mg/dL), <sup>2</sup>Sodio (mmol/L), <sup>3</sup>Potasio (mmol/L), <sup>4</sup>Magnesio (mg/dL), <sup>5</sup>Error estándar de la media, \* < 0,05, \*\* < 0,01, NS = No significativo. Medias seguidas de letras distintas, difieren según la prueba de Tukey.

La concentración sérica de potasio se presentó con valores superiores a los referenciados por KANEKO *et al.* (2008), que es de 1.8 a 2.3 mg/dL. Un exceso de potasio puede inhibir la absorción de magnesio y llevar hasta hipomagnisemia. Esta se presenta cuando los niveles de magnesio están debajo de 1.75 mg/dL, y

los síntomas aparecen cuando los niveles caen a 1 mg/dL (GONZÁLEZ, 2000), situación que no fue evidenciada en este estudio. Por el contrario, las alteraciones encontradas en el metabolismo mineral de los animales no son suficientes para afirmar que hubo perjuicios sobre la salud animal, pues estos presentan señales clínicas que evidencian trastornos metabólicos.

## Conclusión

La inclusión de hasta 30% de glicerina cruda en la dieta de bovinos de corte confinados promueve algunas alteraciones en el cuadro bioquímico sérico de estos animales, indicando posibles alteraciones metabólicas, principalmente renales y hepáticas. Pero más estudios son necesarios para evaluar la influencia de esas dietas sobre el cuadro bioquímico sérico en un periodo mayor de confinamiento, para evitar pérdidas en el desempeño animal.

**Agradecimientos:** A FAPESP (*Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo*), por la financiación al presente estudio y a la Caramuru Alimentos S.A., por ceder parte de los ingredientes utilizados.

## Referencias

AMAR, J.; BURCELIN, R.; RUIDAVETS, J.B.; CANI, P.D.; FAUVEL, J.; ALESSI, M.C., CHAMONTIN, B.; FERRIÉRES, J. 2008. Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *The American journal of Clinical Nutrition* 87(5):1219-1223. Disponible en:

<http://ajcn.nutrition.org/content/87/5/1219.full.pdf+html>

AMETAJ, B.N. 2005. A new understanding of the causes of fatty liver in dairy cows. *Advance in Dairy Technology* 17:97-112. Disponible en:

<http://www.wcds.ca/proc/2005/Manuscripts/Ametaj.pdf>

AMETAJ, B.N.; BRADFORD, B.J.; BOBE, G; NAFIKOV, R.A.; LU, Y.; YOUNG, J.W.; BEITZ, D.C. 2005. Strong relationships between mediators of the acute phase response and fatty liver in dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science*. 85(2):165-175. Disponible en:

[ftp://173.183.201.52/inetpub/wwwroot/DairyWeb/Resources/Research/CJAS85/CJAS8502\\_165.pdf](ftp://173.183.201.52/inetpub/wwwroot/DairyWeb/Resources/Research/CJAS85/CJAS8502_165.pdf)

ANDERSEN, P.H. 2003. Bovine endotoxemia: some aspects of relevance to production diseases. *Acta Veterinaria Escandinavica* 98(Supp):141-155. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1751-0147-44-s1-s141.pdf>

CANI, P.D.; DELZENNE, N.M. 2009. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Current Pharmaceutical Desing* 15(13):1546-1558. Disponible en: <http://www.farm.ucl.ac.be/Full-texts-FARM/Cani-2009-1.pdf>

DASARI, M.A.; KIATSIMKUK, P.; SUTTERLIN, W.R.; SUPPES, G.J. 2005. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. *Applied Catalysis A: General* 281:225-231. Disponible en: <http://www.renewablealternatives.com/pgpaper.pdf>

DONKIN, S.S., PALLATIN, M.R.; DOANE, P.H.; CECAVA, M.J.; WHITE, H.M.; BARNES, E.; KOSER, S.L. 2007. Performance of dairy cows fed glycerol as a primary feed ingredient. *Journal of Animal Science* 85(Suppl. 1):T341.

DUFFIELD, T.F., LEBLANC, S.J. 2009. Interpretation of serum metabolic parameters around the transition period. *Southwest Nutrition and Management Conference*, p. 106-114, 2009. Disponible en: <http://ag.arizona.edu/ANS/swnmc/papers/2009/11%20Duffield%20%202009%20SWNMC.pdf>

FREITAS, M.D.; FERREIRA, M.G.; FERREIRA, P.M.; CARVALHO, A.U.; LAGE, A.P.; HEINEMANN, M.B.; FACURY FILHO, E.J. 2010. Equilíbrio eletrolítico e ácido-base em bovinos. *Ciência Rural* 40(12):2608-2615. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v40n12/a814cr3198.pdf>

GONZÁLEZ, F.H.D. 2000. Uso de perfil metabólico para determinar o status nutricional em gado de corte. In: González, F.H.D.; Barcellos, J.O; Ospina, H. et al. (Eds). *Perfil Metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais*. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SCHEFFER, J.F.S. 2003. Perfil sangüíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. In: I Simpósio De Patologia Clínica Veterinária Da Região Sul Do Brasil, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre: UFRGS, 2003, p.73-87.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. 2006. Introdução à bioquímica clínica veterinária. pp.1-357. Porto Alegre, Brasil: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

HODGSON, D.R. 1994. Moléstias do músculo. In: B.P., Smith (Ed.) *Tratado de medicina interna de grandes animais: moléstias de eqüinos, bovinos, avinos e caprinos*. 1.ed. pp.1325-1350. São Paulo: Manole.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.C. 2008. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6.ed. pp.1-928. San Diego: Academic Press.

