

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

EFEITO DO ISOPROPANOL NO DESEMPENHO E NA  
QUALIDADE DO LEITE DE VACAS LEITEIRAS

Autora: Janaina Macieiro Bragatto  
Orientador: Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Fevereiro – 2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

EFEITO DO ISOPROPANOL NO DESEMPENHO E NA  
QUALIDADE DO LEITE DE VACAS LEITEIRAS

Autora: Janaina Macieiro Bragatto  
Orientador: Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de Concentração Produção Animal.

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Fevereiro – 2021

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

B813e

Bragatto, Janaina Macieiro

Efeito do isopropanol no desempenho e na qualidade do leite de vacas leiteiras /  
Janaina Macieiro Bragatto. -- Maringá, PR, 2021.

72 f.: il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências  
Agrárias, Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2021.

1. Produção e Qualidade do leite. 2. Vacas leiteiras. 3. Silagem de milho - Tecnologia -  
Produção de leite. 4. Teste do álcool. I. Daniel, João Luiz Pratti , orient. II. Universidade  
Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Zootecnia. Programa  
de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

CDD 23.ed. 636.0862

Jane Lessa Monção - CRB 9/1173




UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS


EFEITO DO ISOPROPANOL NO DESEMPENHO  
E NA QUALIDADE DO LEITE DE VACAS LEITEIRAS

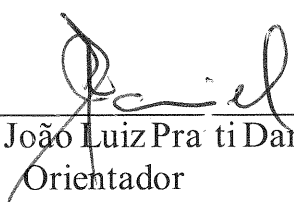
Autora: Janaina Macieiro Bragatto  
Orientador: Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção  
Animal

APROVADA em 26 de fevereiro de 2021.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Eduardo Schmitt

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Rodrigo de Almeida

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel  
Orientador

*“A persistência é o caminho mais curto para o êxito”*

*Charles Chaplin*

*A Deus, à minha família e aos amigos queridos e verdadeiros, que foram fundamentais em meu crescimento*

DEDICO

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pelo dom da vida e pela oportunidade de crescer e ser uma pessoa melhor a cada dia;

À Universidade Estadual de Maringá e o Programa de Pós-graduação, por viabilizar a realização deste projeto;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos;

Ao professor e orientador Dr. João Luiz Pratti Daniel, pelo carinho, oportunidades, conselhos, ensinamentos, pela confiança no meu trabalho e, sobretudo, pela colaboração para o meu crescimento tanto pessoal quanto profissional;

Ao professor Dr. Clóves Cabreira Jobim e todos os amigos do grupo de estudo em silagem e feno (GESF/ UEM-Maringá), por todo carinho, amizade e ajuda prestada, vocês foram essenciais;

Em nome do INCT-Leite (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Leite), ao professor Dr. Geraldo Tadeu dos Santos e ao prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri, pelo apoio de infraestrutura durante a realização deste projeto de pesquisa;

Ao professor Dr. Luiz Gustavo Nussio, pelo apoio na realização das análises de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas;

Aos meus pais Sandra Regina Macieiro Bragatto e José Wanderley Bragatto sem os quais nada disso seria possível, por todo amor, carinho, apoio, paciência, consolo nos momentos difíceis e orações;

Aos meus irmãos Mariana e Pedro Francisco pelo incentivo, companheirismo, amizade e confiança em mim depositada;

Às minhas sobrinhas Valentina e Helena, por renovarem minhas energias sempre que necessário e por serem minha fonte infinita de alegria e amor;

Aos funcionários da Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), em especial ao Célio, Valdecir, Nelson Palmeira e Valter, por toda a ajuda na realização deste trabalho a nível de campo;

Aos funcionários do Laboratório de Análise de Alimentos e Nutrição Animal (LANA), Angélica, Osvaldo e Ulisses, pela ajuda e apoio na condução das análises químicas;

Aos amigos Bruna Calvo, Érica Machado, Camila Parra e Jesus Cardozo, pela amizade, pela troca de experiências, pelo aprendizado, pelos bons momentos compartilhados e por toda ajuda prestada;

E, aos que não foram citados, mas que contribuíram de forma direta ou indireta para a conclusão desta etapa e estão no meu coração.

Meus sinceros agradecimentos!



## **BIOGRAFIA**

JANAINA MACIEIRO BRAGATTO, filha de Sandra Regina Macieiro Bragatto e José Wanderley Bragatto, nasceu na cidade de Colorado, Paraná, no dia 02 de março de 1994. Em fevereiro de 2014, iniciou no curso de graduação em Zootecnia, pela Universidade Estadual de Maringá. Em fevereiro de 2019, obteve o título de “Zootecnista” pela mesma instituição. Em março de 2019 iniciou no curso de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, em nível de Mestrado, área de concentração Produção Animal, realizando estudos sobre Nutrição de Ruminantes. Em Fevereiro de 2021, submeteu-se à banca examinadora para defesa da dissertação.

## ÍNDICE

	Página
RESUMO .....	11
ABSTRACT .....	12
INTRODUÇÃO .....	13
1.0 REVISÃO DE LITERATURA .....	14
1.1 ÁLCOOIS NA SILAGEM .....	14
1.2 ETANOL EM SILAGENS E SEU METABOLISMO EM RUMINANTES .....	17
1.3 ISOPROPANOL EM SILAGENS E SEU METABOLISMO EM RUMINANTES ..	19
1.4 TESTE DE ÁLCOOL NO LEITE FLUIDO .....	22
REFERÊNCIAS .....	23
II. EFEITO DO ISOPROPANOL NO DESEMPENHO E NA QUALIDADE DO LEITE DE VACAS LEITEIRAS	
RESUMO .....	33
INTRODUÇÃO .....	34
MATERIAL E METODOS .....	36
RESULTADOS .....	46
DISCUSSÃO .....	47
CONCLUSÃO .....	51
REFERÊNCIAS .....	52

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1.</b> Perfil de produtos de fermentação das silagens de milho suplementadas com etanol e isopropanol .....	59
<b>Tabela 2.</b> Composição nutricional das dietas experimentais .....	61
<b>Tabela 3.</b> Desempenho de vacas leiteiras suplementadas com etanol e isopropanol .....	62
<b>Tabela 4.</b> Concentrações de ácidos graxos voláteis (AGV), amônia e pH ruminal em vacas leiteiras suplementadas com etanol e isopropanol .....	63
<b>Tabela 5.</b> Digestibilidade aparente no trato total e parâmetros sanguíneos de vacas leiteiras suplementadas com etanol e isopropanol .....	64
<b>Tabela 6.</b> Derivados de purinas na urina de vacas leiteiras suplementados com etanol e isopropanol .....	66
<b>Tabela 7.</b> Ácidos graxos do leite (g/100 g de lipídios totais) de vacas leiteira suplementadas com etanol e isopropanol .....	67
<b>Tabela 8.</b> Perfil oxidativo e concentração de acetona e álcoois no leite de vacas suplementadas com etanol e isopropanol .....	69
<b>Tabela 9.</b> Reatividade de teste do álcool e de tias Milksreen ao etanol, isopropanol e acetona .....	70

## LISTA DE FIGURAS

	Página
REVISÃO DE LITERATURA	
<b>Figura 1.</b> Produção de isopropanol a partir do piruvato durante a ensilagem .....	20
<b>Figura 2.</b> Via de metabolização do isopropanol e acetona .....	21
II. EFEITO DO ISOPROPANOL NO DESEMPENHO E NA QUALIDADE DO LEITE DE VACAS LEITEIRAS	
<b>Figura 1.</b> Teste qualitativo do álcool etílico no leite de vacas suplementadas com etanol e isopropanol .....	71

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi verificar se o álcool isopropanol, isoladamente ou em combinação com o etanol, pode alterar o desempenho, a qualidade do leite e o metabolismo de vacas leiteiras. Oito vacas mestiças Jersey × Holandês no terço médio da lactação ( $152 \pm 44$  DEL), com peso corporal médio de  $527 \pm 98$  kg e produção de leite de  $20,0 \pm 4,3$  kg/d foram alocadas em dois quadrados latinos  $4 \times 4$ . As dietas experimentais continham 45% de concentrado e 55% de silagem de milho controle ou silagem de milho suplementada com 1,5% de isopropanol ou silagem de milho suplementada com 1,5% de etanol ou ainda silagem de milho suplementada com 1,5% de isopropanol + 1,5% de etanol (% da MS). Os álcoois foram aspergidos sobre a silagem e, na sequência, a silagem foi misturada ao concentrado e fornecida como dieta total misturada. O consumo de MS, a digestibilidade aparente de nutrientes, os parâmetros de fermentação ruminal (pH, AGV e  $\text{NH}_3$ ), os derivados de purinas na urina, a produção de leite, os teores de sólidos e o perfil oxidativo no leite não foram afetados pela adição de etanol e isopropanol na dieta. Entretanto, os valores de gama-glutamil transferase (GGT) no sangue foram aumentados com a adição de álcoois. As concentrações de isopropanol e acetona no leite foram aumentadas nos tratamentos contendo isopropanol. Logo, o teste qualitativo da presença de álcool no leite se mostrou positivo para os tratamentos com isopropanol. Em conclusão, isopropanol e etanol, isolados ou combinados na dose suplementada neste estudo não alteram o consumo de MS e o desempenho de vacas leiteiras, mas a presença de isopropanol na dieta (mas não de etanol) leva a resultado positivo ao teste do álcool no leite.

**Palavras-chave:** álcool, leite, metabolismo, 2-propanol, silagem de milho, teste do álcool

## ABSTRACT

The objective of this study was to verify whether isopropanol, alone or in combination with ethanol, can alter the performance, milk quality and metabolism of dairy cows. Eight mid-lactation ( $152 \pm 44$  DEL) crossbred Jersey  $\times$  Holstein cows, with an average body weight of  $527 \pm 98$  kg and milk yield of  $20.0 \pm 4.3$  kg.d<sup>-1</sup> were allocated in two  $4 \times 4$  Latin squares. The experimental diets contained 45% concentrate and 55% corn silage or corn silage supplemented with 1.5% isopropanol or corn silage supplemented with 1.5% ethanol or corn silage supplemented with 1.5% isopropanol + 1.5% ethanol (% DM). The alcohols were sprayed onto the silage and, subsequently the silage was mixed with concentrates and fed as a total mixed ration. The DM intake, nutrients apparent digestibility, ruminal fermentation parameters (pH, VFA and NH<sub>3</sub>), purine derivatives in urine, milk production, milk solids and milk oxidative profile were not affected by ethanol and isopropanol addition in diet. However, the gamma-glutamyl transferase (GGT) values in blood were increased by alcohols. The isopropanol and acetone concentrations in milk were increased in treatments containing isopropanol. Therefore, the qualitative test for the presence of alcohol in milk was positive for treatments with isopropanol. In conclusion, isopropanol and ethanol, alone or combined at the dose tested in this study, do not alter the feed intake and the performance of dairy cows, but the isopropanol in diet (but not ethanol) leads to a positive result in the milk alcohol test.

**Key words:** alcohol, corn silage, milk, milk alcohol test, metabolism, 2-propanol

## INTRODUÇÃO

Álcoois são constituintes normais em silagens (Kristensen, 2007), gerados como produtos finais de fermentação (McDonald et al., 1991). O etanol é o principal álcool encontrado em silagens, embora outros álcoois como 1,2-propanodiol, 2,3-butanodiol e 1-propanol possam ser encontrados em concentrações significativas em silagens de milho. Além desses, metanol, 2-butanol e isopropanol (2-propanol ou isopropílico) têm sido relatados em concentrações traço (ppm) em silagens (Kalac, 2011; Hafner et al., 2013).

Quando ingeridos por vacas leiteiras, a maior parte dos álcoois (principalmente o etanol) é metabolizada no fluido ruminal, pelas vísceras drenadas pelo sistema porta e pelo fígado, sendo que uma fração relativamente pequena atinge a circulação periférica e chega até a glândula mamária (Kristensen et al., 2007; Kristensen et al., 2010; Kristensen et al., 2011; Kristensen et al., 2012). Contudo, além de não ser considerado um constituinte normal da composição do leite, a presença de álcoois em amostras de leite cru é considerada fraude, pois mascara a adição de água (Halfen, 2017).

Com o intuito de evitar fraude por adulteração na composição do leite, diversos testes e procedimentos são realizados pela indústria a fim de evitar que leite adulterado passe para o processo de industrialização (Rodrigues, 2013). A determinação qualitativa de álcool etílico no leite fluido é um teste oficial instituído pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Este teste tem como base a alteração da coloração da solução sulfocrômica, que na presença de álcoois primários, reduzem o  $\text{Cr}^{+6}$  para  $\text{Cr}^{+3}$ , passando da coloração laranja para verde (MAPA, 2014).

Recentemente, nosso laboratório recebeu uma amostra de silagem de milho de uma fazenda leiteira comercial, cujo teor de isopropanol estava relativamente elevado (~0,5% da MS), mas a literatura sobre a presença de isopropanol em silagens e seus

efeitos no desempenho de vacas leiteiras e na qualidade do leite é virtualmente inexistente. Em humanos, o isopropanol apresenta toxidez aproximadamente duas vezes maior do que a do etanol, incluindo depressão do sistema nervoso central, hipotensão, irritação da mucosa gástrica, vômito e dor abdominal. Tanto o isopropanol quanto seu metabólito, a acetona, deprimem o sistema nervoso central (Salyer, 2007).

Diante desse contexto, o objetivo deste trabalho é verificar se os álcoois isopropanol e etanol são secretados no leite e se afetam a qualidade do leite, o desempenho e o metabolismo de vacas leiteiras. Hipoteticamente, o etanol não deve ser secretado no leite, enquanto o isopropanol deve ser secretado no leite.

## **1. REVISÃO DE LITERATURA**

### **1.1 ÁLCOOIS EM SILAGENS**

Silagem é caracterizada como o produto resultante da fermentação de alimentos, que se mantém conservada em anaerobiose pela formação de ácidos orgânicos, principalmente o ácido lático formado pela oxidação de carboidratos solúveis presentes no alimento fresco por bactérias epifíticas e/ou inoculadas. Outros compostos como, álcoois, ésteres, cetonas e aldeídos também são encontrados em silagens (Morgan e Pereira, 1962; Weiß et al., 2009). Estes compostos podem contribuir como nutrientes ou alterar o desempenho animal tanto de forma direta como indireta, por modificações no consumo de alimentos ou no processo de digestão e metabolismo (Daniel e Nussio, 2011).

A formação de álcoois na silagem tem sido estudada por mais de um século (Hart e Willaman, 1912). O etanol é o principal álcool encontrado em silagens (Hafner et al., 2013; Kung Jr et al., 2018). Entretanto, outros álcoois são encontrados em concentrações significativas, tais como 1,2-propanodiol, 2,3-butanodiol e 1-propanol. Também tem sido relatado concentrações traços (ppm) de metanol, 1-butanol, 2-butanol, 2-metil-propanol (terc-butanol), 2-feniletanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 2-metil-butanol, 3-metil-butanol, pentanol, hexanol e isopropanol (2-propanol ou álcool isopropílico) (Edwards et al., 1994; Mo et al., 2001; Krooneman et al., 2002; Weiss et al., 2009; Kalac, 2011; Hafner et al., 2013).

Muitas espécies de leveduras sob condições anaeróbicas podem fermentar ativamente açúcares como glicose, maltose e sacarose, tendo como principais produtos de fermentação etanol, CO<sub>2</sub>, e em pequenas quantidades outros álcoois, como 1-propanol, 2-butanodiol, 2-metilpropanol, pentanol, 3-metil-butanol (Pahlow et al., 2003). Além das



leveduras, algumas espécies de clostrídios e bacilos têm como produtos finais de suas fermentações os álcoois (Pahlow et al., 2003).

Em silagens de cana-de-açúcar, o principal produto final da fermentação é o etanol (Zopollatto et al., 2009). A abundância de açúcares simples desta forrageira estimula não só a ocorrência de fermentação láctica no material ensilado, como também a fermentação alcoólica, que por sua vez, não possui valor preservativo para silagens resultando em perdas significativas de matéria seca (MS) e energia líquida em relação ao material original (Preston et al., 1976; Daniel e Nussio, 2011).

Em silagens de milho com MS inferior a 25%, Kalac et al. (2011) reportaram concentrações médias de metanol (0,03% da MS), etanol (0,56% da MS), 1-propanol (0,16% da MS), 2-propanol (0,03% da MS), 1-butanol (0,08% da MS) e 2-butanol (0,08% da MS). Figueiredo et al. (2007) encontraram 3 metil-1-butanol em silagem de trevo vermelho e trevo branco supondo ainda que este álcool seja oriundo do catabolismo da leucina. Álcoois como butanol, hexanol, 3-metil butanol e 2-feniletanol podem ser produzidos por espécies do gênero *Lactobacillus* (Edwards e Peterson, 1994), por meio do catabolismo de aminoácidos (Hafner et al., 2013).

Oude Elferink et al. (2001) reportaram que o 1,2-propanodiol em silagens é um coproduto da conversão de ácido láctico em ácido acético, por meio de bactérias heterofermentativas (e.g., *L. buchneri*). Algumas espécies de leveduras (Suzuki et al., 1968) e clostrídios (Suzuki e Onishi, 1968; Sanchez et al., 1987) também podem produzir 1,2-propanodiol em quantidades menores. Concentrações elevadas deste álcool foram reportadas em silagem de milho com tempos prolongados de estocagem (>45 dias) (Driehuis; Elferink et al., 1999; Kleinschmit et al., 2006). Kristensen et al. (2010) reportaram concentrações de 1,2-propanodiol variando de 0,10 a 0,14% de MS em silagens armazenadas por 3 a 11 meses. Concentrações elevadas (2 a 4% da MS) foram observadas em estudos realizados por Driehuis et al. (2001) e Nishino et al. (2002, 2003). O 1,2-propanodiol quando consumido pelo ruminante é parcialmente convertido em ácido propiônico no rúmen e o restante é absorvido. No fígado, este álcool é convertido principalmente à L-lactato via álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase (Kristensen e Raun, 2007). Em um trabalho realizado por Kristensen et al. (2007) avaliando o metabolismo do 1,2-propanodiol em vacas leiteiras, os autores concluíram que a maior parte deste álcool foi metabolizado pelos microrganismos ruminais, menos de 10% perdido na urina e o restante metabolizado pelos tecidos do animal.

Durante a fermentação no silo, o 1-propanol pode ser formado pela conversão de 1,2-propanodiol em 1-propanol e ácido propiônico por bactérias heterotáticas, como *L. diolivorans* (Krooneman et al., 2002). Ainda, o 1-propanol também pode ser um produto secundário da fermentação por leveduras e bactérias do gênero *Clostridium* por meio da degradação de aminoácidos (treonina e metionina) (McDonald et al., 1991; Janssen et al., 2004; Giudici et al., 1993). Concentrações de 1-propanol geralmente são baixas em silagens, mas podem atingir valores próximos de 1% da MS em silagens de milho (Oude Elferink et al., 1999; Hafner et al., 2014) e concentrações acima de 2% da MS em silagens de capim tratadas com *L. buchneri* (Kristensen et al., 2010).

Avaliando o metabolismo de álcoois oriundos de silagem em vacas leiteiras, Kristensen et al. (2007) não observaram efeito sobre o CMS dos animais na presença de propanol (0,3 % MS) e etanol (1,4% MS) em silagens de milho. Ainda, parte dos álcoois foi absorvida (sendo grande parte metabolizada pelo fígado) e parte foi metabolizada pelo epitélio ruminal. Não foi observado efeito destes álcoois sobre os parâmetros sanguíneos avaliados nos animais. Os autores concluíram que quantidades típicas de álcoois na silagem de milho não interferem no metabolismo esplâncnico de nenhuma das variáveis medidas e não saturam as vias hepáticas para o metabolismo do álcool.

Raun e Kristensen (2011) avaliaram os efeitos metabólicos de etanol e 1-propanol na alimentação de vacas pós-parto e não relataram alterações de CMS com a adição de álcoois, entretanto o tratamento com 1-propanol diminuiu o teor de gordura do leite em 15 a 29 g/kg em comparação com o etanol. A ingestão de álcool aumentou as concentrações ruminais das proporções correspondentes de AGV (etanol para acetato e 1-propanol para propionato). Os autores concluíram ainda que vacas no pré e pós-parto são eficientes para metabolizar os álcoois absorvidos (etanol e 1-propanol), ou seja, não se acumularam no sangue arterial.

Raun e Kristensen (2012) avaliando os efeitos metabólicos de vacas Holandesas em lactação recebendo altas doses de 1-propanol (5% da MS) e acetato de propila (5% da MS), reportaram redução na produção de gordura no leite para os tratamentos 1-propanol e acetato de propila comparados ao tratamento controle. No entanto, o CMS e a produção de leite não foram afetados pelos tratamentos. A proporção molar ruminal de propionato e a produção hepática de glicose foram aumentadas com a suplementação de 1-propanol na dieta.

Silva (2014), avaliando o efeito do 1-propanol (1% da MS) e *L. buchneri* ( $1 \times 10^5$  ufc/g MV de silagem) no valor nutricional de silagens de milho para vacas leiteiras,

reportou que o CMS, a produção e a composição de leite não diferiram entre os tratamentos. Entretanto, os animais suplementados com 1-propanol apresentaram maior concentração ruminal deste álcool, maior concentração sanguínea de glicose e menor de ácidos graxos não esterificados no sangue. A adição de 1-propanol na dieta não causou alterações na digestibilidade de nutrientes.

O álcool 2,3-butanodiol, segundo Nishino e Shinde (2007), é produto da fermentação de enterobactérias, encontradas na maioria das silagens. Porém, o 2,3-butanodiol também pode ser formado por bactérias dos gêneros *Clostridium spp.* e *Bacillus spp.* Não é desejável a produção deste álcool nas silagens, visto que sua ocorrência está ligada a perda de nutrientes (Daniel, 2019). Em silagem de arroz, concentrações de 2,3-butanodiol entre 1 e 2% da MS foram reportadas (Nishino et al., 2007). Baixas concentrações deste álcool também foram relatadas em silagens de capim (Fennessy e Barry 1973; Barry 1975), silagens de cevada (Mathison et al. 1981; Nia e Wittenberg 1999), silagens de milho (Weissbach, 2009; Daniel et al., 2013; Silva 2014) e silagem de cana-de-açúcar (Daniel et al., 2013). Em silagem de azevém, Li et al. (2013) encontraram valores de 5,8% da MS de 2,3-butanodiol. Mathison et al. (1981), suplementando ovinos com 2,3-butanodiol, não observaram influência no CMS, na taxa de crescimento ou na digestibilidade da dieta, com concentrações de até 5% de 2,3-butanodiol na dieta.

Em silagens, o metanol é principalmente um produto oriundo da desmetilação da pectina, através da ação da pectina metil esterase juntamente com a poligalacturonase ou com a pectato liase (Birch et al., 1981; Fall e Benson, 1996; Kalac et al., 2011). Embora o metanol livre não deva exceder 150 mg/kg de MS, como aditivo alimentar na nutrição animal (Sellers, 2008), altas concentrações de metanol foram encontradas em silagens de capim (538-878 mg/kg MS) (Weiss, 2017). Em silagens de cana-de-açúcar, Daniel et al. (2013a) reportaram concentrações de metanol inferiores a 200 mg/kg de MS.

## 1.2 ETANOL EM SILAGENS E SEU METABOLISMO EM RUMINANTES

O etanol é o álcool mais encontrado em silagens (Kung et al., 2018), e é produzido principalmente por leveduras, mas também por outros microrganismos como bactérias lácticas heterofermentativas, enterobactérias, clostrídios, bacillus (McDonald et al., 1991; Driehuis e Van Wixselaar 2000; Kung et al., 2018). Na ausência de O<sub>2</sub>, a via de fermentação dominante em leveduras é a piruvato descarboxilase, que converte o piruvato em acetaldeído por meio da descarboxilação. O acetaldeído é reduzido a etanol

pela enzima álcool desidrogenase. O equilíbrio da oxidação-redução é mantido no catabolismo da glicose para duas moléculas de etanol. As leveduras possuem uma cadeia de transporte de elétrons. Portanto, na presença de O<sub>2</sub>, substratos como açúcares e ácido láctico são completamente oxidados a CO<sub>2</sub> e água através da via glicolítica e do ciclo de ácido tricarbóxico com rendimento de ATP substancialmente aumentado (Rooke and Hatfield, 2003).

O etanol encontrado em silagens em concentrações elevadas (>2% da MS) além de não apresentar valor preservativo na silagem (Jobim e Nussio, 2013) ocasiona perdas elevadas no teor de MS (Daniel, 2019). Além disso, quando consumido pelo animal, parte do etanol é convertido em ácido acético e metano no rúmen, ocorrendo perda de energia líquida (Daniel e Nussio, 2011).

Em silagens de leguminosas as concentrações de etanol normalmente são baixas, variando de 0,5-1,5% da MS (Kung et al., 2018). Entretanto, silagens de gramíneas podem apresentar concentrações elevadas de etanol. Driehuis e Van Wixselaar (2000) relataram altas concentrações de etanol (5 a 6% da MS) em silagem de capim. Silagens de cana-de-açúcar podem conter mais de 15% de etanol (% da MS) (Kung e Stanley, 1982; Daniel., 2013), por causa da alta concentração de sacarose e a população elevada de leveduras epifíticas (Ávila 9., 2010). Concentrações elevadas de etanol (>4%) em silagens, são associadas com a alta atividade de leveduras, e geralmente tais silagens quando expostas ao ar deterioram facilmente, porque algumas leveduras são capazes de associar ácido láctico nessas condições. Em silagens de milho as concentrações de etanol normalmente são baixas, mas em alguns casos pode exceder 1% da MS (Hafner., 2013). Zopollatto et al. (2009) relataram valores médios de etanol de 0,1% da MS em silagens de milho produzidas no Brasil. Em silagens de milho produzidas na Alemanha, Weiss et al. (2009) reportaram concentrações de etanol entre 0,09 a 6,40% da MS.

Apesar de uma parte do etanol de silagens ser perdida por volatilização durante a utilização da silagem (no painel do silo, no descarregamento, mistura da dieta e exposição da dieta no cocho), a maior parte do etanol presente na silagem é consumida pelos animais (Daniel e Nussio, 2011).

O etanol ingerido pelo animal é parcialmente convertido em ácido acético no rúmen e parcialmente absorvido pela parede ruminal (Bruning e Yokoyama, 1988; Kristensen et al., 2007). A fração absorvida é metabolizada pelo fígado pela ação da enzima álcool desidrogenase (Kristensen et al., 2007). Durante a metabolização em

acetato no rúmen, concomitantemente ocorre formação de metano (Yoshii et al., 2005) e perda de energia líquida (Daniel e Nussio, 2013).

Randby et al. (1999) suplementaram 600 g/d de etanol para vacas em lactação e relataram aumento no CMS dos animais. Os teores de gordura e proteína do leite foram aumentados com a suplementação de etanol, e conseqüentemente a produção de leite corrigida para energia foi aumentada. A adição de etanol resultou em aumento na secreção de gordura do leite, devido a síntese de todos os ácidos graxos saturados de cadeia curta e média (C8 a C16) serem aumentados. O mesmo foi reportado por Orskov et al. (1967), em relação aos ácidos graxos do leite quando suplementaram vacas leiteiras com etanol.

Avaliando sabor, concentração e preferência de álcoois, Richter e Campbell (1940) reportaram preferência e boa aceitabilidade por etanol pelos mamíferos, com inclusão de até 6% na dieta. Apesar de pesquisadores e técnicos presumissem efeito negativo do etanol no CMS, estudos com animais não têm demonstrado efeito negativo sobre o consumo e desempenho destes, quando suplementados com etanol na dieta (Chalupa et al., 1964; Randby et al., 1999; Kristensen et al., 2007, 2011; Daniel et al., 2013).

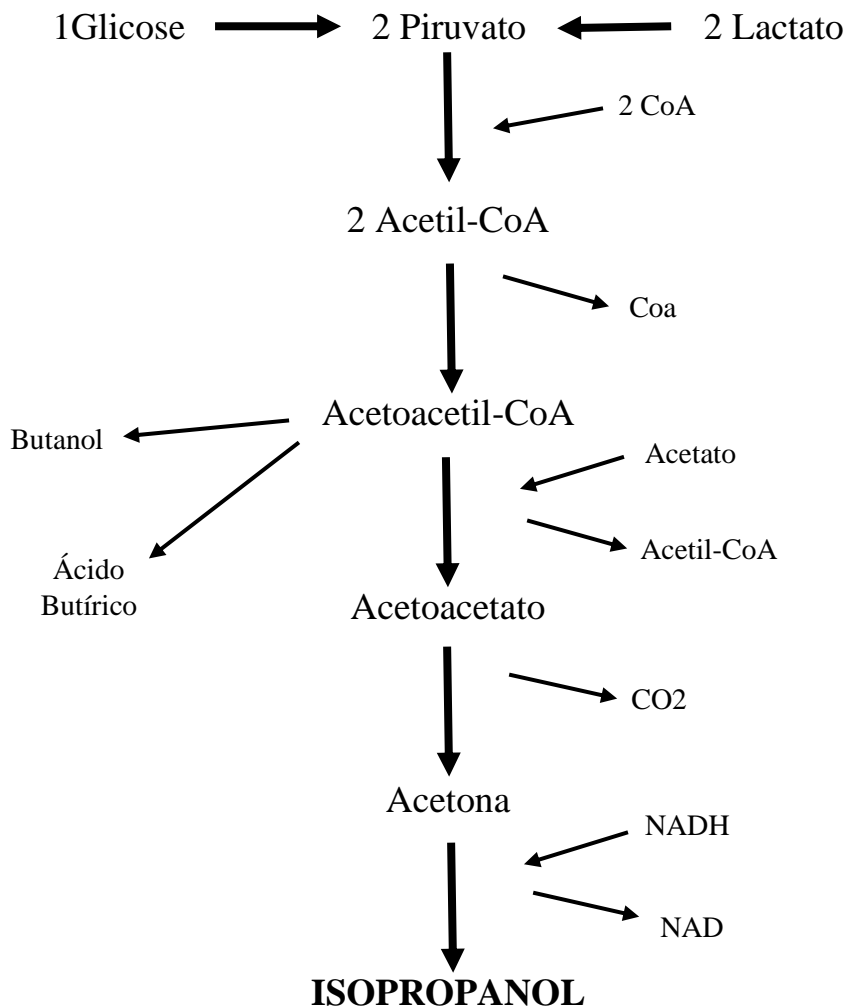
### 1.3 ISOPROPANOL EM SILAGENS E SEU METABOLISMO EM RUMINANTES

O isopropanol é um álcool secundário (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O), raramente analisado em amostras de silagens. Os poucos trabalhos que avaliaram a concentração de isopropanol em silagens reportaram concentrações traço (ppm) (Kalac, 2011; Hafner et al., 2013).

Morgan e Pereira (1962), avaliando os compostos voláteis da silagem de capim e silagem de milho, reportaram a presença de isopropanol em ambas as culturas. Kalac (2011) reportou concentrações de isopropanol 0,3% da MS em silagem de milho, com teor de MS ≤ 25%. Ao avaliar a emissão de compostos orgânicos voláteis em silagem de milho, Hafner et al. (2013) encontraram concentrações de isopropanol variando de 0,26 a 0,59 mg/kg MS. Silva (2017) observou baixas concentrações de isopropanol em silagem de milho sem ou com inoculante contendo *L. buchneri* (0,36 a 0,49 mg/kg MS).

Na literatura, algumas espécies clostrídios, tais como *Clostridium beijerinckii*, *C. acetobutylicum* e *C. aurantibutyricum* são supostos produtores de isopropanol (George et al., 1983; Hippe et al., 1992; Chen et al., 1995; Hafner et al., 2013). Rooke and Hatfield (2003) descreveram que uma molécula de piruvato (derivado de glicose ou lactato) pode ser descarboxilado a acetil-CoA e posteriormente duas moléculas de acetil-CoA se

condensam para formar acetoacetyl-CoA, que pode ser convertido em ácido butírico (redução) ou acetona (descarboxilação). Na sequência, a acetona pode ser reduzida a isopropanol (Figura 1).