KHAFIPOUR, E.; LI, S.; PLAIZIER, J.C.; KRAUSE, D.O. 2009. Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute rumen acidosis. *Applied and Environmental Microbiology* 75(22):7115-7124. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2786511/pdf/0739-09.pdf>

LAGE, J.F.; PAULINO, P.V.R.; PEREIRA, L.G.R.; VALADARES FILHO, S.C.; OLIVEIRA, A.S.; DETMANN, E.; SOUZA, N.K.P.; LIMA, J.C.M. 2010. Glicerina bruta na dieta de cordeiros terminados em confinamento. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 45(9):1012-1020. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/pab/v45n9/a11v45n9.pdf>

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

MARQUES, L.C.; CATELLAN, J.W.; MACORIS, D.G.; MARQUES, J.A.; PORTUGAL, E.S. ECADIOLI, F.A. 2001. Estudo clínico, cirúrgico e anatomopatológico de intussuscepção em quatro bovinos. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 53(1): 52-57. Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352001000100008&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352001000100008&script=sci_arttext)

MINERVINO, A.H.H.; BARRETO JUNIOR, R.A.; RODRIGUES, F.A.M.L.; FERREIRA, R.N.F.; SAUT, J.P.E.; QUEIROZ, G.F.; REIS, L.F. E ORTOLANI, E.L. 2009. Biópsia hepática por laparotomia paracostal em bovinos e búfalos. *Ciênci Rural* 39(3):798-802. Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782009000300025&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782009000300025&script=sci_arttext)

MORAIS, M.G.; GONÇALVES, L.C.; LOPES, H.O.S. 2000. Variação sazonal de eletrólitos no sangue de vacas aneladas sob pastejo contínuo de *Brachiaria decumbens*. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia* 52(2):105-111. Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352000000200004&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352000000200004&script=sci_arttext)

NAGARAJA, T.G.; LECHTENBERG, K.F. 2007. Liver abscesses in feedlot cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 23(2): 351-369.

NEUMANN, M.; SANDINI, I.E.; OST, P.R.; FALBO, M.K.; LUSTOSA, S.B.C.; PELLEGRINI, L.G. 2007. Desempenho de novilhos confinados alimentados com silagens de milho ou sorgo, associadas a três níveis de concentrado. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo* 6(3): 365-378. Disponible en: <http://rbms.cnpms.embrapa.br/index.php/ojs/article/viewFile/239/246>

NOCEK, J.K. 1997. Bovine acidosis: implications for laminitis. *Journal of Dairy Science* 80(5): 1005-1028. Disponible en:



[http://profs.basu.ac.ir/alipour/free\\_space/bovine%20acidosis%20implications%20on%20laminitis.pdf](http://profs.basu.ac.ir/alipour/free_space/bovine%20acidosis%20implications%20on%20laminitis.pdf)

NRC. 1996. Nutrient requirements of beef cattle. 7 ed. National Academic Press, Washington, D.C.

OLIVEIRA, N.J.F.; MELO, M.M.; LAGO, L.A.; NASCIMENTO, E.F. 2005. Hemograma, bioquímica sérica e histologia da biópsia hepática de bovinos após administração de polpa cítrica. Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia 57(3): 418-422. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v57n3/25509.pdf>

PARSONS, G. L., SHELOR, M. K.; DROUILLARD, J. S. 2009. **Performance and carcass traits of finishing heifers fed crude glycerin.** Journal of Animal Science 87(2):653-657. Disponível em: <http://biodieselfeeds.cfans.umn.edu/articles-beef/2009-Parsons-Performance%20and%20carcass%20traits%20of%20finishing%20heifers%20fed%20crude%20glycerin.pdf>

POGLIANI, F. C.; BIRGEL JÚNIOR, E. 2007. Valores de referência do lipidograma de bovinos da raça holandesa, criados no Estado de São Paulo. Brazilian Journal of Animal Research and Animal Science 44(5):373-383. Disponível em: <http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/26621/28404>

SILVA FILHO, A.P.; AFONSO, J.A.B.; SOUZA, J.C.A.; COSTA, N.A.; MENDONÇA, C.L. 2010. Análise clínica e patológica em 20 casos de intussuscepção em bovinos. Vet. e Zootec., 17(3):421-430. Disponível em: <http://www.fmvz.unesp.br/rvz/index.php/rvz/article/view/44>

TAJIMA, K.; AMINOV, R.I.; NAGAMINE, T.; MATSUI, H.; NAKAMURA, M.; BENNO, Y. 2001. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. Applied and Environmental Microbiology 67(6):2766-2774. Disponível em: <http://aem.asm.org/content/67/6/2766.full.pdf+html>

WITTEWER, F. 2000. Diagnósticos dos desequilíbrios metabólicos de energia em rebanhos bovinos. In: González, F.H.D.; Barcellos, J.O; Ospina, H. *et al.* (Eds). Perfil Metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais. Porto Alegre, Brasil, Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.