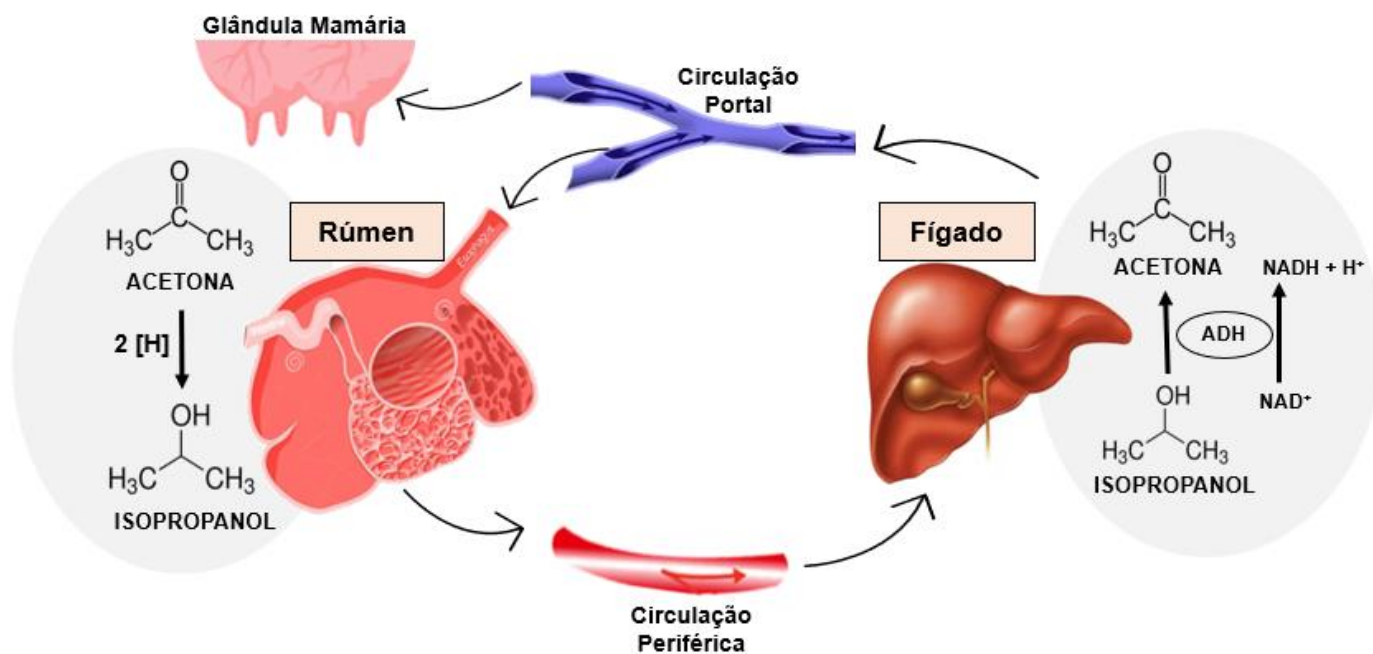
**Figura 1.** Produção de isopropanol a partir de piruvato durante a ensilagem. Fonte: Adaptado de Rooke and Hatfield (2003).

Considerando que o rúmen é um ambiente reduzido e que o isopropanol é uma molécula reduzida (estado de oxidação reduzido), espera-se que a maior parte do isopropanol consumido via dieta seja absorvido nos pré-estômagos rúmen, retículo e omaso. Após a absorção pelo sistema porta-hepático, o fígado é o principal ponto de metabolismo do isopropanol. No fígado, o isopropanol é oxidado até acetona pela enzima álcool desidrogenase (ADH), que está localizada no citoplasma dos hepatócitos (Baik et al., 2009; Cederbaum, 2012; Jones e Rössner, 2007).

Além do isopropanol oriundo da dieta, o isopropanol pode ser gerado no rúmen pela conversão da acetona oriunda da dieta ou do metabolismo intermediário (Bruss e

Lopez, 2000). Em vacas com cetose, o isopropanol pode ser encontrado em concentrações significativas no fluido ruminal, no sangue, na urina e no leite (Robertson, 1950; Thin e Roberts et al., 1953; Andersson, 1984; Bruss e Lopes, 2000; Sato, 2009, 2010; Araújo et al., 2013; Halfen, 2017). Sato (2010) avaliou amostras de fezes e líquido ruminal de vacas em lactação pós-parto, com e sem cetose, e observou a presença de isopropanol em amostras fecais de 57 dos 80 animais avaliados com e sem cetose, e em todas as amostras de líquido ruminal. A acetona foi observada em 13 amostras fecais e 53 amostras de líquido ruminal.

Em vacas leiteiras, as concentrações sanguíneas de isopropanol são positivamente correlacionadas com as concentrações sanguíneas de corpos cetônicos, sendo as maiores correlações com as concentrações de acetona (Bruss e Lopes, 2000). A acetona circulante é reciclada parcialmente para o fluido ruminal. No rúmen, a acetona recebe dois elétrons para se tornar isopropanol novamente. O isopropanol é absorvido, entra no fígado e doa dois elétrons para o pool de NADH, sendo convertido a acetona (Bruss e Lopes, 2000) (Figura 2). O esqueleto de carbono de uma única molécula de acetona/isopropanol pode completar este circuito várias vezes antes de ser excretado no leite, na urina, na expiração ou, em pequenas quantidades, convertido em glicose (Black et al., 1972).



**Figura 2.** Via de metabolização do isopropanol e acetona. Fonte: Esquema construído a partir de dados compilados de vários trabalhos.

Bruss e Lopez (2000) avaliando a capacidade dos microrganismos do rúmen em sintetizar isopropanol a partir de acetona (0,200 mmol/L) ou 3-D-hidroxi-butirato (0,200

mmol/L) juntamente com substrato de amido e celulose *in vitro*, reportaram que os microrganismos presentes no rúmen não foram capazes de sintetizar isopropanol a partir da descarboxilação de 3-D-hidroxi-butarato, mostrando que a acetona é necessária para a síntese de isopropanol. Acredita-se que as bactérias e talvez os fungos foram os microrganismos responsáveis pela produção de isopropanol. Entretanto, em teoria é possível que sistemas enzimáticos em protozoários não móveis (supostamente mortos) possam ter produzido algum isopropanol (Bruss e Lopez, 2000).

Além do isopropanol presente em alimentos fermentados (e.g., silagens) e do isopropanol oriundo da acetona produzida pelo metabolismo intermediário ou presente na dieta, a suplementação dietética com o precursor de metionina éster isopropílico do ácido 2-hidroxi-4-(metil-tio) butanoico (HMBi) também gera isopropanol no fluido ruminal. Pereira et al. (2020), avaliando os efeitos do HMBi no desempenho de vacas em lactação, observaram que o isopropanol é mediador plausível para o efeito negativo do éster isopropílico sobre o rendimento microbiano ruminal em dietas com teores de proteína ao redor de 15,2%. Os mesmos autores criaram hipótese que o isopropanol poderia alterar o transporte de metabólitos e afetar a fluidez da parede celular microbiana e alterar o transporte de metabólitos (Hui e Barton, 1973), podendo limitar a incorporação de aminoácidos nas células microbianas, principalmente quando o fornecimento de aminoácido é escasso (Pereira et al., 2020). Graulet (2005), ao avaliar o destino metabólico e concentrações plasmáticas dos metabólitos do éster isopropílico (isopropanol e acetona), em vacas secas não gestantes, observou aumento nas concentrações plasmáticas de isopropanol 2 h após suplementação de éster isopropílico, atingindo concentrações de  $44,1 \pm 27,5 \mu\text{M}$ . Esse aumento persistiu por aproximadamente 6 h atingindo concentrações de  $385,7 \pm 35,3 \mu\text{M}$ . Logo a seguir, essas concentrações diminuíram de forma linear, sendo restauradas 40 e 46 h após suplementação com éster isopropílico.

#### 1.4 TESTE DE ÁLCOOL NO LEITE FLUIDO

A qualidade do leite é grande preocupação de técnicos de laticínios e da área da saúde. Ainda, o leite é um dos produtos mais comumente fraudados (Moore et al., 2012). Neste cenário, as fraudes causadas no leite representam prejuízos econômicos, riscos à saúde dos consumidores e diminuição do rendimento industrial.

Na indústria existem diversos procedimentos e testes realizados, a fim de evitar o recebimento de leite adulterado ou em condições inadequadas para industrialização e



consumo. Apesar de grande parte das alterações no leite serem causada durante a estocagem na fazenda e/ou durante o transporte até a indústria (Marezes et al., 2015), algumas alterações na qualidade do leite estão relacionadas com a saúde, manejo nutricional e higiene dos animais (Halfen, 2017).

Testes desenvolvidos para identificar fraudes no leite são utilizados há anos pelas indústrias. Dentre os testes existentes, pode-se destacar o teste de “Determinação Qualitativa de Álcool no Leite Fluido”, proposto pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em 2014, com objetivo de detectar a presença de álcool no leite que chega na indústria. Esta análise se baseia na redução do Cromo<sup>+6</sup> a Cromo<sup>+3</sup>, em meio ácido pelos grupos álcool primário ou aldeídos.

Durante o teste, o leite é submetido à fervura para que, em caso da presença de álcool ocorra a volatilização destes compostos. Quando ocorre a volatilização de algum desses compostos presente no leite, os mesmos reagem com a solução sulfocrômica, fazendo com que o Cr<sup>+6</sup> presente na solução se reduza a Cr<sup>+3</sup> (ganhe 3 elétrons) e dessa forma ocorrerá mudança na cor desta solução de laranja para verde (Fangmeier, 2016). Este é um teste qualitativo, capaz de indicar a presença de álcoois. A presença de álcoois em amostras de leite cru refrigerado é considerada fraude, pois pode mascarar a adição de água (Brasil, 2011). Entretanto, a presença de álcoois no leite pode ocorrer por distúrbios metabólicos (Robertson and Thin, 1953; Sato, 2009; Halfen, 2017) ou ainda pela ingestão de alimentos fermentados, gerando resultados falso-positivos para fraude. Entretanto, não existem informações suficientes e consistentes na literatura sobre o potencial de transferência dos álcoois presentes na dieta para o leite.

## 2. REFERÊNCIAS

- Andersson, L. 1984. Concentrations of blood and milk ketone bodies, blood isopropanol and plasma glucose in dairy cows in relation to the degree of hyperketonemia and clinical signs. *Zbl. Vet. Med. A.* 31:683–693. doi: 10.1111 / j.1439-0442.1984.tb01327.x.
- Andersson, L., and K. Lundström. 1984. Milk and blood ketone bodies, blood isopropanol and plasma glucose in dairy cows; methodological studies and diurnal variations. *Zbl. Vet. Med. A.* 31:340–349. doi: 10.1111 / j.1439-0442.1984.tb01292.x.

- Araújo, C. A. S.C.; Rodrigues, F. A. M. L.; Minervino, A. H. H.; Trivelatto, B. F.; Reis, L. F.; Mori, C. S.; Ortolani, E. L. 2013. Manifestações clínicas da cetose nervosa induzida por isopropanol em ovinos. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v. 50, n. 6, p. 493-496. doi: 10.11606/bjvras.v50i6.57878
- Ávila, C. L. S., C. E. C., Bravo Martins, R. F. Schwan. 2010. Identification and characterization of yeasts in sugarcane silages. *J. Applied Micr.* 109:1677–1686. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04796.x>
- Baik, M.; B. E. Etchebarne., J. Bong., M. J. VandeHaar. 2009. Gene Expression Profiling of Liver and Mammary Tissues of Lactating Dairy Cows. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 22:871-884. doi: 10.1186 / 1471-2164-9-443
- Birch, G. G., N. Blakebrough., K. J. Parker., 1981. *Enzymes and Food Processing*. Springer Netherlands. doi: 10.1007/978-94-011-6740-6
- Black, A. L., J. R. Luick, S. L. Lee, and K. Knox. 1972. Glucogenic pathway for acetone metabolism in the lactating cow. *Am. J. Physiol.* 222:1575–1580.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília.
- Bruss, M. L. and J. L. Lopez. 2000. Mixed ruminal microbes of cattle produce isopropanol in the presence of acetone but not 3-d-hydroxybutyrate. *J. Dairy Sci.* 83:2580–2584. doi: 10.3168 / jds.S0022-0302 (00) 75151-4.
- Bruning, CL and MT Yokoyama. 1988. Features of life and killed poisoning beer and yeast sludge by intraruminal administration to cattle. *J. Anim.Sci.*66: 585–591.
- Cederbaum, A. I. 2012. Alcohol metabolism. *Clin Liver Dis.* 16:667-685. doi: 10.1016 / j.cld.2012.08.002
- Chalupa, W., J. L. Evans, and M. C. Stillions. 1964. Influence of ethanol on rumen fermentation and nitrogen metabolism. *J. Anim. Sci.* 23:802–807. <https://doi.org/10.2527/jas1964.233802x>
- Chen, J. S. 1995. Alcohol dehydrogenase: multiplicity and relatedness in the solvent-producing clostridia. *FEMS Microbiol. Rev.* 17:263–273. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1995.tb00210.x>

- Daniel, J.L.P. 2011. Contribuição da fração volátil no valor nutricional de silagens. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Daniel, J. L. P., and L. G. Nussio. 2011. Contribution of silage volatile compounds for the animal nutrition. 2th Intl. Symp. Forage Qual. Conserv. 279-306.
- Daniel, J. L. P., R. C. Amaral, A. Sá Neto, E. H. Cabezas-Garcia, A. W. Bispo, M. Zopollatto, T. L. Cardoso, M. F. F. Spoto, F. A. P. Santos, L. G. Nussio, 2013a. Performance of dairy cows fed high levels of acetic acid or ethanol. *J. Dairy Sci.* 96:398–406. doi: 10.3168 / jds.2012-5451.
- Daniel, J. L. P., K. Weiß, L. Custódio, A. Sá Neto, M. C. Santos. 2013. Occurrence of volatile organic compounds in sugarcane silages. *Anim Feed Sci Technol.* 185:101– 105. doi: 10.1016 / j.anifeedsci.2013.06.011
- Daniel, J. L. P. 2019. Produtos de fermentação em forragens conservadas para vacas leiteiras. I Simpósio Internacional de Produção e Nutrição de Gado de Leite, UFU, Uberlândia-MG.
- Driehuis, F., S.J.W.H. Oude Elferink and S.F. Spoelstra. 1999. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. *J. Applied Microb.* 87:583–594. doi: 10.1046 / j.1365-2672.1999.00856.x.
- Driehuis, F., and P. G. Van Wilselaar. 2000. The occurrence and prevention of ethanol fermentation in high-dry-matter grass silage. *J. Sci. Food Agric.* 80:711–718. doi: 10.1002 / (SICI) 1097-0010 (20000501) 80: 6 <711 :: AID-JSFA593> 3.0.CO; 2-6
- Driehuis, F., W. H. Oude Elferinck, P. G. Van Wilselaar. 2001. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculant with *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic bacteria. *Grass and Forage Science.* 56:330-343. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2494.2001.00282.x>
- Edwards, C., J. Peterson, 1994. Sorbent extract and analysis of volatile metabolites synthesized by lactic acid bacteria in a synthetic medium. *J. Food Sci.* 59(1):192 – 196. doi: 10.1111 / j.1365-2621.1994.tb06930.x
- Fangmeier, M. 2016. Análise de álcool em leite: metodologia e reações – Indústria de laticínios. Acessado em 03 de janeiro de 2021. <https://www.milkpoint.com.br/artigos/industria-de-laticinios/analise-de-alcool-em-leite-metodologia-e-reacoes-103135n.aspx>

- Fall, R., A. A. Benson. 1996. Leaf methanol the simplest natural product from plants. *Trends in Plant Sci.* 1:296-301. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(96\)88175-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(96)88175-0)
- Fennessy, P. F. and T. N. Barry. 1973. Identification and measurement of 2,3-butanediol in silage. *J Sci. Food Agric.* 24:643–648.
- Figueiredo, R., A. I. Rodrigues., M. C. Costa. 2007. Volatile composition of red clover (*Trifolium pratense* L.) forages in Portugal: The influence of ripening stage and ensilage. *Food Chemistry.* 104:1445-1543. doi: 10.1016 / j.foodchem.2007.02.022
- Fuller, T. C., and A. A. Marucci. 1972. Immunological cross-reactivity of liver alcohol dehydrogenases from various animal species with rabbit and guinea pig anti-horse liver alcohol dehydrogenase. *Enzym.* 42(2):139–53.
- George, H. A., J. L. Johnson, J. L. W. E. C. Moore, L. V. Holdeman, J. S. Chen. 1983. Acetone, isopropanol, and butanol production by *clostridium beijerinckii* (syn. *clostridium butylicum*) and *Clostridium aurantibutyricum*. *Appl. Environ. Microb.* 1160-1163. doi: 10.1128 / AEM.45.3.1160-1163.1983.
- Giudici, P., C. Zambonelli, R. E. Kunkee. Increased production of n-propanol in wine by yeast strains having an impaired ability to form hydrogen sulfide. *Amer. J. Enol. Vitic.* 44:17-22.
- Graulet, B., C. Richard, and J. C. Robert. 2005. Methionine availability in plasma of dairy cows supplemented with methionine hydroxy analog isopropyl ester. *J. Dairy Sci.* 88:3640–3649. doi: 10.3168 / jds.S0022-0302 (05) 73049-6.
- Hafner, S. D., C. Howard, R. E. Muck, R. B. Franco, F. Monte, P. G. Green, F. Mitloehner, S. L. Trabue, C. A. Rotz. 2013. Emission of volatile organic compounds from silage: Compounds, sources, and implications, *atmospheric Environment.* 77:827-839. doi: 10.1016 / j.atmosenv.2013.04.076
- Hafner S. D., R. B. Franco, L. Kung, C. A. Rotz, F. Mitloehner. 2014. Potassium sorbate reduces production of ethanol and 2 esters in corn silage. *J Dairy Sci.* doi: 10.3168/jds.2014-8537. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8537>
- Halfen, J. 2017. Avaliação do teste de redução do cromo no leite de vacas com cetose subclínica. Dissertação (Mestrado em nutrição animal: ênfase em metabolismo e qualidade do leite) - Universidade Federal De Pelotas, Pelotas- RS.
- Hart, E. B., J. J. Willaman. 1912. Volatil fatty acids and alcohols in corn silage. *shibu J. Am. Chemical Soc.* 34:1619-1625.

- Hippe, H., J. Andreesen, G. Gottschalk. 1992. The genus *Clostridium* enon medical. In: *The Prokaryotes*, 2:1800-1866.
- Hui, F. K., G. P. Barton. 1973. Mesomorphic behavior of some phospholipids with aliphatic alcohols and other non-ionic substances. *Bioc. Bioph. Acta.* 296:510-517. doi:10.1016 / 0005-2760 (73) 90111-2.
- Janssen P. 2004. Propanol as an end product of threonine fermentation. *Arch. Microb. New.* 182:482-486. doi: 10.1007 / s00203-004-0732-y.
- Jobim, C. C.; L. G. Nussio. 2013. Princípios básicos da fermentação na ensilagem. In: *Forragicultura: ciência, tecnologia e gestão dos recursos forrageiros.* 649-660.
- Jones, A. E. and R. L. Summers. 2000. Detection of isopropyl alcohol in a patient with diabetic ketoacidosis. *J. Emerg. Medic.* 19:165–168. doi: 10.1016 / s0736-4679 (00) 00203-1
- Kalac P. 2011. The effects of silage feeding on some sensory and health attributes of cow's milk: A review. *Food Chemistry.* 125:307-317. doi: 10.1016 / j.foodchem.2010.08.077
- Kleinschmit, D. H., and L. Kung Jr.. 2006. A meta-analysis of the effects of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation and aerobic stability of corn and grass and small-grain silages. *J. Dairy Sci.* 89:4005–4013. doi: 10.3168 / jds.S0022-0302 (06) 72444-4.
- Kristensen, N. B.; A. B. Storm, M. L. B. Raun, A. Røjen, D. L. Harmon. 2007. Metabolism of silage alcohols in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:1364–1377. doi: 10.3168 / jds.S0022-0302 (07) 71623-5.
- Kristensen, N. B., K. H. Sloth, O. Højberg, N. H. Spliid, C. Jensen, R. Thøgersen. 2010. Effects of microbial inoculants on corn silage fermentation, microbial contents, aerobic stability, and milk production under field conditions. *J. Dairy Sci.* 93:3764–3774. doi: 10.3168 / jds.2010-3136.
- Krooneman, J.; F. Faber, A. Alderkamp. 2002. *Lactobacillus diolivorans* sp. nov., a 1,2-propanediol degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. *Inter. J. Syst. Evolut. Microb.* 52:639-646. doi: 10.1099 / 00207713-52-2-639.
- Kung, L. Jr., and R. W. Stanley. 1982. Effect of stage of maturity on the nutritive value of whole-plant sugarcane preserved as silage. *J. Anim. Sci.* 54:689–696. doi: 10.2527 / jas1982.544689x

- Kung, L. Jr., R. D. Shaver, R. J. Grant, R. J. Schmidt. 2018. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *J. Dairy Sci.* 101:4020–4033. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13909>
- Li, Y., N. Nishino. 2013. Effects of ensiling fermentation and aerobic deterioration on the bacterial community in Italian ryegrass, guinea grass, and whole-crop maize silages stored at high moisture content. *Asian Aust. J. Anim. Sci.* 26(9): 1304-1312. doi: 10.5713 / ajas.2013.13175
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. 2018. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Instrução Normativa nº30, de 13 de setembro de Brasília, DF.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. 2019. Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal. 1:60-61.
- Mareze, J., L. R. M. Marioto, N. Gonzaga, G. C. Daniel, R. Tamanini, V. Beloti. 2015. Detecção de adulterações do leite pasteurizado por meio de provas oficiais. *Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina.* 36(1):283-290. doi: <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0367.2015v36n1Suplp283>
- Mathison, G. W., M. Fenton, L. P. Milligan. 1981. Use of 2,3-Butanediol By Sheep. *J. Anim. Sci.* 61:649-656.
- McDonald, P., A. R. Henderson, S. J. E. Heron. 1991. The biochemistry of silage. Page 340 in Lincoln: Chalcombe Publ.
- Mo, M., I. Selmer-Olsen, A. T. Randby, S. E. Aakre, A. Asmyhr. 2001. New fermentation products in grass silage and their effects on feed intake and milk taste. In: *Proc. 10th Inter. Symp. on Forage Conser.* 98-99.
- Moore, J. C. J. Spink, M. Lipp. 2012. Development and Application of a Database of Food Ingredient Fraud and Economically Motivated Adulteration from 1980 to 2010. *J. Food Sci.* 77(4):118-126. doi: 10.1111 / j.1750-3841.2012.02657.x.
- Morgan, M. E., R. L. Pereira. Volatile constituents of grass and corn silage. 1962. I. Steam distillates. *J. Dairy Sci.* 45:457-466. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(62\)89427-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(62)89427-2)
- Nia, S. A. M., K. M. Wittenberg. 1999. Use of forage inoculants with or without enzymes to improve preservation and quality of whole-crop barley forage ensiled as large bales. *J. Anim. Sci.* 79: 525–532.

- Nishino, N., H. Wada, M. Yoshida, H. Shiota. 2003. Microbial counts, fermentation products and aerobic stability of whole crop corn and a total mixed ration ensiled with and without inoculation of *Lactobacillus* or *Lactobacillus buchneri*. 2003. *J. Dairy Sci.* 87:2563–2570. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73381-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73381-0)
- Nishino, N.; M. Yoshida, H. Shiota, E. Sakaguchi. 2002. Evaluation of *Lactobacillus buchneri* derived from by-products ensiling as an inoculum for whole crop maize silage. In: International Silage Conference Scottish Agricultural College. 13:146–147.
- Nishino, N., H. Hattori, Y. Kishida. 2007. Alcoholic fermentation and its prevention by *Lactobacillus buchneri* in whole crop rice silage. *The Society for Applied Microbiology.* 44:538–543. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02105.x>
- Nishino, N. and S. Shinde, S. 2007. Ethanol and 2,3-butanediol production in whole-crop rice silage. *Japanese Soc. Grassland Sci.* 53:96–198. DOI: 10.1111 / j.1744-697X.2007.00089.x
- Nordmann, R., C. Ribiere, H. Rouach, F. Beauge, Y. Giudicelli, and J. Nordmann. 1973. Metabolic pathways involved in the oxidation of isopropanol into acetone by the intact rat. *Life Sci.* 13:919–932.
- Orskov, E. R. R.; W. Hemken, L. A. Moore. 1967. Effect of ethanol infusion on milk fat content and composition and on volatile fatty acids in the rumen liquor. *J. Dairy Sci.* 50:692–695. doi: 10.3168 / jds.S0022-0302 (67) 87494-0.
- Oude Elferink, S. J. W. H., J. Krooneman, J. C. Gottschal, S. F. Spoelstra, F. Faber, F. Driehuis. 2001. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2 propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Applied Env. Microb.* 67:125-132. doi: 10.1128 / AEM.67.1.125-132.2001.
- Oude Elferink, S. J. W. H., F. Driehuis, J. Krooneman, J. C. Gottschal, and S. F. Spoelstra. 1999. *Lactobacillus buchneri* can improve the aerobic stability of silage via a novel fermentation pathway: The anaerobic degradation of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol. 266–267.
- Pahlow, G.; R. R. Muck, F. Driehuis, S. J. W. H. Oude Elferink, S. Spoelstra. 2003. *Microbiology of Ensiling. Silage Science and Technology, Agronomy Monograph, 42.* doi: 10.2134 / agronmonogr42.c2

- Pereira, M. N., N. N. Morais Junior, R. C. Oliveira, G. G. S. Salvati, R. A. N. Pereira. 2020. Methionine precursor effects on lactation performance of dairy cows fed raw or heated soybeans. *J. Dairy Sci.* 104. doi:10.3168/jds.2020-18696
- Preston, T. R. 1976. Nutritive value of sugar cane for ruminants. *Trop. Anim. Prod.* 2:125-142.
- Randby, A. T. 2007. Effect of propanol and dimethylsulphide in grass silage on organoleptic milk quality. *J. Anim. Feed Sci.* 16(1):102–107. DOI: <https://doi.org/10.22358/jafs/74122/2007>
- Raun, B. M. L. and N. B. Kristensen. 2011. Metabolic effects of feeding ethanol or propanol to postpartum transition Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 94 :2566–2580. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3999>
- Raun, B. M. L. and N. B. Kristensen. 2012. Metabolic effects of feeding high doses of propanol and propylacetate to lactating Holstein cows. *Livest. Sci.* 144:37–47.
- Richter, C. P., K. H. Campbell. 1940. Alcohol taste thresholds and concentrations of solution preferred by rats. *Science* 91:507-508. doi: 10.1126 / science.91.2369.507
- Robertson, A., C. Thin, and A. M. Stirling. 1950. Isopropyl alcohol in cows suffering from acetonemia. *Nature* 166:954.
- Robertson, A. and C. Thin. 1953. A Study of Starvation Ketosis in the Ruminant. *Brit. J. Nutr.* 7 (1-2):181 – 195. doi: <https://doi.org/10.1079/BJN19530019>
- Rodrigues, E., A. A. Castagna, M. T. Dias, M. Aronovich. 2013. Qualidade do leite e derivados: processos, processamento tecnológico e índices. Rio Rural, Niterói, Rio de Janeiro. 11.
- Rooke, J. A., R. D. Hatfield. 2003. Biochemistry of ensiling. Pages 95-139 in *Sil. Sci. Tech.* ed. American Society of Agronomy, Madison. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr42.c3>
- Salyer, S. W. 2007. *Essential Emergency Medicine - Toxicology Emergencies.* 17:923-1049.
- Sanchez, R. F., D. C. Cameron, C. L. Cooney. 1987. Influence of environmental factors in the production of (R)-1,2 propanediol and acetol by *Clostridium thermo saccharolyticum*. *Biotech.* 9:449–454.
- Sato H. 2009. Increased blood concentration of isopropanol in ketotic dairy cows and isopropanol production from acetone in the rumen. *J. Animal Sci.* 80:381–386. doi: 10.1111 / j.1740-0929.2009.00649.x.



- Silva, J. 2014. Efeitos de *L. buchneri* e 1-propanol no valor nutritivo de silagens de milho para vacas leiteiras. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Silva, J., J. P. P. Winckler, M. H. O. Pasetti, P. A. R. Salvo, N. B. Kristensen, J. L. P. Daniel, L. G. Nussio. 2017. Effects of *Lactobacillus buchneri* inoculation or 1-propanol supplementation to corn silage on the performance of lactating Holstein cows. *Rev. Bras. Zootec.* 46:591-598. <https://doi.org/10.1590/s1806-92902017000700006>
- Sellers, R. S. 2008. Glycerin as a feed ingredient, official definition(s) and approvals. *J. Animal Sci.* 86:392.
- Suzuki, T. e H. Onishi. 1968. Dissimilação aeróbica de  $\alpha$ -ramnose e a produção de ácido  $\alpha$ -ramnônico e 1,2 propanodiol por fermento. *Agric. Biol. Chem.*32:888–893.
- Thin, C., and A. Robertson. 1953. Biochemical aspects of ruminant ketosis. *J. Comp. Pathol.* 63:184–194. doi: 10.1016 / s0368-1742 (53) 80022-6.
- Weiß, K., C. Kalzendorf, J. Zittlau, 2009. Auerbach, H. Novel results on the occurrence of volatile compounds in maize silages. *Proceedings of XVth International Silage Conference Proceedings.* 33-34.
- Weiss, K., 2009. Novel results on the occurrence of volatile compounds in maize silages. In: *Proceedings of the XVth International Silage Conference.* Madison, WI.
- Weiss, K. 2017. Volatile organic compounds in silages—Effects of management factors on their formation: A review. *Slovak J. Anim. Sci.*50(1):55–67.
- Yoshii, T., N. Asanuma, T. Hino. 2005. Effect of ethanol on nitrate and nitrite reduction and methanogenesis in the ruminal microbiota. *Anim. Sci. J.* 76:37-42. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2005.00235.x>
- Zopollatto, M.; L. G. Nussio, J. O. Sarturi, C. Amaral, N. L. Lombardi, G. B. Muraro, J. L. P. Daniel. 2009. Fermentative parameters of corn silages inoculated either with *Propionibacterium acid propionic*, *Lactobacillus buchneri* or the combination of both microorganisms. In: *International Silage Conference Proceedings.* 15:345-346.

## **II. Influência do isopropanol no desempenho e na qualidade do leite de vacas leiteiras**

(Manuscrito formatado de acordo com as normas da revista Journal of Dairy Science)

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi verificar se o álcool isopropanol, isoladamente ou em combinação com o etanol, pode alterar o desempenho, a qualidade do leite e o metabolismo de vacas leiteiras. Oito vacas mestiças Jersey × Holandês no terço médio da lactação ( $152 \pm 44$  DEL), com peso corporal médio de  $527 \pm 98$  kg e produção de leite de  $20,0 \pm 4,3$  kg/d, foram alocadas em dois quadrados Latinos  $4 \times 4$ . As dietas experimentais continham 45% de concentrado e 55% de silagem de milho controle ou silagem de milho suplementada com 1,5% de isopropanol ou silagem de milho suplementada com 1,5% de etanol ou silagem de milho suplementada com 1,5% de isopropanol + 1,5% de etanol (% da MS). Os álcoois foram aspergidos sobre a silagem e, na sequência, a silagem foi misturada ao concentrado e fornecida como dieta total misturada. O consumo de MS, a digestibilidade aparente de nutrientes, os parâmetros de fermentação ruminal (pH, AGV e  $\text{NH}_3$ ), os derivados de purinas na urina, a produção de leite, os teores de sólidos e o perfil oxidativo no leite não foram afetados pela adição de etanol e isopropanol na dieta. Entretanto os valores de gama-glutamil transferase (GGT) no sangue foram aumentados com a adição de álcoois. As concentrações de isopropanol e acetona no leite foram aumentadas para os tratamentos contendo isopropanol. Logo, o teste qualitativo da presença de álcool no leite se mostrou positivo para os tratamentos com isopropanol. Em conclusão, isopropanol e etanol, isolados ou combinados na dose suplementada neste estudo não alteram o consumo de MS e o desempenho de vacas leiteiras, mas a presença de isopropanol na dieta (mas não de etanol) leva a resultado positivo ao teste do álcool no leite.

**Palavras-chave:** álcool, leite, 2-propanol, silagem de milho, teste do álcool

## INTRODUÇÃO

Os álcoois são constituintes de silagens, gerados durante a fermentação (McDonald et al., 1991). O etanol é o principal álcool encontrado em silagens, embora outros álcoois como 1,2-propanodiol, 2,3-butanodiol e 1-propanol possam ser encontrados em concentrações significativas. Além destes, metanol, 2-butanol e isopropanol (2-propanol ou álcool isopropílico) têm sido reportados em concentrações traço (ppm) em silagens (Kalac, 2011; Hafner et al., 2013).

Quando ingeridos por vacas leiteiras, os álcoois podem ser metabolizados no fluido ruminal, nas vísceras drenadas pelo sistema porta e no fígado, sendo que uma fração relativamente pequena atinge a circulação periférica e, portanto, pode chegar até a glândula mamária (Kristensen et al., 2007; Raun e Kristensen, 2009, 2011, 2012). A ocorrência de álcoois em amostras de leite cru é considerada fraude, pois o etanol é uma das substâncias utilizadas para mascarar a adição de água no leite nos atos de fraude (Halfen, 2017).

Com o intuito de evitar fraude por adulteração na composição do leite, diversos testes e procedimentos são realizados pela indústria a fim de evitar que o leite adulterado seja recebido, processado e comercializado pela indústria (Instrução Normativa Nº 30, de 26 de junho de 2018, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Um dos testes utilizado pelas indústrias de laticínios para a detecção de fraude é o “Teste da Determinação Qualitativa de Álcool Etílico no Leite Fluido”. A presença de álcool em amostras de leite cru refrigerado é considerada fraude, pois pode mascarar a adição de água. A 2ª edição do Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal, publicada em 2019 pela Secretaria de Defesa Agropecuária do MAPA, traz a descrição do seguinte teste: “2.38 Substâncias redutoras voláteis (álcool etílico)” (páginas 60 e 61). Este teste (colorimétrico) tem como base a alteração da coloração de uma

solução sulfocrômica. Em meio ácido, hidroxilas ligadas a carbono primário ou secundário são oxidadas pela ação do ácido crômico, com conseqüente redução do cromo VI a cromo III modificando a coloração da solução, de alaranjado para esverdeado. Entretanto, é provável que em algumas situações, os álcoois presentes em amostras de leite possam ser oriundos do metabolismo (Robertson e Thin, 1953; Andersson, 1984; Sato, 2009; Halfen, 2017) ou talvez da dieta, ao contrário da adição fraudulenta de álcool no leite.

Recentemente, nosso laboratório foi contactado por técnicos de campo atuantes em fazendas leiteiras no estado do Rio Grande do Sul, e foram detectadas amostras de leite positivas ao teste do álcool etílico no leite fluido. Após contato inicial, amostras da silagem de milho (o único alimento fermentado presente na dieta das vacas) foram coletadas e enviadas ao laboratório. A análise dos produtos de fermentação na silagem de milho revelou que a concentração de isopropanol se apresentava relativamente elevada (~0,4% da MS) quando comparada aos poucos dados da literatura (0,9 a 49 ppm; Silva et al., 2017; Gomes et al., 2019; Parra et al., 2019). Então, sugeriu-se que um grupo de vacas cujo leite apresentava positivo ao teste do álcool fosse separado e a silagem de milho da fazenda substituída pela silagem de milho de uma propriedade vizinha. No dia subsequente à substituição da silagem de milho, as amostras de leite do grupo separado apresentaram-se negativas ao teste do álcool. Neste interim, amostras de leite foram coletadas antes (= positivas) e depois (= negativas) da troca da silagem de milho e enviadas ao laboratório. A análise comparativa dos compostos orgânicos voláteis nas amostras de leite pela técnica de *head-space* em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) indicou que a concentração de etanol era similar entre as amostras, mas as concentrações de isopropanol, acetona e 2-butanol se encontravam

mais altas no leite positivo do que no leite negativo, em alinhamento ao observado na silagem de milho.

A literatura sobre a presença de isopropanol em silagens e seus efeitos no desempenho de vacas leiteiras e na qualidade do leite é virtualmente inexistente. Em humanos, o isopropanol apresenta toxidez aproximadamente duas vezes maior do que a do etanol, incluindo depressão do sistema nervoso central (Salyer, 2007). Entretanto, não se conhece os efeitos do isopropanol em vacas leiteiras.

Diante desse contexto, o objetivo deste trabalho é verificar se o isopropanol suplementado na dieta, isoladamente ou em combinação com o etanol, pode ser excretado no leite e se afeta o desempenho, o metabolismo e a qualidade do leite de vacas leiteiras. A hipótese é que o isopropanol pode ser excretado no leite e que o etanol pode aumentar a excreção de etanol no leite, por competir pela mesma via metabólica no fígado. Isoladamente, é pouco provável que o etanol seja excretado no leite ou gere resultados positivos ao teste de álcool no leite.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi conduzido no Setor de Bovinocultura de Leite da Fazenda Experimental de Iguatemi, do Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá. Os procedimentos de cuidado e manejo dos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá, PR, sob número de aprovação 4649301019/2019.

### ***Animais, dietas e tratamentos***

Oito vacas leiteira cruzadas Jersey × Holandês, com  $527 \pm 98$  kg PV, com produção média de 20,0 kg/d de leite, no meio da lactação ( $152 \pm 44$  DEL), sendo quatro adaptadas

com cânula ruminal e quatro intactas, foram estabuladas em baias do tipo *tie-stall* com cama de borracha. As vacas foram submetidas a duas ordenhas diárias (06h30min e 15h30min) e durante a noite os animais tiveram período de exercício e descanso fora das baias. Os animais foram alimentados individualmente duas vezes ao dia, às 08h30min e às 13h30min com dieta total misturada e fornecida *ad libitum* a fim de se obter sobras entre 5 e 10% do alimento fornecido.

Os animais foram distribuídos em dois quadrados Latinos  $4 \times 4$  (um quadrado com vacas canuladas e outro quadrado com vacas intactas), com 4 tratamentos e 4 períodos de 22 dias, sendo 15 dias de adaptação e 7 dias de coletas, totalizando 88 dias de experimento. As dietas experimentais continham (% MS) 17,2% de milho seco moído fino, 15,4% de farelo de soja, 10,0% de caroço de algodão, 2,0% de premix mineral-vitamínico, 0,4% de calcário calcítico e 55% de uma das silagens de milho descritas a seguir:

- 1) Silagem de milho (Controle);
- 2) Silagem de milho com adição de etanol (1,5% da MS da silagem);
- 3) Silagem de milho com adição de isopropanol (1,5% da MS da silagem);
- 4) Silagem de milho com adição de etanol (1,5% da MS da silagem) + isopropanol (1,5% da MS da silagem).

A silagem de milho utilizada para todos os tratamentos foi descarregada de um único silo trincheira ao longo de todo experimento, antes de receber a adição com álcoois. Os álcoois foram diluídos em água destilada (1:2) e aspergidos diretamente sobre a silagem de milho espalhada em lona plástica. O tratamento controle recebeu o mesmo volume de água destilada dos outros tratamentos. O perfil de produtos de fermentação das silagens tratadas está apresentado na Tabela 1. As silagens continham em média 32,0% matéria seca (%MV); 4,52% de cinzas (%MS); 6,16% de proteína bruta (%MS);

49,29% de fibra em detergente neutro (%MS); 3,14% de extrato etéreo (%MS) e 36,89% de carboidrato não fibroso (%MS). Após homogeneização com os concentrados, as silagens foram fornecidas aos animais na forma de ração completa. As dietas foram formuladas para atender ou exceder às exigências nutricionais de vacas leiteiras com produção média de 20 kg/dia de leite (NRC, 2001). A composição bromatológica das dietas experimentais se encontra na Tabela 2.

### *Coletas de dados e amostragens*

O consumo de MS (CMS) foi determinado diariamente pela diferença entre a quantidade de MS ofertada e as sobras de MS. As amostras de alimentos e sobras foram coletadas diariamente do 16° dia ao 20° dia do período experimental. Ao final do experimento foram formadas amostras compostas por período e por animal e as amostras foram desidratadas em estufa de ventilação forçada a 55°C e moídas em moinho de faca tipo Willey (Marconi MA340, Piracicaba, Brasil) com o tamanho das partículas igual a 1 mm.

No 16° e 17° dia de cada período, o comportamento ingestivo foi monitorado durante as primeiras três horas após a alimentação matinal. Foram registrados o tempo de ingestão (min/3 h) e consumo de MS (kg MS/3 h) e a taxa de consumo de MS (g MS/min).

Entre os dias 16° e 22° foi registrada a produção de leite de cada animal. Para a análise da composição e qualidade do leite foram coletadas amostras de leite de oito ordenhas consecutivas do 16° ao 19° dia de cada período experimental. Uma alíquota do leite coletado por animal foi armazenada em frasco plástico com conservante (bromopol) para determinação dos teores de proteína, gordura, lactose, N-ureico, caseína e contagem de células somáticas. Outra alíquota sem adição de conservantes foi congelada em tubos



Falcon a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior determinação da concentração de ácidos graxos e antioxidantes. Para determinação qualitativa da presença de álcool no leite foram coletadas amostras de leite em frascos plásticos de 250 mL.

Amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal do 17<sup>o</sup> ao 20<sup>o</sup> dia duas vezes ao dia (em horários alternados), às 08h00min, 12h00min, 15h00min e 19h00min, com total de oito amostras por animal em cada período. Foram obtidas amostras compostas, perfazendo uma amostra por animal por período. As amostras foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  e posteriormente desidratadas em estufa de  $55^{\circ}\text{C}$  por 72 h e moídas em moinho tipo Willey (Marconi MA340, Piracicaba, Brasil), com tamanho de partícula igual a 2 mm para determinação da fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) e com tamanho de partícula igual a 1 mm para análise de composição química. A excreção fecal foi estimada utilizando a concentração de FDNi como marcador interno (Huhtanen et al., 1994).

Das amostras de silagem, uma porção foi utilizada para preparo de extrato aquoso (Kung Jr. et al., 1984) e o remanescente seco em estufa a  $55^{\circ}\text{C}$ . No extrato aquoso 25 g em 225 g de água destilada, foi homogeneizado por 1 min em liquidificador e filtrado em gaze para determinação do pH (medidor de pH modelo Tec5, Tecnal®, Piracicaba, Brasil) e posteriormente as concentrações de produtos de fermentação.

Amostras de líquido ruminal foram coletadas no 21<sup>o</sup> dia de cada período pela cânula ruminal nos tempos zero (que antecede à primeira alimentação), 2, 4, 8 e 12 h após o trato ou refeição da manhã, e imediatamente determinado o pH (medidor de pH modelo Tec5, Tecnal®, Piracicaba, Brasil). As amostras foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  em tubos falcon para posterior determinação das concentrações de AGV e  $\text{NH}_3$ .

Amostras de urina foram obtidas por micção espontânea aproximadamente 3,5 h após a alimentação, no 19<sup>o</sup> e 20<sup>o</sup> dia de cada período para análises de creatinina e

derivados de purinas. Após filtração em gaze, uma alíquota de 10 mL de urina diluída em 40 mL de ácido sulfúrico 0,036 N foi congelada a -20°C para posterior determinação de alantoina. Uma segunda alíquota, sem diluição com ácido sulfúrico foi armazenada a -20°C para determinação de creatinina e ácido úrico.

No dia 22° de cada período, amostras de sangue foram obtidas 1,5 h e 5 h após o fornecimento do trato da manhã, por punção da veia jugular externa em tubos a vácuo contendo K<sub>2</sub>EDTA para obtenção de plasma e em tubos sem anticoagulante para obtenção de soro. Após centrifugação, as amostras de plasma e soro foram armazenadas a -20°C para posterior determinação da concentração de metabólitos sanguíneos.

### *Análises químicas*

As amostras de alimentos, sobras e fezes foram analisadas quanto aos teores de MS, cinzas, proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN) e FDNi. O teor absoluto de MS foi determinado de acordo com o método n° 924.01 da AOAC (1990). O teor de cinzas foi determinado por combustão em mufla a 600°C durante 4 h, de acordo com o método n° 924.05 da AOAC (1990). A determinação do nitrogênio (N) total foi realizada de acordo com o método n° 990.03 da AOAC (1990) e o teor de PB foi obtido multiplicando o teor de N por 6,25. O teor de EE foi determinado de acordo com o método n° 7.060 da AOAC (1990). O teor de (FDN) foi determinado em extrator de fibra com saquinhos filtrantes (F57, Ankom) utilizando a solução de detergente neutro descrita por Mertens (2002) e incluindo amilase termoestável e sulfito de sódio. O teor de FDNi foi determinado por incubação *in situ* por 288 h (Huhtanen et al., 1994). O teor de carboidratos não fibrosos (CNF) foi calculado (NRC, 2001): CNF = 100 - PB - FDN - EE - cinzas.

As concentrações de ácido láctico (Pryce, 1969) e amônia (Chaney e Marback, 1962) na silagem foram determinadas por colorimetria (modelo Janway 6305, Marconi®, Piracicaba, Brasil) com comprimentos de onda de  $\lambda = 630$  nm e  $\lambda = 565$  nm, respectivamente. As concentrações de ácidos graxos voláteis, álcoois, ésteres e acetona foram determinadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GCMS QP 2010 plus, Shimadzu, Kyoto, Japão) usando coluna capilar (Stabilwax, Restek, Bellefonte, PA; 60 m, 0,25 mm  $\varnothing$ , 0,25  $\mu$ m crossbond carbowax polietilenoglicol).

A presença de álcool no leite foi determinada através do teste de determinação qualitativa de álcool em leite fluido de acordo com a Instrução Normativa n° 30 MAPA (2018), em amostras frescas de leite refrigerado (até 3 h após a ordenha). Uma alíquota de 100 mL de leite foi adicionada em kitassato, juntamente com adição de 3 mL de solução antiespumante e fechado com rolha de borracha. Em um tubo de ensaio foi adicionado 2 mL de solução sulfocrômica, que é mergulhada a extremidade de um tubo de silicone acoplado ao kitassato, formando um sistema fechado entre o *head-space* do kitassato e a solução sulfocrômica. Então, o kitassato com a amostra foi aquecido em chapa de pirocerâmica (Analógica - SL-141/A) e mantido sob aquecimento até que se completasse o tempo de 5 min após a fervura da amostra de leite. Durante este período, o vapor da amostra gerado no kitassato borbulhava dentro da solução sulfocrômica. O teste era considerado negativo quando a solução se mantinha de cor alaranjada. Se ao final de 5 min a solução sulfocrômica fosse alterada para coloração esverdeada, o teste foi considerado positivo.

Paralelamente, também foi realizado o teste do álcool em amostras de leite obtidas de vacas do tratamento controle adicionadas com doses crescentes de etanol, isopropanol, acetona e 2-butanol para confirmação da reatividade do teste a estes compostos. Além disso, as amostras de leite contaminadas propositalmente com diferentes doses de etanol,

isopropanol, 2-butanol e acetona foram utilizados para testar a reatividade de fitas Milkscreen (UpSpring, Austin, TX, USA), utilizadas para detecção de resíduos de álcool em leite humano.

As concentrações de acetona, isopropanol, etanol e 2-butanol no leite foram determinados pela técnica *head-space*. Amostras de 2 mL de leite foram alocadas em frascos de vidro com septo (10 mL) e aquecidos a 60°C por 30 min sob agitação no forno do autoinjeter (AOC – 5000 Plus, Shimadzu, Kyoto, Japão). Na sequência uma alíquota (1 mL) foi injetada em modo split (1:20), em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas GCMS QP 2010 plus, Shimadzu, Kyoto, Japão), usando coluna capilar (Stabilwax, Restek, Bellefonte, PA; 60 m, 0,25 mm ø, 0,25 µm crossbond carbowax polietilenoglicol).

A secreção de energia do leite (Mcal/d) foi calculada como  $[(0,0929 \times \% \text{ gordura}) + (0,0547 \times \% \text{ proteína}) + (0,0395 \times \% \text{ lactose})] \times \text{produção de leite (kg/d)}$  (NRC, 2001). Em seguida, a produção de leite corrigida para energia (kg/d) foi calculada da seguinte forma: secreção de energia no leite/ 0,70 (assume 0,70 Mcal/kg de leite com a seguinte composição média: 3,7% de gordura, 3,2% de proteína e 4,6% de lactose).

As concentrações de proteína, gordura, lactose, N-ureico e caseína no leite foram determinadas pela técnica de infravermelho, segundo a ISO 9622| IDF: 141 (2013) através do espectrômetro (Bentley Instruments FTS/FCM), assim como a contagem de células somáticas, determinada pelo método de citometria de fluxo segundo a ISO 13366-2| IDF:148-2 (2006), no Laboratório Centralizado da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH) – Curitiba/PR, em quantificador eletrônico infravermelho BENTLEY-2000 (Bentley Instruments, Chaska, MN, EUA).

Para determinação da capacidade antioxidante e poder redutor do leite, extratos de amostras de leite foram obtidos pela adição de 9 mL de metanol em 1 mL de leite. A mistura foi agitada em vórtex durante 5 min e centrifugada a  $2500 \times g$  por 10 min. O sobrenadante foi filtrado com filtro PTFE e utilizado nas análises, como descritas a seguir.

A capacidade antioxidante total (CAT) das amostras de leite foi determinada com a adição do radical ABTS<sup>+</sup> (2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico]) ao extrato (Rufino et al., 2007). Também foi determinada a capacidade antioxidante total, com a adição do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) ao extrato. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro Evolution 300 (Thermo Scientific, EUA) a 734 nm após 6 minutos de reação e 515 nm respectivamente. A CAT do radical ABTS foi expressa em equivalente Trolox ( $\mu\text{M}$  Trolox/mL), e do DPPH expresso em porcentagem (%) de equivalência.

A análise de produção de hidroperóxidos dieno conjugados (DC) foi realizada conforme metodologia descrita por Kiokias et al. (2006), sendo adicionado 50  $\mu\text{L}$  de leite a 2,5 mL de uma solução isooctano/2-propanol (2:1, v/v) em um tubo e agitado por um minuto em vórtex. A mistura foi filtrada em filtro de membrana PTFE 0,22  $\mu\text{m}$  e a absorbância foi determinada em espectrofotômetro UV-Vis a 232 nm, sendo expressa em mmol/kg de gordura.

A análise de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) foi realizada segundo Vyncke (1970), com modificações, sendo adicionado 500  $\mu\text{L}$  de leite a 2 mL de solução composta por ácido tiobarbitúrico (TBA 1%, TCA 15% e HCl 562,5 mM), em tubos falcon de 15 mL. A mistura foi agitada em vórtex e submetida a 100°C durante 15 minutos, seguido por banho frio durante 5 minutos, e posteriormente centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para cubeta e a absorbância

determinada em espectrofotômetro Evolution 300 (Thermo Scientific, EUA) a 538 nm. Os valores foram expressos como mmol/kg de gordura.

Para determinar a composição de ácidos graxos do leite, a gordura foi extraída por centrifugação, segundo a metodologia descrita por Murphy et al. (1995) e os ácidos graxos foram esterificados conforme o método 5509 da ISO (1978) usando KOH/metanol e n-heptano. Aproximadamente 100 mg da gordura extraída foi transferida para tubo Falcon com capacidade de 10 mL, adicionou-se 2,0 mL de N-heptano e agitou em vórtex até solubilização total, adicionou-se mais 2,0 mL de solução 2 mol/L de KOH em metanol e foi agitada em vórtex durante 5 min. Após separação das fases, a fase superior contendo os ésteres metílicos de ácidos graxos, foi transferida para tubo vaio e analisada. Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram quantificados por cromatografia gasosa (Trace GC 52 Ultra, Thermo Scientific, West Palm Beach, Florida, USA), no laboratório de espectrofotometria e cromatografia (LEC – UEM/Maringá), equipado com detector de ionização de chama e coluna capilar de sílica fundida (SP 8 – 2560, Select FAME, 100 m, 0,25 mm d.i. e 0,25 µm de cianopropil). O fluxo dos gases foi de 2 mL/min para o gás de arraste (H<sub>2</sub>), 30 mL/min para o gás auxiliar (N<sub>2</sub>) e 35 mL/min para o H<sub>2</sub> e 350 mL/min para o gás sintético. O volume do material injetado foi de 2,0 µL, usando o método split flow. A temperatura inicial da coluna foi estabelecida em 50°C, mantida por 4 min, elevada de 10°C em 10°C até 200°C, e mantida por 15 min, depois foi elevada de 20°C em 20°C chegando a 240°C, e mantida por 8 min de temperatura final. A quantificação dos ácidos graxos da amostra foi efetuada por comparação com o tempo de retenção de ésteres metílicos de ácidos graxos de amostras padrões 189-19 (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil). As áreas dos picos e os tempos de retenção foram determinados através do software ChromQuest 5.0.

As concentrações de ácido úrico e creatinina na urina foram estimadas através de kits comerciais (ácido úrico PP, creatinina PP Gold Analisa®, Belo Horizonte, MG) e as leituras em espectrofotômetro (Bioplus 2000®, São Paulo, SP). A determinação de alantoina foi determinado pelo método colorimétrico, segundo a metodologia de Chen e Gomes (1992).

As concentrações de N-NH<sub>3</sub> no fluido ruminal foram realizadas segundo Chaney e Marback (1962). Os ácidos graxos voláteis (AGV) no fluido ruminal foram determinados por cromatografia gasosa utilizando um cromatógrafo Shimadzu® GC-2010 Plus equipado com injetor automático AOC-20i, coluna capilar Stabilwax-DA™ (30m, 0,25mm ID, 0,25µm df, Restek®) e detector de ionização de chama (FID), após acidificação das mesmas com 1 M de ácido o-fosfórico p.a. (Ref. 100573, Merck®) e fortificação com mistura de ácidos voláteis livres (Ref. 46975, Supelco®). Uma alíquota de 1µL de cada amostra foi injetada com taxa de split de 40:1, utilizando hélio como gás de arraste à velocidade linear de 42 cm.s<sup>-1</sup>, obtendo-se a separação dos analitos em uma corrida cromatográfica de 11,5 min. As temperaturas do injetor e do detector foram, respectivamente, 250°C e 300°C e temperatura inicial da coluna de 40°C. A rampa de temperatura da coluna se iniciou com um gradiente 40 até 120°C à taxa de 40°C.min<sup>-1</sup>, seguido de um gradiente de 120 até 180 °C à taxa de 10°C/min e de 180 a 240°C à taxa de 120°C/min, mantendo-se a temperatura a 240°C por mais 3 min ao final. Para a quantificação dos analitos, uma calibração do método foi feita com diluições do padrão WSFA-2 (Ref. 47056, Supelco®) e de ácido acético glacial (Ref. 33209, Sigma-Aldrich®) analisadas sob as condições descritas acima. A determinação e a integração dos picos foram feitas utilizando o software GCsolution v. 2.42.00 (Shimadzu®).

A determinação das concentrações de ureia e glicose foram analisadas no plasma sanguíneo, enquanto as atividades de AST e GGT foram analisadas no soro sanguíneo,

utilizando *kits* comerciais (ureia PP, glicose PP, AST PP e GGT PP Gold Analisa®, Belo Horizonte, MG) e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Bioplus 2000®, São Paulo, SP).

### *Análise Estatística*

O delineamento experimental empregado foi o quadrado Latino replicado  $4 \times 4$ , com 4 tratamentos, 4 períodos experimentais e 8 animais. Os dados foram analisados utilizando o procedimento Mixed do SAS (versão 9.4). O modelo matemático utilizado foi o seguinte:  $Y_{ijkl} = \mu + Q_i + V(Q)_{ij} + P_k + T_l + e_{ijkl}$ , em que  $\mu$  = média geral;  $Q_i$  = efeito de quadrado Latino ( $i = 1$  ou  $2$ );  $V(Q)_{ij}$  = efeito aleatório de vaca aninhada em quadrado Latino ( $j = 1$  a  $8$ );  $P_k$  = efeito de período ( $k = 1$  a  $4$ );  $T_l$  = efeito de tratamento ( $l = 1$  a  $4$ );  $e_{ijkl}$  = resíduo. As médias foram comparadas por contrastes ortogonais pré-planejados: isopropanol vs. controle; isopropanol vs. etanol; isopropanol vs. etanol+isopropanol. As variáveis mensuradas várias vezes no mesmo período foram analisadas como medidas repetidas no tempo. O efeito de tempo e sua interação com tratamento foram adicionados ao modelo descrito acima, assim como o efeito de vaca dentro de tratamento que foi usado como termo de erro. As seguintes estruturas de covariância foram testadas: VC, CS, AR(1) e UN. Para cada variável, optou-se pela estrutura de covariância com menor valor para o critério de informação de Akaike corrigido (AICc).

## **RESULTADOS**

A adição de etanol e isopropanol na dieta de vacas em lactação não alterou o CMS, a produção de leite, a concentração de sólidos do leite e a eficiência alimentar (Tabela 3). O pH ruminal e as concentrações de ácidos graxos voláteis e amônia não foram alteradas com a adição de etanol e isopropanol na dieta (Tabela 4).



A suplementação com álcoois também não afetou a digestibilidade aparente no trato total. Entretanto, a adição de etanol e isopropanol na silagem aumentou ( $P < 0,05$ ) a concentração da enzima gama-glutamil transferase (GGT) no soro sanguíneo. Comparado ao tratamento controle, os álcoois tiveram suas concentrações aumentadas quando fornecidos de forma isolada, e quando fornecido de forma conjunta esses valores duplicaram em relação ao tratamento controle (Tabela 5). Não foi observado efeito significativo de tratamento sobre os demais parâmetros sanguíneos avaliados (glicose, ureia e AST).

Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações relativas de derivados de purinas na urina (Tabela 6). Também, a suplementação com álcoois não alterou a composição de ácidos graxos do leite (Tabela 7), nem a capacidade oxidativa do leite (Tabela 8). Entretanto, as concentrações de acetona e isopropanol no leite foram aumentadas pela presença de isopropanol na silagem, isoladamente ou em conjunto com o etanol. A suplementação conjunta de etanol e isopropanol também resultou em aumento da concentração de etanol no leite.

O teste qualitativo para presença de álcool no leite apresentou resultado positivo para todas as amostras de leite oriundas de vacas suplementadas com isopropanol (isoladamente ou combinado ao etanol), mas foi negativo para todas as amostras de leite das vacas suplementadas apenas com o etanol (Figura 1). A reatividade do teste de álcoois e acetona no leite, tiveram o resultado positivo para amostras com etanol, isopropanol e 2-butanol, enquanto o teste de fitas Milkscreen foi reativo somente ao etanol (Tabela 9).

## DISCUSSÃO

A silagem de milho é a principal forragem conservada utilizada em dietas de vacas leiteiras no Brasil e no mundo (Wilkinson e Toivonen, 2003; Bernardes e do Rêgo, 2014;

Ferraretto et al., 2018). Como alimento fermentado, a silagem de milho contém variedade de produtos de fermentação, incluindo álcoois (Morgan e Pereira, 1962). Dentre os álcoois presentes na silagem de milho está o isopropanol (Hafner et al., 2013; Kalac, 2011), mas, a literatura não contém informações sobre os possíveis efeitos do isopropanol no consumo voluntário de alimentos, sobre o metabolismo, o desempenho e a qualidade do leite de vacas leiteiras. Neste estudo, demonstra-se que o isopropanol não foi capaz de alterar o desempenho de vacas leiteiras em meio de lactação, mas foi excretado no leite e gerou resultados positivos ao teste qualitativo do álcool etílico em amostras de leite fluido. Apesar da adição teórica de 1,5% da MS da silagem de cada um dos álcoois testados, as concentrações observadas nas silagens tratadas ficaram entre 0,42 e 0,48% da MS para o etanol, e entre 0,39 e 0,42% da MS para o isopropanol. Isso indica que apenas 30% do etanol e 27% do isopropanol aspergido sobre a silagem foi recuperado na silagem no momento da alimentação, sendo o restante perdido por volatilização durante a aplicação e a homogeneização das silagens. Experimentos prévios também têm reportado perda significativa de compostos orgânicos voláteis quando aspergidos sobre os ingredientes da ração antes do fornecimento (Daniel et al., 2013; Gerlach et al., 2019). É válido notar que a perda de compostos aspergidos (suplementados) em silagens ou ingredientes da ração são muito mais altas do que a perda de compostos voláteis oriundos da própria fermentação (Robinson e Swanepoel, 2016).

A suplementação com etanol e isopropanol não alterou o CMS, nem a taxa de ingestão nas primeiras horas, após o primeiro fornecimento de ração (trato condicionado), apesar do odor pungente do isopropanol ao olfato humano. Experimentos prévios com a suplementação de álcoois em dietas de vacas leiteiras, tais como etanol (Frederiksen e Ochia, 1970; Randby et al., 1999; Raun e Kristensen, 2011; Daniel et al., 2013), 1-propanol (Raun e Kristensen, 2011; Raun e Kristensen, 2012; Silva et al., 2017) e 1,2-

propanodiol (Kristensen et al., 2002; Kristensen e Raun, 2007), também não demonstraram depressão no CMS ou em alguns casos houve até aumento no CMS para os tratamentos com suplementação de álcoois. No presente experimento, os níveis testados de álcoois semelhantes ao teor de isopropanol detectado nas silagens de milho (~0,4% da MS) oriundas das fazendas com amostras de leite positivas ao teste do álcool, mas é provável que os níveis suplementados de etanol e isopropanol foram baixos (<0,5% da MS que foi recuperado na alimentação) para causar alguma alteração no CMS. Provavelmente, esta também seja a justificativa para a ausência de efeitos na fermentação ruminal, na digestibilidade de nutrientes, nas concentrações de derivados de purinas na urina, na produção de leite, na composição de sólidos do leite, de ácidos graxos e do perfil oxidativo do leite.

Em vacas em lactação, a fermentação ruminal é um componente importante no metabolismo de álcoois (Orskov et Al., 1967; Pradhan e Hemken, 1970). Para o etanol, a digesta ruminal e o epitélio ruminal respondem por mais da metade do catabolismo, refletindo em redução da quantidade de etanol que chega ao fígado (Raun e Kristensen, 2011). Entretanto, para o isopropanol, espera-se que a maior parte da fração ingerida seja absorvida no rúmen, pois o rúmen é um ambiente reduzido e que o isopropanol é uma molécula com estado de oxidação reduzido. No fígado, ambos, etanol e isopropanol são metabolizados pela enzima álcool desidrogenase (Lieber e Abittan, 1999; Bruss e Lopes, 2000; Kristensen et al., 2007; Jones, 2015). O etanol é oxidado até acetaldeído e depois acetil-coA, que é utilizado pelo metabolismo celular (Lieber e Abittan, 1999). Por outro lado, o isopropanol é oxidado até acetona. A acetona atinge a circulação portal e é reciclada parcialmente para o fluido ruminal. No rúmen, a acetona é reduzida até isopropanol novamente. O isopropanol é absorvido, entra no fígado e é oxidado até acetona (Bruss e Lopes, 2000). O esqueleto de carbono de uma única molécula de

acetona/isopropanol pode completar este circuito várias vezes antes de ser excretada no leite, na urina, na expiração ou, em pequenas quantidades, convertido em glicose (Black et al., 1972). Neste sentido, a suplementação com etanol e isopropanol aumentou as concentrações da enzima GGT no soro sanguíneo ( $P < 0,03$ ) que é um indício de metabolismo hepático de álcoois (Anttila et al., 2003; Tennant, 2008; Sato, 2009). Notadamente, a atividade de GGT foi mais alta para o tratamento etanol + isopropanol ( $P < 0,05$ ) comparado aos tratamentos com álcoois isoladamente, sugerindo metabolismo de ambos os álcoois pela mesma rota nos hepatócitos. Apesar do aumento na atividade da GGT causado pela suplementação com álcoois, os valores se mostraram dentro da faixa normal para bovinos ( $< 17,0$  U/L) (Tennant, 2008).

A circulação de isopropanol e acetona no sague periférico resultou na excreção destes compostos no leite, e a concentração de etanol no leite foi ligeiramente aumentada quando o etanol foi suplementado juntamente com o isopropanol, indicando maior escape de etanol do metabolismo hepático na presença do isopropanol, pois no fígado, ambos, os álcoois, etanol e isopropanol são metabolizados pela mesma enzima álcool desidrogenase (Kristensen et al., 2007; Cederbaum et al., 2012). Enquanto isso, a concentração de etanol no leite não foi alterada pela suplementação isolada de etanol, indicando alta eficiência de metabolismo pelos animais ruminantes, incluindo o fluido ruminal, o epitélio ruminal e o fígado (Kristensen et al., 2007; Raun e Kristensen, 2009). Como consequência, todas as amostras de leite das vacas suplementadas apenas com etanol foram negativas ao teste qualitativo de álcool etílico no leite fluido. Ao contrário, a suplementação com isopropanol resultou em 100% de amostras positivas ao teste qualitativo de álcool etílico no leite fluido, estabelecido como teste oficial do MAPA. Apesar da descrição do teste incluir no título o termo “álcool etílico”, este teste não é exclusivo para detecção de álcool etílico. Não somente álcoois primários, mas também álcoois secundários como o

isopropanol são capazes de doar elétrons para redução do  $\text{Cr}^{6+}$  para  $\text{Cr}^{3+}$  em meio ácido, resultando em alteração de coloração da solução sulfocrômica de alaranjado para esverdeado, resultando, portanto, em teste positivo. Quando amostras de leite foram contaminadas com doses crescentes de etanol, isopropanol, 2-butanol e acetona, observou-se que o etanol, o isopropanol e o 2-butanol geram resultados positivos ao teste do álcool estabelecido oficialmente pelo MAPA. No caso do etanol, concentrações acima de 79  $\mu\text{g/mL}$  de leite foram necessárias para detecção no teste, para o isopropanol concentrações de apenas 23  $\mu\text{g/mL}$  de leite, levaram à resultados positivos, enquanto para o 2-butanol concentrações de 40  $\mu\text{g/mL}$  mostraram resultados positivos. Quando as amostras de leite contendo álcoois foi testada com fitas Milkscreen, apenas o etanol foi reativo, sugerindo que este método rápido pode ser utilizado para diferenciação de fraude, após resultado do teste qualitativo de álcool etílico estabelecido pelo MAPA, evitando assim a condenação indevida do leite pela ocorrência de falso-positivo.

## CONCLUSÃO

A suplementação com isopropanol e etanol não alterou o consumo de alimentos e o desempenho de vacas em lactação. Entretanto, a presença de isopropanol na silagem (mas não de etanol) resulta em amostras positivas ao teste qualitativo do álcool etílico no leite fluido. O teste qualitativo de álcool etílico em leite fluido não deve ser adotado como método exclusivo para detecção de fraude.

## REFERÊNCIAS

- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA.
- Andersson, L. 1984. Concentrations of blood and milk ketone bodies, blood isopropanol and plasma glucose in dairy cows in relation to the degree of hyperketonemia and clinical signs. *Zbl. Vet. Med. A.* 31:683–693. doi: 10.1111 / j.1439-0442.1984.tb01327.x.
- Anttila, P., J. Kimmo, J. Latvala, J. E. Blake, O. Niemela. 2003. new modified g-%CDT method improves the detection of problem drinking: studies in alcoholics with or without liver disease. *Clin. Chem.* 338:45–51.
- Black, A. L., J. R. Luick, S. L. Lee, and K. Knox. 1972. Glucogenic pathway for acetone metabolism in the lactating cow. *Am. J. Physiol.* 222:1575–1580.
- Bruss, M. L. and J. L. Lopez. 2000. Mixed ruminal microbes of cattle produce isopropanol in the presence of acetone but not 3-d-hydroxybutyrate. *J. Dairy Sci.* 83:2580–2584. doi: 10.3168 / jds.S0022-0302 (00) 75151-4.
- Bernardes, T. F., A. C. REGO. 2014. Study on the practices of silage production and utilization on Brazilian dairy farms. *J. Dairy Sci.* 97:1852-1861.
- Cederbaum, A. I. 2012. Alcohol metabolism. *Clin Liver Dis.* 16:667-685. doi: 10.1016 / j.cld.2012.08.002
- Chaney, A. L., and E. P. Marbach. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8:130-132. doi:10.1093/clinchem/8.2.130.
- Chen, X., Gomes, M. J. 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: an overview of the technical details. *Row. Res. Inst.*

- Daniel, J. L. P., R. C. Amaral, A. Sá Neto, E. H. Cabezas-Garcia, A. W. Bispo, M. Zopollatto, T. L. Cardoso, M. F. F. Spoto, F. A. P. Santos, L. G. Nussio, 2013a. Performance of dairy cows fed high levels of acetic acid or ethanol. *J. Dairy Sci.* 96:398–406. doi: 10.3168 / jds.2012-5451.
- Ferraretto, L. F., D. Shaver, and B. D. Luck. 2018. Silage review: Silage feeding management: Silage characteristics and dairy cow feeding behavior. *J. Dairy Sci.* 101(5):4111–4121. doi:10.3168/jds.2017-13729
- Frederinksen, J. H., B. A. Ochia. 1970. The effect of ethanol and acetic acid on milk yield and milk composition of cows given rations high in concentrates. *Acta Agric. Scan.* 20(1):17-24. doi: 10.1080/00015127009433197
- Gomes, A. L. M., F.A. Jacovaci, D.C. Bolson, L.G. Nussio, C.C. Jobim, J.L.P. Daniel. 2019. Effects of light wilting and heterolactic inoculant on the formation of volatile organic compounds, fermentative losses and aerobic stability of oat silage. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 247:194-198. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.11.016>
- Gerlach, K. K. Weib, K.H. Südekum. 2019. Effects of ethyl ester supplementation to forage on short-term dry matter intake and preference by goats. *Ani. Nutr.* 73:(2) 127-139. doi: 10.1080/1745039X.2019.1575656
- Hafner, S. D., C. Howard, R. E. Muck, R. B. Franco, F. Monte, P. G. Green, F. Mitloehner, S. L. Trabue, C. A. Rotz. 2013. Emission of volatile organic compounds from silage: Compounds, sources, and implications, atmospheric Environment. 77:827-839. doi: 10.1016 / j.atmosenv.2013.04.076
- Halfen, J. 2017. Avaliação do teste de redução do cromo no leite de vacas com cetose subclínica. Dissertação (Mestrado em nutrição animal: ênfase em metabolismo e qualidade do leite) - Universidade Federal De Pelotas, Pelotas- RS

- Huhtanen, P., K. Kaustell, and S. Jaakkola. 1994. The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48:211–227. doi:10.1016/0377-8401(94)90173-2.
- ISO – International Organization for Standardization. 1978. *Animal and Vegetable Fats and Oils – Preparation of Methyl Esters of Fatty Acids*. Geneva: ISO. Method ISO 5509, 1-6.
- ISO. International Organization for Standardization. 2006. Enumeration of somatic cells. Guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counters. Geneva: ISO. Method ISO 9622.
- ISO. International Organization for Standardization. 2013. *Milk and liquid milk products. Guidelines for the application of mid infrared spectrometry*. Geneva: ISO. Method ISO 13366-2.
- Jones, A. W., A. Holmgren. 2015. Occurrence of acetone concentrations > 0.10 g/L in post-mortem femoral blood and association with ethanol and isopropanol concentrations. *Tox. Anal. Clin.* 27:226-232. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxac.2015.10.003>
- Kalac P. 2011. The effects of silage feeding on some sensory and health attributes of cow's milk: A review. *Food Chemistry.* 125:307-317. doi: 10.1016 / j.foodchem.2010.08.077
- Kiokias, S. N., C. P. Dimakou. I. V. Tsaprouni. V. Oreopoulou. 2006. Effect of compositional factors against the thermal oxidative deterioration of novel food emulsions. *Food Bioph.* 3:155-123.
- Kristensen, N. B., A. Danfær, B. A. Røjen, B.-M. L. Raun, M. R. Weisbjerg, and T. Hvelplund. 2002. Metabolism of propionate and 1,2-propanediol absorbed from



- the washed reticulorumen of lactating cows. *J. Anim. Sci.* 80:2168–2175. doi: 10.2527 / 2002.8082168x
- Kristensen, N. B.; A. B. Storm, M. L. B. Raun, A. Røjen, D. L. Harmon. 2007. Metabolism of silage alcohols in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:1364–1377. doi: 10.3168 / jds.S0022-0302 (07) 71623-5.
- Kung Jr, L., J. W. Grieve, J. W. Thomas, J. T. Huber. 1984. Added ammonia or microbial inocula for fermentation and nitrogenous compounds of alfalfa ensiled at various percents of dry matter. *J. Dairy Sci.* 67:299-306.
- Lieber, C.S., C. S. Abittan.1999. Farmacologia e metabolismo do álcool, incluindo seus efeitos metabólicos e interações com outras drogas. *Clin. Derm.* 17(4):365–379. doi: 10.1016 / s0738-081x (99) 00020-6
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária.2018. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Instrução Normativa nº30, de 13 de setembro de 2018. Brasília, DF.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. 2019. Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal. 1:60-61.
- McDonald, P., A. R. Henderson, S. J. E. Heron. 1991. *The biochemistry of silage*. 2nd ed. Marlow (UK): Chalcombe Publications.
- Mertens, D. R. 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. *J. of AOAC Inter. Main.* 85:1217-1240.
- Morgan, M. E., L. R. Pereira.1962. Volatile constituents of grass and corn silage. I. Steam distillates. *J. Dairy Sci.*45:457-466.

- Murphy, J. J., J. F. Connolly, G. P. McNeill. 1995. Effects on milk fat composition and cow performance of feeding concentrates containing full fat rapessed and maize distillers grains on grass-silage based diets. *Live. Prod. Sci.* 44:1-11.
- NRC. 2001. *Nutrient Requirements of dairy cattle*. 7th ver. Ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- Orskov, E. R. R.; W. Hemken, L. A. Moore. 1967. Effect of ethanol infusion on milk fat content and composition and on volatile fatty acids in the rumen liquor. *J. Dairy Sci.* 50:692–695. doi: 10.3168 / jds.S0022-0302 (67) 87494-0.
- Parra, C. S., Bolson, D. C., Jacovaci, F. A. Nussio, L. G. Jobim, C. C. and Daniel, J. L. P. 2019. Influence of soybean-crop proportion on the conservation of maize-soybean bi-crop silage. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 257:114295. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114295>
- Pradhan, K., and R. W. Hemken. 1970. Utilization of ethanol and its effect on fatty acid patterns in ruminants. *J. Dairy Saci.* 4308:20742.
- Pryce, J. D. 1969. A modification of Barker-Summerson method for the determination of lactic acid. *Analyst.* 94:1151-1152. doi: 10.1039/an9699401151.
- Randby, A. T. 2007. Effect of propanol and dimethylsulphide in grass silage on organoleptic milk quality. *J. Anim. Feed Sci.* 16(1):102–107. DOI: <https://doi.org/10.22358/jafs/74122/2007>
- Raun, B. M. L., and N. B. Kristensen. 2009. Portal absorption of ethanol and propanol in early lactating dairy cows. In: *Inter. Symp. Rumi. Phys.* 11: 338-339. doi: 10.1080 / 09064709609415875
- Raun, B. M. L. and N. B. Kristensen. 2011. Metabolic effects of feeding ethanol or propanol to postpartum transition Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 94 :2566–2580. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3999>

- Raun, B. M. L. and N. B. Kristensen. 2012. Metabolic effects of feeding high doses of propanol and propylacetate to lactating Holstein cows. *Livest. Sci.* 144:37–47.
- Robertson, A. and C. Thin. 1953. A Study of Starvation Ketosis in the Ruminant. *Brit. J. Nutr.* 7 (1-2):181 – 195. doi: <https://doi.org/10.1079/BJN19530019>
- Robson, P. H., N. Swanepoel. 2016. Impacts of a polyethylene silage pile underlay plastic with or without enhanced oxygen barrier (EOB) characteristics on preservation of whole crop maize silage, as well as a short investigation of peripheral deterioration on exposed silage faces. *Anim. Feed. Sci.* 215:13-24. doi: 10.1016 / j.anifeedsci.2016.02.001
- Rufino, M. S. M., R. E. Alves, E. S. Brito, S. M. Morais, C. G. Sampaio, J. Pérez-Jiménez, F. D. Saura-Calixto. 2007. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS·+. Comunicado Técnico Embrapa 128. Junho, Fortaleza, CE.
- Salyer, S. W. 2007. Essential Emergency Medicine - Toxicology Emergencies. 17:923-1049.
- Sato H. 2009. Increased blood concentration of isopropanol in ketotic dairy cows and isopropanol production from acetone in the rumen. *J. Animal Sci.* 80:381–386. doi: 10.1111 / j.1740-0929.2009.00649.x.
- Silva, J., J. P. P. Winckler, M. H. O. Pasetti, P. A. R. Salvo, N. B. Kristensen, J. L. P. Daniel, L. G. Nussio. 2017. Effects of *Lactobacillus buchneri* inoculation or 1-propanol supplementation to corn silage on the performance of lactating Holstein cows. *R. Bras. Zootec.* 46:591-598. <https://doi.org/10.1590/s1806-92902017000700006>
- Tennant, B.C., S. A. Center. 2008. Hepatic Function. In: Kaneko, J. J., J. W. Harvey, M. L. Bruss. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6th ed. San Diego : Elsevier.

Vyncke, W. 1970. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. *Fette. Seif. Anstr.* 72:1084-1087.

Wilkinson, J. M., and M. I. Toivonen. 2003. *World silage: a survey of forage conservation around the world*. Marlow (UK): Chalcombe Publications.

## TABELAS

**Tabela 1.** Perfil de produtos de fermentação das silagens de milho suplementadas com etanol e isopropanol.

Item	Tratamentos <sup>1</sup>			
	C	E	I	E+I
pH	3,86 ± 0,09	3,87 ± 0,094	3,82 ± 0,085	3,86 ± 0,082
N-NH <sub>3</sub> , % N	5,86 ± 1,83	6,20 ± 3,22	6,87 ± 2,54	5,80 ± 0,78
Ácido láctico, % MS	3,03 ± 1,40	2,85 ± 1,89	2,97 ± 1,44	2,89 ± 1,29
Ácido acético, % MS	1,11 ± 0,45	1,19 ± 0,51	1,17 ± 0,37	1,18 ± 0,46
Ácido propiônico, % MS	0,194 ± 0,02	0,192 ± 0,06	0,200 ± 0,02	0,192 ± 0,03
2,3-Butanediol, % MS	0,177 ± 0,03	0,165 ± 0,08	0,162 ± 0,09	0,168 ± 0,03
Etanol, % MS	0,153 ± 0,04	0,480 ± 0,06	0,189 ± 0,23	0,416 ± 0,10
Isopropanol, % MS	0,010 ± 0,00	0,009 ± 0,01	0,392 ± 0,06	0,416 ± 0,11
1-Propanol, mg/kg MS	325 ± 378	285 ± 547	302 ± 355	362 ± 503
Ácido butírico, mg/kg MS	216 ± 229	257 ± 201	295 ± 238	254 ± 179
Ácido valérico, mg/kg MS	53,8 ± 0,32	36,7 ± 1,07	60,8 ± 2,68	46,2 ± 0,29
Lactato de etila, mg/kg MS	47,3 ± 26,26	48,6 ± 40,68	48,0 ± 27,32	50,9 ± 22,84
Metanol, mg/kg MS	42,8 ± 25,93	44,7 ± 36,11	41,1 ± 26,63	44,1 ± 21,38
Acetona, mg/kg MS	23,1 ± 5,38	32,8 ± 3,70	32,5 ± 15,25	34,9 ± 6,46
Acetato de etila, mg/kg MS	12,5 ± 4,97	17,2 ± 27,19	13,0 ± 11,96	19,5 ± 2,30
Ácido isobutírico, mg/kg MS	8,60 ± 12,46	4,50 ± 2,98	11,7 ± 14,43	8,00 ± 5,01
1,2-Propanodiol, mg/kg MS	3,40 ± 2,58	2,50 ± 0,81	2,30 ± 0,98	2,80 ± 0,74
Ácido isovalérico, mg/kg MS	1,80 ± 0,32	2,50 ± 1,07	3,30 ± 2,68	2,30 ± 0,29
2-Butanol, mg/kg MS	1,50 ± 0,49	2,20 ± 1,22	1,90 ± 0,11	2,80 ± 2,59

Acetato de propila, mg/kg MS 1,50 ± 0,41 1,40 ± 0,76 1,30 ± 0,13 1,50 ± 0,16

---

<sup>1</sup>C: controle, E: etanol, I: isopropanol, E+I: etanol + isopropanol.

**Tabela 2.** Composição nutricional das dietas experimentais.

Item	Tratamentos <sup>1</sup>			
	C	E	I	E+I
Matéria seca, % MV	42,7 ± 0,94	42,7 ± 0,89	42,4 ± 0,93	42,2 ± 0,95
Cinzas, % MS	5,93 ± 0,45	5,68 ± 0,33	5,70 ± 0,29	5,99 ± 0,52
Proteína bruta, % MS	15,5 ± 0,15	15,3 ± 0,37	15,5 ± 0,18	15,5 ± 0,25
Fibra em detergente neutro, % MS	36,1 ± 0,63	36,5 ± 2,53	36,0 ± 0,29	36,1 ± 0,90
Extrato etéreo, % MS	4,61 ± 0,24	4,59 ± 0,22	4,53 ± 0,29	4,63 ± 0,42
CNF <sup>2</sup> , % MS	37,9 ± 1,28	37,9 ± 1,55	38,3 ± 1,87	37,8 ± 0,76

<sup>1</sup>C: controle, E: etanol, I: isopropanol, E+I: etanol + isopropanol.

<sup>2</sup>Carboidratos não fibrosos.

**Tabela 3.** Desempenho de vacas leiteiras suplementadas com etanol e isopropanol.

Item	Tratamento <sup>1</sup>				EPM	P-Contraste		
	C	E	I	E + I		I vs.	I vs.	I vs.
						C	E	I+E
CMS, kg/d	16,3	16,3	16,2	16,3	0,99	0,90	0,92	0,89
CMS durante 3 h após 1° trato, kg MS/3 h	6,62	6,34	6,43	6,43	0,413	0,70	0,84	0,99
Tempo de ingestão durante 3 h após 1° trato, min/3 h	76,9	77,2	76,5	76,3	6,29	1,00	0,93	0,98
Taxa de ingestão, g MS/min	80,0	84,9	86,3	87,3	6,42	0,50	0,89	0,91
Leite, kg/d	17,2	17,3	17,3	17,6	0,69	0,90	0,93	0,56
LCE, kg/d	17,3	17,0	17,1	17,7	1,42	0,80	0,93	0,54
Gordura, %	3,73	3,71	3,74	3,69	0,160	0,90	0,85	0,74
Gordura, kg/d	0,638	0,632	0,625	0,650	0,0340	0,70	0,82	0,41
Proteína, %	3,30	3,29	3,29	3,30	0,130	0,80	0,98	0,71
Proteína, kg/d	0,560	0,558	0,543	0,569	0,0210	0,50	0,59	0,31
Caseína, %	2,65	2,63	2,61	2,64	0,11	0,20	0,55	0,31
Lactose, %	4,61	4,64	4,64	4,63	0,043	0,54	0,95	0,76
NUL, mg/dL	13,5	12,9	12,9	12,2	1,39	0,60	0,99	0,61
CCS, ×1000/mL	181	221	192	214	-	-	-	-
Log CCS	2,08	2,18	2,11	2,09	0,216	0,80	0,65	0,88
Leite/CMS	1,07	1,08	1,03	1,09	0,094	0,48	0,41	0,31
LCE/CMS	1,08	1,08	1,04	1,09	0,088	0,44	0,45	0,32

<sup>1</sup>C: Controle; E: Etanol; I: Isopropanol; E+I: Etanol + Isopropanol.



**Tabela 4.** Concentrações de ácidos graxos voláteis (AGV), amônia e pH ruminal em vacas leiteiras suplementadas com etanol e isopropanol.

Parâmetro	Tratamento <sup>1</sup>				EPM	P-valor		P-Contraste			
	C	E	I	E+I		Trat	Tempo	Trat × Tempo	I vs C	I vs E	I vs E+I
Acetato, mM	46,2	44,1	47,3	46,7	4,22	0,95	<0,01	0,68	0,86	0,59	0,92
Propionato, mM	28,1	25,9	25,4	25,8	2,53	0,88	<0,01	0,93	0,46	0,88	0,91
Isobutirato, mM	0,905	0,855	0,779	0,944	0,0848	0,55	0,02	0,42	0,30	0,52	0,17
Butirato, mM	9,71	8,55	10,33	10,86	0,829	0,24	<0,01	0,22	0,60	0,14	0,65
Isovalerato, mM	1,60	1,88	1,44	2,00	0,252	0,33	0,17	0,45	0,65	0,19	0,10
Valerato, mM	2,04	1,95	1,88	2,50	0,316	0,52	<0,01	0,42	0,73	0,87	0,17
Caproato, mM	1,60	1,30	1,44	1,14	0,306	0,74	<0,01	0,73	0,71	0,74	0,49
AGV total, mM	90,2	84,5	88,5	89,9	6,68	0,93	<0,01	0,72	0,86	0,68	0,88
Acetato/Propionato	1,79	1,83	1,93	1,87	0,129	0,87	<0,01	0,85	0,42	0,56	0,72
Amônia, mg/dL	17,5	18,6	18,8	18,7	1,62	0,93	<0,01	0,99	0,57	0,94	0,98
pH	6,85	6,90	6,94	6,95	0,076	0,79	<0,01	0,43	0,43	0,72	0,89

<sup>1</sup>C: controle; E: etanol; I: isopropanol; E+I: etanol + isopropanol.

**Tabela 5.** Digestibilidade aparente no trato total e parâmetros sanguíneos de vacas leiteiras suplementadas com etanol e isopropanol.

%	Tratamento <sup>1</sup>				EPM	P-Contraste		
	C	E	I	E+I		I vs.	I vs.	I vs.
						C	E	I+E
<i>Digestibilidade<sup>2</sup></i>								
MS	66,0	66,3	66,7	66,3	0,82	0,44	0,70	0,71
MO	68,0	68,1	68,2	68,4	0,72	0,84	0,92	0,82
FDN	51,6	49,3	49,6	49,4	1,84	0,44	0,93	0,96
CNF	88,6	88,0	89,1	87,6	1,29	0,57	0,82	0,42
PB	72,2	72,6	71,8	71,2	1,22	0,71	0,46	0,59
EE	90,2	91,4	90	89,6	1,23	0,91	0,32	0,76
NDT	70,0	70,7	70,2	70,3	0,74	0,76	0,67	0,91
<i>Parâmetros sanguíneos</i>								
<i>1h30min após a alimentação matutina</i>								
Glicose, mg/dL	55,0	54,6	52,5	53,8	2,34	0,46	0,54	0,70
Ureia, mg/dL	37,3	34,5	35,4	35,5	5,22	0,61	0,81	0,99
<i>4h após a alimentação matutina</i>								
Glicose, mg/dL	54,9	54,7	53,7	53,1	2,91	0,75	0,80	0,88
Ureia, mg/dL	29,2	24,2	28	25,2	5,06	0,66	0,20	0,31
AST <sup>3</sup> , U/L	54,0	57,8	57,8	61,8	6,81	0,57	0,99	0,55
GGT <sup>4</sup> , U/L	4,96	6,34	6,78	8,36	0,998	0,03	0,57	0,05

<sup>1</sup>C : controle; E: etanol; I: isopropanol; E+I: etanol mais isopropanol.

<sup>2</sup>MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; FDN: fibra em detergente neutro; CNF: carboidratos não fibrosos; PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo; NDT: nutrientes digestíveis totais.

<sup>3</sup>AST: aspartato amino transferase.

<sup>4</sup>GGT: gama-glutamil transferase.

**Tabela 6.** Derivados de purinas na urina de vacas leiteiras suplementados com etanol e Isopropanol.

Variável	Tratamento <sup>1</sup>				EPM	P-Contrast		
	C	E	I	E+I		I vs	I vs	I vs
						C	E	E+I
Alantoina/Creatinina	1,26	1,24	1,10	1,36	0,199	0,54	0,61	0,34
Ácido Úrico/Creatinina	0,885	0,787	0,820	0,866	0,107	0,65	0,85	0,75
(Alantoina+Ac Úrico)/Creatinina	2,08	1,96	1,91	2,04	0,138	0,41	0,82	0,52

<sup>1</sup>C : controle; E: etanol; I: isopropanol; E+I: etanol + isopropanol.

**Tabela 7.** Ácidos graxos do leite (g/100 g de lipídios totais) de vacas leiteiras suplementadas com etanol e isopropanol.

Item	Tratamento <sup>1</sup>				EPM	P-Contrast		
	C	E	I	E+I		I vs.	I vs.	I vs.
						C	E	E+I
6:0	0,444	0,422	0,355	0,427	0,0510	0,14	0,28	0,23
8:0	0,829	0,819	0,711	0,829	0,0868	0,22	0,29	0,22
10:0	3,01	2,84	2,78	3,19	0,339	0,49	0,86	0,22
11:0	0,204	0,191	0,224	0,228	0,0273	0,52	0,30	0,89
12:0	4,38	3,93	4,20	4,48	0,378	0,67	0,53	0,51
13:0	0,303	0,295	0,321	0,330	0,0275	0,63	0,50	0,80
14:0	15,5	14,0	15,1	15,9	0,72	0,64	0,22	0,35
14:1	1,00	1,00	1,00	1,00	0,07	0,43	0,89	0,79
15:0	2,03	2,00	2,09	2,11	0,148	0,72	0,59	0,94
15:1	0,118	0,100	0,105	0,109	0,0120	0,30	0,75	0,72
16:0	36,9	37,2	37,9	36,9	0,80	0,34	0,49	0,34
16:1	1,50	1,46	1,43	1,38	0,157	0,74	0,87	0,80
17:0	0,769	0,775	0,808	0,755	0,0369	0,46	0,54	0,31
17:1	0,162	0,162	0,168	0,155	0,0170	0,81	0,83	0,60
18:0	10,7	11,5	10,5	10,2	0,73	0,82	0,29	0,74
18:1 n9t	5,11	4,95	4,56	4,88	0,411	0,17	0,35	0,42
18:1 n9c	15,0	16,6	15,2	14,3	1,05	0,87	0,26	0,46
18:2 n6t	0,252	0,245	0,231	0,216	0,0243	0,28	0,49	0,45
18:2 n6c	1,26	1,39	1,27	1,20	0,101	0,90	0,41	0,59
18:3 n6	0,011	0,015	0,014	0,014	0,0060	0,75	0,90	0,97

18:3 n3	0,021	0,020	0,028	0,021	0,0110	0,53	0,48	0,49
18:2 c9 t11 – CLA	0,130	0,178	0,133	0,121	0,0597	0,97	0,62	0,88
20:0	0,124	0,135	0,137	0,128	0,0113	0,42	0,90	0,55
20:1	0,0211	0,0149	0,0213	0,0134	0,00789	0,99	0,59	0,49
20:2	0,0135	0,0029	0,0101	0,0188	0,00699	0,74	0,49	0,40
20:3 n6	0,0106	0,0058	0,0108	0,0019	0,00497	0,98	0,43	0,15
21:0	0,1215	0,1260	0,1273	0,0961	0,04512	0,93	0,99	0,63
22:0	0,0021	0,0023	0,0019	0,0038	0,00269	0,94	0,91	0,59
AG cadeia curta <sup>2</sup>	4,28	4,07	3,85	4,45	0,454	0,32	0,61	0,17
AG cadeia média <sup>3</sup>	62,00	59,90	62,30	62,50	1,390	0,87	0,23	0,93
AG cadeia longa <sup>4</sup>	33,7	36,1	33,2	32,1	1,41	0,77	0,10	0,51
AG saturados	75,3	74,1	75,2	75,6	1,82	0,95	0,65	0,86
AG mono insaturados	22,9	24,3	22,4	21,8	1,43	0,73	0,20	0,64
AG poli-insaturados	1,70	1,86	1,70	1,60	0,149	0,98	0,44	0,60
AG n-3	0,021	0,020	0,028	0,021	0,0112	0,53	0,48	0,49
AG n-6	1,53	1,65	1,53	1,44	0,107	0,99	0,42	0,52

<sup>1</sup>C: controle etanol; I: isopropanol; E+I: etanol mais isopropanol.

<sup>2</sup>AG cadeia curta (6:0 a 10:0);

<sup>3</sup>AG cadeia média (11:0 a 16:1);

<sup>4</sup>AG cadeia longa (17:0 a 22:0).

**Tabela 8.** Perfil oxidativo e concentração de acetona e álcoois no leite de vacas suplementadas com etanol e isopropanol.

Item	Tratamento <sup>1</sup>				EPM	P-Contraste		
	C	E	I	E+I		I vs. C	I vs. E	I vs. E+I
<i>Perfil oxidativo<sup>2</sup></i>								
ABTS ( $\mu\text{M}$ Trolox/mL)	153	154	160	152	7,6	0,42	0,48	0,35
DPPH (%)	9,65	9,04	9,44	9,32	0,271	0,59	0,33	0,76
DC (mmol/kg gordura)	0,431	0,447	0,464	0,424	0,0421	0,53	0,76	0,44
TBARS (mg MDA/L)	1,44	1,50	1,65	1,38	0,177	0,24	0,35	0,10
<i>Acetona e álcoois no leite</i>								
Acetona, $\mu\text{g/mL}$	21,9	20,7	97,9	105,0	3,51	<0,01	<0,01	0,24
Isopropanol, $\mu\text{g/mL}$	4,61	4,63	94,1	98,3	3,99	<0,01	<0,01	0,48
Etanol, $\mu\text{g/mL}$	1,32	2,00	1,09	3,65	0,510	0,73	0,19	<0,01
2-Butanol, $\mu\text{g/mL}$	0,085	0,094	0,093	0,088	0,0044	0,71	0,34	0,37

<sup>1</sup>C: controle; E: etanol; I: isopropanol; E+I: etanol mais isopropanol.

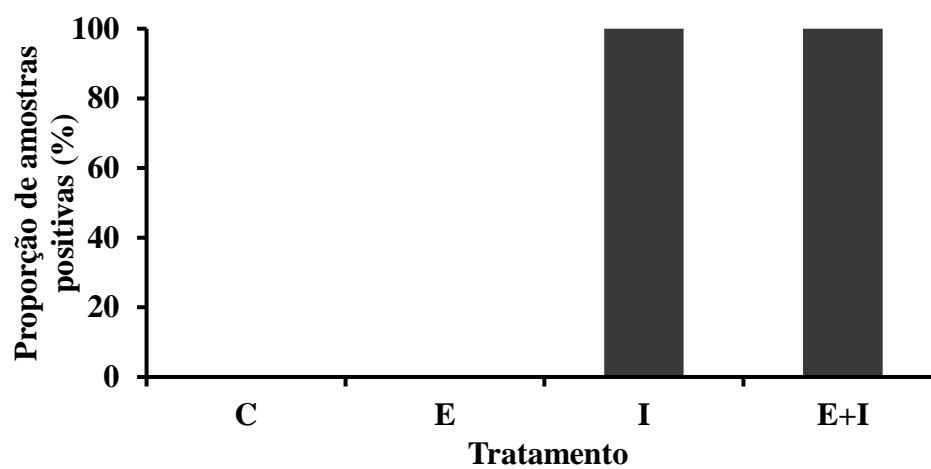
<sup>2</sup>ABTS: 2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico; DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazil; DC hidroperóxidos dienos conjugado; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

**Tabela 9.** Reatividade do teste do álcool estabelecido oficialmente pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e de fitas Milkscreen ao etanol, isopropanol, 2-butanol e acetona.

Item	Resultado
<i>Composto</i>	<i>Teste do álcool – Oficial MAPA</i>
Etanol	Reativo em concentração >79 µg/mL
Isopropanol	Reativo em concentração >24 µg/mL
2-Butanol	Reativo em concentração >40 µg/mL
Acetona	Não reage
<i>Composto</i>	<i>Fitas Milkscreen</i>
Etanol	Reativo em concentração >118 µg/mL
Isopropanol	Não reage
2-Butanol	Não reage
Acetona	Não reage



## FIGURA



**Figura 1.** Teste qualitativo do álcool etílico no leite de vacas suplementadas com etanol e isopropanol. C: controle; E: etanol; I: isopropanol; E+I: etanol + isopropanol. Teste chi-quadrado,  $\chi^2 < 0,01$  para efeito de tratamento.